

ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ім. М. І. ПИРОГОВА МОЗ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

БОБР АННА МИКОЛАЇВНА

УДК 61:612.1:615.9.616.1:616-099

ДИСЕРТАЦІЯ
ЗМІНИ ГІСТОАРХІТЕКТОНІКИ І БІОХІМІЧНИХ ПАРАМЕТРІВ
МІОКАРДУ ТА СЕЛЕЗІНКИ ЩУРІВ ПРИ ВПЛИВІ ОТРУТИ ГАДЮК
ВИДУ VIPERA BERUS

222 – Медицина
22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії.

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

_____ А. М. Бобр

Наукові керівники:

Гунас Ігор Валерійович, доктор медичних наук, професор;
Маєвський Олександр Євгенійович, доктор медичних наук,
професор.

Вінниця – 2025

АНОТАЦІЯ

Бобр А. М. Зміни гістоархітекτονіки і біохімічних параметрів міокарду та селезінки щурів при впливі отрути гадюк виду *Vipera berus* – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 222 «Медицина». – Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова, Вінниця, 2025.

У дисертаційній роботі подано теоретичне узагальнення та нове вирішення науково-практичного завдання щодо визначення особливостей морфологічних та біохімічних параметрів структури серця і селезінки щурів при впливі отрути гадюк виду *Vipera berus*.

Дисертаційне дослідження здійснене відповідно до планів наукових досліджень Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова.

Експеримент проведено на 50 білих безпородних щурах-самцях, що отримані з віварію Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Протягом дослідження експериментальних тварин розподіляли на групу контролю та дві групи досліду: щурі, яким внутрішньоочеревинно вводили отруту гадюки *Vipera berus berus* у відповідній дозі LD₅₀, та щурі, яким внутрішньоочеревинно вводили отруту гадюки *Vipera berus nikolskii* у відповідній дозі LD₅₀.

Для гістологічного дослідження забирали шматочки серця та селезінки у попередньо зважених тварин всіх груп та вивчали за допомогою методів світлової мікроскопії. Гомогенати серця та селезінки, а також зразки крові експериментальних щурів використовували для проведення біохімічних і лабораторних досліджень.

При світловій мікроскопії серця та селезінки щурів контрольної групи встановлено, що епікард інтактних тварин утворений сполучнотканинною пластинкою, вкритою шаром мезотелію, в якій відмічали наявність колагенових та, меншою мірою, еластичних волокон. Міокард побудований з

серцевої м'язової тканини та елементів сполучної тканини. М'язові волокна мають поздовжню спрямованість розміщення в міокарді, скоротливі кардіоміоцити видовженої прямокутної форми, з'єднуються між собою за допомогою вставних дисків. Виявляються також клітини волокон Пуркінє, які є значно більшими, ніж скоротливі кардіоміоцити. Ендокард побудований з чотирьох шарів, має класичну, не змінену будову. Селезінка вкрита сполучнотканинною капсулою, від якої відходять трабекули в паренхіму, яка представлена білою та червоною пульпою. В білій пульпі селезінки виявляли лімфоїдні вузлики переважно округлої чи дещо витягнутої форми, які представлені гермінативним центром, периартеріальною та крайовою зонами. В гермінативних центрах виявляли В-лімфоцити, макрофаги, периартеріальні зони представлені переважно Т-лімфоцитами і макрофагами, в крайовій або маргінальній зоні наявні лімфоцити, макрофаги та дендритні клітини, плазмоцити. Червона пульпа представлена тяжами та венозними синусами, де спостерігаються чисельні еритроцити, а також лімфоцити, макрофаги, плазматичні клітини, моноцити.

Гістологічні дослідження серця щурів на тлі дії отрути *V. berus berus* показали, що крім колагенових волокон, що типово формують каркас епікарду, відмічається підвищення вмісту молодих волокон, на їх фоні шар мезотелію майже не візуалізується. В міокарді м'язові волокна набряклі, втрачають характерну поздовжню орієнтацію, набувають звивистої форми; відмічаються зони руйнування сарколеми, а поперечна посмугованість волокон міокарда не чітко виражена. Також визначаються зони деструкції скоротливих елементів, фрагментація волокон, між якими значно зростає об'єм пухкої сполучної тканини; скоротливі кардіоміоцити втрачають звичну прямокутну форму. Спостерігаються зони згладжування та лізису м'язових волокон, вогнища некрозу. Гістіолейкоцитарна інфільтрація міокарда за гострої інтоксикації отрутою гадюк *Vipera berus berus* помірно виражена, проте відзначається значне розростання колагенових волокон в тканині міокарда, активація фібробластів. Кровоносні судини міокарду також

підлягали структурним перебудовам: стінки артерій значно потовщуються, спостерігається десквамація ендотеліального вистилення судинної стінки від компонентів базальної мембрани. Судини повнокровні, з явищами складжу, адгезією еритроцитів до епітеліального вистилення інтими. В просвітах вен спостерігається наявність геморагічного, серозного вмісту, поодиноких формених елементів крові. Відзначаються зони масивних крововиливів, подекуди геморагії мали дифузний характер з просякненням тканини серцевого м'яза. В ендокарді виявляється набряк ендотеліоцитів, ділянки відшарування ендотеліального вистилення від підендотеліального шару.

Мікроскопічні дослідження селезінки щурів при впливі отрути *V. berus berus* показали, що відбувається дезорганізація структури білої пульпи: лімфоїдні вузлики нечітких контурів, крайова зона майже не піддається диференціації; візуалізуються збільшені гермінативні центри із значною кількістю лімфобластів; зрілих В-лімфоцитів в реактивних центрах лімфоїдних вузликів значно менше, ніж лімфобластів; в періартеріальних зонах наявні помірної кількості Т-лімфоцити і макрофаги. В червоній пульпі виявляються чисельні еритроцити, тромбоцити, лімфоцити, плазматичні клітини та макрофаги. В окремих ділянках спостерігаються вогнища деструкції тканини селезінки та геморагії; відмічаються ділянки апоптозу лімфоцитів.

Гістологічні дослідження серця тварин при впливі отрути *V. berus nikolskii* встановили, що подекуди відмічаються ділянки десквамації мезотелію епікарду; кровоносні судини деформовані, спостерігаються руйнування їх стінок. Просвіти цих судин заповнені геморагічним вмістом, з чисельними скупченнями еритроцитів. Виявлено деструктивні зміни міокарду, ступінь вираженості яких значно вищий, ніж при впливі отрути *Vipera berus berus*. Відмічається хаотичне розміщення м'язових волокон, їх фрагментація, потовщення, набряклість, а також звивистість. Спостерігаються вогнища некрозу та міоцитолізу з деструкцією, розшарованням, зонами повного руйнування сарколеми волокон міокарду. Відмічається масивна

гістіолейкоцитарна інфільтрація міокарду, в міжміофібрилярних проміжках спостерігаються активовані фібробласти з формуванням колагенових волокон; кровоносні судини повнокровними. В просвітах артерій виявляються складжі та адгезія еритроцитів; спостерігається периваскулярний набряк та виражена периваскулярна лейкоцитарна інфільтрація, велика кількість зон геморагій. Спостерігається лейкоцитарна інфільтрація навколо провідних клітин, екстрацелюлярний набряк. Ендотеліоцити ендокарду мають дещо витягнуту форму та не щільно фіксуються до базальної мембрани, відмічається розпушеність ендотеліального вистилення та зони його відшарування; також спостерігається значна лейкоцитарна інфільтрація.

Мікроскопічні дослідження селезінки тварин на тлі дії отрути *V. berus nikolskii* встановили, що в білій пульпі органу відмічаються чисельні лімфоїдні вузлики, переважна більшість яких має нечіткі межі внаслідок зменшення кількості лімфоцитів в крайовій зоні; в гермінативних центрах лімфоїдних вузликів виявляються клітини з фігурами мітозів, а також зростання чисельності лімфобластів; в периартеріальних лімфоїдних зонах спостерігається наявність Т-лімфоцитів та макрофагів. В червоній пульпі селезінки, в порівнянні зі щурами, яким вводили отруту гадюк *Vipera berus berus*, значно підвищувалась кількість лімфоцитів, макрофагів, плазмоцитів. Еритроцити червоної пульпи розміщуються у венозних синусах, в той час як основну масу червоної пульпи займають лімфоцити та макрофаги. В червоній пульпі виявляються вогнища геморагій, порушення міжклітинних комунікацій в ендотеліальному шарі судин. В трабекулах селезінки відмічається набряк гладком'язових клітин, навколо трабекулярних судин - лімфоцитарна інфільтрація.

Результати якісного та кількісного аналізу загального протеїна, дослідження протеолітичної активності та вмісту молекул середньої маси свідчать про зниження рівня протеїна в обох органах, селезінка відчувала більш виражений вплив, ніж серце. Вплив отрути *V. berus nikolskii* на організми значно більший, ніж у *V. berus berus*, що може свідчити про відмінності

у складі отрут. Відзначено перерозподіл протеїнових молекул, про що свідчить зменшення їх молекулярної маси. Вплив отруту *V. berus* на органи-мішені та організм в цілому призводить до синтезу активних фібриногенолітичних ферментів, утворенням деградованих або аномальних молекул зі зміненою субстратною специфічністю. Перерозподілу зазнають і протеолітичні молекули, що виявляють більш специфічну колагенолітичну активність, що свідчить про прямий вплив отрути *V. berus* на патологічне посилення протеолітичних процесів, та завершується активацією специфічних колагенолітичних ферментів. Все це вказує на суттєві зміни протеїнового балансу, зниження рівня загального протеїна та зсув ферментативного профілю, а отже - про потенційні механізми, за допомогою яких отрути гадюк видів *V. berus* можуть впливати на цільові органи. Крім того, вплив на ці органи може призводити до внутрішньої інтоксикації, яка пов'язана з появою низькомолекулярних молекул.

Таким чином, проведенні дослідження серця та селезінки тварин контрольної групи показали, що дані органи мають типову будову, яка характерна для даного виду тварин.

За умов впливу отрути *V. berus berus* мікроскопічно спостерігаються патологічні зрушення структурної організації всіх шарів стінки серця. В епікарді відбувається збільшення об'єму колагенових волокон, потовщення стінок судин; в міокарді - набряк, дезорганізація м'язових волокон, їх фрагментація, лізис, деструкція, втрата характерної поперечної посмугованості, некроз. Крім того, виявлено зростання чисельності фібробластів, їх активація та, як результат, розростання в тканині міокарду компонентів сполучної тканини, в тому числі колагенових волокон. Ендокард відрізнявся десквамацією ендотеліального вистелення та збільшенням кількості активних фібробластів в зовнішньому сполучнотканинному шарі. Гостра інтоксикація отрутою гадюк *Vipera berus berus* асоціювалась з дезорганізацією білої пульпи селезінки: втрата чіткості та впорядкованості розміщення її структурних елементів, погана візуалізація крайової зони

лімфоїдних вузликів; в гермінативних центрах - зростання чисельності лімфобластів. В червоній пульпі органу відмічаються ділянки деструкції тканини селезінки, геморагії; наявність вогнищ апоптозу лімфоцитів, потовщення трабекул, стази і складжі еритроцитів в просвітах трабекулярних вен.

За умов впливу отрути *V. berus nikolskii* встановлено деструкцію стінок судин серця, набряк їх внутрішньої та середньої оболонок. Для міокарду характерним є значно вищий ступінь морфологічних змін, в порівнянні зі щурами, яким вводили отруту гадюк *Vipera berus berus*: хаотичне розміщення та фрагментація волокон серцевого м'язу, втрата ними поперечної посмугованості, наявність вогнищ некрозу та міоцитолізу. Виявляється виражена гістіолейкоцитарна інфільтрація, зростання чисельності фібробластів; кровоносні судини міокарда зазнають деформації, стінки їх набряклі; зростає проникність стінок судин та, як результат, спостерігається поява геморагій. В білій пульпі селезінки відмічається зростання чисельності лімфоїдних вузликів з великою кількістю лімфобластів, клітин з фігурами мітозів. В периартеріальних зонах виявляється збільшення Т-лімфоцитів, розширення просвітів центральних артерій, потовщення їх стінок, розпушення та дезорганізація ендотеліального вистелення внутрішньої оболонки. В червоній пульпі значно підвищується кількість лімфоцитів, макрофагів, плазмоцитів; спостерігаються ділянки апоптозу лімфоцитів, піністі макрофаги, вогнища геморагій, лімфоцитарна інфільтрація трабекулярних судин, розширення просвітів вен, їх виражене повнокрів'я, складжі еритроцитів.

Потенційний вплив зміїних отрут *Vipera berus* на стан протеїнового метаболізму свідчить про патологічну активацію протеолітичних шляхів у селезінці та серці під дією отрут, а отже, зміни білкового та ферментативного профілів призводять до змін в біохімічних ланцюгах. Утворення молекул з низькою молекулярною масою також є ознакою патологічних змін в органах-мішенях, оскільки наявність таких молекул значною мірою корелює з початком процесів внутрішньої інтоксикації.

Ключові слова: серце, селезінка, отрута змій, металопротеїнази, протеїновий профіль, некроз, крововилив.

ANNOTATION

Bobr A. M. Changes in histoarchitectonics and biochemical parameters of the myocardium and spleen of rats under the influence of the venom of the *Vipera berus* species – Qualification scientific work in the form of a manuscript.

Dissertation for the Doctor of Philosophy degree in knowledge 22 “Health Care” in the speciality 222 “Medicine”. – National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya, 2025.

The dissertation presents a theoretical generalisation and a new solution to the scientific and practical task of determining the features of the morphological and biochemical parameters of the structure of the heart and spleen of rats under the influence of the venom of the *Vipera berus* species.

The scientific research plans of National Pirogov Memorial Medical University carried out the dissertation research.

The experiment was conducted on 50 white male outbred rats obtained from the vivarium of the Taras Shevchenko National University of Kyiv. During the study, the experimental animals were divided into a control group and two experimental groups: rats that were intraperitoneally injected with the venom of the viper *Vipera berus berus* at the appropriate LD₅₀ dose and rats that were intraperitoneally injected with the venom of the viper *Vipera berus nikolskii* at the appropriate LD₅₀ dose.

For histological examination, pieces of the heart and spleen were taken from previously weighed animals of all groups and studied using light microscopy methods. Homogenates of the heart and spleen and blood samples of experimental rats were used for biochemical and laboratory studies.

Light microscopy of the heart and spleen of rats in the control group revealed that the epicardium of intact animals is formed by a connective tissue plate covered with a layer of the mesothelium, in which the presence of collagen and, to a lesser

extent, elastic fibres was noted. The myocardium is built of cardiac muscle tissue and connective tissue elements. Muscle fibres have a longitudinal orientation of placement in the myocardium, and contractile cardiomyocytes of an elongated rectangular shape are connected using intercalated discs. Purkinje fibre cells are also detected to be significantly larger than contractile cardiomyocytes. The endocardium has four layers and a classic, unchanged structure. The spleen is covered with a connective tissue capsule, from which trabeculae extend into the parenchyma, which is represented by white and red pulp. In the white pulp of the spleen, lymphoid nodules of predominantly rounded or slightly elongated shape were found, which are represented by the germinal centre, periarterial and marginal zones. In the germinal centres, B lymphocyte macrophages were found, the periarterial zones were represented mainly by T lymphocytes and macrophages; in the marginal or marginal zone, there are lymphocytes, macrophages and, dendritic cells, plasma cells. The red pulp is represented by cords and venous sinuses, where numerous erythrocytes and lymphocytes, macrophages, plasma cells, and monocytes are observed.

Histological studies of rat hearts under the influence of *V. berus berus* venom showed that in addition to collagen fibres, which typically form the epicardium framework, an increase in the content of young fibres is noted; against their background, the mesothelium layer is almost not visualised. In the myocardium, muscle fibres are swollen, lose their characteristic longitudinal orientation, and acquire a sinuous shape; zones of the destruction of the sarcolemma are noted, and the transverse striation of myocardial fibres is not clearly expressed. Zones of destruction of contractile elements and fragmentation of fibres, between which the volume of loose connective tissue significantly increases, are also determined; contractile cardiomyocytes lose their usual rectangular shape. Zones of smoothing and lysis of muscle fibres and foci of necrosis are observed. Histioleukocyte infiltration of the myocardium in acute intoxication with the venom of the *Vipera berus berus* is moderately pronounced. However, significant proliferation of collagen fibres in the myocardial tissue and activation of fibroblasts are noted. The

blood vessels of the myocardium also underwent structural changes: the walls of the arteries are significantly thickened, and desquamation of the endothelial lining of the vascular wall from the components of the basement membrane is observed. The vessels are full-blooded, with sludge phenomena and adhesion of erythrocytes to the epithelial lining of the intima. In the lumens of the veins, the presence of hemorrhagic, serous content, and single-formed blood elements is observed. Areas of massive haemorrhages are noted; in some places, the haemorrhages were diffuse with the penetration of the heart muscle tissue. In the endocardium, oedema of endothelial cells is detected, and areas of the detachment of the endothelial lining from the subendothelial layer are found.

Microscopic studies of the spleen of rats exposed to *V. berus berus* venom showed that the white pulp structure is disorganised: lymphoid nodules have indistinct contours, the marginal zone is almost not differentiated; enlarged germinative centers with a significant number of lymphoblasts are visualised; mature B-lymphocytes in the reactive centres of lymphoid nodules are significantly less than lymphoblasts; in the periarterial zones, there are a moderate number of T-lymphocytes and macrophages. Numerous erythrocytes, platelets, lymphocytes, plasma cells and macrophages are found in the red pulp. In some areas, foci of the destruction of the spleen tissue and haemorrhage are observed; areas of lymphocyte apoptosis are noted.

Histological studies of the hearts of animals exposed to *V. berus nikolskii* venom have established that in some places, there are areas of desquamation of the epicardium mesothelium; Blood vessels are deformed, and destruction of their walls is observed. The lumens of these vessels are filled with hemorrhagic contents, with numerous accumulations of erythrocytes. Destructive changes in the myocardium are detected, the degree of severity of which is significantly higher than with the influence of the poison of *Vipera berus berus*. Muscle fibres' chaotic arrangement, fragmentation, thickening, swelling, and tortuosity are noted. Foci of necrosis and myocytolysis with destruction, delamination, and zones of the destruction of the sarcolemma of myocardial fibres are observed. Massive histioleukocytic infiltration

of the myocardium is noted, and activated fibroblasts with the formation of collagen fibres are observed in the intermyofibrillar spaces; blood vessels are full-blooded. Sludge and adhesion of erythrocytes are detected in the lumens of the arteries; Perivascular oedema and pronounced perivascular leukocyte infiltration are observed, and many areas of haemorrhages. Leukocyte infiltration is observed around the conducting cells, which is extracellular oedema. Endocardial endothelial cells have a somewhat elongated shape and are not tightly fixed to the basement membrane; there is a looseness of the endothelial lining and areas of its detachment; significant leukocyte infiltration is also observed.

Microscopic studies of the spleen of animals exposed to the venom of *V. berus nikolskii* have shown that numerous lymphoid nodules are observed in the white pulp of the organ, the vast majority of which have indistinct boundaries due to a decrease in the number of lymphocytes in the marginal zone; cells with mitotic figures and an increase in the number of lymphoblasts are found in the germinative centres of lymphoid nodules; the presence of T-lymphocytes and macrophages is observed in the periarterial lymphoid zones. The number of lymphocytes, macrophages, and plasma cells significantly increased in the red pulp of the spleen compared to rats injected with the viper *Vipera berus berus* venom. Erythrocytes of the red pulp are located in the venous sinuses, while lymphocytes and macrophages occupy the bulk of the red pulp. In the red pulp, foci of haemorrhages are detected, and intercellular communications in the endothelial layer of the vessels are disrupted. In the trabeculae of the spleen, oedema of smooth muscle cells is noted, and around the trabecular vessels - lymphocytic infiltration.

The results of qualitative and quantitative analysis of total protein, studies of proteolytic activity and the content of medium-weight molecules indicate a decrease in protein levels in both organs; the spleen felt a more pronounced effect than the heart. The impact of *V. berus nikolskii* venom on target organs is significantly more significant than that of *V. berus berus*, which may indicate differences in the composition of the venoms. A redistribution of protein molecules is noted, as evidenced by decreased molecular weight. The effect of *V. berus* venom on target

organs and the body as a whole leads to the synthesis of active fibrinogenolytic enzymes and the formation of degraded or abnormal molecules with altered substrate specificity. Proteolytic molecules that exhibit more specific collagenolytic activity are also redistributed, indicating a direct effect of *V. berus* venom on pathological enhancement of proteolytic processes, culminating in activating specific collagenolytic enzymes. All this shows significant changes in protein balance, a decrease in total protein levels, a shift in the enzymatic profile, and potential mechanisms by which the venoms of *V. berus* vipers can affect target organs. In addition, exposure to these organs can lead to internal intoxication, which is associated with the appearance of low molecular weight molecules.

Thus, the study of the heart and spleen of animals in the control group showed that these organs have a typical structure, which is characteristic of this species of animals.

Under the influence of *V. berus* venom, pathological shifts in the structural organisation of all heart wall layers are microscopically observed. In the epicardium, there is an increase in the volume of collagen fibers and thickening of the vessel walls; in the myocardium - there is oedema, disorganisation of muscle fibers, fragmentation, lysis, destruction, loss of characteristic transverse striation, and necrosis. In addition, the myocardial tissue's increased number of fibroblasts, their activation, and the proliferation of connective tissue components, including collagen fibres, was detected. The endocardium was distinguished by desquamation of the endothelial lining and increased active fibroblasts in the outer connective tissue layer. Acute intoxication with the venom of the viper *Vipera berus berus* was associated with disorganisation of the white pulp of the spleen: loss of clarity and orderliness of the placement of its structural elements, poor visualisation of the marginal zone of lymphoid nodules in germinal centres - an increase in the number of lymphoblasts. In the red pulp of the organ, areas of destruction of the spleen tissue and haemorrhages are noted; the presence of foci of lymphocyte apoptosis, thickening of the trabeculae, stasis and sludge of erythrocytes in the lumen of the trabecular veins.

Under the influence of the venom of *V. berus nikolskii*, destruction of the walls of the heart vessels and oedema of their inner and middle membranes were established. The myocardium is characterised by a significantly higher degree of morphological changes compared to rats injected with *Vipera berus berus* venom: chaotic arrangement and fragmentation of cardiac muscle fibres, loss of transverse striation, presence of foci of necrosis and myocytolysis. Pronounced histioleukocyte infiltration, an increased number of fibroblasts are detected; myocardial blood vessels are deformed, and their walls are swollen; permeability of vessel walls increases, and, as a result, haemorrhages occur. In the white pulp of the spleen, an increase in the number of lymphoid nodules with a large number of lymphoblasts and cells with mitotic figures is noted. In the periarterial zones, an increase in T-lymphocytes, expansion of the lumens of the central arteries, thickening of their walls, and loosening and disorganisation of the endothelial lining of the inner membrane are detected. In the red pulp, the number of lymphocytes, macrophages, and plasma cells increases significantly; areas of lymphocyte apoptosis, foamy macrophages, foci of haemorrhages, lymphocytic infiltration of trabecular vessels, expansion of the lumens of veins, their pronounced pleurisy, erythrocyte sludge are observed.

The potential effect of *Vipera berus* snake venoms on the state of protein metabolism indicates pathological activation of proteolytic pathways in the spleen and heart under the influence of venoms, and therefore, changes in protein and enzymatic profiles lead to changes in biochemical chains. The formation of molecules with a low molecular weight is also a sign of pathological changes in target organs since the presence of such molecules largely correlates with the onset of internal intoxication processes.

Keywords: heart, spleen, snake venom, metalloproteinases, protein profile, necrosis, haemorrhage.

Список публікацій здобувача за темою дисертації

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Palamarchuk, M., Bobr, A., Mudrak, A., Gunas, I., Maievskyi, O., Samborska, I., & Ostapchenko, L. (2023). Proteolytic Homeostasis in the Tissue of the Spleen and the Heart of Rats Injected with the Venom of *Vipera berus berus* and *Vipera berus nikolskii*. *Current Applied Science and Technology*, 23(6). <https://doi.org/10.55003/cast.2023.06.23.015> (*Scopus*)

2. Maievskyi, O. Y., Bobr, A. M., & Gunas, I. V. (2023). Structural changes in the heart tissue of rats under conditions of acute intoxication with *Vipera berus berus* venom. *Reports of Morphology*, 29(3), 20-25. [https://doi.org/10.31393/morphology-journal-2023-29\(3\)-03](https://doi.org/10.31393/morphology-journal-2023-29(3)-03) (*Scopus*)

3. Bobr, A. M. (2024). Analytical and quantitative assessment of the state of the spleen and immune processes in rats under administering *Vipera berus* venom. *Morphologia*, 18(3), 20-25. <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.3.20-25>

4. Maievskyi, O. Ye., Bobr, A. M., Gunas, I. V., Tkach, G. F., Maslii, V. P., Kyrychenko, I. M., & Ihnatishchev, M. R. (2024). Histological organization of the spleen of rats under conditions of acute intoxication with viper venom *Vipera berus berus*. *Reports of Morphology*, 30(4), 52-57. [https://doi.org/10.31393/morphology-journal-2024-30\(4\)-06](https://doi.org/10.31393/morphology-journal-2024-30(4)-06) (*Scopus*)

5. Bobr, A. M. (2024). Analytical and quantitative assessment of the condition of the heart wall of rats exposed to the venom of the vipers *Vipera berus berus* and *Vipera berus nikolskii*. *Morphologia*, 18(4), 15-21. <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.15-21>

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

6. Бобр, А. М., & Маєвський, О. Є. (2023). Молекулярний вміст отрути гадюк виду *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii* та його вплив на зміни біохімічних параметрів міокарду і селезінки щурів. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю: XX Міжнародна наукова

конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська Весна: досягнення в науках про життя», Київ, 27–28 квітня 2023 року – Київ – 214 с.

7. Бобр, А. М., & Маєвський, О. Є. (2023). *Зміни біохімічних параметрів міокарду та селезінки щурів при впливі отрути гадюк виду у *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii**. Збірник наукових праць: XIX Наукова – конференція «Львівські хімічні читання – 2023», Львів, 29–31 травня 2023 року – Львів: Видавництво від А до Я, 2023. – 254 с.

8. Бобр, А. М., & Маєвський, О. Є. (2023). *Analytical and quantitative assessment of the state of the spleen and immune processes in rats under administering *Vipera berus**. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю: «Теорія та практика сучасної морфології», Дніпро, 6–8 листопада 2024 року – Дніпро – 184 с.

ЗМІСТ

стор.

АНОТАЦІЯ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

ВСТУП

РОЗДІЛ 1 МОРФОЛОГІЧНІ ТА БІОХІМІЧНІ ЗМІНИ СЕРЦЯ ТА СЕЛЕЗІНКИ ПРИ ДІЇ СТРЕСОРНИХ ФАКТОРІВ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1. Особливості впливу отрути гадюк на показники гомеостазу
ссавців

1.2. Механізми ураження серця за умов дії різних пошкоджуючих
факторів

1.3. Вплив стресорних агентів на структурні та біохімічні
перебудови селезінки

РОЗДІЛ 2 ЗАГАЛЬНА МЕТОДИКА Й ОСНОВНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Загальна методика і об'єкти дослідження

2.2. Методи дослідження

2.2.1. Біохімічні і лабораторні.

2.2.2. Гістологічні.

2.2.3. Морфометричні.

РОЗДІЛ 3 БІОХІМІЧНІ ЗМІНИ СЕРЦЯ ТА СЕЛЕЗІНКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ВПЛИВУ ОТРУТИ ГАДЮК ВИДУ VIPERA BERUS

РОЗДІЛ 4 МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ СТРУКТУРНИХ КОМПОНЕНТІВ СЕРЦЯ ТА СЕЛЕЗІНКИ ЩУРІВ ПРИ ДІЇ ОТРУТИ ГАДЮК ВИДУ VIPERA BERUS

4.1. Мікроскопічна організація серця інтактних щурів

4.2. Особливості гістологічної структури серця щурів за умов інтоксикації отрутою гадюк *Vipera berus berus*

4.3. Мікроскопічні зміни в серці щурів при дії отрути гадюк *Vipera berus nikolskii*

4.4. Гістологічна організація селезінки інтактних щурів

4.5. Морфологічні зміни селезінки щурів при впливі отрути гадюк *Vipera berus berus*

4.6. Гістологічні зміни селезінки щурів за умов впливу отрути гадюк *Vipera berus nikolskii*

РОЗДІЛ 5 МОРФОМЕТРИЧНИЙ АНАЛІЗ ГІСТОЛОГІЧНИХ ЗМІН СЕРЦЯ ТА СЕЛЕЗІНКИ ЩУРІВ НА ТЛІ ДІЇ ОТРУТИ ГАДЮК ВИДУ VIPERA BERUS

5.1. Оцінка ширини кардіоміоцитів у міокарді контрольної та експериментальних груп

5.2. Оцінка площі та долі ендомізію у міокарді контрольної та експериментальних груп

5.3. Оцінка співвідношення площі білої та червоної пульпи у паренхімі селезінки між контрольною та експериментальними групами

5.4 Оцінка кількості макрофагів з включеннями ліпофусцину у червоній пульпі селезінки тварин контрольних та експериментальних груп

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

ВИСНОВКИ

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

ДОДАТКИ

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ,
СКОРОЧЕНЬ ТА ТЕРМІНІВ**

3FTX – трьохпетельні токсини
Asp Ps – аспарагінові протеази
BPPs – брадикінін-потенціюючі пептиди
CCl₄ – чотирехлористий вуглець
CRISP – секреторні протеїнази
DI – дезінтегрини
KTPI – інгібітори протеаз типу Кунітц
LAAO – оксидази L-амінокислот
NP – натрійуретичні пептиди
PLA₂ – фосфоліпази A₂
SVMP – металопротеїнази
SVSP – серинові протеази
VEGF – ендотеліальний фактор росту F
ДДТ – дихлородифенілтрихлоретан
ДСН – додецилсульфат натрію
ЕПС – ендоплазматична сітка
НМР – низькомолекулярні речовини
ПААГ – поліакриламідний гель
ТХО – трихлороцтова кислота

ВСТУП

Актуальність теми. Серед усіх отруйних тварин змії привертають особливу увагу людства. Отрута змій являє собою суміш ферментів та білків без каталітичних властивостей. Серед основних ензимів наявні металопротеїнази, фосфоліпази A₂, серинові протеази, ацетилхолінестераза, оксидази L-амінокислот, гіалуронідаза, нуклеотидаза [19, 176]. До білків з неферментними властивостями належать трьохпетельні токсини, лектиноподібні пептиди C-типу, натрійуретичний фактор, інгібітори протеїназ, брадикінін-потенціюючі пептиди [22, 29, 37]. Склад отрути змій не є стабільним і може змінюватись залежно від статі, особливостей онтогенезу, географічного розподілу, умов навколишнього середовища [64]. Тому сполуки їх токсинів здатні спричиняти цілий ряд біологічних ефектів як на місцевому, так і системному рівнях [182]. Як вже зазначалось, ураження органів серцево-судинної системи є одним із можливих наслідків зміїних укусів. Оскільки серцево-судинні захворювання є найпоширенішою причиною смерті в усьому світі, вивчення компонентів отрути змій та особливостей їх впливу на структуру і функції органів кровообігу є актуальною задачею.

Кардіотоксичність та виражені ЕКГ зміни є частими ускладненнями укусів змій. Найбільш поширеними є синусова аритмія, атріовентрикулярна блокада та синусова брадикардія [183]. Випадки укусів змій сімейства *Viperidae* часто асоціюються з такими патологіями як інфаркт міокарда та ішемічний інсульт, що виникають внаслідок активації коагуляційного каскаду і прямої кардіотоксичності протеолітичних ферментів, зокрема металопротеїназ. Також компоненти отрути спричиняють розвиток гіпофібриногенемії, ураження ендотелію судин та порушення агрегації тромбоцитів [33, 146].

Імунна система відіграє важливу роль в реакції організму на чисельні фактори середовища, що впливають на нормальний перебіг фізіологічних процесів. Будь-які зміни гомеостазу супроводжуються імунною відповіддю, яка

індукується і у випадку укусів отруйних тварин, в тому числі змій. Встановлено, що їх токсини здатні активувати II тип імунної відповіді, однак, особливості патогенезу взаємодії даної системи організму та отрути гадюк є значно складнішими [44, 84]. Враховуючи велике різноманіття ферментів та неферментних компонентів в її складі, зовсім не дивує той факт, що наслідком є розвиток вираженого запального процесу. Головними учасниками виступають PLA2 та металопротеїнази. Висока активність PLA2 в отруті змій підтримує на значному рівні концентрацію арахідонової кислоти та асоційованих з нею цитокінів [46, 72]. Також вплив токсинів запускає продукцію IL-6, TNF- α , IL-1, хемокінів, ліпідних медіаторів, створюючи умови для активації і міграції лейкоцитів [38, 191, 192]. Ліпідні медіатори (простагландини, лейкотрієни, тромбоксани) супроводжують запальний процес, проявляючи різноманітні патологічні ефекти.

Таким чином, значне різноманіття компонентів отрути гадюк стають причиною виникнення виражених патологічних змін як серцево-судинної, так і імунної систем. Розвиток того чи іншого ускладнення внаслідок укусів змій багато в чому зажить від дози отрути, швидкості її розподілу в організмі постраждалих та наявності хронічних захворювань. Однак, порушення нормального функціонування зазначених систем є надзвичайно згубним, підвищує тривалість лікування та реабілітації, а також стає причиною значних економічних втрат внаслідок порушення працездатності.

Не зважаючи на достатньо ґрунтовні і масштабні дослідження науковців світу, досі не встановленими є окремі складові елементи токсинів змій, особливості їх дії та патогенез ураження внутрішніх органів. Зокрема, механізми пошкодження серця та селезінки за даних умов розкриті не в повній мірі і не надають інформації щодо особливостей морфологічних змін органів на світлооптичному та біохімічному рівнях. Крім того, дані про вплив токсинів гадюк *V. berus berus* та *V. berus nikolskii* на структуру та функції серцево-судинної і імунної систем на даний момент повністю відсутні. Тому дослідження даного питання з метою ранньої діагностики, попередження

ускладнень та можливостей покращення методів лікування є актуальною задачею.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційне дослідження здійснене відповідно до планів наукових досліджень Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова і є фрагментом науково-дослідних робіт кафедри патологічної анатомії: «Особливості патоморфологічних змін внутрішніх органів в умовах дії отруйних та токсичних речовин» (номер державної реєстрації 0125U001927)..

Мета дослідження – визначення особливостей морфологічних та біохімічних параметрів структури серця і селезінки щурів при впливі отрути гадюк виду *Vipera berus berus*, і *Vipera berus nikolskii*.

Завдання дослідження:

1. Виявити на світлооптичному рівні прояви пошкодження серця щурів при впливі отрути гадюк виду *Vipera berus*.
2. Визначити на світлооптичному рівні прояви пошкодження селезінки щурів при впливі отрути гадюк виду *Vipera berus*.
3. Встановити морфометричні параметри змін в серці та селезінці щурів при впливі отрути гадюк виду *Vipera berus*.
4. Визначити біохімічні маркери ураження тканини серця та селезінки щурів при впливі отрути гадюк виду *Vipera berus*.

Об'єкт дослідження – особливості пошкодження та компенсаторно-приспосувальних змін в серці та селезінці щурів при впливі отрути гадюк виду *Vipera berus*.

Предмет дослідження – гістологічні, гістохімічні та біохімічні зміни серця та селезінки щурів при впливі отрути гадюк виду *Vipera berus*.

Методи дослідження: гістологічний та гістохімічний – для дослідження мікроскопічних змін структури серця та селезінки; морфометричний – для проведення аналітичної та кількісної оцінки стану серця і селезінки щурів; біохімічний – для об'єктивної оцінки перебігу адаптивних та деструктивних

процесів в серці та селезінці щурів за умов експерименту; статистичного аналізу – для забезпечення передбачених описовою статистикою процедур визначення статистичної значущості розбіжностей між групами порівняння.

Наукова новизна одержаних результатів. В ході проведеного дослідження вперше встановлені *гістологічні* (за умов впливу отрути *Vipera berus berus*: патологічні зрушення структурної організації всіх шарів стінки серця; в епікарді - збільшення об'єму колагенових волокон, потовщення стінок судин; в міокарді - набряк, дезорганізація м'язових волокон, їх фрагментація, лізис, деструкція, втрата характерної поперечної посмугованості, некроз; зростання чисельності фібробластів, їх активація та, як результат, розростання в тканині міокарду компонентів сполучної тканини, в тому числі колагенових волокон; ендокард - десквамація ендотеліального вистелення та збільшення кількості активних фібробластів в зовнішньому сполучнотканинному шарі. Дезорганізація білої пульпи селезінки: втрата чіткості та впорядкованості розміщення її структурних елементів, погана візуалізація крайової зони лімфоїдних вузликів; в гермінативних центрах - зростання чисельності лімфобластів. В червоній пульпі органу - ділянки деструкції тканини селезінки, геморагії; наявність вогнищ апоптозу лімфоцитів, потовщення трабекул, стази і складжі еритроцитів в просвітах трабекулярних вен. За умов впливу отрути *Vipera berus nikolskii*: деструкція стінок судин серця, набряк їх внутрішньої та середньої оболонки; міокард - хаотичне розміщення та фрагментація волокон серцевого м'язу, втрата ними поперечної посмугованості, наявність вогнищ некрозу та міоцитолізу; виражена гістіолейкоцитарна інфільтрація, зростання чисельності фібробластів; кровоносні судини міокарда зазнають деформації, стінки їх набряклі; зростає проникність стінок судин та, як результат, спостерігається поява геморагій. В білій пульпі селезінки - зростання чисельності лімфоїдних вузликів з великою кількістю лімфобластів, клітин з фігурами мітозів. В периартеріальних зонах - збільшення Т-лімфоцитів, розширення просвітів центральних артерій, потовщення їх стінок, розпушення та дезорганізація ендотеліального

вистелення внутрішньої оболонки. В червоній пульпі значно підвищується кількість лімфоцитів, макрофагів, плазмоцитів; спостерігаються ділянки апоптозу лімфоцитів, пінисті макрофаги, вогнища геморагій, лімфоцитарна інфільтрація трабекулярних судин, розширення просвітів вен, їх виражене повнокрів'я, складж еритроцитів), **та біохімічні** (зниження рівня протеїна в обох органах; перерозподіл протеїнових молекул, зменшення їх молекулярної маси; синтез активних фібриногенолітичних ферментів, утворення деградованих або аномальних молекул зі зміненою субстратною специфічністю; перерозподіл протеолітичних молекул з специфічною колагенолітичною активністю) зміни в структурі серця та селезінки щурів при впливі отрути *Vipera berus*.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані дані морфологічного, морфометричного та біохімічного досліджень тканини, зразків крові та гомогенату серця та селезінки щурів за умов дії отрути гадюк виду *Vipera berus* свідчать про розвиток негативних гістологічних та біохімічних змін структури цих органів, що зумовлює необхідність в подальшому продовження досліджень щодо використання відповідних корегуючих заходів.

Результати досліджень використовуються в лекційних курсах та в ході проведення практичних занять на кафедрах: гістології, цитології та ембріології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького; гістології та ембріології Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського; біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка; оперативної хірургії з топографічною анатомією Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.

Особистий внесок здобувача. Авторка брала участь у постановці та проведенні експериментального дослідження. Самостійно провела забір і підготовку матеріалу для гістологічного дослідження. Здобувачкою особисто виконано патентно-інформаційний пошук, аналіз наукової літератури та

написаний її аналітичний огляд, описані всі глави власних досліджень дисертаційної роботи, здійснено розробку основних теоретичних та практичних положень проведеного дослідження. Разом з науковими керівниками проведено аналіз отриманих результатів і сформульовані висновки. Гістологічне дослідження виконано за консультативною допомогою д.б.н., проф. З. М. Небесної (кафедра гістології та ембріології Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського). Біохімічні дослідження виконані за консультативною допомогою д.б.н, проф. О. М. Савчука (кафедра біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка). У сумісних з науковими керівниками та колегами публікаціях здобувачу належать основні результати стосовно гістологічних, морфометричних та біохімічних змін у серці та селезінці щурів за умов дії отрути гадюк виду *Vipera berus*.

Апробація результатів дисертації. Основні положення роботи викладені та обговорені на: XX Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених «Шевченківська Весна: досягнення в науках про життя», (Київ, 2023); XIX Науковій конференції «Львівські хімічні читання – 2023» (Львів, 2023); Восьма Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю: «Теорія та практика сучасної морфології» (Дніпро, 2024).

Публікації. Опубліковано 5 наукових статей (з яких 3 – в виданнях, що відносяться до міжнародної наукометричної бази Scopus), з яких 4 статті – в наукових фахових журналах України, 2 – самостійних, а також 3 тези в матеріалах науково-практичних конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена українською мовою на 177 сторінках. Робота складається з анотації, змісту, переліку умовних скорочень, вступу, аналітичного огляду літератури, загальної методики й основних методів дослідження, трьох розділів власних досліджень, аналізу й узагальнення результатів дослідження, висновків, списку літературних джерел, з яких 16 викладені кирилицею і 182 – латиницею, та додатків. Дисертаційне дослідження ілюстровано 34 рисунками та 4 таблицями.

РОЗДІЛ 1

МОРФОЛОГІЧНІ ТА БІОХІМІЧНІ ЗМІНИ СЕРЦЯ ТА СЕЛЕЗІНКИ ПРИ ДІЇ СТРЕСОРНИХ ФАКТОРІВ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1. Особливості впливу отрути гадюк на показники гомеостазу ссавців

Змії використовують свою отруту для нейтралізації здобичі, а також з метою відлякування чи ослаблення хижаків. Реалізація зазначених цілей можлива завдяки тому, що токсини спричиняють розвиток м'язових паралічів (через блокування передачі нервових імпульсів), викликають зміни у функціонуванні серцево-судинної системи або зумовлюють виражені локальні ураження в місцях укусів. Серед усіх отруйних тварин змії привертають особливу увагу людства. З одного боку така цікавість зумовлена тим, що випадки отруєнь їх токсинами є надзвичайно поширеними та належать до невирішених проблем охорони здоров'я в усьому світі, оскільки спричиняють чисельні смертельні наслідки. За оцінкою ВООЗ, щороку від укусів змій помирає від 81 000 до 138 000 людей, а ще 400 000 постраждалих мають важкі ускладнення або навіть інвалідність [41, 64, 73, 76, 81, 102, 116, 122, 138, 187]. Однак, не дивлячись на це, токсини змій вважають також цінними джерелами для виготовлення різноманітних лікарських засобів [20, 77, 163, 191].

Отрута змій являє собою суміш ферментів та білків без каталітичних властивостей. Серед основних ензимів наявні металопротеїнази, фосфоліпази A₂, серинові протеази, ацетилхолінестераза, оксидази L-амінокислот, гіалуронідаза, нуклеотидаза [13, 37, 155]. До білків з неферментними властивостями належать трьохпетельні токсини, лектиноподібні пептиди C-типу, натрійуретичний фактор, інгібітори протеїназ, брадикінін-потенціюючі

пептиди [22, 29, 154, 176, 177]. Склад отрути змій, згідно даних літератури, не є стабільним і може змінюватись залежно від статі, особливостей онтогенезу, географічного розподілу, умов навколишнього середовища [19, 47, 195]. Тому сполуки їх токсинів здатні спричиняти цілий ряд біологічних ефектів як на місцевому, так і системному рівнях [31]. Відомо, що в місці інюкуляції отрути зазвичай виникає сильний біль, набряк та некроз тканин [75]. На рівні органів і систем отрута спричиняє нейро-, міо-, кардіо-, нефротоксичний ефекти, коагулопатію [12, 16, 18, 32, 46, 184]. Такі небезпечні для життя ускладнення змушують вчених більш детально досліджувати компоненти токсинів змій з метою розробки ефективних методів лікування.

Фосфоліпаза A_2 (PLA_2) є одним з основних компонентів токсинів змій різних видів. Вона каталізує гідроліз складноєфірних зв'язків фосфоліпідів клітинних мембран в sn-2 положенні з утворенням лізофосфоліпідів та вільних жирних кислот. Процес супроводжується вивільненням арахідонової кислоти, з якою асоціюється значна кількість ефектів. Зокрема, активується циклооксигеназний шлях метаболізму, що призводить до продукції простагландинів і тромбоксану. У випадку запуску ліпоксигеназного каскаду обміну арахідонової кислоти зростатиме активність лейкотрієнів [61]. Згідно загальноприйнятій класифікації розрізняють секреторні PLA_2 ($sPLA_2$), цитозольні ($cPLA_2$), кальцій-незалежні ($iPLA_2$), тромбоцитаактивуючі ацетилгідролази (PAF) і лізосомальні ($LPLA_2$) [23]. Дана група ферментів проявляє найширший спектр фармакологічних ефектів. Серед них кардіо-, міо-, нейро-, цитотоксичність, антикоагулянтна та прозапальна дії [53, 78, 88, 194]. Нейротоксичний ефект PLA_2 асоціюється з пресинаптичною блокадою нервових імпульсів в нервово-м'язових синапсах. Хоча молекулярні механізми її дії і досі вивчаються, однак як показали дослідження останніх років, даний фермент спричиняє зміни проникності плазмолемі нейронів для іонів кальцію, призводячи до пригнічення вивільнення медіатора ацетилхоліну. Крім того, наявні дані щодо порушення структури мембрани мітохондрій дихальних м'язів, що призводить до гострої нервово-м'язової

слабкості та в'язлого паралічу. Антикоагулянтні властивості PLA₂ пов'язані з пригніченням протромбіназного комплексу через зв'язування з фактором Ха. Також вона здатна інгібувати зсідання крові шляхом розщеплення фосфоліпідів і тим самим пригнічувати формування коагулянтного комплексу, що залежить саме від наявності інтактних форм даних біомолекул на поверхні клітинних мембран. Вважають, що PLA₂ порушує плинність плазмолеми, підвищує її проникність, а активні форми кисню (АФК), що вивільняються при гідролізі фосфоліпідів стають причиною розвитку окисного стресу (ОС) та активації шляхів загибелі клітин. Останні асоціюються зі зниженням активності білка Bcl₂ та зростанням каспази-3, що призводить до апоптозу [21, 168, 197].

Запалення, що виникає внаслідок дії PLA₂ може бути причиною ураження багатьох органів та систем жертви. Опосередкована нею глибока екстравазація рідини в тканини, призводить до їх набряку, системної гіповолемії, циркуляторного шоку. Віддалені ефекти запалення за даних умов асоціюють із загибеллю клітин та поліорганною недостатністю. Зокрема, відомі випадки набряку легень. Також наявні дані щодо розвитку легеневої кровотечі, нервово-м'язового паралічу дихальної мускулатури та навіть дихальної недостатності [135, 145, 169]. Крім того, системне запалення та зростання циркулюючих цитокінів, може спричинити респіраторний дистрес-синдром [64].

Металопротеїнази (SVMP – snake venom metalloproteinases) є чисельними компонентами зміїних отрут. Згідно класифікації розрізняють такі класи, як I, II та III. SVMP I типу мають молекулярну масу від 20 до 30 кДа і в своєму складі містять лише один каталітичний домен. SVMP II є середніми за розмірами – близько 30-60 кДа та представлені протеїназним і дезінтегриновим доменами. SVMP III володіють найбільшою молекулярною масою – 60-100 кДа та містять в собі протеїназний, дезінтегриновий і збагачений цистеїном домени. Всі види SVMP асоціюються з геморагічним синдромом [91, 126, 134, 173, 193]. Встановлено, що дана група ферментів бере

активну участь в процесі зсідання крові, діючи в якості протромбінового активатора, активатора X фактора, інгібітора агрегації тромбоцитів. Крім того, вони мають фібринолітичну активність, розщеплюють компоненти позаклітинного матриксу, проявляють активність у відношенні апоптозу, активують прозапальні фактори [103, 152]. Однак головними таргетами для SVMР виступають структурні елементи базальної мембрани кровоносних судин і оточуючого екстрацелюлярного матриксу, що забезпечують механічну стабільність судин [74]. Розщеплюючи пептидні зв'язки між ендотеліальними клітинами та базальною мембраною, призводять до ініціації апоптозу, втрати міцності та розриву стінок судин, що в кінцевому рахунку стають причиною їх розриву. Крім того, SVMР руйнують ламінін, колаген I і IV типів, фібронектин, нідоген, протеоглікани. За даними наукових джерел, окремі SVMР стимулюють продукцію IL, PGE₂, TNF-α, зміну популяції лейкоцитів та їх міграцію в місця введення отрути [48].

Оксидази L-амінокислот (LAAOs) каталізують реакції окисного дезамінування L-амінокислот до α-кетокислот. Процес супроводжується продукцією H₂O₂, що проявляє потужні окисні властивості. Дана група ферментів зміїної отрути впливає на ADP-індуковану агрегацію тромбоцитів, порушує процес коагуляції. Крім того, вони володіють вираженою цитотоксичною дією [137, 167, 179]. Накопичення значної кількості АФК у вигляді H₂O₂ призводить до розвитку ОС. Останній стає причиною транслокації цитохрому c в цитозоль, активації каспази-9, що є ініціатором мітохондріального шляху апоптозу клітин. Доведеним є факт, що проапоптотичні білки p53 експресуються в надмірній кількості в присутності LAAOs, що зумовлює транспорт протеїну Вах в мітохондрії і запуску програмованої смерті клітин. Наявні дані також стосовно участі цих ферментів в активації каспази-3, яка в процесі апоптозу відповідає за конденсацію хроматину в ядрі (каріорексис) та фрагментацію ДНК [58, 78, 80, 174].

Серинові протеази (SPs) є як правило одноланцюговими глікопротеїнами, з молекулярною масою від 26 до 67 кДа. Даний вид

ферментів має потужну каталітичну ділянку та проявляє широку субстратну специфічність, що дозволяє їм втручатись в різні механізми каскаду згортання крові, викликаючи порушення гемостазу. Наразі SPs класифікують на окремі підтипи: тромбіноподібні ферменти, активатори плазміногену, протейну C, V фактору, серпіну та протромбіну, інгібітори агрегації тромбоцитів, калікреїноподібні, конвертази системи комплементу [180]. Загалом вони впливають на каскад згортання крові через активацію компонентів, що беруть участь в процесах коагуляції, фібринолізу та агрегації тромбоцитів, за допомогою механізмів, які імітують дію власних ферментів організму людини. Також відомо, що деякі види SPs зумовлюють вивільнення брадикініну та калідину шляхом гідролізу кініногену. Це призводить до розширення судин, підвищує проникність їх стінок, а тому може зумовлювати розвиток гіпотензивного шоку [99, 133].

Дезінтегрини – неферментні, багаті на цистеїн білки з відносно низькою молекулярною масою (4-15 кДа). Їх функціональна класифікація залежить від здатності взаємодіяти з певними інтегринами, що визначається наявністю інтегринзв'язуючого мотиву. Такі мотиви відрізняються амінокислотною послідовністю (RGD, MLD або R / KTS) [94, 99]. Найбільш поширеним сімейством є RGD-дезінтегрини. Зокрема вони містить послідовність Arg-Gly-Asp, інгібують агрегацію тромбоцитів *in vivo* та *in vitro*, що індукована ADP, колагеном або адреналіном. Також є дослідження, що демонструють як даний вид дезінтегринів блокував формування кров'яних згустків через пригнічення зв'язування фібриногену та фактора Вілебранда з комплексом GPIIb / GPIIa на поверхні тромбоцитів [25, 51, 95, 101].

Наразі активно вивчаються такі компоненти отрути змії як пептиди Кунітц-типу, що належать до сімейства інгібіторів SPs та присутні в отруті змії Elapidae і Viperidae. Встановлено, що вони порушують гомеостаз жертви, зумовлюючи, головним чином, розлади функціонування каскаду згортання крові. В їх складі наявні близько 60 амінокислот та три дисульфідних містка, що стабілізують структуру молекули. Окремі дослідження показали, що крім

розладів коагуляції пептиди Кунітц-типу виступають в ролі нейротоксинів, блокуючи K^+ та Ca^{2+} - канали. Така дія притаманна, зокрема, дендротоксинам [121, 160].

Трьохпетельні токсини являють собою сімейство білків, що не володіють властивостями ферментів. Включають близько 60-75 амінокислотних залишків та 4-5 дисульфідних зв'язків, що стабілізують їх третинну структуру. Наразі відомі декілька видів трьохпетельних токсинів, що проявляють значний спектр біологічної дії – нейро-, цито-, кардіотоксини, інгібітори ацетилхолінестерази. Нейротоксини є постсинаптичними токсинами, що блокують нікотинові ацетилхолінові рецептори в нервово-м'язових синапсах, призводячи до паралічів, ураження дихальної мускулатури. Цитотоксини здатні впливати на активність зв'язаних з плазматичною мембраною ферментів, зумовлювати деполяризацію клітинних оболонок кардіоміоцитів, нейронів, пригнічувати агрегацію тромбоцитів, проявляти цитолітичні властивості. Інгібітори ацетилхолінестерази зумовлюють мимовільні скорочення м'язових волокон внаслідок накопичення ацетилхоліну в синаптичних щілинах [56, 115].

Натрійуретичний фактор отрути змій реалізує ефекти через рецептори натрійуретичного фактору А, В, С. Наслідком є вазодилатація, оскільки він впливає на гладенькі міоцити судинної стінки, активує гуанілатциклазу, генерує активність залежної від цГМФ протеїнкінази G, що в свою чергу стимулює Ca^{2+} -канали та АТФ-чутливі K^+ -канали, призводячи до розширення судин [71, 139].

Брадикінін-потенціюючі пептиди – багаті проліном олігопептиди, що містять 5-14 амінокислотних залишків. Вперше були виділені з отрути гадюки *Bothrops jararaca* і являють собою інгібітори ангіотензин-перетворюючого ферменту (АПФ). Даний пептид потенціює гіпотензивний ефект брадикініну. Зниження артеріального тиску відбувається за двома механізмами: інгібування С-домену АПФ, що протидіє утворенню ангіотензину II з ангіотензину I та посилення дії ендогенного брадикініну. Також є дані, що цей пептид може

активувати мускаринові ацетилхолінові рецептори – M_1 та рецептори брадикініну – B_2 , що в свою чергу викликає тимчасове зростання внутрішньоклітинного рівня Ca^{2+} . Даний процес активує ендотеліальну синтазу оксиду азоту – eNOS, що індукує продукцію NO і сприяє вазодилатації. Крім пригнічення активності АПФ, деякі брадикінін-потенціюючі пептиди отрути змій здатні модулювати дію аргініносукцинатсинтази *in vitro* та *in vivo*, що призводить до вироблення NO в ендотеліальних клітинах судинної стінки та зниження артеріального тиску. Відомо також, що дані компоненти отрути можуть спричиняти дозозалежне зниження скоротливості передсердь [59, 127, 139, 158].

Аналіз наукових джерел дає змогу встановити, що до найбільш поширених ускладнень зміїних укусів належать ураження скелетних м'язів, нервової системи, нирок та кровотечі різного ступеня важкості [46].

Міонекроз є наслідком токсичної дії компонентів отрути, головним чином PLA_2 , що здатна взаємодіяти з плазматичними мембранами м'язових волокон, пошкоджуючи їх цілісність. Надходження Ca^{2+} в цитозоль м'язових волокон як наслідок дії зазначеного ферменту, зумовлює посилене скорочення міофіламентів, дисфункцію мітохондрій, різноманітні дегенеративні явища, що призводять до незворотніх змін в клітинах м'язової тканини [117, 190]. Крім PLA_2 пептиди з низькою молекулярною масою, що володіють міотоксичною дією, здатні спричиняти розвиток некрозу [40]. За даних умов м'язові волокна пошкоджуються внаслідок ішемії, яка розвивається у відповідь на ураження судин. Оскільки отрута більшості змій сімейства Viperidae призводить до деструктивних змін судин та нервів, регенерація скелетних м'язів після укусів є порушеною, адже успіх її залежить від здатності фагоцитів, що надходять до місця ураження кровотоком, утилізувати некротичні залишки та від ступеня іннервації [130]. Тому наслідки міонекрозів можуть носити непередбачуваний характер. Як вже зазначалось, SVMР руйнують основні компоненти міжклітинного матриксу, а, отже, можуть виступати одним з головних учасників пошкодження м'язової тканини [188].

Слід зазначити, що SVMР зумовлюють також порушення цілісності епідермального та дермального шарів шкіри, руйнують міжклітинні контакти, призводячи до формування пухирів набряку. Разом з тим, розвивається запальна реакція в місцях інокуляції отрути, що супроводжується продукцією та вивільненням ейкозаноїдів, NO, брадикініну, компонентів комплементу, гістаміну, активації резидентних макрофагів, міграцію лейкоцитів [142, 143, 198]. Це підвищує проникність стінок судин, сприяє формуванню ексудату, що крім білків плазми крові містить хемокіни, цитокіни, фрагменти поза- та внутрішньоклітинних протеїнів, які погіршують перебіг запальних процесів [42].

Для більшості змій характерною є нейротоксична дія отрути, яка викликає низхідний млявий нервово-м'язовий параліч. Останній є небезпечним через можливість блокади м'язів, що відповідають за процеси ковтання і дихання. До основних типів нейротоксинів належать α та β [162, 189]. α -нейротоксини відносять до трьохпетельних токсинів, що реалізують свою дію впливаючи на постсинаптичні мембрани чи нервово-м'язові з'єднання. Вони володіють високим ступенем афінності до холінергічних рецепторів моторних пластинок в м'язових волокнах та пригнічують їх зв'язування з ацетилхоліном, провокуючи розвиток паралічів [129]. Властивостями β -нейротоксинів володіють PLA₂, що чинить вплив на пресинаптичні нервові закінчення нервово-м'язових з'єднань. Зв'язуючись з таргетами, нейротоксичні PLA₂ індукують ферментний гідроліз фосфоліпідів плазматичної мембрани нервових закінчень. Це призводить до злиття синаптичних везикул з пресинаптичною мембраною і екзоцитоз їх вмісту. Крім того, підвищується проникність клітинних оболонок для іонів з подальшою їх деполяризацією, надходженням всередину клітин Ca²⁺ та остаточним виснаженням пресинаптичних везикул, що спричиняє розвиток дегенеративних змін і руйнування нервових закінчень [49, 65].

Системні кровотечі належать до ускладнень отруєнь токсинами змій. При цьому, головними провокуючими чинниками в даному випадку є SVMР

III типу. Кровотечі можуть виникати майже у всіх органах, зумовлюючи важкі наслідки. Наприклад, внутрішньочерепні геморагії спричиняють ішемію, інсульти [150]. Отрута змій порушує процеси гемостазу різноманітними механізмами. Компоненти її діють як тромбіноподібні ензими або активатори факторів коагуляції – V, X, протромбіну. Також вони здатні гідролізувати фібриноген і фібрин. Крім того, SVMР стимулюють продукцію тканинних факторів, що порушують функцію ендотелію судин [70, 82]. Відомим є той факт, що токсини змій впливають на функцію тромбоцитів. Ураження судинної стінки SVMР та дія лектиноподібних протеїнів С-типу призводять до скорочення чисельності тромбоцитів [69, 110, 157]. Дезінтегрини та серинові протеази порушують агрегацію тромбоцитів, блокуючи рецептори їх або перешкоджаючи взаємодії з фактором Вілебранда. Індуковані токсинами системні кровотечі є головною причиною, що зумовлює гемодинамічні розлади, такі як гіповолемія та шок, які можуть поглиблюватись у випадку присутності в складі отрути брадикінін-потенціюючих пептидів. Гіпонатріємія, що ймовірно розвивається внаслідок дії натрійуретичних пептидів також виступає причиною серцево-судинних розладів [55, 68, 83, 149, 166].

Встановленим є факт розвитку гострого ураження нирок внаслідок укусів змій. Серед основних патофізіологічних механізмів даного ускладнення є ішемія через пошкодження судин та порушення кровопостачання органу, а також системних кровотеч. Крім того, характерними є протеолітична деградація базальної мембрани судинних клубочків, накопичення мікротромбів в судинах мікроциркуляторного русла нирок, що можуть стати причиною гемолізу та прямий цитотоксичний вплив компонентів отрути на клітини каналців нефрона. У випадку рабдоміолізу нирки уражаються внаслідок накопичення міоглобіну в ниркових каналцях [53, 54, 62, 119, 156, 150].

Таким чином, значне різноманіття компонентів отрути гадюк стають причиною виникнення виражених патологічних змін. Розвиток того чи іншого

ускладнення внаслідок укусів змій багато в чому зажить від дози отрути, швидкості її розподілу в організмі постраждалих та наявності хронічних захворювань. Однак порушення нормального функціонування органів та систем є надзвичайно згубним, підвищує тривалість лікування і реабілітації, а також стає причиною значних економічних втрат внаслідок порушення працездатності. Тому важливим є всебічне та глибоке дослідження даної проблеми в усьому світі, а не лише в країнах з високою частотою випадків зміїних укусів, з метою розробки заходів профілактики, швидкої діагностики ускладнень та їх ефективного лікування.

1.2. Механізми ураження серця за умов дії різних пошкоджуючих факторів

Значна кількість факторів як фізичного, так і хімічного походження можуть чинити негативний вплив на органи серцево-судинної системи. При цьому, реалізація пошкоджуючої дії чинників різного генезу полягає не лише в змінах нормального функціонування серця, але і в запуску складних патогенетичних механізмів, що стають причиною виражених структурних перебудов органу, які подекуди носять незворотній характер. Саме тому, надзвичайно важливим є комплексне вивчення та узагальнення особливостей і шляхів ураження кардіоаскулярної системи.

Однією з токсичних речовин, що має широкий спектр застосування в побутових та промислових умовах і чинить негативний вплив на тканину серця є етанол. Хронічна алкогольна інтоксикація наразі є надзвичайно поширеною медичною і соціальною проблемою, яка призводить до важких мультисистемних уражень та смерті. Слід зазначити, що етанол є нормальним метаболітом в організмі людини та бере участь в обміні ліпопротеїнів, фосфоліпідів, холестерину. За звичайних умов ферментна система печінки

забезпечує його базальний метаболізм. Однак при надходженні етанолу в значних концентраціях, що перевищують можливості організму з його утилізації, велика кількість токсичних продуктів, головним чином ацетальдегіду, потрапляє в кровотік, спричиняючи негативний системний вплив, в тому числі і на тканину серця [67]. Механізм дії етанолу полягає в безпосередньому токсичному ефекті на міокард шляхом роз'єднання процесів збудження і скорочення, порушення діяльності АТФ-залежного Na^+/K^+ -насоса, дисбалансу в надходженні і вивільненні Ca^{2+} з саркоплазматичного ретикулума, пригнічення окисного фосфорилювання в мітохондріях кардіоміоцитів, активації синтезу позаклітинних білків. Крім того, він зумовлює зниження вмісту вітаміну B_1 , селену, електролітів (гіпомагніємія, гіпокаліємія, гіпофосфатемія). При електронно-мікроскопічному дослідженні зразків серця експериментальних тварин, що отримували високі дози етанолу виявляли розширення каналців ендоплазматичної сітки, дезорганізовані мітохондрії з фрагментованими кристами. Також спостерігали наявність процесів дегенерації міофібрил, руйнування Z дисків і замісного фіброзу з помірною лімфогістіоцитарною інфільтрацією. Характерним є накопичення колагенових волокон в позаклітинному матриксі. Відмічали чергування атрофованих та гіпертрофованих м'язових волокон, жирову дистрофію кардіоміоцитів. В судинах мікроциркуляторного русла виявляли атрофію ендотеліоцитів, складжі і стази еритроцитів. Зазначені морфологічні зміни в кінцевому рахунку призводили до розвитку дифузного кардіосклерозу.

Висока ефективність сучасної хіміотерапії дозволяє досягнути значних успіхів в лікуванні онкологічних захворювань. Основою більшості схем поліхіміотерапії першої лінії є антрациклінові антибіотики. Однак успішне лікування основного захворювання в ряді випадків супроводжується розвитком різноманітних ускладнень з боку серцево-судинної системи, в тому числі надзвичайно важких, що можуть призвести до летальних наслідків [151]. В основі дії антибіотиків антрациклінового ряду лежить синтез АФК, які активують процеси перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) і пошкодження

мембран кардіоміоцитів. Характерним є також перебудова позаклітинного матриксу серцевого м'яза, який, як відомо, представлений міофібрилами, колагеновими волокнами. Встановлено, що при прийомі даних препаратів виявляють ураження структури саркомерів, запальні зміни міокарда. Доведено, що доксорубіцин стимулює продукцію TNF- α та IL-2 [120, 132]. Антрацикліни порушують продукцію АТФ шляхом пошкодження мітохондрій і як наслідок – збільшення продукції супероксиданіонів, активації мітохондріально-залежного апоптозу кардіоміоцитів. Доказами даних змін є гістологічні ознаки ураження міокарду у вигляді деградації міофібрил та руйнування плазмолемі клітин серця.

Активація вільнорадикальних процесів при лікуванні антрациклінами в тканині серця має декілька механізмів. Так, доксорубіцин підвищує експресію мРНК NAD(P)H-оксидази. Внаслідок діяльності останньої утворюється реактивний семіхінон-радикал антрациклінів, що після взаємодії з молекулярним киснем і іонами заліза або міді продукують супероксидний чи гідроксильний радикали, пероксинітрит. Зазначені сполуки зумовлюють розвиток ОС. Також дані хіміотерапевтичні препарати пригнічують продукцію ферментів антиоксидантного захисту, інгібуючи експресію відповідних генів. Зокрема, знижується продукція ферментів, що відповідають за відновлення глутатіону. Останній накопичується в окисленій формі, а активність глутатіонредуктази (ГР) та глутатіонтрансферази (ГТ) значно пригнічується. Характерним є також розвиток ендотеліальної дисфункції судинної стінки при впливі антибіотиків антрациклінового ряду. ОС та АФК стимулюють прозапальні Toll-like рецептори-4, пригнічують продукцію фактора росту ендотелію судин (VEGF), його рецептора (VEGFR2), NO, збільшують синтез ендотеліна-1. Все це зумовлює розвиток структурно-функціональних порушень ендотеліального шару судинної стінки та сприяє продукції міокардіальних матриксних металопротеїназ (MMP).

Ефекти іонізуючого випромінювання на живий організм протягом останнього десятиліття є предметом дослідження провідних науковців світу.

При цьому значну зацікавленість викликають механізми пошкоджуючого впливу радіації на серцево-судинну систему, оскільки вона є однією з критичних систем організму і смертність від негативної дії на неї факторів екзогенного походження залишається надзвичайно високою. Для радіоіндукованого ураження серця характерним є пошкодження в першу чергу судин міокарда, а саме їх ендотеліального вистилення [128, 141, 196]. Активація запальних процесів і запуск коагуляційного каскаду за даних умов лежать в основі патогенезу ураження серця. Запальні зміни супроводжуються індукцією моноцитарно-макрофагальної системи організму, яка є пусковим механізмом для гіперпродукції цитокінів – TNF- α , IL-1, 6, 18, моноцитарного хемотаксичного фактора та тромбоцитарного фактора росту. Дані зміни викликають виражену проліферацію епітеліальних клітин судинної стінки, утворення тромбів, нашарування фібрину та як наслідок – закупорку просвіту судин міокарда, що спричиняє ішемію і некроз кардіоміоцитів [144]. При цьому значне пригнічення проліферації кардіоміоцитів призводить до заміни їх фіброзною тканиною, участь в формуванні якої бере TGF- β 1. Також радіоіндуковані ураження серця асоціюються з продукцією нуклеарного фактора каппа β , MMP, молекул адгезії та зниження NO. Характерним є зростання рівнів колагену I і III типів. Активація фіброзних змін, зменшує здатність міокарда до розтягнення шлуночків під час наповнення і розвитку діастолічної дисфункції [14, 170].

Частота термічного ураження шкіри є високою в побутових, промислових умовах, характеризується складністю і тривалістю лікування, частою інвалідизацією та летальністю. Опікова хвороба супроводжується рядом відхилень і розладів нормального функціонування організму в цілому і з боку серцево-судинної системи в тому числі. При масивних опіках спостерігаються різноманітні за характером зміни міокарда, що призводять до розвитку не лише серцевої недостатності, але часом і смерті постраждалих. За даними наукових джерел, в ранні терміни після опіків шкіри в серці виявляють мікротромбози, порушення мікроциркуляції, тканинну гіпоксію. Виникає

патологічна деполяризація мембрани кардіоміоцитів та порушення їх проникності. Функція серця пригнічується за рахунок дії прозапальних медіаторів – IL-1 β , TNF- α . В подальшому запальні процеси в міокарді підтримуються через β -адренергічні механізми. Також встановлено, що в клітинах міокарда характерним є розвиток ацидозу та зростання внутрішньоклітинного рівня Ca²⁺, запуск процесів апоптозу і аутофагії. Беззаперечним є той факт, що в механізмах ураження серця за даних умов беруть участь АФК і ліпідні радикали. Надлишок АФК зумовлює порушення проникності плазмолем, зміни іонного складу, пошкодження генетичного апарату клітин і смерть шляхом апоптозу. Зміни в системі кислотно-основного гомеостазу, рівня електролітів (гіпо- чи гіперкаліємія) стають причиною порушень провідності і ритму. Морфологічно виявляють дистрофічні зміни стінки лівого шлуночка і мілководнищеві некрози [7, 185].

Як вже зазначалось, ураження органів серцево-судинної системи є одним із можливих наслідків зміїних укусів. Вони здатні маніфестувати у вигляді інфаркту міокарда, серцевої недостатності, порушень ритму, провідності і тону судин. Дані прояви виникають внаслідок впливу одного компонента отрути чи синергічної дії декількох молекул. Оскільки серцево-судинні захворювання є найпоширенішою причиною смерті в усьому світі, а це близько 45 % смертей кожного року, вивчення особливостей впливу компонентів отрути змії на структуру і функції органів кровообігу є актуальною задачею.

Кардіотоксичність та виражені електрокардіографічні зміни є частими ускладненнями укусів змії [104, 146, 172]. Найбільш поширеними є синусова аритмія, атріовентрикулярна блокада та синусова брадикардія. Випадки укусів змії сімейства *Viperidae* часто асоціюються з такими патологіями як інфаркт міокарда та ішемічний інсульт, що виникають внаслідок активації коагуляційного каскаду згортання крові і прямої кардіотоксичності протеолітичних ферментів отрути, зокрема SVMP. Також компоненти їх

токсинів спричиняють розвиток гіпофібриногенемії, ураження ендотелію судин та порушення агрегації тромбоцитів [26, 111, 181, 183].

За даними літератури, в основі патогенезу інфаркту міокарду при укусах змій сімейства *Viperidae* лежать також порушення постачання кисню до кардіоміоцитів внаслідок надмірного гемолізу еритроцитів, вазоконстрикції коронарних судин через значну продукцію ендотеліну та вплив сафатоксинів отрути. Науковці зазначають, що можливим є розвиток міокардиту з вираженим некрозом скоротливих міоцитів, геморагій і накопичення тромбів в судинах мікроциркуляторного русла серцевого м'яза [33, 87, 165].

Введення тваринам отрути *Crotalus durissus cascavella* призводить до розвитку морфологічних змін в тканині серця. Світлова мікроскопія встановила наявність запалення та крововиливів і зменшення об'єму клітин, еозинофільної інфільтрації, втрати поперечної посмугованості міофібрил, змін в ядрах кардіоміоцитів, накопичення гранул в саркоплазматичному ретикулумі, порушення цілісності м'язових волокон. Також продемонстровано, що отрута проявляє виражений інотропний ефект шляхом активації NO / цГМФ / протеїнкіназа G, що призводить до гіпотензії та брадикардії *in vivo*. NO знижує потік іонів Ca^{2+} через канали L-типу в міокарді щурів. Крім того, він підвищує активність цГМФ / протеїнкіназа G-залежне фосфорилювання серцевого тропоніну I та зв'язування міозину з протеїном C, зумовлюючи розслаблення м'язів та негативний інотропний ефект [164].

Отрута *Vipera ammodytes*, а також споріднених європейських гадюк, може проявляти кардіотоксичний вплив. Головним компонентом, який зумовлює картину ураження серця є аналог секреторної PLA_2 – амодитилін L. В ізолюваному перфузійному серці щурів він індукував виражене та незворотне порушення провідності, а саме важкі атріовентрикулярні блокади. Процес супроводжувався зростанням в крові тварин КФК, ЛДГ, АСТ, тропоніну I, що свідчили про пошкодження тканини серця [86].

На сьогоднішній день значну увагу дослідників привертають кардіотоксини кобр та особливості їх патогенної дії. Зазначені токсини

являють собою β -структуровані білки, що складаються з 59-61 амінокислотних залишків з 4 дисульфідними містками. Після потрапляння в організм жертви вони в першу чергу впливають на серцево-судинну систему, викликаючи систолічну зупинку серця. Експериментальні дослідження показують, що кардіотоксини кобр зумовлюють порушення скоротливості, деполяризацію і контрактуру серцевого м'яза. Встановлено, що при впливі їх на папілярний м'яз серця морських свинок виявляють перехідний позитивний інотропний ефект, який супроводжується розвитком тонічного скорочення. Дослідження механізмів дії кардіотоксину кобр показують, що в кардіоміоцитах вони викликають зростання іонів Ca^{2+} , зміну їх форми, гіперконтрактуру, руйнування плазмолем. Останній факт пов'язують зі здатністю кардіотоксину взаємодіяти з ліпідами клітинної оболонки. При цьому характерні особливості даної взаємодії залежать від типу токсину – Р чи S. Р-тип містить в складі пролін в положенні 30 амінокислотної послідовності, S-тип – залишок серину в 28 положенні. На сьогоднішній день наявні дані про те, що обидва види спричиняють дестабілізацію подвійного ліпідного шару клітинних мембран кардіоміоцитів, але з різною інтенсивністю.

Таким чином, ретельний аналіз наукових джерел демонструє наявність широкого спектру факторів різного генезу, що зумовлюють порушення нормальних функціональних процесів серцево-судинної системи та стають причиною дестабілізації її структурних компонентів. Механізми, що лежать в основі ураження серця за умов дії несприятливих чинників довкілля є надзвичайно різноманітними, однак серед головних – розвиток запалення, фіброзу, активація ОС, розлади системи гемостазу. Значна кількість досліджень щодо вивчення причин та шляхів розвитку зазначених змін при дії негативних факторів різного походження сприяють покращенню уявлень наукової спільноти з приводу даних питань. Однак, досі не висвітленими залишаються особливості кардіотоксичної дії отрути змій, особливо сімейства *Viperidae*, на структурну організацію та функціональні властивості серцевого м'яза. Експериментальні дані, що наявні в наукометричних базах є

нечисельними та не в повній мірі розкривають картину патологічних змін. Оскільки проблема зміїних укісів неухильно росте кожного року в усьому світі, вивчення впливу токсинів отрути гадюк на органи серцево-судинної системи є важливим завданням сьогодення.

1.3. Вплив стресорних агентів на структурні та біохімічні перебудови селезінки

Селезінка є одним з найбільш реактивних органів, що проявляє швидку відповідь на дію пошкоджуючих факторів протягом ранніх етапів їх впливу. Згідно даних чисельних експериментальних досліджень, вона є важливим осередком розвитку специфічних імунологічних реакцій, оскільки має багаточисельні клітинні популяції, що беруть участь в забезпеченні сталості внутрішнього середовища організму. На сьогоднішній день наявні переконливі дані, які свідчать про те, що селезінка здатна підтримувати стійкість організму у відповідь на дію фізичних та хімічних факторів навколишнього середовища. Однак за умов їх хронічного впливу резерви імунного статусу органу значно страждають, виснажуються внаслідок порушення морфології та функцій ключових структурних елементів. В зв'язку з цим серед наукових досліджень сьогодення з'являються все більше тих, що зосереджені на вивченні патофізіологічних шляхів ураження селезінки при впливі несприятливих факторів різного генезу.

Хімічний канцерогенез, як відомо, призводить до порушень в системі імунного захисту. Наявні дані, що ріст злоякісних новоутворень супроводжується продукцією біологічно активних речовин, які пригнічують захисні механізми організму, що в свою чергу, зумовлює зниження протипухлинної імунної відповіді. Одна з провідних ролей у формуванні такої відповіді належить селезінці, оскільки тут відбувається кінцева

антигензалежна диференціація Т- і В-лімфоцитів. Тому поглиблене вивчення імунного статусу селезінки при наявності пухлинних утворень є актуальною задачею [11, 107].

Моделювання канцерогенезу шляхом введення 1,2-диметилгідразину призводить до виражених морфологічних і імуногістохімічних змін білої пульпи селезінки. Вони проявляються у вигляді порушення співвідношення між лімфоїдними вузликами різного діаметру з переважанням мілких, що мають ознаки зменшення розмірів гермінативних центрів. Через 4 місяці після введення канцерогену спостерігали більш значні прояви гіпоплазії лімфоїдних вузликів, ще більше скорочення діаметру гермінативних центрів, ширини маргінальної зони, зменшення чисельності Т- і В-лімфоцитів, діаметру периартеріальних лімфоїдних муфт (ПАЛМ). Зазначені зміни структурної організації, на думку авторів, є свідченням порушення протипухлинної імунної відповіді і фактором ризику прискорення темпів злоякісного росту.

При індукції канцерогенезу та застосуванні цитостатичних препаратів в тканині селезінки щурів спостерігають значне накопичення токсичних продуктів ПОЛ, що виникає внаслідок надмірної продукції реактивних форм кисню і вираженого дисбалансу ланок системи антиоксидантного захисту. За умов хронічної онкогенної інтоксикації, що змодельована диметилгідразином характерним є розвиток ОС та порушення синтезу ГП і ГР в ендоплазматичній сітці. Також встановлено, що в тканині селезінки знижується активність супероксиддисмутази (СОД). Супроводжується процес зростанням в крові та гомогенатах органу малонового діальдегіду (МДА), основ Шифа, альдегідів, кетонів [9].

Застосування доксорубіцину при хіміотерапії онкологічних захворювань супроводжується розвитком імуносупресивних процесів в тканині селезінки та зниженням імунного статусу організму. Морфологічно дані зміни характеризуються розвитком в білій пульпі виражених гіпопластичних процесів. Характерним є редукція лімфоїдних вузликів і муфт. Чіткою є Т-залежна зона, в той час як маргінальна майже не визначалась,

погано вираженими були гермінативні центри. Зменшувалась кількість лімфоцитів в периартеріальних зонах. Погано прослідковувалась межа між білою та червоною пульпою. В останній були відсутні або в незначній кількості мегакаріоцити, значно знижувалось число макрофагів [6].

Серед задач сучасної імуноморфології важлива роль належить вивченню морфофункціональних змін в лімфоїдній тканині при тривалому впливі різноманітних екотоксикантів органічної та неорганічної природи, одними з яких є сполуки хрому. Встановлено, що селезінка виступає в ролі чутливої індикаторної системи, яка реагує на надходження токсичних речовин до організму, що є виразними при гістологічних дослідженнях. При отруєнні біхроматом калію зазвичай виявляють значне повнокрів'я трабекулярних і пульпарних судин, збільшення розмірів лімфоїдних фолікулів. В гермінативних центрах спостерігається гіперпластична реакція, що супроводжується накопиченням в них макрофагів і плазмоцитів. Зростають розміри В-зон селезінки. При електронно-мікроскопічному дослідженні виявляють порушення компартменталізації ретикулярних клітин та лімфоцитів. В цитоплазмі цих клітин мітохондрії мілкі, з дезорганізованими кристами, наявні ліпосоми. Імуноцитохімічні дослідження демонструють, що дія біхромата калію індукує програмовану смерть лімфоцитів в Т-зонах селезінки. Такі апоптозні лімфоцити мали характерні зміни цитоплазми і ядер. В пізні терміни дослідження встановлено, що апоптозу підлягають не лише окремі клітини, а й цілі їх групи. При цьому вони не піддаються фагоцитозу, а знаходяться в оточенні стромальних клітин та іноді формують кістозні порожнини. Наявність апоптозних груп клітин є свідченням міжклітинної індукції програмованої смерті.

При комбінованому введенні біхромату калію та тетраборату натрію спостерігалось достовірне зменшення відносної площі білої пульпи та зростання червоної. Характерними були зміни площі функціональних зон лімфоїдних вузликів, зменшення периартеріальної та маргінальної (крайової) зон.

Ретельний аналіз наукових джерел демонструє, що важкі ураження структури селезінки можуть спостерігатись при надмірному надходженні фтору до організму з продуктами харчування. Патологічні ефекти його дії асоціюють з пригніченням проліферації лімфоцитів органу, апоптозом спленоцитів, ураженням структури ДНК [105]. Науковці в досліджах на щурах, які отримували надмірну кількість фтору з водою (150 мг/л), визначили, що в значній кількості клітин селезінки була зруйнована ядерна мембрана, мітохондрії мали деструктивні кристи та ознаки вакуолізації. Спостерігали також набряк і дезорганізацію ендоплазматичної сітки. Морфологічні зміни супроводжувались пригніченням експресії IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α , які визначають стан функціональної активності селезінки, а порушення їх синтезу є свідченням дисфункції імунної системи [108].

Встановлено, що окремі ксенобіотики, які наразі є компонентами продуктів харчування, зокрема ефіри поліоксипропілентріолу та пропіленгліколь, спричиняють ультраструктурні зміни клітин селезінки, що характеризуються маргінацією хроматину, появою виражених інвагінацій каріолеми аж до фрагментації ядер. Крім того, виявляють вакуолізацію цитоплазми, набряк мітохондрій. Дані зміни є проявом гідропічної дистрофії та апоптозу спленоцитів [27].

Важлива роль в регуляції функцій імунної системи належить ендокринним механізмам, при цьому особливе місце в зазначених процесах відводять глюкокортикоїдним та статевим гормонам. Експериментальні дослідження свідчать, що дані гормони здатні як стимулювати, так і пригнічувати імунну відповідь. Встановлено також, що синтетичні глюкокортикоїди, які на сьогоднішній день мають широкий спектр застосування в практичній медицині проявляють в десятки разів сильніший ефект, ніж ендогенний кортизол [63]. Вивчався вплив дексаметазону в терапевтичній добовій (0,6 мг/кг) і максимальній терапевтичній (3 мг/кг) дозах та медроксипрогестерона ацетату в терапевтичній добовій (30 мг/кг) і максимальній терапевтичній (150 мг/кг) дозах на структуру селезінки щурів.

При гістологічному дослідженні виявлено, що поверхня капсули селезінки є неоднорідною, в трабекулах і в капсулі переважають колагенові волокна, а кількість гладеньких міоцитів значно знижена. Відмічали, що паренхіма органа є нерівномірно і хаотично диференційована на компартменти. Лімфоїдні фолікули були поодинокими та мали невеликі розміри. Вони перебували у фазі інволюції, про що свідчило наявність неактивних гермінативних центрів без ознак мітозів. В деяких лімфоїдних фолікулах гермінативні центри взагалі були відсутні. Повне їх зникнення спостерігали після введення дексаметазону в максимальній терапевтичній дозі. Наявні ділянки з порушенням нормальної цитоархітектоніки білої пульпи. Відмічали значне зменшення розмірів маргінальної зони. Червона пульпа містила незначну кількість клітин і широкі венозні синуси. Зазначені зміни свідчать про розвиток атрофічних змін в селезінці за умов застосування даних препаратів [123].

Надзвичайно активними в наш час є дослідження впливу наночастинок різних металів на структуру і функції органів імунної системи. Згідно даних літератури, однією зі сполук, що має широке використання, як в побутових, так і промислових умовах є ZnO . Вважають, що серед патологічних механізмів, через які наночастинки ZnO реалізують ефекти на організм головними є ОС, запалення, фіброз, пошкодження структури ДНК [106]. Науковцями встановлено, що надмірне надходження ZnO до організму призводить до значних морфологічних змін структури селезінки. Зокрема, виявляють потовщення її капсули і трабекул, зменшення компартментів білої пульпи, розширення відділів, набряк та застійні явища червоної. Остання містила гемосидеринвмісні включення та мегакаріоцити. Біла пульпа характеризувалась наявністю незначної кількості лімфоцитів, зосереджених навколо центральних артеріол. Спленоцити мали вакуолізовану цитоплазму та темно забарвлені ядра [17].

Дослідження останніх років доводять, що вплив стресорів різного походження змінює кількість або активність популяцій імунних клітин

селезінки. Так, за умов хронічного стресу знижується чисельність Т-кілерів, активується диференціація клітин, що беруть участь в ініціюванні та прогресуванні багатьох аутоімунних захворювань [66]. Встановлено, що вплив світлового стресу протягом 6 місяців асоціюється зі змінами структурної організації селезінки щурів. Капсула її і трабекули потовщуються, зростає вміст грубої сполучної тканини, яка при фарбуванні за ван Гізоном є фуксинофільною. Біла пульпа характеризується наявністю мілких, неправильної форми лімфоїдних фолікулів. Спостерігається зниження щільності клітинних елементів в Т- і В-зонах. Науковці пояснюють дані зміни пригніченням проліферації та диференціації лімфоцитів, їх загибеллю. Характерною є наявність лімфоїдних фолікулів, що не мають В-зони. Центральні артерії володіють ознаками периваскулярного склерозу, подекуди просвіт їх звужений. Червона пульпа містить значну кількість зруйнованих еритроцитів та накопичення гемосидерину [15].

Селезінка бере активну участь в усуненні наслідків термічної травми. Будучи найбільшим периферійним органом імуногенезу, вона здатна регулювати ефективність клітинної та гуморальної імунної відповіді в умовах пошкодження та дисфункції. Оскільки при опіковій хворобі селезінка забезпечує знешкодження ендотоксинів і нерозчинних компонентів клітинного детриту, структура її за даних умов зазнає виражених змін. В ранні терміни після опіків шкіри остання важко візуалізується при морфологічних дослідженнях. Спостерігається набряк паренхіми білої та червоної пульпи. В білій пульпі загальна кількість та діаметр лімфоїдних вузликів, піхв збільшується. Характерною є відсутність світлих зон в багатьох реактивних центрах. Темні зони містять скупчені групи лімфоцитів, подекуди між ними визначаються ділянки некрозів. Ті світлі зони, які зустрічаються в реактивних центрах мають невеликі розміри, містять лімфоцити різного ступеня диференціації. Стінки синусоїдних капілярів маргінальних зон є набряклими, а просвіт їх звужений. Також в маргінальних зонах виявляються макрофаги і лімфоцити. Червона пульпа містить значну кількість зруйнованих

еритроцитів. В пізні терміни після опіку шкіри (14, 21, 30 доба) виявляли повнокрів'я в червоній пульпі, зменшення кількості клітин в тяжах Більрота, вогнища активного екстрамедулярного гемопоезу. Біла пульпа характеризується атрофією, зниженням цитогенності в періартеріальних ділянках. Фолікули не мають світлих центрів. Визначальними були явища диспротейнозу. Також на 21 добу збільшувались розміри лімфоїдних вузликів. При цьому одні з них не мали світлого центру, а в інших він був присутній, в якому визначались макрофаги та лімфоцити. Останні мали різний ступінь диференціації. На 30 добу виявляли гіперплазію білої пульпи, а в ПАЛМ значно зростала кількість Т-лімфоцитів [5].

Імунна система відіграє важливу роль в реакції організму на чисельні фактори середовища, що впливають на нормальний перебіг фізіологічних процесів. Будь-які зміни гомеостазу супроводжуються імунною відповіддю. Згідно даних літератури остання індукується і у випадку укусів отруйних тварин, в точу числі змій. Встановлено, що їх токсини здатні активувати II тип імунної відповіді, однак, як демонструють дослідження останніх років, особливості патогенезу взаємодії даної системи організму та отрути гадюк є значно складнішими [44, 84]. Враховуючи велике різноманіття ферментів та неферментних компонентів в її складі, зовсім не дивує той факт, що наслідком є розвиток вираженого запального процесу. Механізми його і досі вивчаються. Однак головними учасниками виступають PLA₂ та SVMР [72]. Висока активність PLA₂ в отруті змій підтримує на значному рівні концентрацію арахідонової кислоти та асоційованих з нею цитокінів [38, 192]. Також вплив токсинів запускає продукцію IL-6, TNF-α, IL-1, хемокінів, ліпідних медіаторів, створюючи умови для активації і міграції лейкоцитів. Ліпідні медіатори (простагландини, лейкотрієни, тромбосани) супроводжують запальний процес, проявляючи різноманітні патологічні ефекти (набряк, біль). Доведеним є той факт, що токсини змій здатні активувати ендогенні PLA₂. Останні чинять вплив на ріанодинові рецептори, активують протеїнкіназу C,

вивільнення Ca^{2+} і, таким чином, формують стійку гуморальну імунну відповідь.

Отрута гадюк проявляє виражений вплив на клітинну та гуморальну імунну відповідь. Токсини, що отримані від виду *Naja naja atra* у мишей з нормальним імунітетом підвищували активність NK-клітин та проліферацію В-лімфоцитів. Також в даній групі тварин вони пригнічували реакцію гіперчутливості уповільненого типу, викликану динітрофторбензолом і інгібували проліферацію Т-лімфоцитів, стимульовану конкаваліном А. У мишей з помірно вираженими імунодефіцитними станами введення отрути даного виду гадюк зумовлювало зростання рівнів Ig G та Ig M і відновлення гермінативних центрів в селезінці. Крім того, в клітинах селезінки, досліджених методом проточної цитометрії, спостерігали селективне підвищення рівнів Th1, Th2, IFN- γ , IL-4 та зниження IL-17 [92, 186].

За даними наукових джерел, PLA₂ отрути змій активує інфламасоми. Останні являють собою мультипротеїнові комплекси, що розміщені в цитоплазмі імунних клітин. Вони здатні розпізнавати та реагувати на інфекційні агенти, пошкодження, тощо. Одними з найбільш досліджених є інфламасоми NLRP3 (нуклеотидний олігомерний домен, багатий лейцином протеїн). У випадку взаємодії PLA₂, в якій каталітичний домен містить лізин (в позиції 49) замість аспартату і є характерним для отрути змій *Bothrops jararacussu* з клітинними мембранами, відбувається активація NLRP3, що стає причиною формування інфламасомного комплексу. Активована NLRP3 сприяє взаємодії прокаспаз-1 з ASC (апоптоз-асоційований цитозольний адаптерний білок). Даний процес призводить до формування каспази-1, вивільнення IL-1 β та запуску процесу апоптозу [39].

Таким чином, склад отрути змій та особливості її впливу на організм людини є досить різноманітними. Переважання того, чи іншого компоненту токсину стає визначальним для появи ускладнень чи навіть смерті. Не зважаючи на достатньо ґрунтовні і масштабні дослідження науковців світу, досі не встановленими є окремі складові елементи токсинів змій, особливості

їх дії та патогенез ураження внутрішніх органів. Зокрема, механізми пошкодження серця та селезінки за даних умов розкриті не в повній мірі і не надають інформації щодо особливостей морфологічних змін органів на світлооптичному та субмікроскопічному рівнях. Крім того, дані про вплив токсинів гадюк *V. berus berus* та *V. berus nikolskii* на структуру та функції серцево-судинної і імунної систем на даний момент повністю відсутні. Тому дослідження даного питання з метою ранньої діагностики, попередження ускладнень та можливостей покращення методів лікування є актуальною задачею.

РОЗДІЛ 2

ЗАГАЛЬНА МЕТОДИКА Й ОСНОВНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Загальна методика і об'єкти дослідження

Експериментальне дослідження виконане з дотриманням міжнародних рекомендацій про проведення медично-біологічних досліджень з використанням тварин згідно з «Загальними принципами роботи на тваринах», затвердженими I Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001) і погоджене з положеннями «Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, Франція, 1986). Дотримання етичних принципів роботи засвідчено комітетом з біоетики Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова (протокол № 7 від 27.05.2024 та протокол № 5 від 16.04.2025).

Тварин утримували в умовах віварію на стандартному харчовому раціоні в індивідуальних клітках. До введення досліджуваних речовин експериментальні тварини протягом не менше 5 днів проходили акліматизацію в умовах кімнати для проведення досліджень.

Щурі були поділені на 3 групи (табл. 2.1):

1 – контрольна (внутрішньоочеревинно вводили фізіологічний розчин в об'ємі 0,5 мл).

2 – щурам внутрішньоочеревинно вводили отруту гадюки *Vipera berus berus* в дозі ED₅₀ 1,576 мкг/г.

3 – щурам внутрішньоочеревинно вводили отруту гадюки *Vipera berus nikolskii* ED₅₀ 0,972 мкг/г.

Вибір дози був обумовлений попередніми дослідженнями в яких було чітко встановлені токсичні дози отрут звичайних гадюк *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii*.

Таблиця 2.1

Розподіл щурів за групами експерименту

Група	Кількість тварин	Речовини, які вводили тваринам
Контроль	n=10	NaCl в об'ємі 0,5 мл
Дослід	підгрупа 1 (n=20)	отрута гадюки <i>Vipera berus berus</i> в дозі ED ₅₀ 1,576 мкг/г
	підгрупа 2 (n=20)	отрута гадюки <i>Vipera berus nikolskii</i> ED ₅₀ 0,972 мкг/г

Через 24 години тварин умертвляли за допомогою декапітації. Далі проводили їх розтин і здійснювали макроскопічні обстеження і опис внутрішніх органів. Всі виявлені патологічні зміни реєструвалися і підлягали подальшому біохімічному, гістологічному та гістохімічному дослідженню.

2.2. Методи дослідження**2.2.1. Біохімічні і лабораторні.**

Реактиви та обладнання. В роботі були використані такі реактиви: казеїн, 0,05 М фосфатний буфер (pH 7.4), трихлороцтова кислота, ЕДТА, тріс(3-гідроксиметиламіноетан), гліцин, хлорид натрію, спирт етиловий 96 %, бета-меркаптоетанол, акриламід, N,N'-метилен-біс-акриламід, персульфат амонію, TEMED, додецилсульфат натрію (ДСН), LMW маркери молекулярної маси білків для електрофорезу, барвник Coomassie Brilliant Blue G-250, льодяна оцтова кислота. Решта хімічних реактивів (солі, кислоти, луги) була кваліфікації «чда» та «хч».

При проведенні досліджень використовували наступне обладнання: апарат для препаративного вертикального диск-електорофорезу (BioRad, США), центрифуга CM-6M «ELMI»; центрифуга Allegra 64R «Beckman Coulter»; мікропланшетний рідер виробництва фірми «BioTec» США; спектрофотометр «Smart Spec Plus» виробництва фірми «BioRad», США; автоматичні піпетки та дозатори «Humapette»; магнітні мішалки, піпетки автоматичні, термостати і т.д. є продукцією фірм, що працюють згідно стандарту ISO 9001; пластиковий лабораторний посуд (планшети для імуноферментного аналізу; планшети з несорбуючою поверхнею; еппендорфи, пробірки та інше отримано від фірми Sente-Lab; скляний лабораторний посуд (колби, стакани, пробірки, циліндри та інше) фірми Simax.

Отримання гомогенату тканин щурів.

Всі операції в період виділення проводили при температурі 1-4 °C.

Для отримання гомогенату досліджуваних тканин, їх швидко вилучали, поміщали у чашку Петрі і промивали 0,9 % NaCl. Зважували 0,5 г органу, подрібнювали ножицями, переносили в скляний гомогенізатор та гомогенізували в 50 mM трис-HCl-буфері (1 mM EDTA та 0,1 M трис-HCl, pH 7,4), у співвідношенні 1:10 (тканина : буфер). Час гомогенізації тривав 15 хв. Гомогенат центрифугували 20 хвилин при 2500 об/хв. Отриманий супернатант використовували для подальших.

Кількісне визначення білку.

Кількість білку визначали за методом Bradford [43]. Даний метод ґрунтується на здатності барвника Кумасі діамантово-синього G-250 змінювати забарвлення при зв'язуванні з білком, при цьому максимум поглинання зміщується відповідно з 465 до 595 нм. За таких умов концентрація барвника, що зв'язалась з білком прямопропорційна кількості білку в пробі.

Для визначення концентрації білка до проби додавали 30 % розчин NaOH, дистильовану воду та робочий розчин реактиву Бредфорд. Для

приготування робочого розчину змішували стоковий розчин реактиву, 95% етанол та 88 % ортофосфорну кислоту за співвідношення 2:1:2 та доводили водою до об'єму 100 мл. Стоковий розчин містив 10 мл 95 % етанолу, 20 мл 88 % ортофосфорної кислоти та 35 мг кумасі діамантового синього. Інтенсивність забарвлення, яке утворювалось через 2-5 хв, вимірювали спектрофотометрично при довжині хвилі 595 нм проти контролю, який замість проби містив дистильовану воду. Концентрацію білка у досліджуваному зразку визначали за калібрувальним графіком і виражали у мг/мл.

Приготування проб для електрофорезу.

Для одержання чіткої картини у ПААГ застосовують метод концентрування зразків за допомогою трихлороцтової кислоти (ТХО). Для цього зразки в мікропробірках змішують з 55 % ТХО у співвідношенні 1:1 і залишають на 10 хвилин. Після п'яти хвилинного центрифугування при 10 000g зливають надосадову рідину. Додають 0,5 мл ацетону на пробу і знову центрифугують. Процедуру з ацетоном повторюють 2-3 рази, після чого зразки залишають на ніч для випаровування залишків ацетону.

Після випаровування зразки розчиняють у буфері для електрофорезу, що містив 0,01 М трис-НСl буфер, рН 6,8, 2 % додецилсульфат натрію, 10 % сахарозу та 0,01 % бромфенолового синього, у співвідношенні 1:1. Для диск-електрофорезу зразки прогрівали впродовж 2 хв, у той час як проби для ензим-електрофорезу нагріванню не піддавали.

Диск-електрофорез в поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію.

Для отримання електрофореграми проводили диск-електрофорез за методом Леммлі [97]. Процедури проводилися у камері для вертикального електрофорезу Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad). Камера для вертикального електрофорезу є пластиковим резервуаром з анодними та катодними буферними відсіками, в яких містяться відповідні електроди (Bio-Rad laboratories inc., 2015). Для дослідження готували пластини гелю товщиною 1

мм, застосовували 12 % поліакриламідний гель (ПААГ) в якості гелю для розділення макромолекул, а також використовували 4 % ПААГ в якості гелю для концентрації досліджуваних зразків. Для проведення електричного струму через електроди в камері для фореку готували електродний буфер, котрий містив Tris, гліцин та додецилсульфатнатрію (ДСН).

Гель для розділення макромолекул (12 % ПААГ) вносили між двома зафіксованими в положенні скельцями, котрі були зафіксовані бортами знизу та по бокам. Після внесення гелю очікували 1 год до повної полімеризації останнього. Зразки, котрі містять білки поміщали у лунки, сформовані в ПААГ для концентрації, котрий вносили над гелем для розділення, в якому вже відбулась полімеризація. Електроди камери для вертикального електрофорезу (матеріал – платина) підключали до гнізда джерела живлення PowerPac Basic Power Supply (Bio-Rad). При проведенні досліду застосовували силу струму 19 мА в в час проходження білкового вмісту зразків через гель для концентрації. В фазі проходження білкового вмісту зразків через гель для розділення – застосовували силу струму 38 мА (Bio-Rad laboratories inc., 2015).

По проходженню вищеописаних процедур, отриманий гель забарвлювали розчином кумасі G-250 (0,125 %), котрий містить 96 % етанол, ізопропанол, а також концентровану оцтову кислоту. Після забарвлення, пластину гелю промивали в 8 % розчині оцтової кислоти протягом години. За допомогою камери CANON IXUS 185 фотографували в цифровому форматі. За допомогою програмного забезпечення від лабораторії TotalLab - CLIQS Gel Image Analysis Software аналізували досліджувані зразки.

Ензим-електрофорез.

Розділяючий гель полімеризували за присутності желатину, фібриногену та колагену з розрахунку 1 мг/мл. Концентрація розділяючого гелю становила 12 %. Розділення зразків проводили за сили струму 19 мА.

Кінцевим етапом було відмивання гелів у 2,5 % розчині тритону X-100 протягом години для видалення залишків ДСН. Після цього гелі заливали

0,05 М трис-НСІ буфером, рН 7,4, що містив 0,13 М NaCl, та інкубували протягом 12 годин. Фарбування та фіксацію гелів здійснювали відповідно до стандартного протоколу проведення електрофорезу (розділ «Диск-електрофорез в поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію»). Проби попередньо не прогрівали за для попередження втрати білками ферментативної активності.

Виділення та характеристика плазміногена.

Глу-плазміноген людини виділяли із цитратної плазми донорської крові методом афінної хроматографії на лізин-сефарозі. Перевагою цього методу є зручність роботи, висока відтворюваність результатів і забезпечення необхідної чистоти та нативності білка. Також цей метод дозволяє одержувати препарати плазміногена позбавлені чи з дуже низькою спонтанною активністю.

Для одержання цитратної плазми до крові додавали консервант: на 1 л крові – 100 мл розчину, що містить 3,8 % цитрату Na, 50 мМ ЕДТА, 50 мМ фосфатного буферу рН 7,4. Для видалення формених елементів кров центрифугували на центрифугі РС-6 при 2,5 тис. об/хв. протягом 40 хв.

Всі операції проводили при температурі 4 °С. Одержану плазму розбавляли у 2 рази 0,1 М фосфатним буфером рН 7,4, додавали контрикал з розрахунку 10 тис. од. на 1 л плазми. Колонку врівноважували 0,05 М фосфатним буфером, рН 7,4. Розчин плазми наносили зі швидкістю 30 мл/год. Відмивку від неспецифічно зв'язаних білків проводили 0,05 М фосфатним буфером, рН 7,4 з 0,25 М NaCl до поглинання E_{280} менше 0,01. Елюювали 0,2 М ϵ -АКК в 0,05 М фосфатному буфері, рН 7,4 зі швидкістю 40-50 мл/год. Об'єднували фракції з концентрацією білка вище за 0,05 мг/мл. Для подальшої очистки препарат, отриманий методом афінної хроматографії, висолювали $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ з розрахунку 0,41 г на 1 мл елюату. Центрифугували (на центрифугі РС-6 при 2,5 тис. об/хв, 40 хв), осад розчиняли в 0,05 М фосфатному буфері, рН 7,4 та обробляли протягом 2 годин 5 мМ ДФФ при кімнатній температурі,

з метою інгібування спонтанної активності домішкового плазміну. Потому проводили гель-фільтрацію на сефакрилі S-200. Отриманий таким чином препарат плазміногена зберігали при -20°C .

Чистоту одержаного препарату контролювали методом диск-електрофорезу у 10 % ПААГ з ДС-Na. На електрофореграммі з зразком у відновлених умовах виявилась одна смуга, яка відповідає молекулярній масі плазміногена – 92 кДа (рис. 2.1). Для встановлення форми отриманого препарату плазміногена було проведено електрофорез у 10 % ПААГ з оцтовою кислотою та сечовиною за рН 3,2 (див. рис. 2.1). Це дозволило стверджувати, що отриманий препарат є Глу-формою плазміногена.

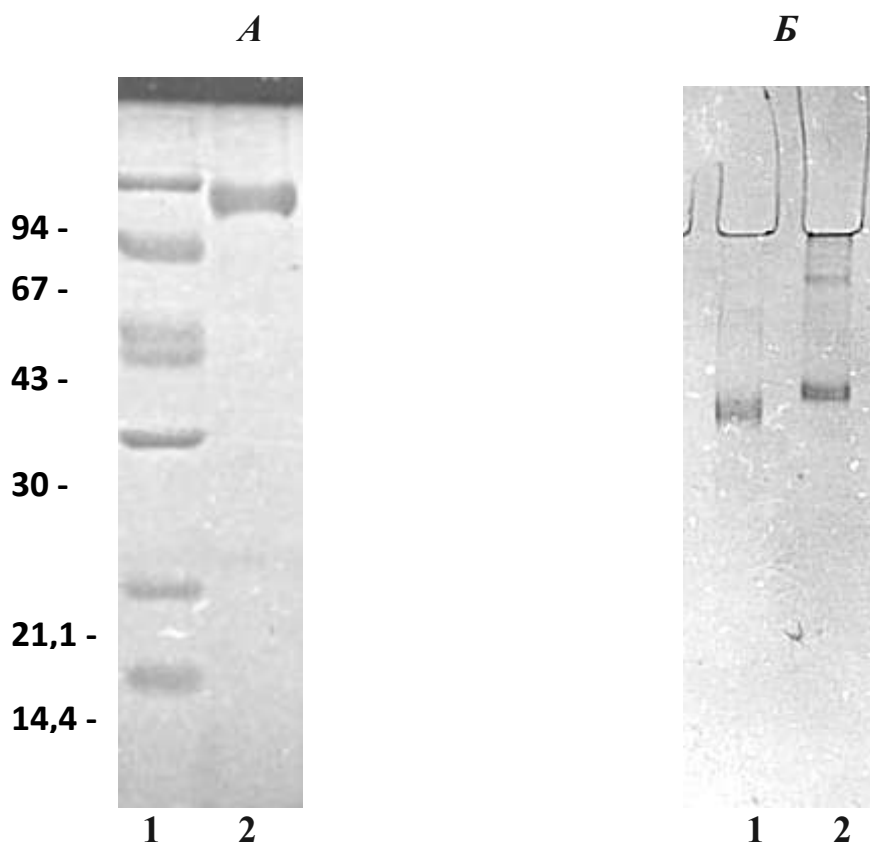


Рис. 2.1. *А* – Електрофореграма препаратів Пг в 8 % ДС-Na-ПААГ за присутності β -меркаптоетанолу: 1 – білкові маркери (94, 67, 43, 30, 21,1; 14,4 кДа), 2 – Пг людини. *Б* – Електрофореграма препаратів 1 – Ліз-Пг, 2 – Глу-Пг в 10% ДС-Na-ПААГ рН 3,2.

Визначення протеолітичної активності отриманого препарату Глу-плазміногена показало, що вона складає 18 казеїнолітичних одиниць/мг білку [175]. В разі інкубації отриманого плазміногена протягом 6 годин з хромогенним субстратом S₂₂₅₁ спонтанної активності у препараті не виявлено.

Одержання плазміну.

Для активації плазміногена до плазміну було обрано метод з використанням іммобілізованої урокінази. Використання іммобілізованого активатора, завдяки його багаторазовості, значно спрощує та здешевлює методику. Окрім того, за такого підходу не потрібна додаткова очистка одержаного препарату плазміну від домішок активатора чи активаційних комплексів.

Плазмін одержували з препаратів Глу-плазміногена за стандартною методикою з використанням іммобілізованої на BrCN-сефарозі 4В урокінази. Плазміноген інкубували з іммобілізованою урокіназою протягом 1 години при температурі 37 °C у 0,05 М трис-HCl буфері, рН 7,4 з вмістом 0,15 М NaCl, 25 % гліцерину. Зберігали препарат плазміну в гліцерині, розведеному до концентрації від 25 % до 50 %, при температурі -18 °C.

Виділення та характеристика фібриногену.

Фібриноген виділяли з оксалатної плазми крові людини шляхом висолювання сульфатом натрію. Фібриноген очищали від домішок плазміногена, обробляючи розчином лізину з наступним спиртовим переосадженням білка, чи афінною хроматографією на лізин-сефарозі. Вміст фібриногену, що згортався під дією тромбіну, становив 96-98 %.

Препарати фібриногену були електрофоретично гомогенними за даними електрофорезу у 10 % ПААГ (рис. 2.2). Одержані препарати зберігали при -20 °C.

Визначення кількості молекул середньої молекулярної маси.

Для отримання фракції молекул середньої молекулярної маси, а також визначення їх вмісту в тканині використовували метод за Ніколайчиком [131].

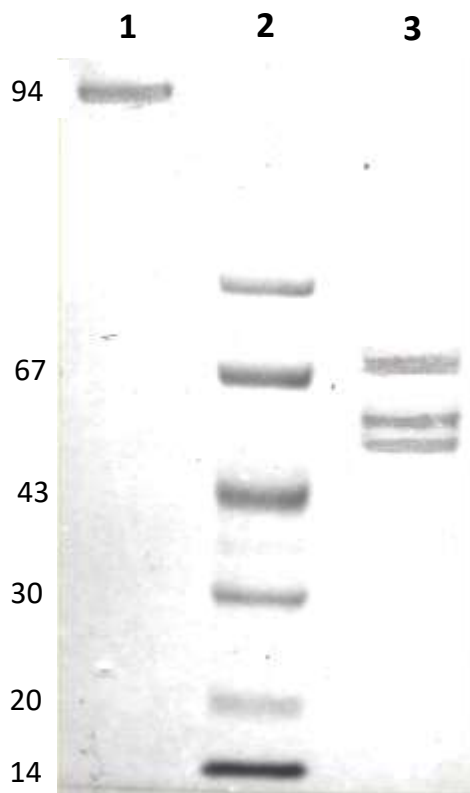


Рис. 2.2. Електрофореграма препаратів фібриногену. 1 – ФГ людини за відсутності відновлюючого агента β -меркаптоетанолу; 2 – молекулярні білкові маркери; 3 – ФГ людини за присутності відновлюючого агента β -меркаптоетанолу.

При проведенні дослідів, всі маніпуляції проводилися на льоду, та на кожному кроці проводилася інкубація впродовж 15 хв. Високомолекулярні комплекси в біологічних матеріалах осаджували застосуванням 1,2 М HClO_4 (співвідношення 1:1), на наступному етапі центрифугували при 5000 g впродовж 20 хвилин. Надосад нейтралізували застосуванням 5М КОН до рН 7,0, а потім суміш знову центрифугували, але вже при 2500 g впродовж 20 хвилин. Потім вносили етанол до фінальної концентрації 80 %, та знову центрифугували при наступних умовах: 2500 g, 15 хвилин. Далі проводили вимірювання оптичної щільності на спектрофотометрі при довжині хвилі 210, 238, 254 нм. Довжини хвиль, на яких вимірювали оптичну густину

використовуються для дослідження пептидів: 210 нм – це є максимумом поглинання пептидних зв'язків, 238 нм – амінопептидна фракція або низькомолекулярні пептиди, 254 нм – пептидна фракція у складі молекул середньої та низької маси.

Отримання фракції пептидного пулу плазми крові.

Виділення пептидного пулу проводилося за методом Ніколайчик [131]. Всі операції проводилися на льоду. Після кожної маніпуляції пробі витримували протягом 15 хв.

Плазму розморожували прогріванням на водяній бані (37 °C) протягом 20 хв, після чого розмішували обережним перевертанням пробірки та негайно поміщали на лід. Плазму осаджували у співвідношенні 1:1 1,2 М HClO_4 і центрифугували 15 хв за 10 тис. обертів/хв. На наступному етапі надоосадову рідину нейтралізували 5 Н КОН до рН 7,0. Суміш перемішували і центрифугували протягом 15 хв за 10 тис. обертів/хв. Надоосадову рідину переносили в мікропробірки і додавали у співвідношенні 1:5 96 % етиловий спирт і центрифугували протягом 15 хв за 10 тис. обертів/хв.

Очищення пептидного зразка від високомолекулярної фракції білків.

Для очищення розчиненого зразка пептидного пулу від залишків високомолекулярних білків використовували білкові концентратори – ультрафільтраційні пристрої для центрифугування з полієфірсульфоною мембраною, що застосовуються для відділення молекул менше 10 кДа і можуть бути застосовані для зразків від 5 до 20 мл. Центрифугували зразок пептидного пулу протягом 40 хв при 2000 обертів/хв.

Діаліз.

Пептидні зразки були розчинені у 0,1 % розчині фосфатної кислоти або у буферному розчині Б, що можуть перешкоджати електрофоретичному аналізу та подальшому дослідженню пептидів. Для переведення пептидних зразків у воду проводили діаліз. Метод базується на здатності низькомолекулярних речовин проходити через напівпроникну мембрану на

відміну від пептидів та високомолекулярних білків. Використовують діалізну мембрану, яка є полімером і має пори певної величини.

Для діалізу використовували напівпроникні мембрани SERVAPOR® з розміром пор 25 Å, через які пептиди не дифундували і залишалися всередині діалізного мішку. Молекули з меншим розміром проходили через пори діалізної мембрани і переходили у діалізат. Діаліз провидили проти води протягом 24 год, воду змінювали двічі.

Ліофілізація.

Пептидні зразки після діалізу заморожували при -20 °C перед проведенням ліофільного висушування. Проводили висушування зразків в замороженому стані під вакуумом, при цьому вода видаляється із заморожених об'єктів шляхом сублімації льоду, тобто перетворення його на пару, минаючи рідку фазу. Ліофільне висушування проводили протягом 6 год.

Статистична обробка результатів

Статистичну обробку отриманих результатів досліджень проводили, використовуючи комп'ютерні програми Origin 7.0, TotalLab 2.01. та Microsoft Excel. Достовірними вважали відмінності при $p < 0,05$.

2.2.2. Гістологічні.

Для мікроскопічного дослідження забирали шматочки серця та селезінки у попередньо зважених тварин всіх груп. Шматочки фіксували в 10 % розчині формаліну, при цьому тривалість експозиції не перевищувала 1 – 2 доби. Застосований фіксуючий розчин запобігає процесу аутолізу та стабілізує клітини і тканини для їх подальшої обробки, та використання в процедурах забарвлення. Далі проводили дегідратацію шматочків в спиртах зростаючої концентрації та заливали в парафінові блоки. Виготовлені зрізи, товщиною 4 – 5 мкм забарвлювали гематоксиліном і еозином, метиленовим-синім та проводили імпрегнацію сріблом за методом Гордона-Світса (для виявлення базальних мембран, ретикулярних та незрілих колагенових

волокон). Гістологічні препарати вивчали за допомогою світлового мікроскопа SEO SCAN та фотодокументували за допомогою відеокамери Vision CCD Camera з системою виводу зображення з гістологічних препаратів.

2.2.3. Морфометричні.

Проведено порівняння абсолютних і відносних змінних, які вимірялись і підраховувались відповідно, за допомогою програми Fiji:ImageJ, між контрольною та обома експериментальними групами, що піддавались дії отрут гадюк *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii*. Статистична обробка з подальшою побудовою графіків для візуалізації одержаних результатів проводилась у програмі Excel.

1. Проведено вимірювання ширини кардіоміоцитів у складі міокарду. Для підвищення точності вимірювань, ширину м'язових клітин серця (збільшення $\times 1000$); ширину волокон вимірювали у мкм і порівнювали між трьома групами щурів, в кожній з яких проводили вимірювання ширини 4 випадкових волокон у 20 різних полях зору (по 80 вимірів для контрольної та обох експериментальних груп). Для вірного встановлення співвідношення між точками цифрового зображення та мікрометрами, при фотографуванні на зображення наносилась мірна шкала на 0,01 мм.

2. Проведено вимірювання співвідношення площі ендомізію, присутнього між волокнами міокарда, до власне площі самих волокон (препарати, забарвлені за Пікросіріус Ред; збільшення $\times 1000$). Площа ендомізію вимірювалась у мкм², також за допомогою програми Fiji:ImageJ вираховувався і відсоток площі, яку займає сполучнотканинний елемент відносно всієї площі препарату.

3. Проведено порівняння співвідношення площ білої та червоної пульпи у селезінках щурів з трьох досліджуваних груп (оцінка проводилась на 8 цифрових зображеннях, одержаних від 4 тварин з кожної з трьох груп, зі світлового мікроскопа на збільшеннях $\times 200$ і $\times 400$). Для вірного встановлення

співвідношення між точками цифрового зображення та мікрометрами, при фотографуванні на зображення наносились мірні шкали на 0,1 і 0,05 мм.

4. Підраховано кількість макрофагів, що містять у собі включення пігменту ліпофусцину за допомогою плагіну “Cell counter” (цифрові зображення препаратів з забарвленням гематоксиліном-еозином для точної верифікації наявності включень ліпофусцину саме у макрофагах). Обробляли по 5 цифрових зображень від кожної з чотирьох тварин в трьох групах (контрольній та двох експериментальних) на збільшенні $\times 1000$ (відповідно мали по 20 цифрових зображень на кожну з груп, що підвищувало статистичну достовірність вимірів).

РОЗДІЛ 3

БІОХІМІЧНІ ЗМІНИ СЕРЦЯ ТА СЕЛЕЗІНКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ВПЛИВУ ОТРУТИ ГАДЮК ВИДУ *VIPERA BERUS*

Члени родини *Viperidae* спричиняють більшість укусів змії у всьому світі, демонструючи статус одних із найотруйніших гадюк [46, 103, 161, 176]. 374 різні види належать до родини, в межах якої можна виділити три підродини: *Azemiopinae* (2 види) і *Crotalinae* (271 вид) – «ямкоголові гадюки» та *Viperinae* (101 вид) – «справжні гадюки» (дані взяті з www.reptile-database.org).

Наслідки укусів змії цієї родини різняться, залежно від молекулярного вмісту отрути кожної гадюки. Сполуки, присутні в отрутах, мають великий вплив на механізм дії, що призводить до різних токсичних проявів і змін біохімічних шляхів в уражених організмах. Це підтверджує необхідність та важливість розуміння ролі кожної сполуки отрути [73].

Загалом, отрута гадюк складається з дуже складної суміші ферментних і неферментних білкових молекул, пептидів і сполук з низькою молекулярною масою, функціональне призначення яких є іммобілізація жертви та початкове перетравлення ураженого організму [103, 176, 60, 37]. Останнім часом зафіксовано значний прорив у сфері ідентифікації вмісту отрут на основі нових омічних підходів, що дозволило розрізнити молекулярні складові отрути гадюки [89, 124, 125, 109]. Беручи до уваги результати цих досліджень, основними токсичними молекулами, присутніми в отруті роду *Vipera*, є металопротеїназа (metalloproteinase (svMP)), фосфоліпаза A₂ (phospholipase A₂ (PLA₂)), серинова протеаза зміїної отрути (snake venom serine protease (svSP)) і лектин-споріднений білок С-типу (C-type lectin-related protein (CTL)). Однак відсотковий розподіл та присутність кожного з них відрізняється у різних видів цього роду. Вміст вторинних токсинів більш однозначний: описано, що гадюки з роду *Vipera* мають високі концентрації багатого цистеїном

секреторного білка (cysteine-rich secretory protein (CRISP)) і незначний вміст дезінтегрину (disintegrin (DI)) [6]. Крім того, в отруті гадюк виявляють інші незначних токсичних молекул [19, 60, 64, 197]. Дані молекули визначають гемолітичні, нейротоксичні, протеолітичні, ліполітичні та цитотоксичні впливи зміїного укусу разом із коагулопатією, міонекрозом, вазоконстрикцією, тахікардією та бронхоспазмом, що також можуть бути викликаними в результаті потрапляння отрути гадюк до людського організму [19, 37, 125, 112]. Ефект впливу гадюки на жертву безпосередньо залежить від токсинів, які входять до складу певної отрути. Таким чином, аналіз та прогнозування можливого впливу укусу гадюки може бути проведено, базуючись на знаннях щодо молекулярного вмісту отрути.

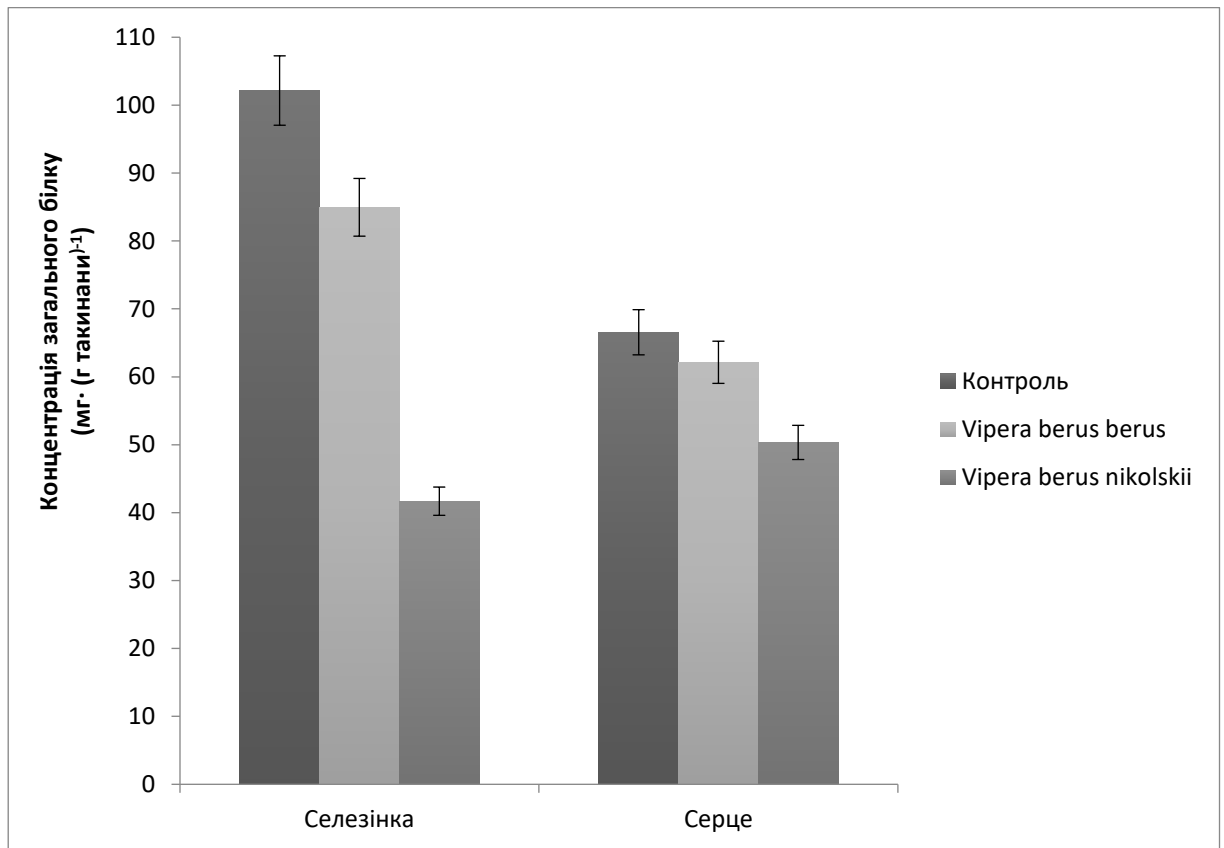
Змії роду *Vipera*, що характеризуються найбільшою поширеністю в Європі та Україні (околиці Харкова), а також Центральній і Південній Росії, Румунії та Молдові, є *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii* відповідно. Отрута даних гадюк характеризується гемо-, протео-, фосфоліпідо- та фібринолітичною дією з нейро- та цитотоксичним впливом на організм жертви [37, 45, 64, 98, 93]. Наслідком даного впливу є серйозні ураження організму, що супроводжуються станом отруєння. Основними молекулами, що є причинами отруєння внаслідок укусів *V. berus berus* є PLA_2 , svSP і svMP разом із другорядним: натрійуретичними пептидами (natriuretic peptides (NP)), аспарагінові протеази (aspartic proteases (AspP)), CRISP, CTL, оксидазами L-амінокислот (L-amino-acid oxidases (LAAO)), DI та інгібіторами протеази типу Куніца (Kunitz-type protease inhibitors (KTPi)) [13, 14, 18]. Тоді як отрута *V. berus nikolskii* характеризується високою кількістю PLA_2 і svSP і нижчим вмістом CTL, svMP і васкулярного ендотеліального фактора росту F (vascular endothelial growth factors F (VEGF)) [60, 197].

Таким чином, беручи до уваги стан отруєння, що провокується дією укусів *V. berus berus* або *V. berus nikolskii*, включаючи активацію протеолізу як одного з найважливіших процесів, що має вплив на увесь організм жертви [45, 93], можна виокремити необхідність дослідження специфічних молекулярних

змін, яких зазнає організм під впливом отрути гадюк. Основна необхідність вивчення цілеспрямованого впливу отрут на окремі органи та системи органів полягає у потребі розуміння прямого та/або опосередкованого впливу отрути на компоненти протеолітичних систем з метою розширення бази знань про патологію укусів змій задля покращення можливостей для розробки ліків, терапії та протиотрут.

Було проведено оцінку рівня загального білка в органах-мішенях – селезінці та серці – під дією отрут *V. berus berus* або *V. berus nikolskii*, і констатовано його зниження, що свідчить про негативний вплив досліджуваних отрут на білковий баланс організму (рис. 3.1). Суттєвий вплив на рівень загального білка, виміряного у мг на грам тканини-мішені, в досліджуваних органах мала отрута *V. berus nikolskii*, знижуючи його на 59 % у селезінці та на 24 % у серці (рис. 3.1). Вплив отрути *V. berus berus* на селезінку, за оцінками, знижує рівень загального білка на 17 %, тоді як кількість білка в серці лише дещо зменшується (див. рис. 3.1). Розуміючи можливість існування кількох механізмів, що лежать в основі зниження кількості білка, необхідно провести подальші дослідження, щоб підтвердити або спростувати кожне з припущень, до яких належать гіперактивація протеолітичних систем або зміни білково-синтетичних процесів у певних органах.

Перший етап визначення впливу отрути гадюк на білковий баланс селезінки та серця щурів був проведений за допомогою диск-електрофорезу в ПААГ у присутності ДСН, проводячи вимірювання якісного білкового профілю цільових органів (табл. 3.1). В обох досліджуваних органах під дією отрут *V. berus berus* і *V. berus nikolskii* було виявлено перерозподіл білкових молекул у бік зменшення молекулярної маси. Підвищена кількість білків, майже вдвічі порівняно з контрольними тканинами, і збільшення вмісту білкових фракцій в селезінці під впливом отрут обох гадюк була задекларована в діапазоні 10-35 кДа, тоді як тканини серця демонструють зниження кількості білків у цьому діапазоні, разом з тим маючи підвищений



* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Рис. 3.1. Вміст загального білка в селезінці та серці під дією отруту *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii* ($\text{мг} \cdot (\text{г тканини})^{-1}$).

відсоток білкових молекул з молекулярною масою 35-67 кДа. Крім того, у тканинах серця під впливом *V. berus nikolskii* спостерігається поява білкової фракції в діапазоні 100-150 кДа, хоча тканинам контролю не притаманна наявність білків з даною молекулярною масою.

Другим етапом аналізу, що оцінює перерозподіл білків в органах-мішенях під впливом отруту *Vipera berus berus* and *Vipera berus nikolskii*, було оцінювання змін в активних протеолітичних молекулах, що проводилося з використанням методологічного підходу – зимографії. Було проведено вимірювання специфічності білкових молекул, присутніх у тканинах контролю та у тканинах, які зазнали впливу досліджуваних отруту, щодо різних

субстратів (желатинолітична, фібриногенолітична та колагенолітична активності).

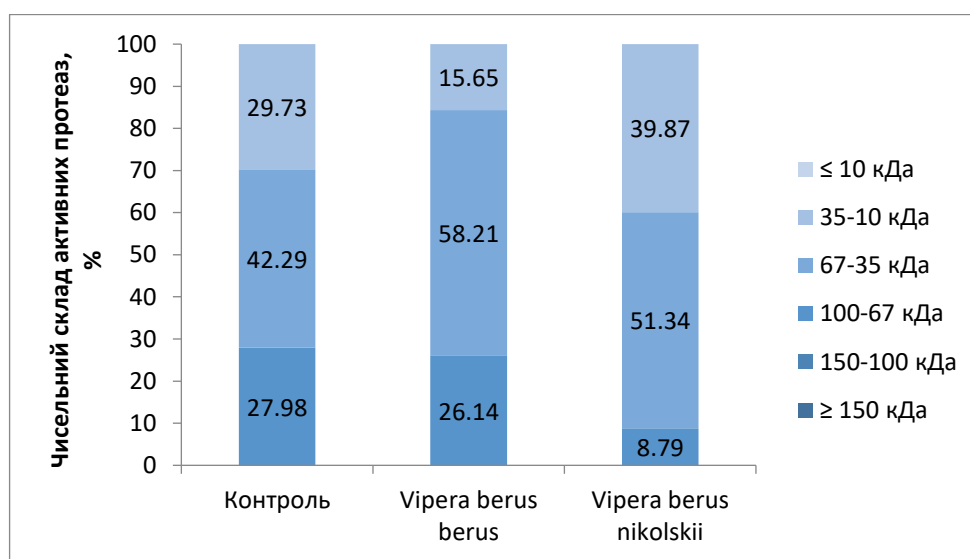
Таблиця 3.1

**Якісний склад білків у досліджуваних тканинах за дії отрут гадюк
V. berus berus і *V. berus nikolskii*.**

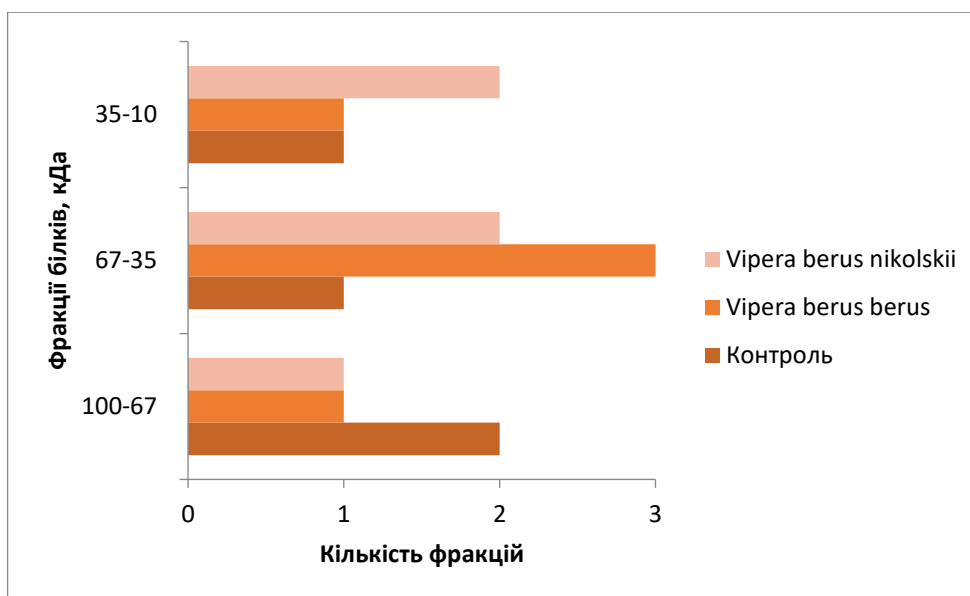
	Контроль		<i>Vipera berus berus</i>		<i>Vipera berus nikolskii</i>	
	Band, %	Кількість фракцій	Band, %	Кількість фракцій	Band, %	Кількість фракцій
Селезінка						
≥ 150 kDa	—	—	—	—	—	—
150-100 kDa	5,29	2	8,96	2	—	—
100-67 kDa	—	—	—	—	—	—
67-35 kDa	23,42	3	28,99	4	11,31	3
35-10 kDa	31,6	3	62,06	4	53,46	5
≤ 10 kDa	39,68	2	—	—	35,23	4
Серце						
150 kDa	—	—	—	—	—	—
150-100 kDa	—	—	—	—	4,35	1
100-67 kDa	5,69	1	7,66	1	5,27	2
67-35 kDa	13,26	3	27,46	1	28,33	3
35-10 kDa	49,69	4	33,89	2	21,85	1

≤ 10 kDa	31,35	4	30,99	3	40,21	1
------------------	-------	---	-------	---	-------	---

Загальну протеолітичну активність визначали з використанням желатину як субстрату. У селезінці під дією обох отрут спостерігали збільшення кількості активних протеолітичних молекул, здатних розщеплювати желатин, в діапазоні молекулярних мас 35-67 кДа, але кількість ферментів в діапазоні 67-100 кДа, навпаки, зменшується (рис. 3.2). Проте, зміни кількості ферментів, що володіють даною цільовою активністю, з молекулярною масою 10-35 кДа не такі очевидні: дія *V. berus berus* знизила цей рівень майже вдвічі, тоді як вплив *V. berus nikolskii* призвів до збільшення відсоткового вмісту даних молекул (див. рис. 3.2).



* – $p < 0,05$ порівняно з контролем



* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Рис. 3.2. Якісний склад та кількість зон активних протеаз у селезінці за дії отруту гадюки *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii* з використанням желатину.

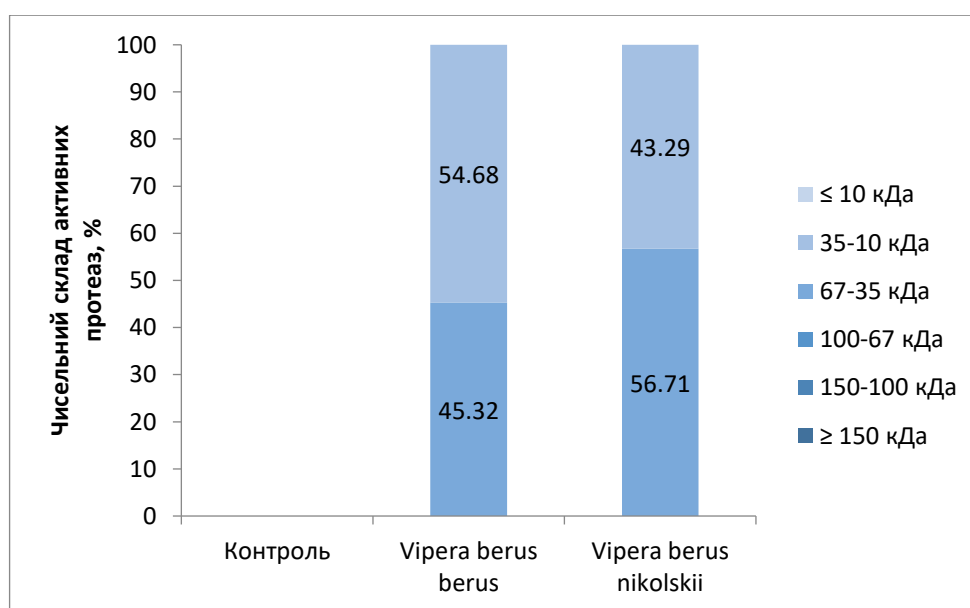
Якісний склад активних протеаз у діапазоні молекулярних мас 10-35 кДа та 35-67 кДа підвищився після впливу *V. berus nikolskii* з 1 для контролю до 2, тоді як вплив *V. berus berus* опосередкував збільшення кількості фракцій білків, що володіють здатністю розщеплювати желатин, з молекулярною масою 35-67 кДа від 1 для контролю до 3. Натомість, кількість фракцій активних протеолітичних молекул специфічних щодо желатину з молекулярною масою, що лежить в діапазоні 67-100 кДа, зменшилась під дією обох отрут (див. рис. 3.2).

Фібриногенолітична активність, що пов'язана з ферментами, присутніми у кров'яному руслі, та може бути ознакою патологічного процесу, у відсутня в тканинах контролю. Проте, як у селезінці, так і в тканинах серця під впливом отруту *V. berus berus* і *V. berus nikolskii* спостерігається поява ферментів, здатних розщеплювати фібриноген в діапазоні молекулярних мас 10-35 кДа і 35-67 кДа (рис. 3.3).

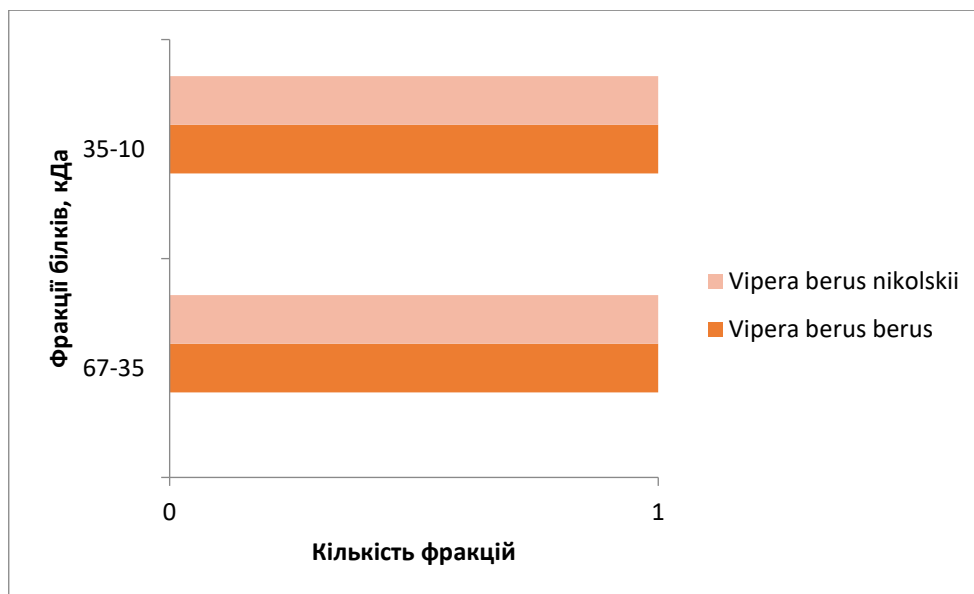
Протеолітичні молекули, що виявляють більш специфічну колагенолітичну активність, також зазнали перерозподілу. Так, рівень

ферментів, здатних розщеплювати колаген, з молекулярною масою 10-35 кДа, значно знизився після впливу *V. berus berus*, але дія *V. berus nikolskii* призвела до підвищення кількості таких молекул (рис. 3.4). Дія обох отрут гадюк призвела до збільшення кількості білків, що є специфічними щодо колагену, з молекулярною масою 67-100 кДа (див. рис. 3.4). Проте кількість протеолітичних молекул з молекулярною масою 35-67 кДа зменшилася (див. рис. 3.2С). Кількість активних протеолітичних зон змінювалась у бік зростання їх числа, порівняно з контролем, у діапазоні молекулярних мас 10-35 кДа та 67-100 кДа (див. рис. 3.4).

Проведений аналіз активності протеолітичних ферментів у серці з використанням зимографії, як методологічного підходу, на тих же субстратах стверджує аналогічний результат для тканин селезінки, що має незначну різницю в кількості фракцій активних протеаз і демонструє збільшення молекул, здатних до розщеплення желатину з молекулярною масою 67-100 кДа разом зі зниженням таких ферментів в діапазоні 35-67 кДа (рис. 3.5, 3.6, 3.7). Ці дані демонструють помітний перерозподіл активних протеолітичних молекул, порівняно з тканинами контролю, і підтверджують припущення про посилення активності протеолітичних ферментів.



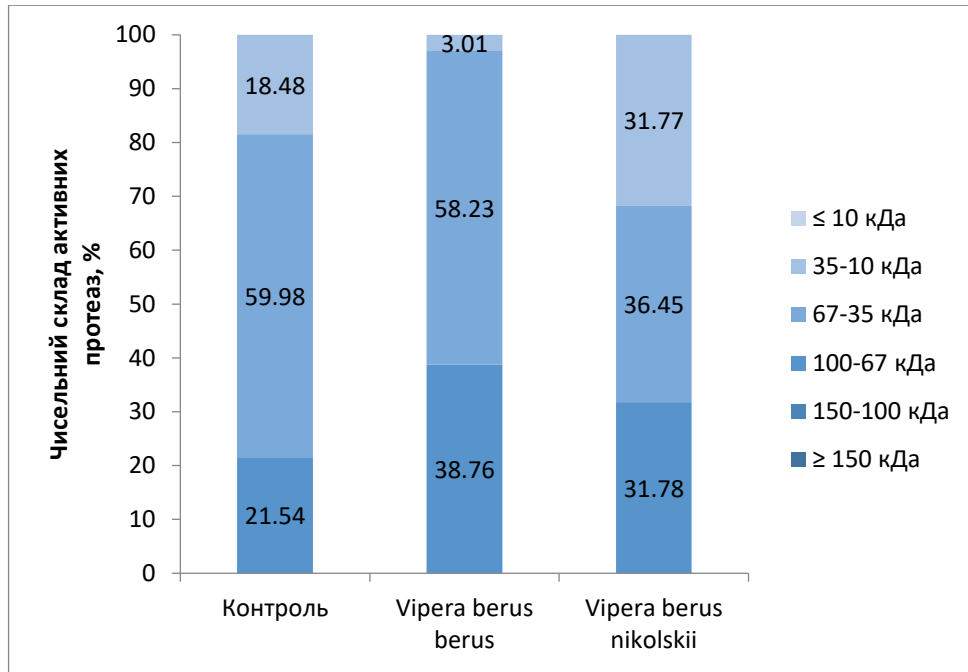
* – $p < 0,05$ порівняно з контролем



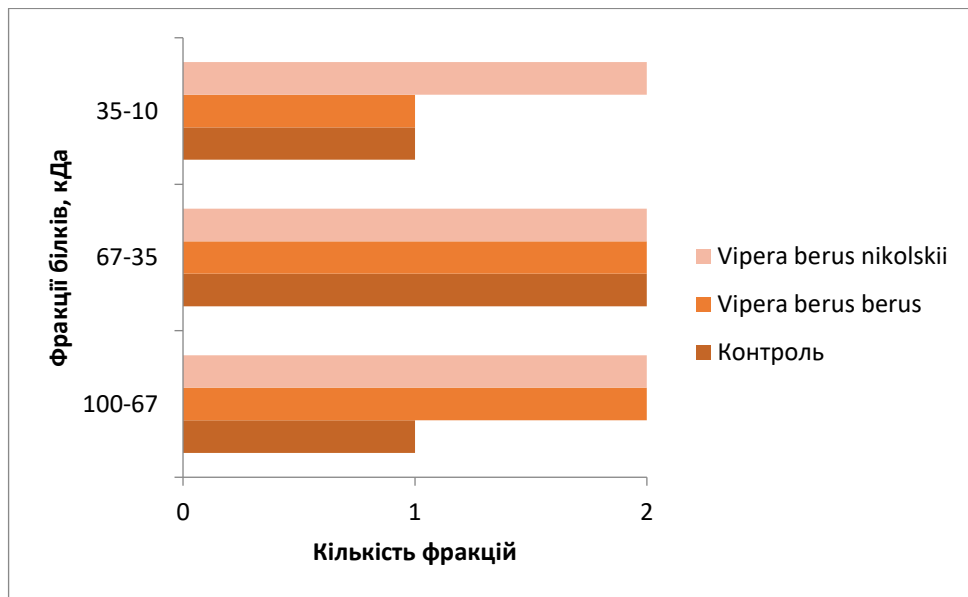
* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Рис. 3.3. Якісний склад та кількість зон активних протеаз у селезінці за дії отруту гадюки *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii* з використанням фібриногену.

Попередньо отримані дані свідчать про значні зміни білкового балансу, демонструючи зменшення загальної кількості білка та перерозподіл профілю ферментів. Такі результати показують можливість отруєння органів-мішеней під впливом отруту гадюк *V. berus berus* і *V. berus nikolskii*. Крім того, ураження органів-мішеней може призвести до внутрішньої інтоксикації, яка пов'язана з появою низькомолекулярних молекул. Спектрофотометричний аналіз цільових тканин демонструє підвищення рівня низькомолекулярних молекул в цільових органах під впливом обох отруту, таким чином, декларуючи початок внутрішньої інтоксикації в селезінці (рис. 3.8А) і серці (рис. 3.8В).

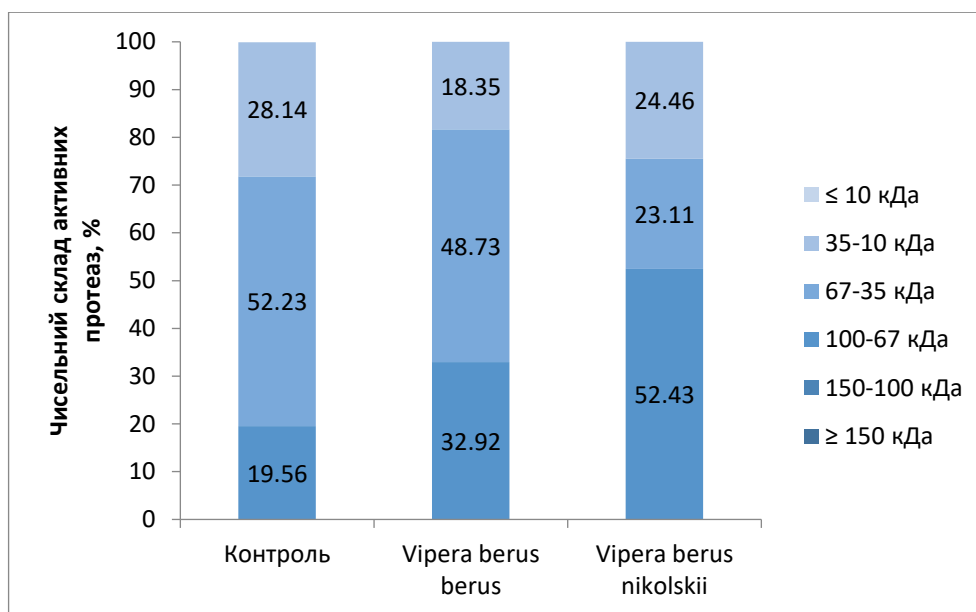


* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

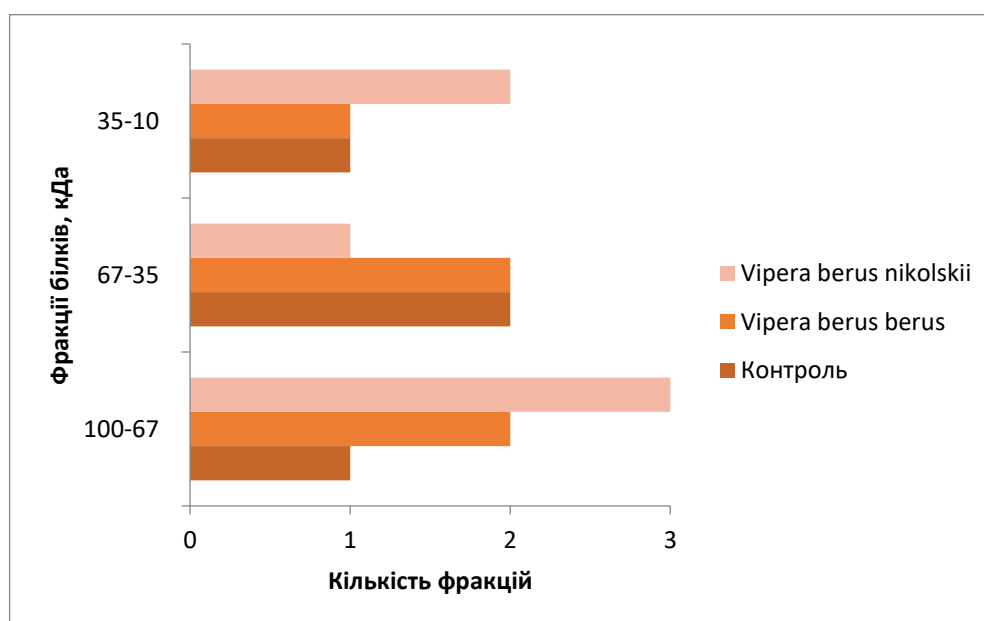


* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Рис. 3.4. Якісний склад та кількість зон активних протеаз у селезінці за дії отрут гадюки *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii* з використанням колагену.



* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

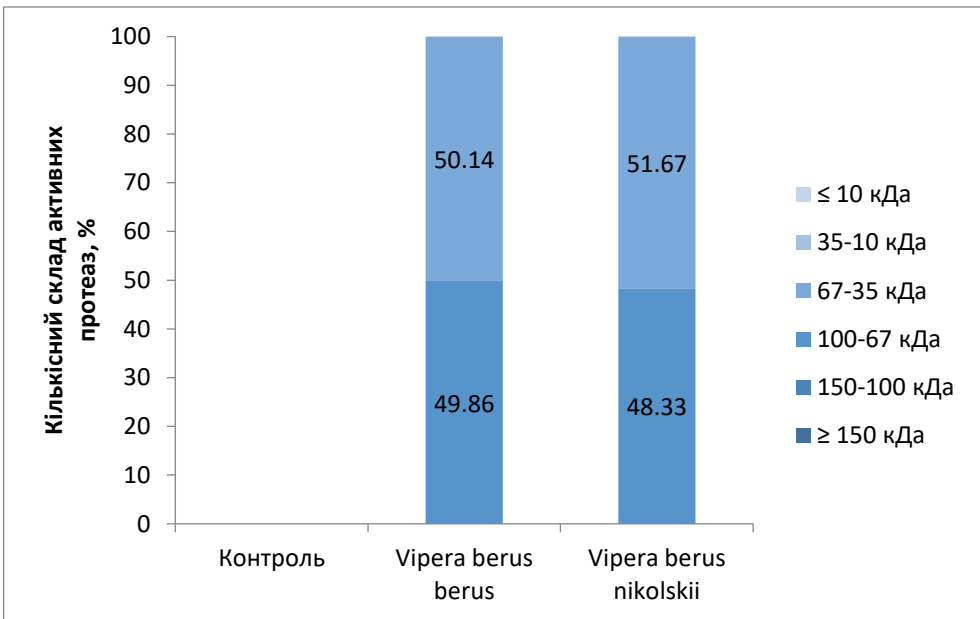


* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

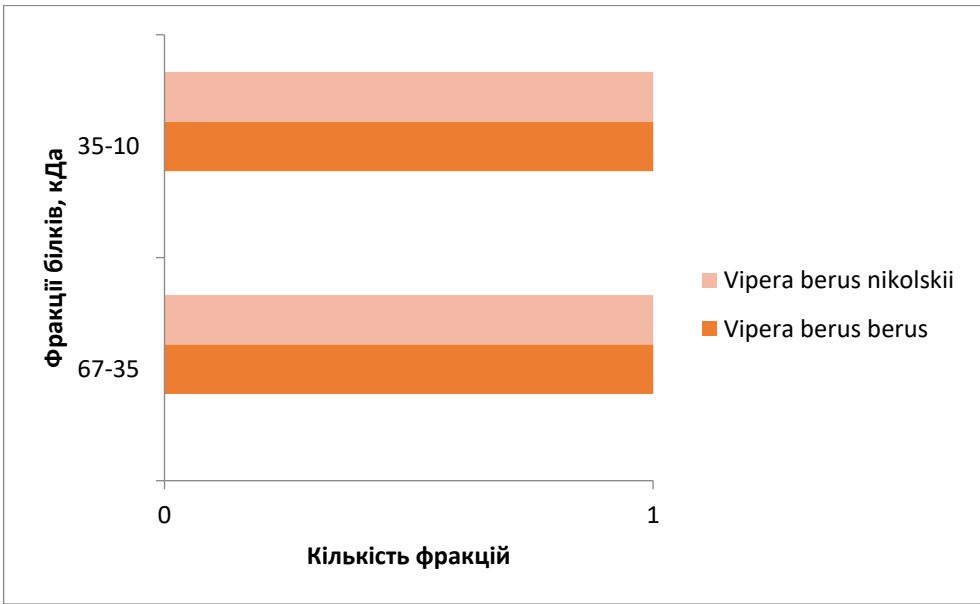
Рис. 3.5. Якісний склад та кількість зон активних протеаз у серці за дії отруту гадюки *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii* з використанням желатину.

Оцінка загального білкового балансу селезінки та серця після впливу отруту гадюки *V. berus berus* та *V. berus nikolskii* показала зменшення кількості білків в обох органах-мішенях, проявляючи більший вплив на селезінку, порівняно з серцем (див. рис. 3.1). Це може бути пов'язано з активацією процесів деградації, гіперактивацією протеолітичних систем і катаболічних

процесів або змінами в білково-синтетичних процесах. Зміни в білково-синтетичних процесах вважаються можливими для зниження кількості білків, проте є кілька сумнівів та застережень щодо їх достовірності в зв'язку з відмінностями часових рамок трансформації синтетичних механізмів і часу, витраченого на даний експеримент. Варто зазначити, що вплив отрути *V. berus nikolskii* на органи-мішені є набагато помітнішим порівняно з *V. berus berus*, що можна пояснити більшою кількістю потужних ефекторних молекул, що призводить до активації деградації білкових сполук (див. рис. 3.1).

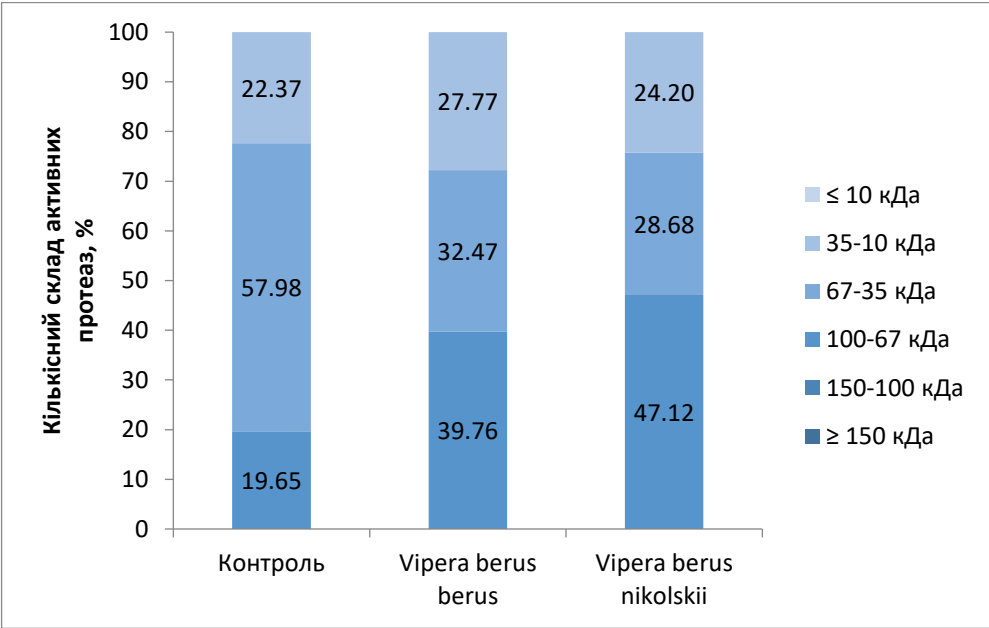


* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

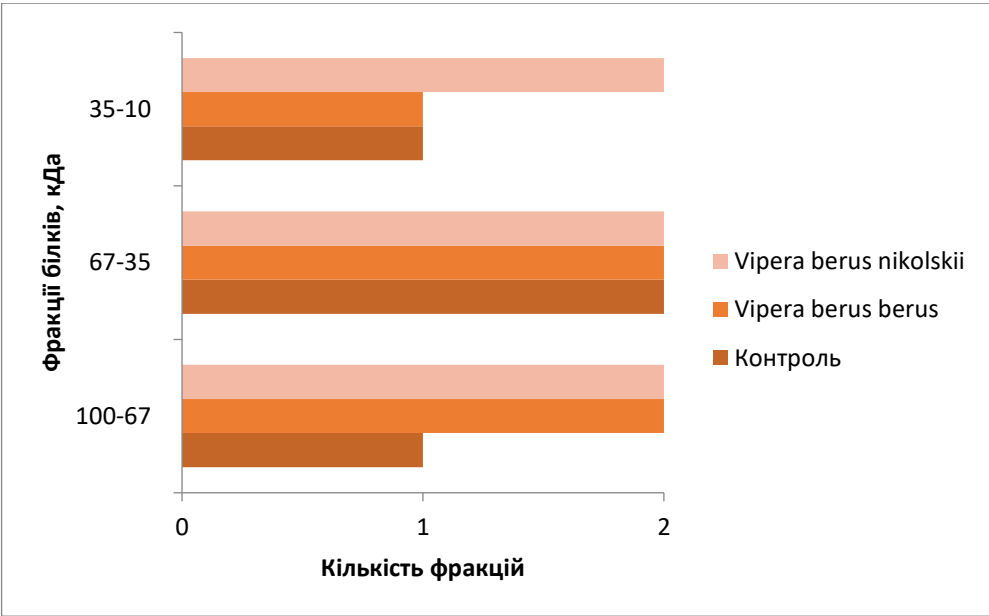


* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Рис. 3.6. Якісний склад та кількість зон активних протеаз у серці за дії отрут гадюки *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii* з використанням фібриногену.



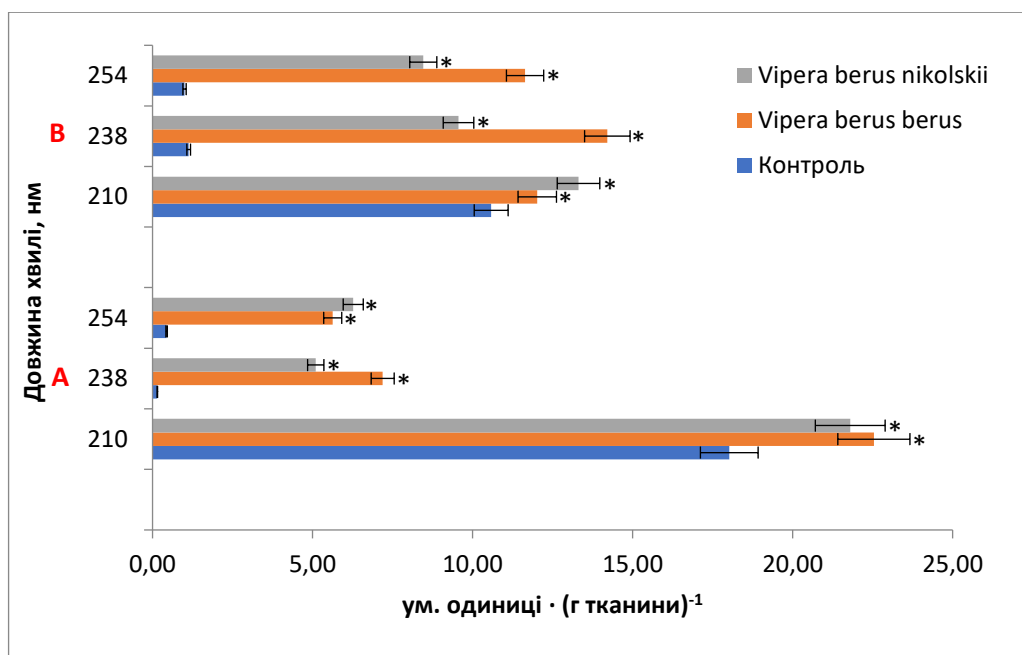
* – $p < 0,05$ порівняно з контролем



* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Рис. 3.7. Якісний склад та кількість зон активних протеаз у серці за дії отрут гадюки *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii* з використанням колагену.

Отримані дані, що свідчать про зниження вмісту загального білка в органах-мішенях під впливом отрут *V. berus berus* та *V. berus nikolskii*, викликають інтерес до вивчення причин зсуву білкового балансу, показуючи перспективність аналізу якісних показників білкового складу тканин. Так, було проведено диск-електрофорез у ПААГ з присутністю ДСН та були отримані результати, що демонструють певний перерозподіл білків між фракціями, підтверджуючи вплив досліджуваних отрут гадюк на білковий баланс органів-мішеней (див. табл. 3.1). Для селезінки під дією обох отрут помітний підвищення відсоткового вмісту білків з низькою молекулярною масою в діапазоні 10-35 кДа. А зміни кількості білків у серці супроводжуються збільшенням відсотка білків у діапазоні молекулярних мас 35-67 кДа разом зі значним зменшенням вмісту білкових молекул з молекулярною масою 10-35 кДа, що пояснюється активацією протеолітичних ферментів, відповідальних за розщеплення даних молекул. Крім того, в обох досліджуваних органах змінюється кількість фракцій білків. Усі ці дані підтверджують припущення про пряму активацію протеолітичних систем у досліджуваних органах під впливом отрут *V. berus berus* та *V. berus nikolskii*. Крім того, в серці під дією отрути *V. berus nikolskii* спостерігається поява нової фракції білків з молекулярною масою 100-150 кДа, що можна пояснити утворенням ковалентних комплексів між певними деградованими білками або агрегацією ферментів з їх інгібіторами.



* – $p < 0,05$ порівняно з контролем.

Рис. 3.8. Спектрофотометричний аналіз низькомолекулярних молекул у тканинах селезінки (А) і серця (В) під впливом отрут гадюки *V. berus berus* і *V. berus nikolskii*.

Зважаючи на отримані дані, щодо активації протеолітичних процесів у селезінці та серці під впливом отрут *V. berus berus* та *V. berus nikolskii*, потрібним є вивчення ферментативного профілю органів-мішеней. Під впливом досліджуваних отрут в обох органах спостерігався перерозподіл ферментів, відповідальних за розщеплення желатину, що, в свою чергу, демонструють загальну протеолітичну активність. Однак зміни відрізняються в селезінці та в серці, демонструючи підвищений рівень ферментів, здатних розщеплювати желатин, з молекулярною масою 35-67 кДа в селезінці (див. рис. 3.2) і з молекулярною масою 67-100 кДа (див. рис. 3.5) в серці. Загалом такі зміни свідчать про активацію певних протеолітичних ферментів або утворення нефізіологічно деградованих форм ферментів. Такі процеси, активізовані впливом досліджуваних отрут, призводять до зміни метаболізму уражених клітин разом із посиленням активності фізіологічно неактивних ферментів і підвищенням рівня змінених і злегка деградованих білків зі

зміненою субстратною специфічністю. Усі ці процеси призводять до виникнення та активації нефізіологічних біохімічних механізмів, відповідальних за подальший розвиток інтоксикаційних процесів.

Патологічні зміни в органах-мішенях також пов'язані з появою ферментів, здатних розщеплювати фібриноген, адже за фізіологічних умов наявність фібриногену в тканинах, окрім кровотоку, є показником початку інтоксикаційного процесу. Проведена експериментальна робота показала відсутність ферментів із цією субстратною специфічністю в тканинах контролю і появу їх в обох досліджуваних тканинах під впливом отрут *V. berus berus* і *V. berus nikolskii* (див. рис. 3.3, 3.6). Таким чином, оцінюючи дані щодо наявності або відсутності в тканинах активних протеолітичних ферментів з фібриногенолітичною активністю та враховуючи факт кореляції появи активних ферментів із субстратною специфічністю щодо фібриногену в тканинах з патологічними процесами, можна стверджувати, що вплив отрут *V. berus berus* і *V. berus nikolskii* на органи-мішені та весь організм призводить до зміни біохімічних ланцюгів, що призводить до посилення патологічних процесів. Такий патологічний зсув можливий через синтез активних фібриногенолітичних ферментів під дією досліджуваних отрут, або через створення деградованих/аномальних молекул зі зміненою субстратною специфічністю.

Зміни ферментативного профілю активних протеолітичних молекул, які демонструють здатність розщеплювати колаген, під впливом отрути гадюк в бік зменшення кількості білків з молекулярною масою 35-67 кДа і збільшення білкових молекул в діапазоні 67-100 кДа (див. рис. 3.4, 3.7) показує прямий вплив укусів *V. berus berus* і *V. berus nikolskii* на патологічне посилення протеолітичних процесів, які завершуються активацією певних колагенолітичних ферментів.

Таким чином, усі наведені раніше дані слугують підтвердженням припущення про патологічну активацію протеолітичних шляхів у селезінці та серці під дією *V. berus berus* та *V. berus nikolskii*, що свідчить про те, що зміни

білкового та ферментативного профілів призводять до змін в біохімічних ланцюгах.

Крім того, утворення молекул з низькою молекулярною масою також можна використовувати як ознаку патологічних змін в органах-мішенях, оскільки наявність таких молекул значною мірою корелює з початком процесів внутрішньої інтоксикації. У ході дослідження впливу отрут гадюк на тканини серця та селезінки було помічено значне збільшення кількості молекул з низькою молекулярною масою під впливом отрут в двох досліджуваних органах (див. рис. 3.8), що свідчить про активацію процесу токсичності. Це можна пояснити трансформацією фізіологічного стану організму в нефізіологічний, що пов'язано з появою принципово нових ліганд-рецепторних взаємодій внаслідок зміни білкового профілю, що викликає зміни в нормальному функціонуванні організму.

Результати досліджень даного розділу дисертації відображені нами в одній статті журналу (Таїланд), що відноситься до наукометричної бази Scopus [118] та двох тезах науково-практичних конференцій [2, 3].

РОЗДІЛ 4

МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ СТРУКТУРНИХ КОМПОНЕНТІВ СЕРЦЯ ТА СЕЛЕЗІНКИ ЩУРІВ ПРИ ДІЇ ОТРУТИ ГАДЮК ВИДУ *VIPERA* *BERUS*

4.1. Мікроскопічна організація серця інтактних щурів

Гістологічні дослідження серця щурів контрольної групи встановили, що орган володів типовими особливостями його мікроскопічної організації. На представлених зразках стінки серця вирізняли три оболонки – епікард, міокард та ендокард, а ззовні були наявні елементи перикарду.

Епікард інтактних тварин утворений сполучнотканинною пластинкою, вкритою шаром мезотелію. Клітини останнього мали витягнуту форму та нерівні краї. В середині їх виявляли 1-2 ядра, що були гіперхромними, містили еухроматин, який розміщувався дифузно та гетерохроматин, що локалізувався на периферії ядра, прилягаючи до внутрішньої оболонки. На люменальній поверхні мезотеліоцити мали мікрроворсинки. В сполучнотканинній пластинці епікарда відмічали наявність колагенових волокон та меншою мірою еластичних. Кровоносні судини епікарда були помірно повнокровними, іноді в їх просвітах виявляли поодинокі еритроцити (рис. 4.1).

Міокард щурів групи контролю був побудований з серцевої м'язової тканини та елементів сполучної тканини. М'язові волокна мали поздовжню спрямованість розміщення в міокарді, володіли характерною поперечною посмугованістю. Скоротливі кардіоміоцити волокон серцевого м'яза були видовженої прямокутної форми. В центрі їх розміщувалось паличкоподібне ядро, саркоплазма займала значну площу клітини, міофібрили присутні в незначній кількості. Сарколема кардіоміоцитів була суцільною, без ознак

ушкодження. Клітини з'єднувались між собою за допомогою вставних дисків, що мали вигляд темних смужок поперек м'язових волокон (рис. 4.2).

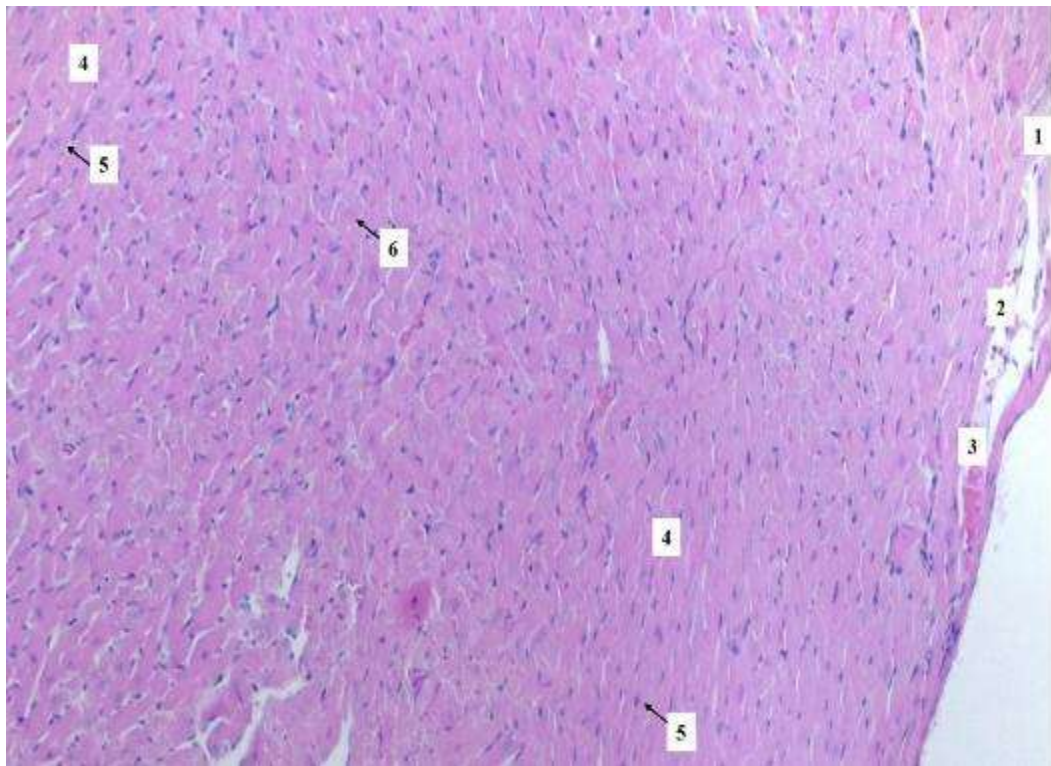


Рис. 4.1. Гістологічна організація серця щура контрольної групи. Епікард (1), артеріальна кровоносна судина епікарда (2), еритроцити в просвіті судини (3), м'язові волокна міокарду (4), скоротливі кардіоміоцити (5), клітини волокон Пуркінє (6). Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 200$.

В міокарді виявляли також клітини провідної системи серця, а саме клітини волокон Пуркінє. Останні володіли значно більшими розмірами, ніж скоротливі кардіоміоцити. Вони містили здебільшого одне ядро, мало міофібрил та значну кількість включень глікогену. Кровоносні артеріальні судини міокарда мали широкі просвіти. Структурно були утворені трьома оболонками – внутрішньою, середньою та зовнішньою. Ендотеліоцити інтими артерій характеризувались видовженою формою, вміщували одне ядро, яке володіло ознаками гіперхромності. Епітеліальне вистилення внутрішньої оболонки судин було суцільним, без проявів десквамації. Середня оболонка артерій при мікроскопічному дослідженні мала звичну будову, складалась з

гладеньких міоцитів, еластичних волокон, нечисельних ретикулярних волокон і фіброblastів. Адвентиція артеріальних судин міокарда представлена сполучнотканинними елементами, одиничними гладком'язовими клітинами. Артерії були помірно повнокровними, в просвітах їх виявляли одиничні формені елементи крові (рис. 4.3).

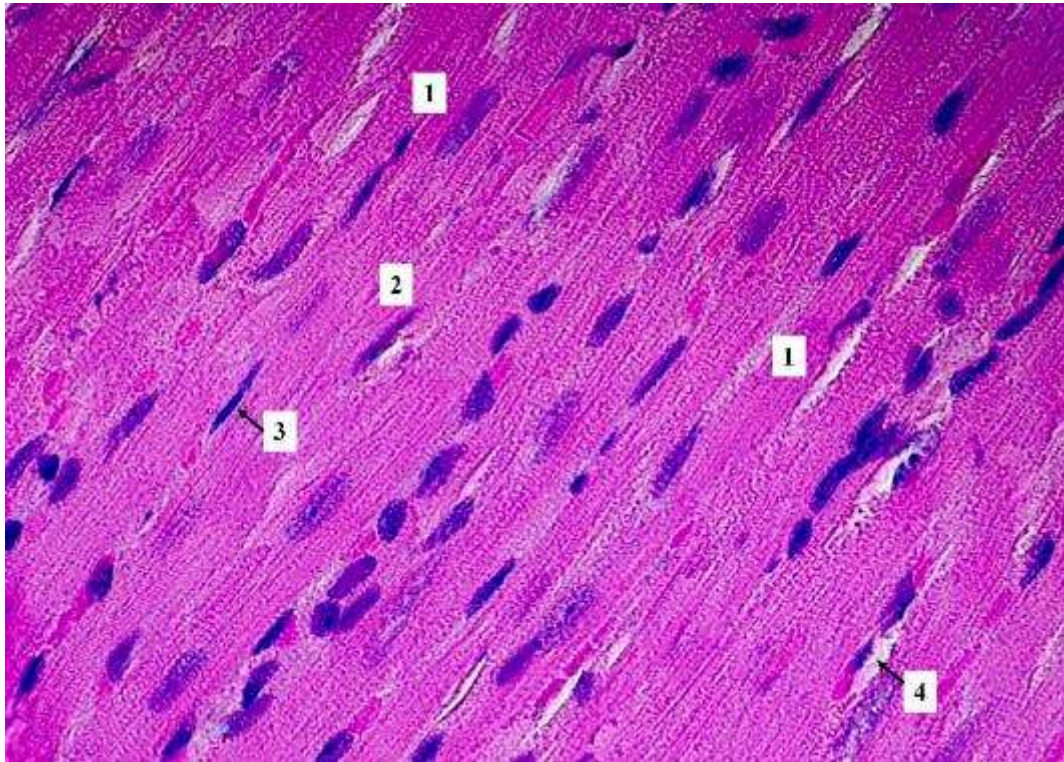


Рис. 4.2. Мікроскопічна будова серця інтактного щура. М'язові волокна міокарда (1), скоротливі кардіоміоцити (2), ядра скоротливих кардіоміоцитів (3), елементи пухкої сполучної тканини (4). Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 1000$.

Ендокард серця інтактних щурів побудований з чотирьох шарів. Ендотеліоцити його найбільш внутрішнього шару, оберненого в просвіт камер серця, мали полігональну форму, розміщувались у вигляді суцільного пласта. На люменальній поверхні їх часто виявляли мікрворсинки. Ендотеліоцити були щільно з'єднані з компонентами базальної мембрани, ознак відшарування не спостерігали. Підендотеліальний шар ендокарда складався з пухкої сполучної тканини, серед клітинних елементів якої переважали

фіброblastи. М'язово-еластичний шар на світлооптичному рівні мав дещо хаотичний вигляд, внаслідок наявних в ньому переплетень гладеньких міоцитів з еластичними волокнами.

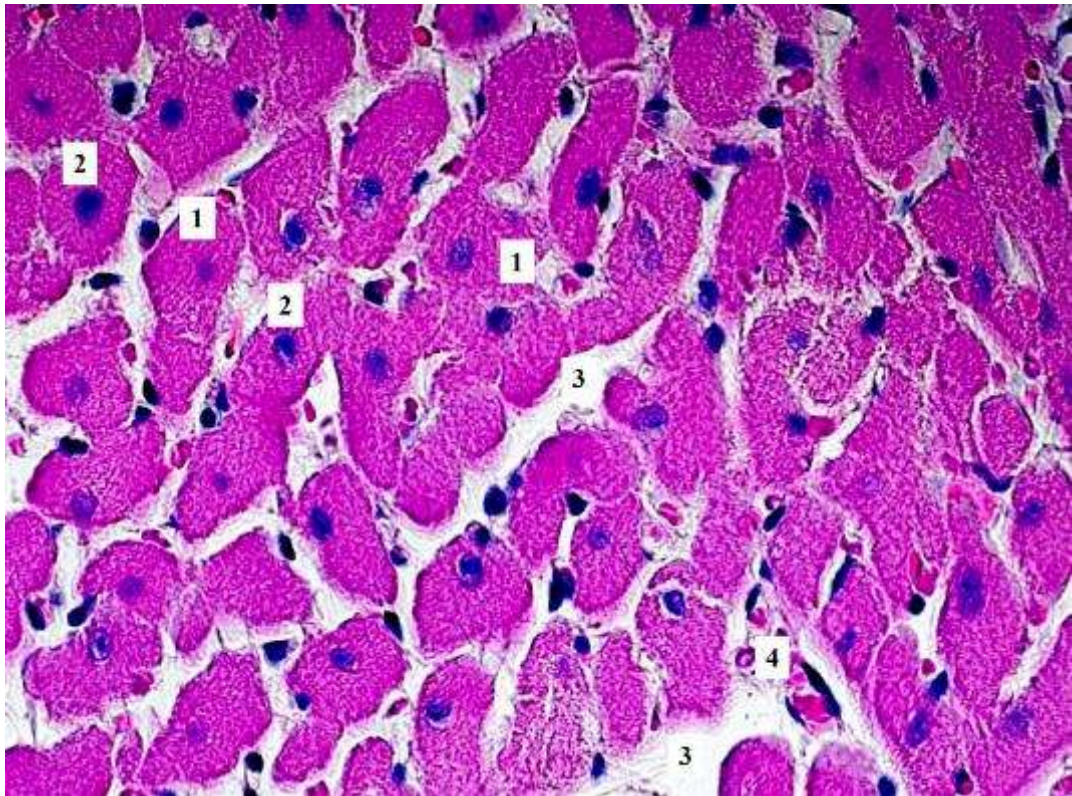


Рис. 4.3. Будова серця щура групи контролю. Провідні кардіоміоцити (1), ядра провідних кардіоміоцитів (2), екстрацелюлярна сполучна тканина (3), просвіт кровоносної судини (4). Забарвлення гематоксилином та еозином. $\times 1000$.

4.2. Особливості гістологічної структури серця щурів за умов інтоксикації отрутою гадюк *Vipera berus berus*

За умов гострої інтоксикації отрутою гадюк *Vipera berus berus* в серці експериментальних щурів спостерігали значні зміни нормальної гістоструктури всіх шарів органу. В складі епікарду переважали

сполучнотканинні елементи, головним чином, колагенові волокна, що розростаючись, формували так звану сітку та в подальшому вплітались в розміщену поруч тканину міокарда. Дані волокна підлягали інтенсивному фарбуванню. Необхідно зазначити, що при мікроскопічному дослідженні крім колагенових волокон, що типово формують каркас даної оболонки серця, відмічали підвищення вмісту молодих. На їх фоні шар мезотелію майже не візуалізувався. Кровоносні судини епікарду мали широкі просвіти. В артеріях спостерігали деформацію стінок. Ендотеліальний шар їх інтими був потоншеним, підлягав локальному відшаруванню від базальної мембрани в просвіт судин, в той час, як в інших ділянках до епітеліального вистилення щільно адгезувались еритроцити. Середня оболонка в переважній більшості артеріальних кровоносних судин епікарду складалась зі значної кількості волокон та одиничних гладких міоцитів. Адвентиція була потовщеною, колагенізованою. Артерії характеризувались ознаками вираженого повнокров'я, в просвітах їх відмічали чисельні еритроцити та лейкоцити (рис. 4.4).

В міокарді дослідних тварин м'язові волокна були набряклими, втрачали характерну поздовжню орієнтацію та набували звивистої форми. В більшості полів зору відмічали зони руйнування сарколеми, а поперечна посмугованість волокон міокарда не була чітко вираженою. В серцевій м'язовій тканині визначали також зони деструкції скоротливих елементів, фрагментацію волокон (рис. 4.5). Між останніми значно зростав об'єм пухкої сполучної тканини, проміжки між ними розширювались. Скоротливі кардіоміоцити за цих умов втрачали звичну прямокутну форму. Ядра їх майже у всіх полях зору не підлягали чіткій візуалізації та ідентифікації, внаслідок вираженого набряку волокон міокарда. Окремі з них, які вдалось віддиференціювати, були гіпохромними, мали витягнуту форму. Також через деструкцію м'язових волокон, деякі ядра виходили за межі скоротливих кардіоміоцитів. Вставні диски мали ледве помітні обриси на мікропрепаратах. Характерними знахідками були зони згладжування та лізису м'язових волокон, зустрічались

також вогнища некрозу. Клітини лейкоцитарного ряду рідко реєстрували при зазначених умовах, а, отже, інфільтрація міокарда за гострої інтоксикації отрутою гадюк *Vipera berus berus* помірно виражена.

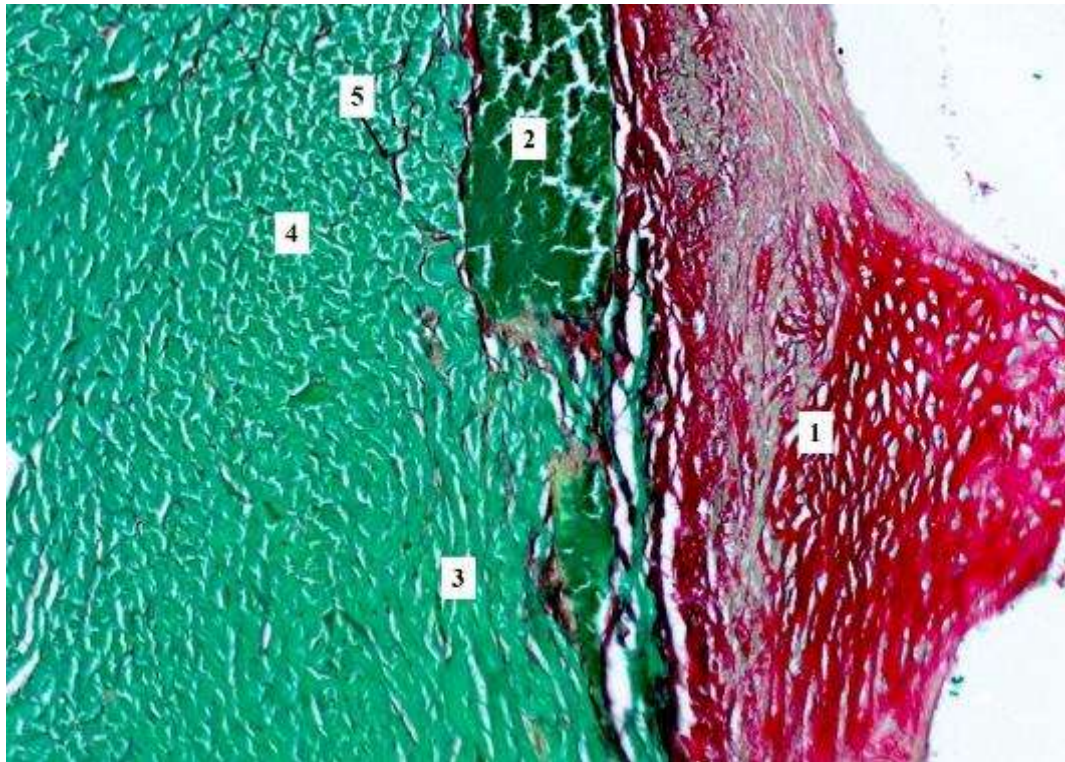


Рис. 4.4. Гістологічні зміни в серці щурів за умов впливу отрути гадюк *Vipera berus berus*. Розростання колагенових волокон в епікарді (1), просвіт кровоносної судини з форменими елементами (2), м'язові волокна міокарду (3), клітини провідної системи серця (4), колагенові волокна в міжміофібрилярних проміжках (5). Забарвлення Picro Sirius Red/Fast Green. $\times 200$.

Отрута *Vipera berus berus* в експериментальних щурів зумовлювала значне розростання колагенових волокон в тканині міокарда. Так, спостерігали активацію фіброblastів, що виступали головними продуцентами компонентів пухкої сполучної тканини, в тому числі колагенових волокон. Чисельність їх зростала в проміжках між скоротливими та провідними кардіоміоцитами (рис. 4.5). Фіброblastи мали видовжену веретеноподібну чи зірчасту форму. На фоні кардіоміоцитів, вони фарбувались більш інтенсивно.

Ядерно-цитоплазматичний індекс їх був високим, що свідчить про активність синтетичних процесів в клітинах. Ядра фібробластів розміщувались цетроцентрично, були нормохромними, хроматин мав дифузний розподіл з переважанням еухроматину.

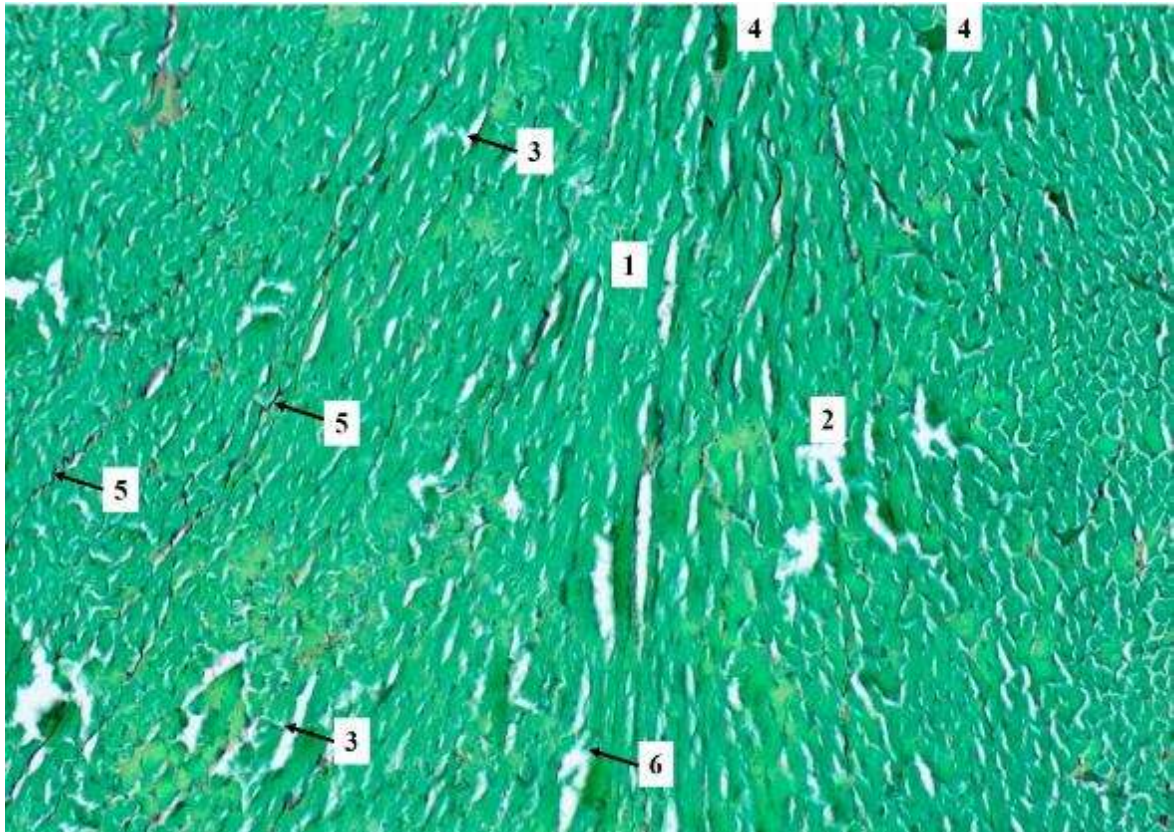


Рис. 4.5. Мікроскопічні зміни в серці щурів за умов дії отрути гадюки *Viper berus berus*. Потовщення та набряк м'язових волокон (1), зони деструкції тканини міокарда (2), фрагментація м'язових волокон міокарда (3), зони крововиливів (4), колагенові волокна (5), розволокнення м'язових волокон міокарда (6). Забарвлення Picro Sirius Red/Fast Green. $\times 200$.

Кровоносні судини міокарду дослідних тварин за даних умов також підлягали структурним перебудовам. Стінки артерій значно потовщувались. Ендотеліоцити внутрішнього шару стінки судини мали вигляд частоколів, вип'ячувались в просвіт артерій. Спостерігали десквамацію ендотеліального вистилення судинної стінки від компонентів базальної мембрани. В деяких

гістопрепаратах відмічали розпушення та набряк інтими артерій. Середня оболонка артеріальних судин характеризувалась вираженим збільшенням кількості колагенових волокон, в той час, як число гладком'язових клітин зменшувалось. Більшість артерій мали потовщену адвентиційну оболонку. Судини міокарда були повнокровними, просвіти їх заповнювали формені елементи крові, а саме еритроцити. Останні формували складжі, стовпчики, часто відмічали адгезію еритроцитів до епітеліального вистилення інтими та фібринові нитки, що мали поперечне розташування. Венозні кровоносні судини міокарда володіли нерівними просвітами. Ендотеліоцити їх були набряклими, подекуди піддавались десквамації в просвіти вен. Середня та адвентиційна оболонки вен представлені, головним чином, колагеновими волокнами, чисельність гладких міоцитів є низькою. В просвітах цих судин спостерігали наявність геморагічного, серозного вмісту, поодиноких формених елементів крові. В цілому венозна система міокарду при гострій інтоксикації отрутою гадюк *Vipera berus berus* характеризувалась ознаками застійних явищ. Визначальними особливостями структурної організації міокарда були зони масивних крововиливів, подекуди геморагії мали дифузний характер з просякненням тканини серцевого м'яза. Еритроцити часто виходили за межі кровоносних судин і розміщувались в інтерфібрилярних проміжках (див. рис. 4.5).

Провідні кардіоміоцити (клітини волокон Пуркінє) локалізувались між компонентами скоротливої системи серця. Вони забарвлювались менш інтенсивно, ніж скоротливі кардіоміоцити, були ширшими, коротшими, іноді мали вигляд світлих тяжів або неупорядкованих структур з невеликою кількістю міофібрил. Більшість клітин Пуркінє характеризувались просвітленням цитоплазми внаслідок їх вираженої гідропічної дистрофії. Останній факт пояснював важке розпізнавання в них ядер. Ядра провідних кардіоміоцитів розміщувались в центрі клітин, мали ознаки гетерохромії, ядерно-цитоплазматичний індекс при цьому був низьким. В окремих клітинах ядра зміщувались до периферії (рис. 4.6).

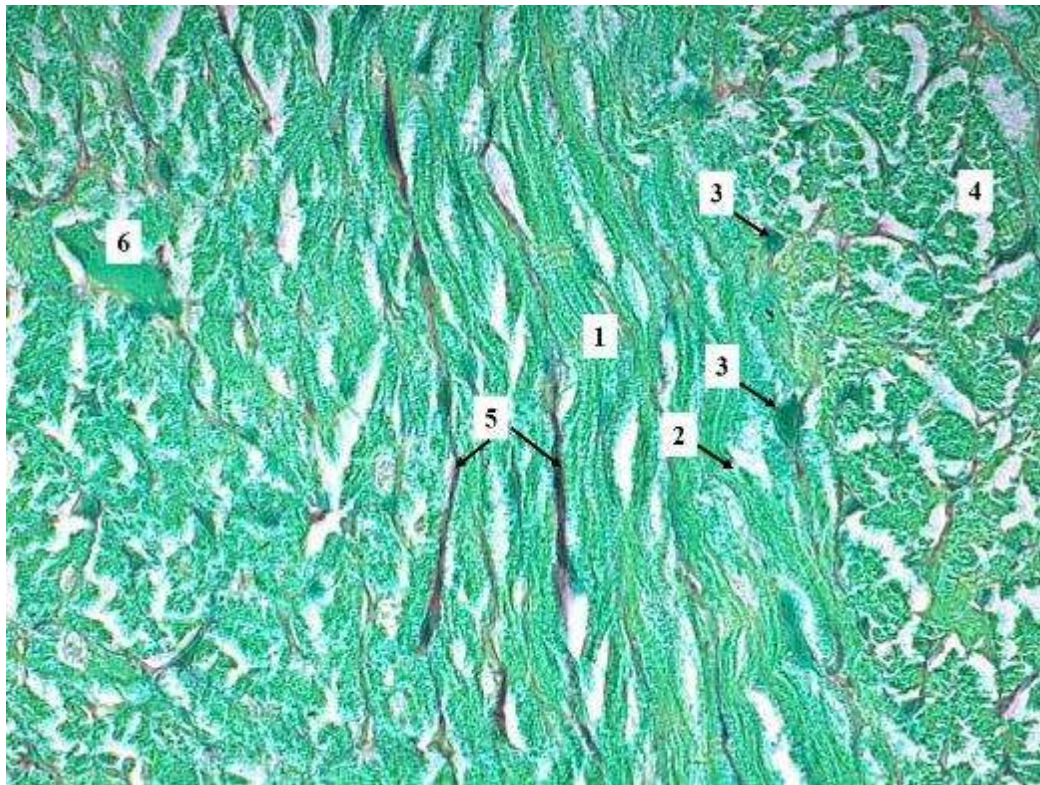


Рис. 4.6. Гістологічна організація серця щурів при впливі отрути гадюк *Vipera berus berus*. Хвилеподібна орієнтація м'язових волокон міокарда (1), зона деструкції сарколеми (2), фібробласти (3), гідропічна дистрофія клітин Пуркінє (4), колагенові волокна (5), просвіт кровоносної судини (6). Забарвлення Picro Sirius Red/Fast Green. $\times 1000$.

В ендокарді тварин дослідної групи виявляли набряк ендотеліоцитів. Ядра цих клітин були гіперхромними. Спостерігали ділянки відшарування ендотеліального вистилення від підендотеліального шару. В підендотеліальному шарі елементи сполучної тканини збільшувались в об'ємі. В зовнішньому сполучнотканинному шарі ендокарду зростала активність фібробластів та відбувалось розростання колагенових волокон, як і в попередньо зазначених оболонках серця.

Таким чином, за умов гострої інтоксикації отрутою гадюк *Vipera berus berus* в експериментальних щурів при мікроскопічному дослідженні тканини серця виявлено патологічні зрушення структурної організації всіх шарів

органу. В епікарді характерним було збільшення об'єму колагенових волокон, потовщення стінок судин. Найбільш виражені гістологічні зміни спостерігали в міокарді. В ньому відмічали набряк, дезорганізації м'язових волокон, їх фрагментацію, лізис, деструкцію, втрату характерної поперечної посмугованості, некроз. Крім того, виявлено зростання чисельності фібробластів, їх активацію та, як результат, розростання в тканині міокарду компонентів сполучної тканини, в тому числі колагенових волокон. Ендокард дослідних щурів відрізнявся десквамацією ендотеліального вистелення та збільшенням кількості активних фібробластів в зовнішньому сполучнотканинному шарі.

4.3. Мікроскопічні зміни в серці щурів при дії отрути гадюк *Vipera berus nikolskii*

При гістологічному дослідженні епікарду експериментальних щурів за умов впливу отрути гадюк *Vipera berus nikolskii* виявляли, що мезотелій його побудований з епітеліальних клітин, які розміщувались на базальній мембрані. Подекуди відмічали ділянки десквамації цих клітин. В сполучнотканинній пластинці епікарду переважали колагенові волокна, а еластичні були нечисельними. В поверхневому шарі колагенові волокна мали хаотичне розміщення, а в глибокому вони набували більш чіткої поздовжньої орієнтації, формуючи переплетення. Кровоносні судини епікарду були деформованими, спостерігали руйнування їх стінок. Внутрішня та середня оболонки їх набрякали, а адвентиція потовщувалась за рахунок розростання в ній колагенових волокон, при цьому останні також проникали до рівня медії. На фоні колагенізації зовнішньої оболонки спостерігали локальні ділянки потоншення її чи деструкції. Просвіти цих судин були заповнені геморагічним вмістом, з чисельними скупченнями еритроцитів (рис. 4.7).

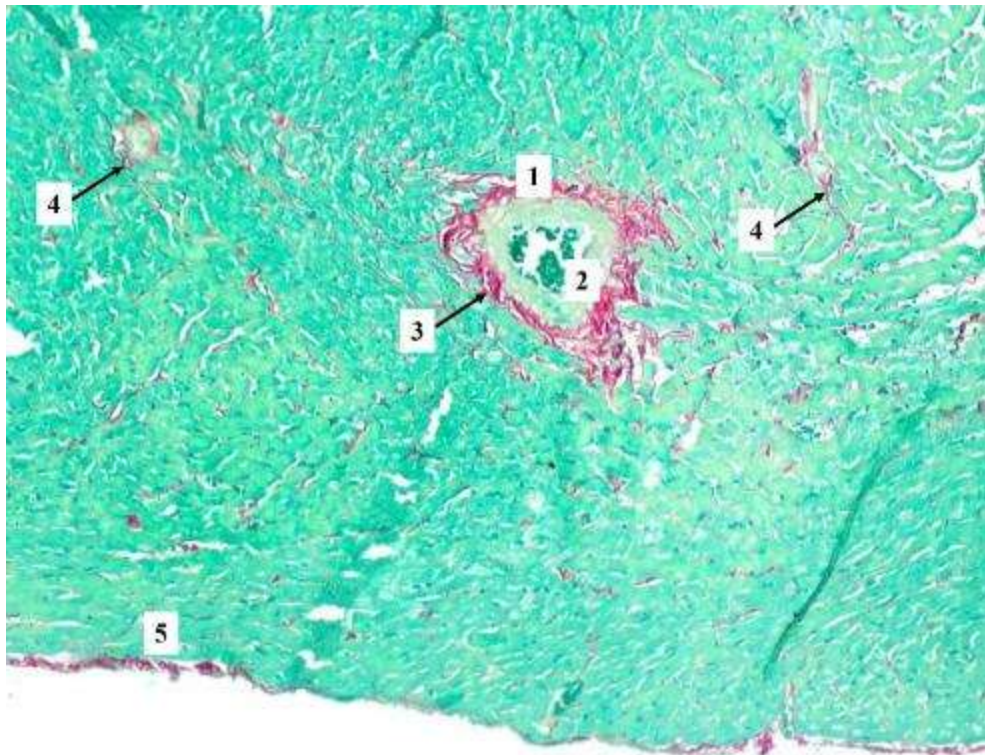


Рис. 4.7. Мікроскопічна організація серця щурів при гострій інтоксикації отрутою гадюк *Vipera berus nikolskii*. Кровоносна судина міокарда (1), складжі еритроцитів в просвіті судини (2), колагенізація адвентиційної оболонки (3), колагенові волокна в міжклітинній сполучній тканині міокарда (4), епікард (5). Забарвлення Picro Sirius Red/Fast Green. $\times 200$.

За умов введення щурам отрути гадюк *Vipera berus nikolskii* при гістологічному дослідженні міокарду виявлено деструктивні зміни, ступінь вираженості яких був значно вищим, ніж у тварин з гострою інтоксикацією отрутою гадюк *Vipera berus berus*. Зокрема, в більшості мікропрепаратів відмічали хаотичне розміщення м'язових волокон, їх фрагментацію. Подекуди зберігалась поздовжня орієнтація волокон серцевого м'яза, однак вони були потовщеними, набряклими, без типової поперечної посмугованості. Спостерігали також звивистість волокон міокарда. На гістологічних зразках тканина серцевого м'язу підлягала нерівномірному зафарбовуванню, оскільки відмічали зони з більш інтенсивним забарвленням. Останні являли собою вогнища некрозу та міоцитолізу. Майже всі волокна міокарду зазнавали деструкції, були розшарованими, з зонами повного руйнування сарколеми.

Саркоплазма в них просвітлена, мала ознаки набряку. Скоротливі кардіоміоцити характеризувались гетероформністю, оскільки деякі з них були видовженими, інші ж ставали більш округлими. Ядра цих клітин зазнавали значних структурних змін. Переважна їх більшість не володіла звичними характеристиками організації. Так, форма з видовженої ставала округлою або овальною. Всередині ядер відмічали ледь помітні ядерця. Хроматин розміщувався, головним чином, на периферії ядер, прилягаючи до внутрішньої оболонки. Ядра були гіпохромними, часто набряклими. Крім того, виявляли зони руйнування каріолеми, а також ознаки каріопікнозу, поліплоїдії ядер скоротливих кардіоміоцитів. Внаслідок лізису волокон серцевого м'язу відбувався вихід ядер за межі клітин (рис. 4.8).

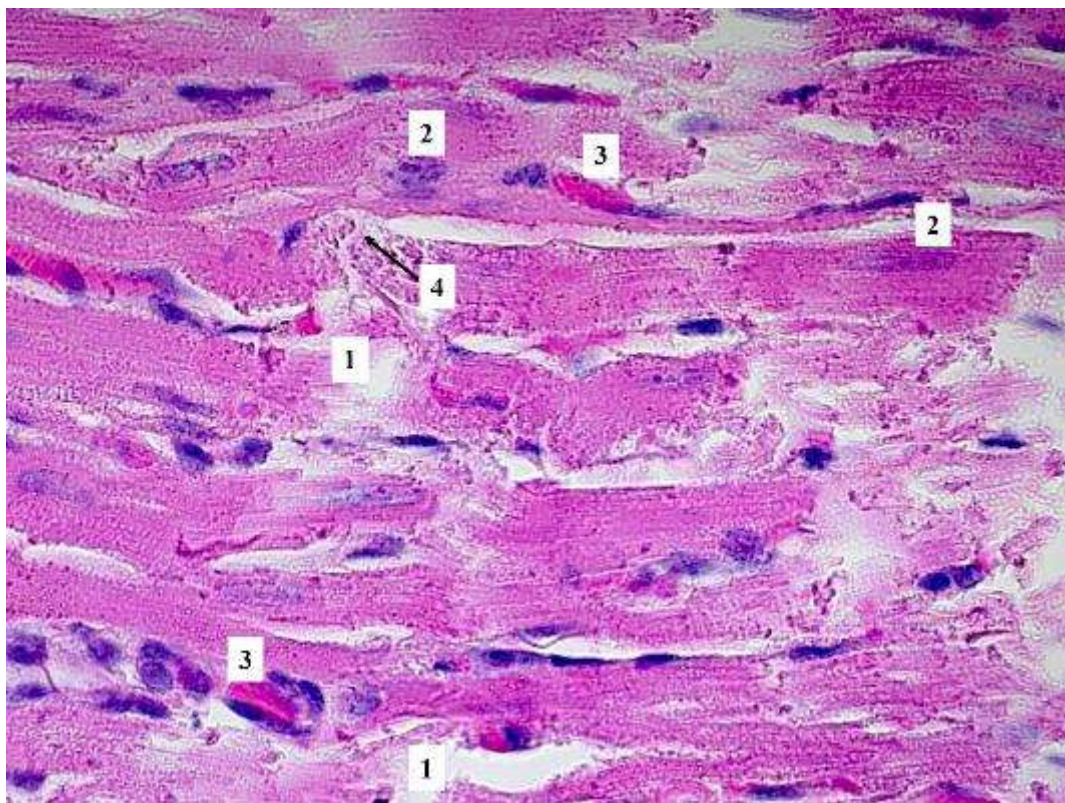


Рис. 4.8. Мікроскопічні зміни серця щурів за умов впливу отрути гадюк *Vipera berus nikolskii*. Фрагментовані м'язові волокна міокарду (1), ядра скоротливих кардіоміоцитів (2), зони крововиливів (3), зони руйнування сарколеми (4). Забарвлення гематоксилином та еозином. $\times 1000$.

Навколо вогнищ некрозу та міоцитолізу відмічали значний набряк тканини міокарду. Проміжки між м'язовими волокнами були заповнені елементами пухкої сполучної тканини, проте об'єм їх був дещо меншим, ніж у групи тварин з гострою інтоксикацією отрутою гадюк *Vipera berus berus*. В той самий час, характерною особливістю у щурів, яким вводили отруту гадюк *Vipera berus nikolskii* була масивна гістіолейкоцитарна інфільтрація, яку реєстрували у всіх полях зору зразків міокарду (рис. 4.9). В міжміофібрилярних проміжках спостерігали фібробласти, активація яких в зонах значної деструкції супроводжувалась формуванням колагенових волокон.

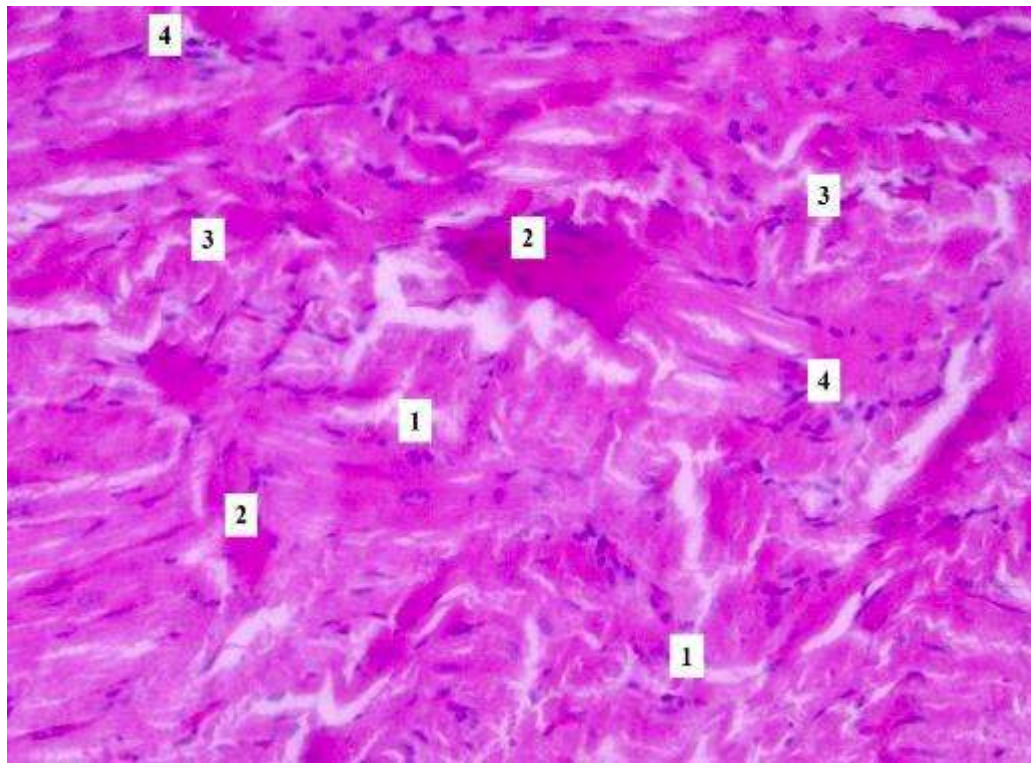


Рис. 4.9. Гістологічні зміни серця щурів при гострій інтоксикації отрутою гадюк *Vipera berus nikolskii*. Хаотичне розміщення м'язових волокон міокарда (1), вогнища некрозу тканини міокарда (2), фрагментація та деструкція м'язових волокон (3), лейкоцитарна інфільтрація тканини міокарда (4). Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 400$.

Кровоносні судини міокарда були повнокровними. Стінки артерій мали розширені просвіти, часом підлягали деформації. Ендотеліальні клітини

інтими були набряклими, містили гіперхромні ядра. Ендотеліоцити також піддавались відшаруванню від базальної мембрани та спрямовувались в просвіт артерій. Середня оболонка артеріальних судин також потовщувалась, гладенькі міоцити в ній розташовувались хаотично, серед волокон переважали еластичні, проте реєстрували і присутність колагенових. Адвентиційна оболонка в більшості випадків буда колагенізованою та інфільтрованою лейкоцитами. В просвітах артерій виявляли складжі та адгезію еритроцитів, нечисельні елементи білої крові (рис. 4.10). Необхідно зазначити, що відмічали периваскулярний набряк та виражену периваскулярну лейкоцитарну інфільтрацію. Вогнищеві руйнування та підвищення проникності судинних стінок призводило до появи великої кількості зон геморагій в тканині серцевого м'яза (див. рис. 4.7).

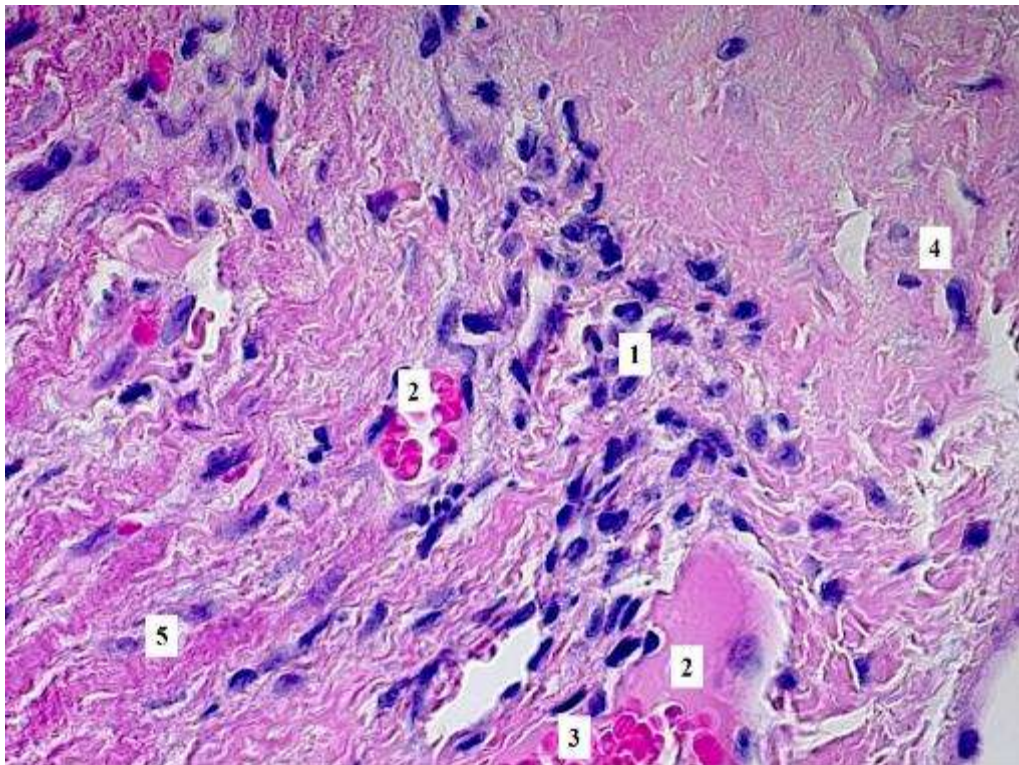


Рис. 4.10. Мікроскопічна організація серця щурів при впливі отрути гадюк *Vipera berus nikolskii*. Виражена лейкоцитарна інфільтрація (1), просвіт кровоносної судини (2), складжі еритроцитів в просвіті судин (3), провідні кардіоміоцити (4), м'язові волокна міокарда (5). Забарвлення гематоксилином та еозином. $\times 1000$.

Провідні кардіоміоцити міокарда локалізувались поміж скоротливих структур. Вони мали більш світле забарвлення та значно переважали за розмірами скоротливі кардіоміоцити. Форма провідних клітин варіювала від округлої до витягнутої чи овальної. Дані кардіоміоцити містили мало міофібрил. Цитоплазма їх була оксифільною, просвітленою, мала незначну кількість включень глікогену. Ядра деяких провідних кардіоміоцитів розміщувались в центрі клітин, інших – зміщувались до полюсів або ж виходили за межі, локалізуючись в оточуючий пухкій сполучній тканині міжклітинного простору. Вони були гіпохромними, частіше містили одне ядро. Контури ядерної оболонки мали нечіткий вигляд. Гетерохроматин зміщувався до внутрішньої ядерної мембрани. Окремі ядра провідних кардіоміоцитів були просвітленими, набряклими. На гістологічних препаратах спостерігали також каріопікноз, каріорексис, перинуклеарний набряк. Проміжки між провідними кардіоміоцитами були розширені, містили елементи сполучної тканини, в тому числі фібробласти. Виявляли лейкоцитарну інфільтрацію навколо провідних клітин, характерним був також екстрацелюлярний набряк. Судини в цій зоні мали ознаки вираженого повнокров'я, містили скупчення еритроцитів в просвітах. Виявлено і обмежені зони геморагій, що зустрічались у всіх досліджуваних полях зору (рис. 4.11).

Мікроскопічні дослідження ендокарда щурів, яким моделювали стан гострої інтоксикації отрутою гадюк *Vipera berus nikolskii* встановили, що ендотеліоцити його мали дещо витягнуту форму та не щільно фіксувались до базальної мембрани. Відмічали розпушеність ендотеліального вистилення та зони його відшарування. Ядра цих клітин були переважно паличкоподібними, гіперхромними. Підендотеліальний шар пухкої сполучної тканини вміщував нечисельні клітинні елементи. Гладенькі міоцити в ендокарді присутні в незначній кількості, як і еластичні волокна. В зовнішньому сполучнотканинному шарі зростав об'єм колагенових волокон, проте на відміну від групи дослідних тварин, яким вводили отруту гадюк *Vipera berus*

berus він був дещо меншим. Варто відмітити, що в ендокарді також спостерігали значну лейкоцитарну інфільтрацію.

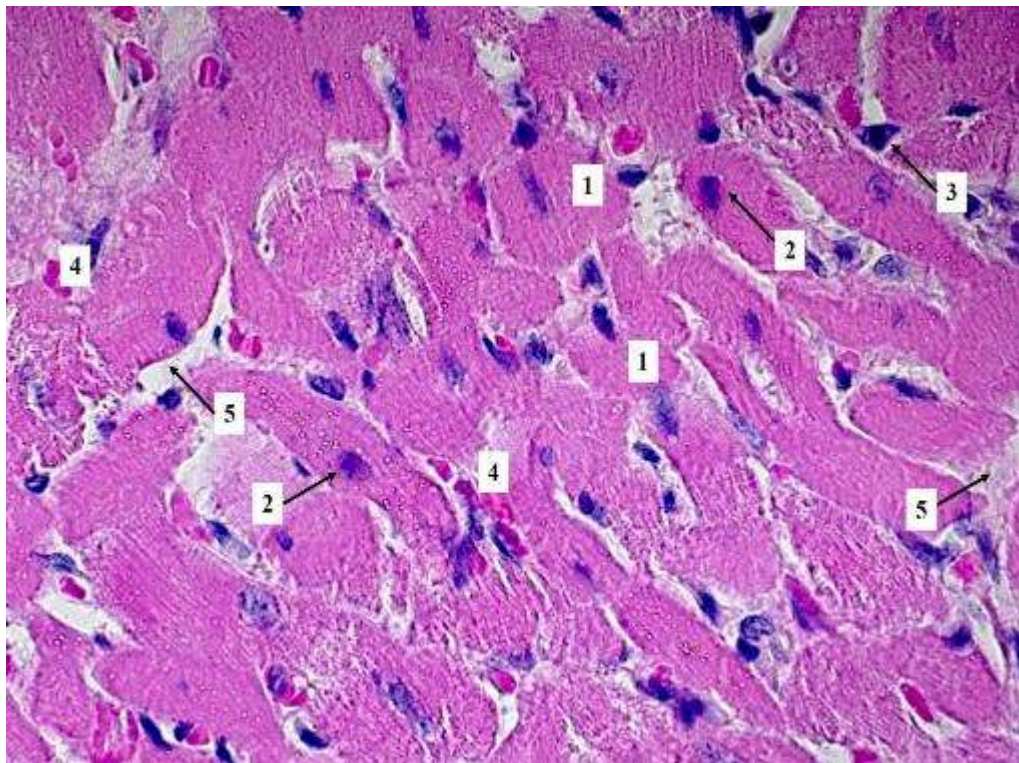


Рис. 4.11. Гістологічна організація серця щурів за умов впливу отрути гадюк *Vipera berus nikolskii*. Провідні кардіоміоцити (1), ядра провідних кардіоміоцитів (2), фібробласти (3), зони геморагій (4), міжклітинна сполучна тканина (5). Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 1000$.

Отже, за умов впливу отрути гадюк *Vipera berus nikolskii* в епікарді щурів відмічали деструкцію стінок судин, набряк їх внутрішньої та середньої оболонок. Для міокарду характерним був значно вищий ступінь морфологічних змін, в порівнянні зі щурами, яким вводили отруту гадюк *Vipera berus berus*. Спостерігали хаотичне розміщення та фрагментацію волокон серцевого м'язу, втрату ними поперечної посмугованості, наявність вогнищ некрозу та міоцитолізу. Виявляли виражену гістіолейкоцитарну інфільтрацію, зростання чисельності фібробластів. Кровоносні судини міокарда зазнавали деформації, стінки їх були набряклими. Крім того, зростала проникність стінок судин та, як результат, поява геморагій.

4.4. Гістологічна організація селезінки інтактних щурів

Мікроскопічні дослідження селезінки інтактних щурів встановили загальні особливості структури органу. Ззовні селезінка вкрита сполучнотканинною капсулою, від якої відходять трабекули в паренхіму. В трабекулах вирізняли трабекулярні вени. Просвіти їх були не розширеними, повнокрівними. Остання представлена білою та червоною пульпою.

В білій пульпі селезінки виявляли лімфоїдні вузлики переважно округлої чи дещо витягнутої форми. Вони представлені гермінативним центром, периартеріальною та крайовою зонами. В гермінативних центрах виявляли В-лімфоцити, макрофаги. Периартеріальні зони були представлені переважно Т-лімфоцитами і макрофагами. Переважали малі та середні лімфоцити з гіперхромними ядрами. В крайовій або маргінальній зоні селезінки щурів контрольної групи відмічали наявність лімфоцитів, макрофагів та дендритних клітин, а також плазмоцитів. Центральні артерії селезінки мали чіткі просвіти, всередині їх зосереджувались нечисельні формені елементи крові (рис. 4.12).

Червона пульпа селезінки інтактних щурів була представлена тяжами та венозними синусами. В червоній пульпі спостерігали чисельні еритроцити, а також лімфоцити, макрофаги, плазматичні клітини, моноцити. Макрофаги відрізнялись великими розмірами та наявністю відростків. Ядра їх були гіперхромними з переважанням гетерохроматину. В цитоплазмі наявні рештки фагацитованого матеріалу. Плазмоцити червоної пули селезінки щурів групи контролю мали ексцентрично розміщені, гіперхромні ядра. Гетерохроматин в них розміщувався переважно під каріолемою (див. рис. 4.12).

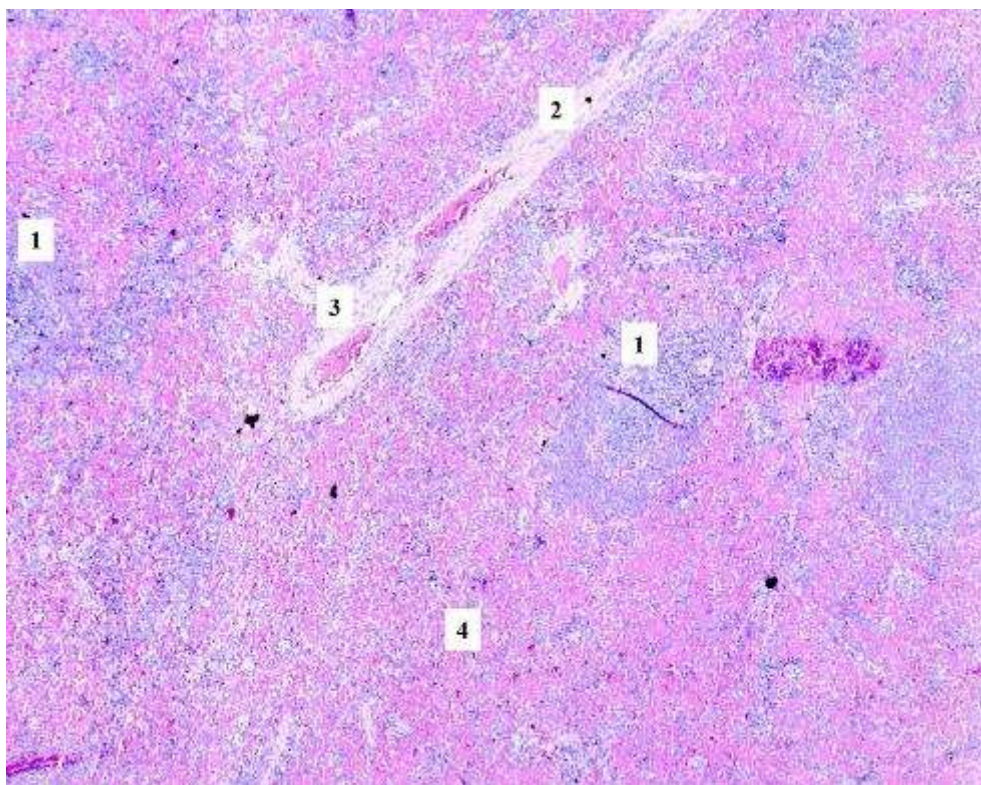


Рис. 4.12. Гістологічна структура селезінки щурів контрольної групи. Лімфоїдні вузлики селезінки (1), трабекули (2), трабекулярна вена (3), червона пульпа (4). Забарвлення гематоксилином та еозином. $\times 100$.

4.5. Морфологічні зміни селезінки щурів при впливі отрути гадюк *Vipera berus berus*

Моделювання гострої інтоксикації отрутою гадюк *Vipera berus berus* асоціювалась з розвитком гістологічних змін селезінки експериментальних щурів. При мікроскопічному дослідженні органу виявлено дезорганізацію структури білої пульпи. Зокрема, лімфоїдні вузлики мали нечіткі контури, крайова зона їх майже не піддавалась диференціації. Крім того, візуалізувались збільшені гермінативні центри із значною кількістю лімфобластів, які відрізнялись великими розмірами, гіпохромними ядрами та

блідою цитоплазмою. Зрілих В-лімфоцитів в реактивних центрах лімфоїдних вузликів було значно менше, ніж лімфобластів. Периартеріальні зони лімфоїдних вузликів характеризувались наявністю помірної кількості Т-лімфоцитів і макрофагів. Відмічали переважно малі світлі та темні лімфоцити. Просвіти центральних артерій були округлими, стінки їх дещо потовщеними, особливо за рахунок середньої та адвентиційної оболонок. Ендотеліальне вистелення інтими центральних артерій в переважній більшості було суцільним, подекуди спостерігали розпушення ендотеліального шару (рис. 4.13).

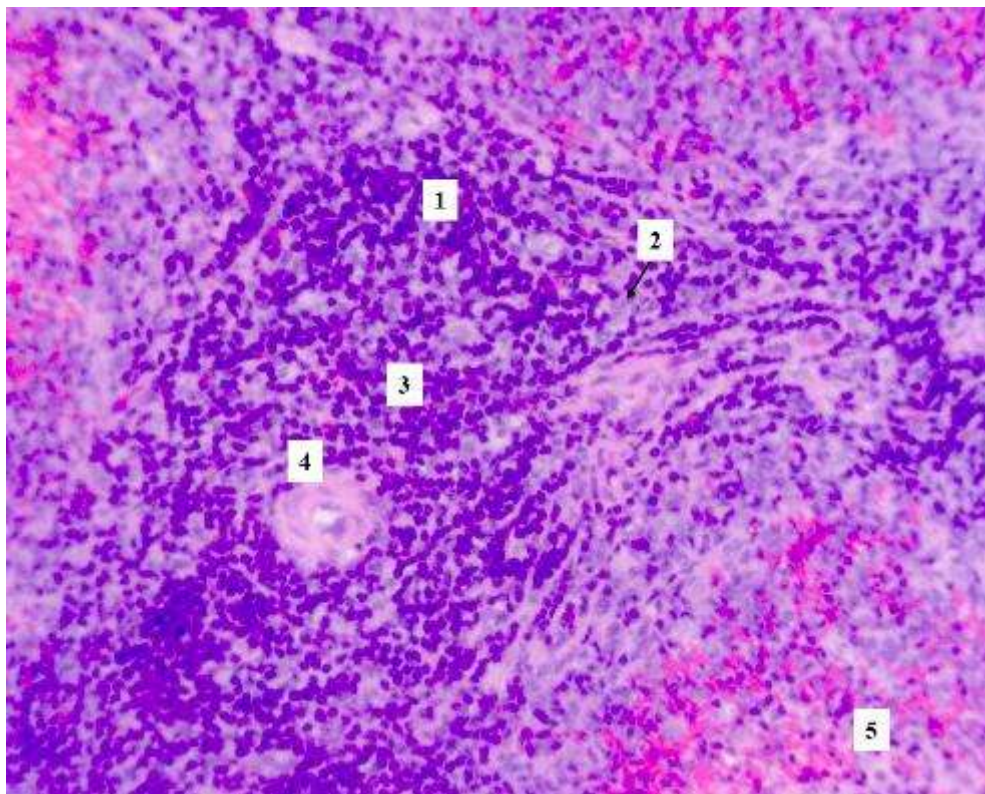


Рис. 4.13. Морфологічні зміни селезінки щурів при впливі отрути гадюки *Vipera berus berus*. Лімфоїдний вузлик (1), лімфобласти (2), крайова зона (3), центральна артерія (4), червона пульпа (5). Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 400$.

В червоній пульпі селезінки за умов введення щурам отрути гадюк *Vipera berus berus* виявляли чисельні еритроцити, тромбоцити, лімфоцити, плазматичні клітини та макрофаги (рис. 4.14).

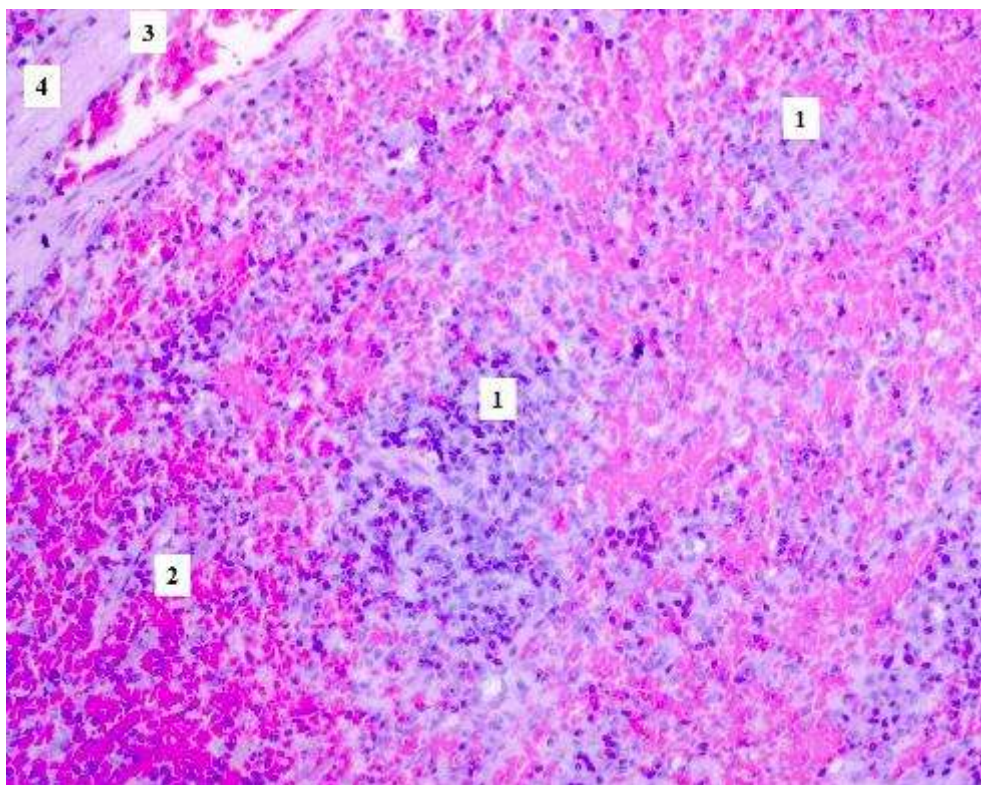


Рис. 4.14. Гістологічна структура селезінки щурів при за умов дії отрути гадюк *Vipera berus berus*. Лімфоїдні вузлики (1), червона пульпа (2), просвіт трабекулярної вени (3), трабекули селезінки (4). Забарвлення гематоксилином та еозином. $\times 400$.

В окремих ділянках червоної пульпи спостерігали вогнища деструкції тканини селезінки та геморагії. Лімфоцити в червоній пульпі мали округлу форму. Ядра їх гіперхромні, цитоплазма займала незначну частину клітини, інколи не візуалізувалась або ж зосереджувалась парануклеарно у вигляді обідка. Плазматичні клітини селезінки мали округлу чи дещо витягнуту форму. Ядра їх зміщувались до полюсів клітин, були гіперхромними. В червоній пульпі чисельні макрофаги мали великі розміри, володіли відростками. Ядра цих клітин займали ексцентричне положення. Цитоплазма була подекуди просвітлена, набрякла, містила залишки фагоцитованого матеріалу. Необхідно зазначити, що при гістологічному дослідженні селезінки щурів, яким вводили отруту гадюк *Vipera berus berus* спостерігали ділянки

апоптозу лімфоцитів. Трабекули селезінки за даних умов були потовщеними. Гладенькі міоцити в їх складі мали видовжені ядра. Проміжки між м'язовими волокнами були розширеними, а самі волокна – набряклими. Трабекулярні вени мали чіткі контури. В просвіті їх виявляли стази та складжі еритроцитів, адгезію еритроцитів до стінок вен (рис. 4.15).

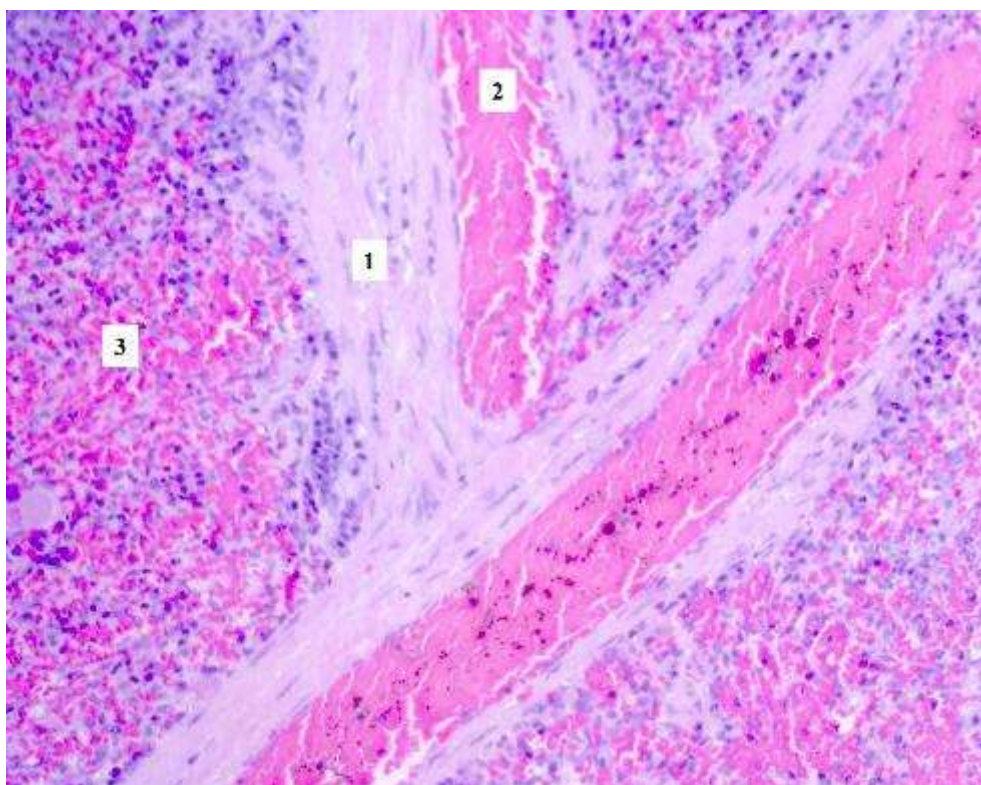


Рис. 4.15. Світлооптичні зміни структури селезінки щурів при впливі отрути гадюки *Vipera berus berus*. Трабекули селезінки (1), трабекулярна вена (2), червона пульпа (3). Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 400$.

Таким чином, гостра інтоксикація отрутою гадюк *Vipera berus berus* асоціювалась з дезорганізацією білої пульпи селезінки дослідних тварин, що проявлялась у вигляді втрати чіткості та впорядкованості розміщення її структурних елементів, поганою візуалізацією крайової зони лімфоїдних вузликів. Гермінативні центри характеризувались зростанням чисельності лімфобластів. В червоній пульпі органу відмічали ділянки деструкції тканини селезінки, геморагії. Спостерігали також наявність вогнищ апоптозу

лімфоцитів, потовщення трабекул, стази і складжі еритроцитів в просвітах трабекулярних вен.

4.6. Гістологічні зміни селезінки щурів за умов впливу отрути гадюк *Vipera berus nikolskii*

При гострій інтоксикації отрутою гадюк *Vipera berus nikolskii* спостерігали порушення гістологічної структури селезінки. В білій пульпі органу відмічали чисельні лімфоїдні вузлики. Переважна більшість останніх мала нечіткі межі внаслідок зменшення кількості лімфоцитів в крайовій зоні. В гермінативних центрах лімфоїдних вузликів селезінки виявляли клітини з фігурами мітозів, а також зростання чисельності лімфобластів. Лімфобласти характеризувались великими розмірами, в порівнянні з диференційованими В-лімфоцитами реактивних центрів. Цитоплазма лімфобластів була блідою, а ядра гіпохромними. Активація зародкових центрів лімфоїдних вузликів є реакцією селезінки на гостре ураження та призводить до збільшення кількості клітин імунного захисту. В периаартеріальних лімфоїдних зонах спостерігали наявність Т-лімфоцитів та макрофагів. Відмічали переважно малі лімфоцити. Вони були присутні у великій кількості, мали округлу форму. Ядра їх були гіперхромними, займали основну частину клітини, а цитоплазма ледь помітна. Макрофаги відрізнялись великими розмірами. Ядра макрофагів локалізувались в центрі клітини або зміщувались до її полюсів, відмічали їх яскраво виражену гіперхромність. Центральні артерії мали розширений просвіт. Ендотеліоцити їх внутрішньої оболонки розміщувались у вигляді частоколів. Tunica media цих судин була дещо набряклою. В просвітах центральних артерій подекуди виявляли клітинний детрит (рис. 4.16, 4.17).

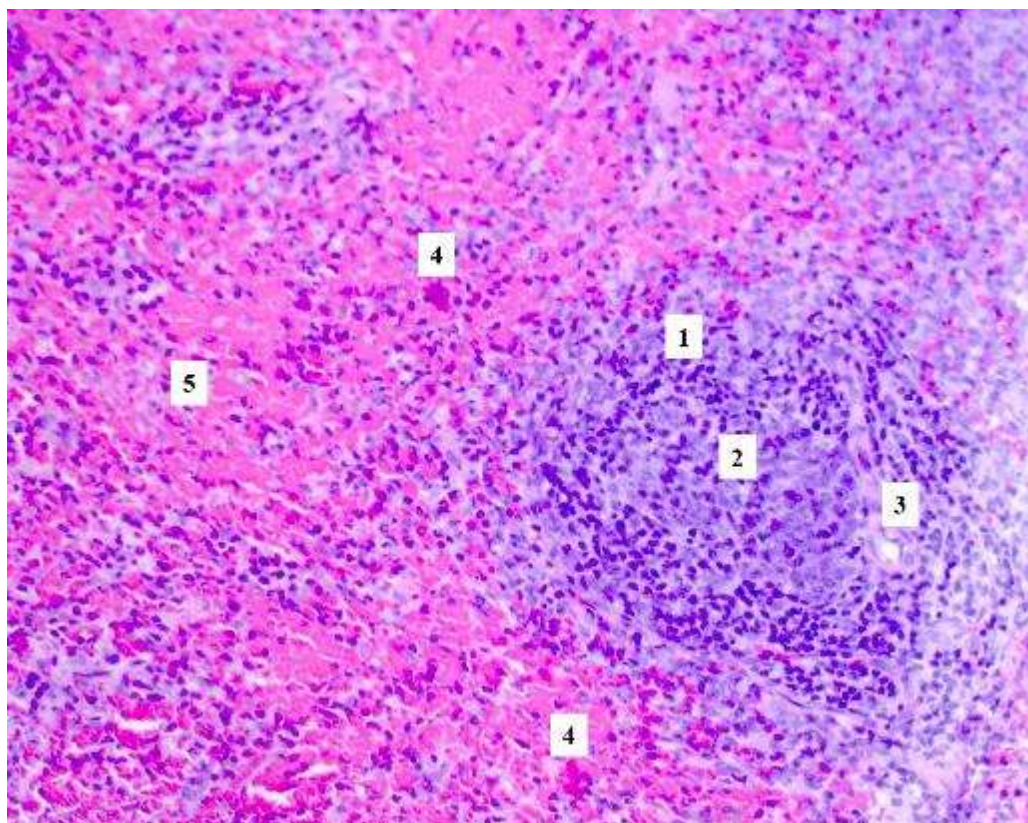


Рис. 4.16. Гістологічна організація селезінки щурів за умов впливу отрути гадюк *Vipera berus nikolskii*. Лімфоїдний вузлик (1), гермінативний центр (2), крайова зона (3), зони геморагій (4), червона пульпа (5). Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 400$.

В червоній пульпі селезінки, в порівнянні зі щурами, яким вводили отруту гадюк *Vipera berus berus*, значно підвищувалась кількість лімфоцитів, макрофагів, плазмоцитів. Еритроцити червоної пульпи розміщувались у венозних синусах селезінки, в той час як основну масу червоної пульпи займали лімфоцити та макрофаги. Чисельність плазмоцитів зростала ймовірно у відповідь на інтоксикацію, спричинену отрутою гадюки *Vipera berus nikolskii*. Плазматичні клітини мали округлу або витягнуту форму, ядра їх були гіперхромними, розміщувались ексцентрично. Макрофаги червоної пульпи мали великі розміри та чисельні відростки. Гіперхромні ядра цих клітин займали центральне або крайове положення. Цитоплазма макрофагів була просвітленою. Відмічали також піністі макрофаги з фагоцитованими

рештками клітин крові. В даній групі дослідних тварин виявлено ділянки загибелі лімфоцитів. Останні зменшувались в розмірах, ядра підлягали пікнозу. Разом з тим, в червоній пульпі виявляли вогнища геморагій, ймовірно внаслідок дії вазо- та гемотоксинів отрути, порушення міжклітинних комунікацій в ендотеліальному шарі судин. В трабекулах селезінки відмічали набряк гладком'язових клітин. Навколо трабекулярних судин спостерігали лімфоцитарну інфільтрацію. Трабекулярні вени відрізнялись розширеними просвітами. Ендотеліальні клітини їх інтими мали видовжені ядра, розміщувались переважно на базальній мембрані. В просвіті вен спостерігали яскраво виражене повнокрів'я та стаз формених елементів крові, переважно еритроцитів (рис. 4.18).

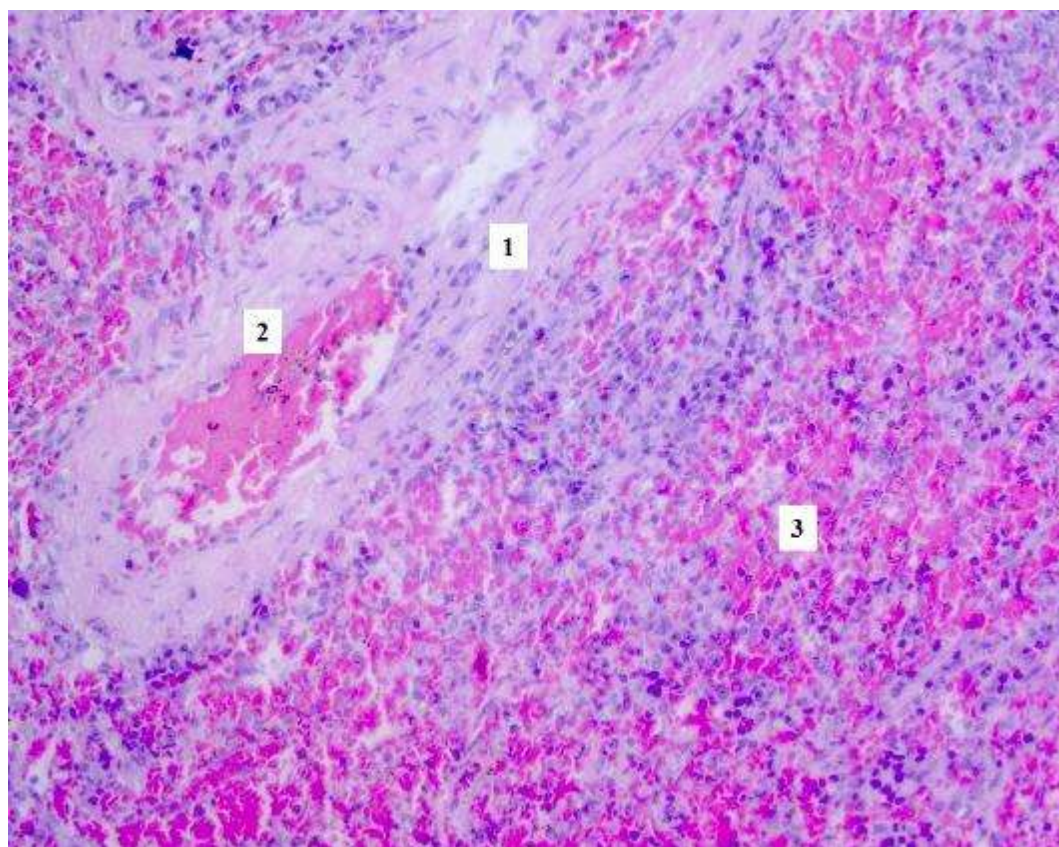


Рис. 4.17. Морфологічні зміни селезінки щурів за умов гострої інтоксикації отрутою гадюк *Vipera berus nikolskii*. Трабекули селезінки (1), трабекулярна вена (2), червона пульпа (3). Зabarвлення гематоксиліном та еозином. $\times 400$.

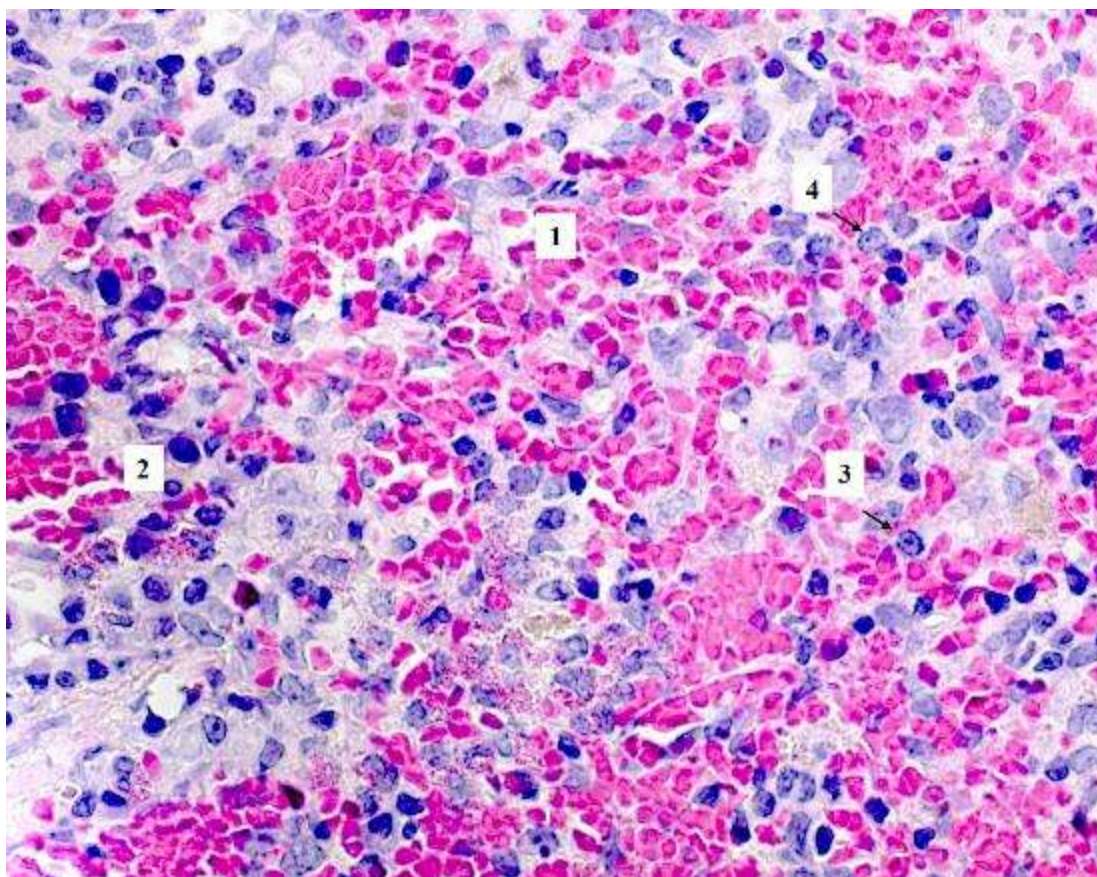


Рис. 4.18. Гістологічна організація селезінки щурів при дії отрути гадюк *Vipera berus nikolskii*. Еритроцити червоної пульпи (1), лімфоцити (2), макрофаг (3), плазмоцит (4). Забарвлення гематоксилином та еозином. $\times 1000$.

Таким чином, при введенні щурам дослідної групи отрути гадюк *Vipera berus nikolskii* відмічали зростання чисельності лімфоїдних вузликів з великою кількістю лімфобластів, клітин з фігурами мітозів. В периартеріальних зонах виявляли збільшення Т-лімфоцитів, розширення просвітів центральних артерій, потовщення їх стінок, розпушення та дезорганізацію ендотеліального вистелення внутрішньої оболонки. В червоній пульпі значно підвищувалась кількість лімфоцитів, макрофагів, плазмоцитів. Спостерігали ділянки апоптозу лімфоцитів, пінисті макрофаги, вогнища геморагій. Введення отрути також асоціювалось з лімфоцитарною інфільтрацією трабекулярних судин, розширенням просвітів вен, їх вираженим повнокрів'ям, сладжем еритроцитів.

Результати досліджень даного розділу дисертації відображені нами в двох статтях фахового журналу (Україна), що відноситься до наукометричної бази Scopus [113, 114].

РОЗДІЛ 5

МОРФОМЕТРИЧНИЙ АНАЛІЗ ГІСТОЛОГІЧНИХ ЗМІН СЕРЦЯ ТА СЕЛЕЗІНКИ ЩУРІВ НА ТЛІ ДІЇ ОТРУТИ ГАДЮК ВИДУ *VIPERA BERUS*

Для детальної оцінки дії отрути двох видів гадюк на загальний стан серця щурів нами було проведено порівняння абсолютних і відносних змінних, які нами було виміряно і підраховано відповідно, за допомогою програми Fiji:ImageJ, між контрольною та обома експериментальними групами, що піддавались дії отрут гадюк *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii*.

Дані статистичної обробки кількісних показників як м'язового, так і сполучнотканинного елементів стінки серця тварин з контрольною та експериментальних груп підтверджують процеси та особливості, відмічені нами при морфологічному дослідженні і описі відповідних тканин і структур. Для кількісної оцінки стану серця тварин нами було обрано два параметри, які було порівняно у тварин з двох експериментальних груп із контрольною групою та між собою.

По-перше, було проведено вимірювання ширини кардіоміоцитів у складі міокарду. На нашу думку, збільшення цього параметру у міокарді тварин, організм яких піддавався дії отрут, в першу чергу свідчить про розвиток набряку в саркоплазмі клітин, як відповіді на їх ушкоджуючий вплив. Для підвищення точності вимірювань, ширину м'язових клітин серця оцінювали на збільшенні $\times 1000$ на цифрових зображеннях препаратів, забарвлених еозином та гематоксиліном. За таких умов легко було вирізняти клітини та їх межі на фоні позаклітинного матриксу як за умов нормального стану цих структур, так і при патологічних процесах, які, як відомо, роблять ці межі розмитими і неконтрастними, порушують нормальну організацію та регулярність форм всіх елементів. Ширину волокон вимірювали у мкм і порівнювали між трьома групами щурів. В кожній з них проводили

вимірювання ширини 4 випадкових волокон у 20 різних «полях зору» - цифрових зображеннях, знятих у різних ділянках органу. Таким чином ми мали по 80 вимірів для контрольної та обох експериментальних груп.

Для вірного встановлення співвідношення між точками цифрового зображення та мікрометрами, при фотографуванні на зображення наносилась мірна шкала на 0,01 мм.

Окрім м'язової складової стінки серця, важливо було також оцінити реакцію інших тканин органа на отруєння, адже ендомізій, утворений пухкою сполучною тканиною, що заповнює проміжки між кардіоміоцитами, забезпечує нормальні умови їх існування і функціонування, живить їх і надає кисень завдяки наявності добре розвиненого мікроциркуляторного русла. Саме з цим руслом до серця може надійти і отрута за умови її потрапляння в циркуляторну систему організму. Незаперечною є також роль сполучнотканинної складової міокарду у його регенерації як при хронічних, так і при гострих ушкодженнях. Сполучна тканина схильна розростатись і заповнювати проміжки у випадку некрозу чи апоптозу функціональної складової органа.

Саме тому, другим параметром, який нами було обрано для кількісної оцінки і аналітичного аналізу, було співвідношення площі ендомізію, присутнього між волокнами міокарда, до власне площі самих волокон. Для проведення цих вимірювань нами було застосовано цифрові зображення препаратів, забарвлених за методикою Пікросіріус Ред, яка веде до забарвлення колагенових волокон у червоний колір, а кардіоміоцитів – в зелений. Таким чином створюється контраст кольорів, достатній для застосування порогів у програмі Fiji:ImageJ, відсіювання за цими порогамі одного кольору і вимірювання площі, зайнятої другим. Тоді ми маємо можливість оцінити площу всіх сполучнотканинних елементів у полі зору за рахунок їх інтенсивно-червоного забарвлення без необхідності вимірювати кожне окреме волокно вручну. Вимірювання проводились на зображеннях препаратів, знятих при збільшенні $\times 1000$, що також дозволяло більш точно

оцінити співвідношення площ ендомізію та кардіоміоцитів, адже «вкраплення» ендомізію між м'язовими волокнами є дуже тонкими і делікатними, їх важко виявити при менших збільшеннях.

Площа ендомізію вимірювалась нами у мкм^2 , також за допомогою програми Fiji:ImageJ вираховувався і відсоток площі, яку займає сполучнотканинний елемент відносно всієї площі препарату. Відповідно, збільшення цього відсотка відносно тварин з групи, яка не піддавалась дії негативних зовнішніх чинників, свідчить про розростання сполучнотканинного елементу, або розвитку набряку у ньому.

Статистична обробка з подальшою побудовою графіків для візуалізації одержаних результатів проводились у програмі Excel.

5.1. Оцінка ширини кардіоміоцитів у міокарді контрольної та експериментальних груп

Оскільки при перевірці вимірювань з контрольної та обох експериментальних груп на нормальність розподілу, графіки не відповідали кривій Гауса, нами для визначення достовірності відмінностей між групами було застосовано непараметричний критерій Манна-Уїтні.

Згідно з нашими вимірюваннями, було виявлено достовірну відмінність у ширині клітин серцевого м'язу не лише між контрольною групою та щурами з груп, які піддались дії отрути обох видів гадюк (*Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii*), але і між цими двома експериментальними групами (рис. 5.1).

Якщо для контрольної групи середнє значення цього показника складає 11,73 мкм (перший квартиль 9,765 мкм ; третій квартиль 12,67 мкм), то для групи, тварини якої піддавались впливу отрути *Vipera berus berus*, воно становить 14,94 мкм (перший квартиль 13,08 мкм ; третій квартиль 16,49 мкм).

Достовірне розширення кардіоміоцитів у цій експериментальній групі відносно контрольної є логічним наслідком дії отрути на структури серця і цілком співвідноситься з морфологічними змінами у цьому органі.

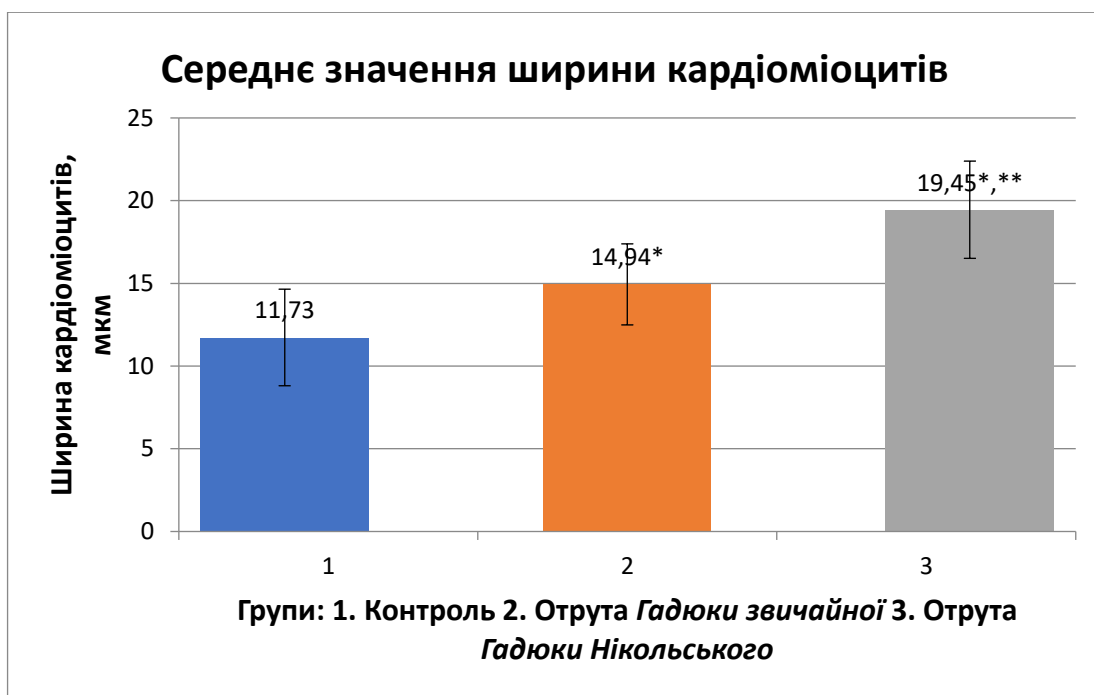


Рис. 5.1. Середнє значення ширини кардіоміоцитів у контрольній групі, групі із введенням отрути *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii*. * – відмінність від контрольної групи достовірна при $p \leq 0,05$; ** – відмінність від групи із введенням отрути *Vipera berus berus* достовірна при $p \leq 0,05$.

При описі стану серця тварин з експериментальної групи, яка зазнала впливу отрути Гадюки звичайної, спостерігався набряк у м'язових волокнах, що спричинювався, імовірно, вакуолізацію саркоплазми. Як відомо з літератури, вплив отруйних речовин викликає порушення мікроциркуляції вже через 3 години після зовнішньої токсичної дії на орган, що, в свою чергу, призводить до гострої гіпоксії міокарда, що морфологічно виражається у вакуолізації саркоплазми [96], імовірно через розширення внутрішнього просвіту гладенької ендоплазматичної сітки та набряку лізосом у спробі боротись з токсинами, що потрапили у цитоплазму клітини. Крім того, нами

відзначалось і порушення форми кардіоміоцитів, що не могло не відображатись на їх діаметрі. Якщо у контрольній групі кардіоміоцити характеризувались чіткими межами і регулярною прямокутною формою, під впливом отрути відзначалась втрата прямокутної форми, нерегулярність і округлість, випуклість контурів. Такі зміни форми клітин кількісно відображаються у збільшенні їх ширини.

Крім того, при морфологічному описі кардіоміоцитів помітним було порушення у посмугованості міокарда, що свідчить про порушення в цитоплазмі, пов'язані з регулярною і чіткою організацією волокон актину і міозину – розшарування цих структур також збільшує обсяг цитоплазми, і, відповідно, ширину клітини.

Якщо говорити про поверхневий комплекс клітин, то морфологічне дослідження показало локальні зони руйнування сарколеми, що є важливим фактором обмеження і структурування цитоплазми. При порушенні структури сарколеми, чіткої організації волокон актину і міозину, цілком імовірним є розширення цистерн саркоплазматичного ретикулюму, всі ці фактори разом впливають на збільшення розмірів кардіоміоцитів, що і відображають результати наших вимірювань.

Яскраво виражені патологічні зміни у стінці серця щурів з експериментальної групи, що піддавалась впливу отрути гадюки *Vipera berus nikolskii* відображаються як у результатах морфологічного, так і морфометричного досліджень (див. рис. 5.1). Середній показник ширини кардіоміоцитів тварин, які піддавались впливу отрути цього виду гадюки, становить 19,45 мкм (перший квартал 17,19 мкм; третій квартал 21,23 мкм) – достовірно більший не лише за параметри контрольної групи, але і статистично достовірно відрізняється від показника ширини цих клітин у тварин з групи, яка зазнала дії отрути Гадюки звичайної. Це свідчить про потужний деструктивний вплив досліджуваної отрути, що посилює процеси набряку, дезорганізації внутрішньоклітинних структур та поверхневого апарату кардіоміоцитів.

Зокрема, м'язові волокна у препаратах з цієї групи були більш фрагментованими і дезорієнтованими у площині, ніж в іншій експериментальній групі. Вони потовщувались, набрякали і набували звивистої форми. Нерівномірне зафарбовування волокон міокарда, виявлене при морфологічному описі, також свідчить про розвиток процесів набряку у саркоплазмі. Посмугованість, а отже і організацію внутрішньоклітинних волокон було остаточно втрачено, волокна розшаровувались, а сарколема була вже не частково ушкоджена, а місцями повністю відсутня. Всі ці морфологічні ознаки свідчать про більш виражений перебіг процесів набряку, деструкції і некрозу у кардіоміоцитах тварин з даної групи, що чисельно вилилось у значне збільшення їх розмірів, і ширини зокрема.

Таким чином можна говорити про морфометрично підтверджений вплив отрути Гадюки Нікольського, який у своїй негативній дії перевершив іншу досліджувану отруту, що вилилось у статистично достовірне збільшення ширини волокон міокарду відносно не лише контрольної, але і другої експериментальної групи з введенням отрути у нашому дослідженні.

5.2. Оцінка площі та долі ендомізію у міокарді контрольної та експериментальних груп

Для кількісної оцінки стану стінки серця щурів, що піддавались дії отрути нами було обрано вимірювання площі, зайнятої на поперечних зрізах ендомізієм, адже саме ця сполучна тканина напряду оточує волокна серцевого м'яза і разом з ними реагує на негативні зовнішні впливи, більше того, виступає бар'єром на шляху токсичних речовин безпосередньо до кардіоміоцитів, адже мстить у собі судини мікроциркуляторного русла, що доносять всі речовини до та від клітин серця. Для адекватної і точної кількісної

оцінки долі ендомізію було використано цифрові зображення зрізів, забарвлених Пікросиріусом червоним, адже саме цей барвник вважається стандартом для виявлення колагену та кількісної його оцінки в гістологічних зрізах нормальних і аномальних тканин [57].

Дані кількісної оцінки площі ендомізію у зрізах показали статистично достовірне її зростання у обох експериментальних групах у порівнянні з групою контролю (рис. 5.2, 5.3), що підтверджує результати морфометричних досліджень тканин міокарда. Зокрема, в експериментальних групах було відмічено активізацію синтетичної активності фіброblastів, про що свідчив їх високий ядерно-цитоплазматичний індекс. Така активність призводила до підвищеного вироблення в оточуючий матрикс колагену, що утворював сітку волокон між кардіоміоцитами – її площу ми і вимірювали у межах ендомізію.

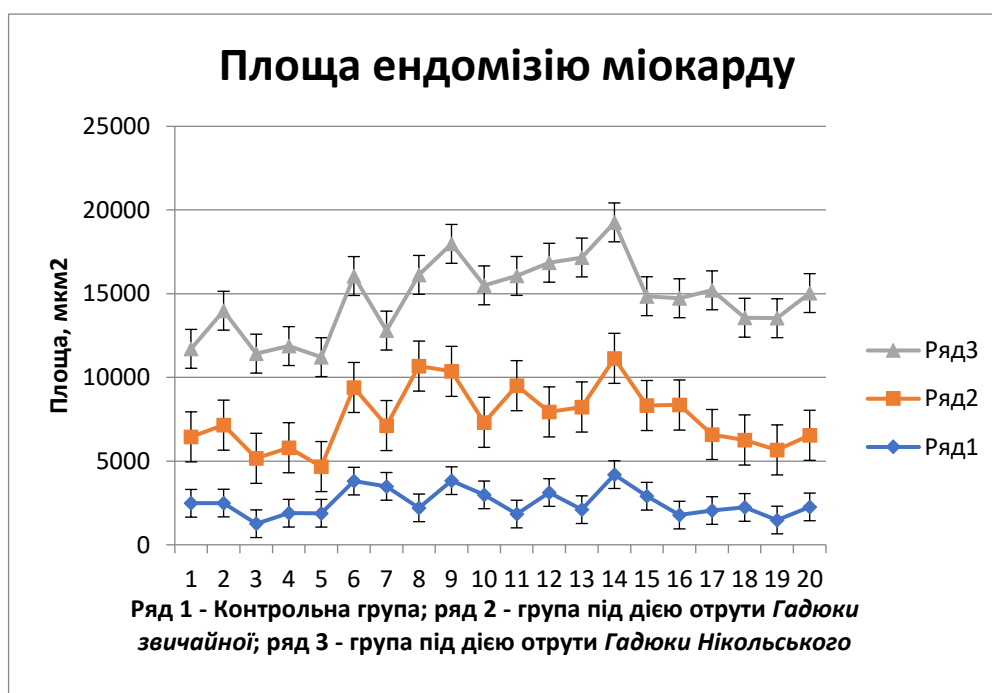


Рис. 5.2. Індивідуальні показники площі ендомізію в міокарді тварин з контрольної та експериментальних груп зі стандартним відхиленням. Ряд 1 – контрольна група; ряд 2 – група із введенням отрути гадюки *Vipera berus berus*; ряд 3 – група із введенням отрути *Vipera berus nikolskii*.

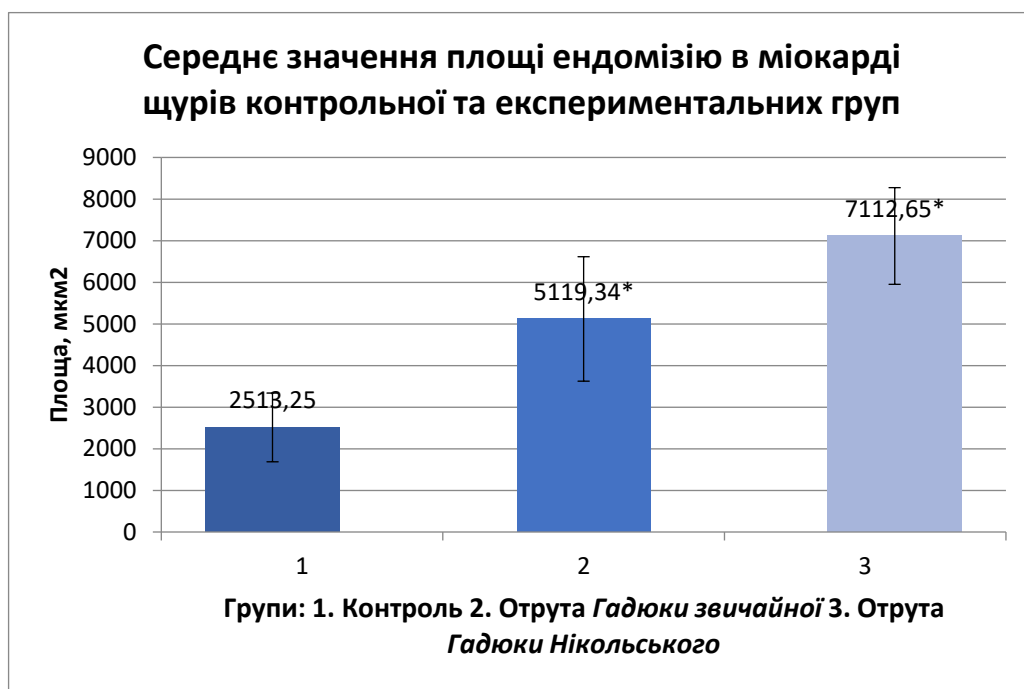


Рис. 5.3. Середнє значення площі ендомізію міокарду серця у контрольній групі, групі із введенням отрути *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii*. * – відмінність від контрольної групи достовірна при $p \leq 0,05$.

У контрольній групі середній показник площі ендомізію склав 2513 мкм² (перший квартиль 1886 мкм²; третій квартиль 3019 мкм²), тоді як для групи, тварини якої піддавались впливу отрути *Vipera berus berus*, він становив 5119 мкм² (перший квартиль 4013 мкм²; третій квартиль 6235 мкм²). Цей показник статистично достовірно вищий, ніж у контрольній групі, що пояснюється кількома аспектами.

По-перше, як уже було згадано, морфологічні свідчення підвищеної синтетичної активності фібробластів свідчать про продукцію колагену в межах ендомізію. По-друге при морфологічному дослідженні міокарду даної експериментальної групи було відмічено потовщення стінки судин, розростання адвентиції як вен, так і артерій, що утворені пухкою сполучною тканиною, яка своїми колагеновими волокнами вплітається в оточуючу сполучні тканину. Відповідно, це також загалом призводить до збільшення

площі ендомізію, в межах якого вони залягають. По-третє, токсичний вплив отрути викликає розвиток процесів набряку не лише в кардіоміоцитах, але і в елементах ендомізію та стінок судин в його складі, їх повнокровності, розпушення і набряку інтими. Застійні явища у венозній системі міокарда також морфометрично відображаються у зменшенні частини площі, зайнятої безпосередньо кардіоміоцитами до площі сполучної тканини з включеними у неї судинами.

Середній показник ширини кардіоміоцитів тварин, які піддавались впливу отрути Гадюки Нікольського, становить 7113 мкм^2 (перший квартал 6346 мкм^2 ; третій квартал 8137 мкм^2) – достовірно більший за відповідний показник контрольної групи, при цьому достовірної різниці за цим показником між двома експериментальними групами не спостерігалось. Ці дані відповідають нашим спостереженням щодо морфологічного стану міокарду щурів з цих груп.

Зокрема, наявні в даній експериментальній групі вогнища некрозу та міоцитолізу оточені зонами значного набряку тканини міокарду. До загальної площі сполучної тканини, колагенові волокна якої ми візуалізували за допомогою Пікринового червоного та вимірювали, додавалась і адвентиція судин, в якій при морфологічному дослідженні відзначалась колагенізація, самі судини були розширеними і повнокровними, що збільшувало їх площу.

Важливо відзначити, що набряку піддаються як сполучнотканинні, так і м'язові складові міокарду, зокрема, при морфологічному дослідженні нами відзначалась округла форма та численні внутрішньоклітинні набряки в них. Ядра кардіоміоцитів набрякали і втрачали витягнуту форму, відображаючи зміну форми самих клітин. Це також відображається у даних статистики – абсолютні значення площі ендомізію у обох експериментальних групах достовірно більші від контролю, в той же час відсоткове співвідношення площі сполучної тканини до загальної площі зрізу не є достовірно більшим, хоча і проявляє тенденцію до збільшення (табл. 5.1). Відмічена нами при морфологічному описі тканин міокарду фрагментація кардіоміоцитів, що

супроводжувалась порушенням цілісності сарколеми цих клітин, також неодмінно призводила до збільшення їх площі.

Таблиця 5.1

Показники середнього значення частки ендомізію у міокарді щурів з контрольної та експериментальних груп.

Група	Контрольна	Експериментальна з отрутою Гадюки звичайної	Експериментальна з отрутою Гадюки Нікольського
Середнє значення і стандартне відхилення, %	10,56±3,47	21,51±6,28	29,88±4,88

Це свідчить на користь того, що на фоні певної активізації фіброblastів і відповідного підвищення вмісту колагену та інших елементів сполучної тканини у позаклітинному матриксі, різноманітні фактори підвищення показника площі, зокрема набряк, розшарування структур та викривлення їх форми, рівномірно вражають як сполучнотканинні складові ендомізію, так і самі кардіоміоцити.

Загалом варто відзначити, що згідно з даними морфометричних досліджень, ми можемо говорити про більш виражений шкідливий вплив отрути *Vipera berus nikolskii*, що проявлявся у порушенні структури та форми, набряці кардіоміоцитів, і призводив до достовірно вищих показників ширини цих клітин як у порівнянні з групою контролю, так і з другою експериментальною групою. Крім того, дія обох отрут, хоч і різною мірою, призводила до розростання елементів сполучної тканини у межах ендомізію, що відображалось у збільшенні показника частки цієї тканини в міокарді. Обидві отрути провокували підвищення частки сполучної тканини в міокарді, проте на фоні набрякlostі м'язових клітин, відносне збільшення площі ендомізію до них проявляє тенденцію до збільшення але не є достовірним.

Для оцінки токсичного впливу отрут на загальну морфологію селезінки та прояви антиген-залежних імунних процесів у ній нами було проведено порівняння дискретних і безперервних змінних у щурів з контрольної та двох експериментальних груп (із введенням отрути *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii*). Дискретні і безперервні змінні нами було підраховано і виміряно відповідно, за допомогою програми Fiji:ImageJ, у контрольній та обох експериментальних групах.

Морфологічні зміни у селезінках тварин, що відображають перебіг імунних процесів в цих органах, було оцінено завдяки порівнянню співвідношення площ білої та червоної пульпи у селезінках щурів з трьох досліджуваних груп. Адже відомо, що саме така складова паренхіми, як біла пульпа (яка займає в середньому 20 % загальної площі паренхіми в селезінці здорового організму, решту 80 % площі заповнюють елементи червоної пульпи) утворена лімфатичними вузликами, в межах яких, зокрема, присутні периартеріальні піхви та інші імунні компоненти, відповідальні за формування Т- і В-лімфоцитів. Тому зростання середньої площі, яку займають складові білої пульпи, можуть свідчити про зростання активності селезінки у даній групі. Оцінка цього показника проводилась на 8 цифрових зображеннях, одержаних від 4 тварин з кожної з трьох груп, зі світлового мікроскопа на збільшеннях $\times 200$ і $\times 400$, препарати забарвлювались еозином та гематоксиліном.

Для вірного встановлення співвідношення між точками цифрового зображення та мікрометрами, при фотографуванні на зображення наносились мірні шкали на 0,1 і 0,05 мм.

Виходячи з логіки імунних процесів у селезінці, вимірювання площі вузликів білої пульпи та встановлення їх долі відносно червоної пульпи, що оточує їх з усіх боків, відображають перебіг у цьому імунному органі таких реакцій, як антиген-залежне диференціювання В- і Т-лімфоцитів у відповідь на вплив зовнішніх негативних чинників, у нашому випадку, токсинів, дедиференціацію цих клітин у лімфобласти, формування з В-

лімфоцитів диференційованих плазмоцитів, здатних до вироблення антитіл, тощо. Очевидно, що активізація перелічених процесів говорить про відповідь селезінки на вплив чужорідних чинників, у нашому випадку, отрут.

Потенційний негативний вплив інтродукованих ззовні отруйних факторів на функціонування паренхіматозних і стромальних складових селезінки оцінювали за допомогою дискретного параметру – було підраховано кількість макрофагів, що містять у собі включення пігменту ліпофусцину, оскільки саме цей пігмент є прямим продуктом боротьби гістіоцитів з токсичною дією реактивних форм кисню на складові клітини. Адже відомо, що накопичення токсинів у тканинах призводить до дисбалансу гомеостазу активних форм кисню (АФК), при цьому печінка та селезінка виступають як головні мішені цього підвищеного окислювального стресу [153]. Цікавим також є той факт, що, наприклад, у мишей низькі дози токсикантів токсичні для імунної системи, але відносно безпечні для інших органів [147]. Відповідно саме у селезінці ми очікували морфометричних проявів дії навіть потенційно менш токсичної отрути.

Для визначення кількості макрофагів з включеннями ліпофусцину в програмі Fiji:ImageJ було застосовано плагін “Cell counter”. Підрахунок проводили на цифрових зображеннях препаратів, які були забарвлені еозином і гематоксиліном, що допомогло нам верифікувати наявність коричнево-золотистих включень ліпофусцину саме в макрофагах. Обробляли по 5 цифрових зображень від кожної з чотирьох тварин в трьох групах (контрольній та двох експериментальних) на збільшенні $\times 1000$. Відповідно, ми мали для аналізу по 20 цифрових зображень на кожну з груп, що підвищувало статистичну достовірність вимірів. Всі дані в подальшому оброблялись в Excel.

5.3. Оцінка співвідношення площі білої та червоної пульпи у паренхімі селезінки між контрольною та експериментальними групами

Оскільки при перевірці вимірювань з контрольних та експериментальних груп тварин на нормальність розподілу, графіки не відповідали кривій Гауса, нами для визначення достовірності відмінностей між групами було застосовано непараметричний критерій Манна-Уїтні.

Згідно з нашими вимірюваннями, достовірної відмінності відносно контролю у співвідношенні між білою та червоною пульпою селезінки не спостерігалось для жодної з експериментальних груп (рис. 5.4). Тим не менш, нами спостерігалась тенденція до збільшення долі білої пульпи для тварин, що піддавались дії отрути *Vipera berus berus*. Якщо для контрольної групи щурів середнє значення цього показника складало 0,277 (перший квартиль 0,207; третій квартиль 0,343), то для групи, тварини якої піддавались дії отрути *Vipera berus berus*, воно становить 0,443 (перший квартиль 0,396; третій квартиль 0,54).

При цьому стандартне відхилення даного параметру у експериментальній групі дещо більше за групу контролю, що говорить про неоднорідність процесів розростання білої пульпи в межах червоної у цій групі (див. рис. 5.4, рис. 5.5). Загалом дані результати відповідають результатам проведеного нами морфологічного опису паренхіми селезінки тварин з цієї експериментальної групи. Збільшенню площі білої пульпи відносно червоної сприяла загальна дезорганізація її структури, що проявлялась, зокрема, у нечіткості контурів лімфоїдних вузликів, через що їх крайову зону майже не можна було диференціювати. Крім того, розростанню білої пульпи сприяло збільшення розмірів гермінативних центрів, зі зростанням кількості лімфобластів в них. Якраз така реакція є фізіологічною при потрапленні з кров'ю до органа токсинів, адже омолодження і активна проліферація з

переважанням молодих лімфобластів над зрілими В-лімфоцитами супроводжують реакції організму на негативний вплив антигенів.

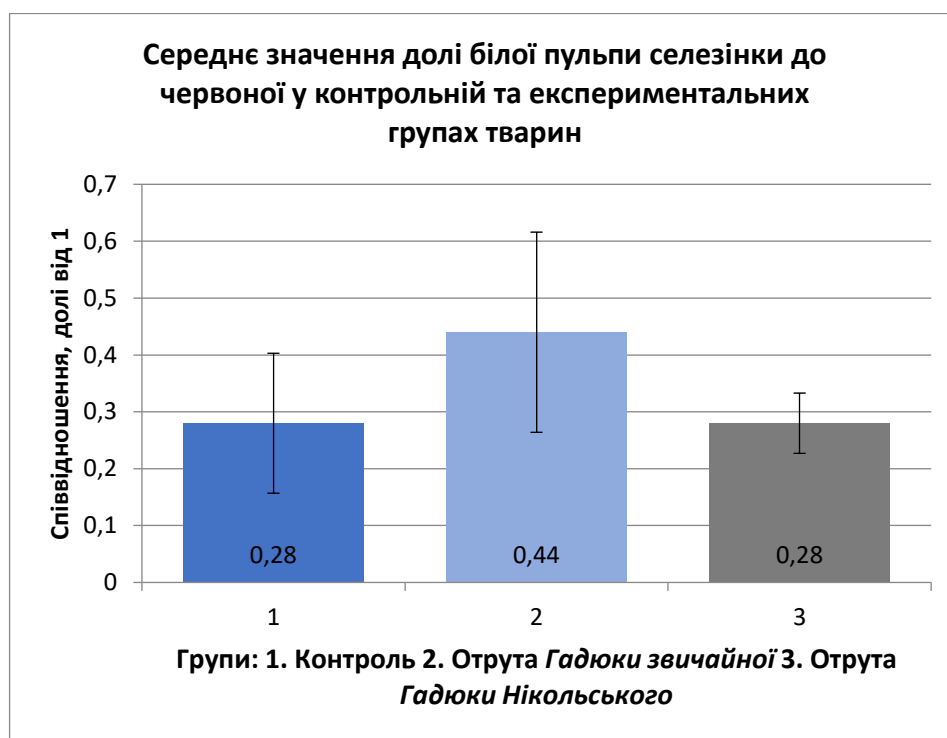


Рис. 5.4. Середнє значення частки білої пульпи селезінки до червоної зі стандартним відхиленням у контрольній групі, групі із введенням отрути *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii*. * – відмінність від контрольної групи достовірна при $p \leq 0,05$.

При цьому в червоній пульпі селезінки тварин з даної групи зміни не були настільки вираженими, щоб повпливати на її загальну площу. Адже згідно з нашим морфологічним дослідженням, зони деструкції тканин червоної пульпи та геморагії в них, хоч і були наявні, але мали досить обмежений характер. Всі ці дані разом свідчать про активізацію білої пульпи селезінки щурів у відповідь на дію токсинів отрути *Vipera berus berus*.

Якщо ж говорити про зміни у співвідношенні білої та червоної пульпи у групі із введенням отрути *Vipera berus nikolskii*, то тут цей показник практично не відрізняється від такого у контрольній групі. Тут він становить 0,278 (перший квартиль 0,229; третій квартиль 0,321) при середньому значенні 0,277

у контролі. При інтерпретації цих результатів важливо не забувати, що ми говоримо не про абсолютні, а про відносні показники, тобто тут варто враховувати зміни не лише в білій, але і в червоній пульпі – при збільшенні площ обох цих складових паренхіми, співвідношення між ними драматично не змінюватиметься. що не говоритиме про відсутність перебігу патологічних процесів у них.

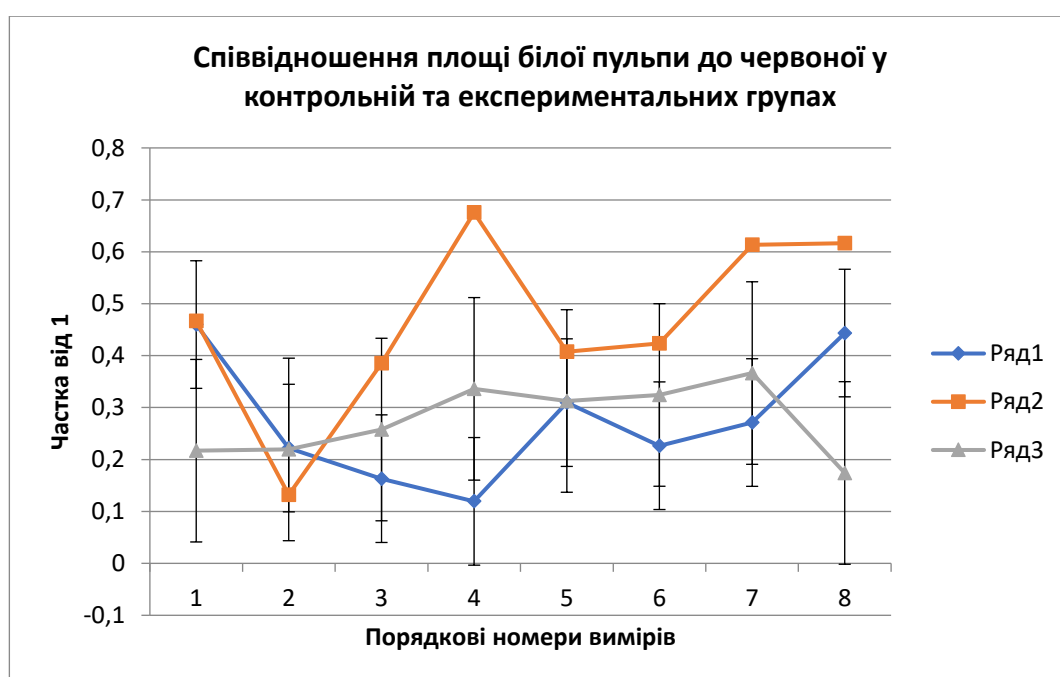


Рис. 5.5. Індивідуальні показники частки білої пульпи селезінки до червоної зі стандартними відхиленнями. Ряд 1 – контрольна група; ряд 2 – група із введенням отрути *Vipera berus berus*; ряд 3 – група із введенням отрути *Vipera berus nikolskii*.

При морфологічному вивченні білої пульпи щурів з даної групи нами було відмічено зменшення кількості лімфоцитів в крайовій зоні та загальне зростання чисельності лімфобластів, що загалом відповідає нормальній реакції імунного органу на потрапляння в організм негативного зовнішнього чинника – антигена. Дані процеси призводять до збільшення долі білої пульпи, але у випадку даної групи, значний ступінь враження червоної пульпи призвів до незмінності загального співвідношення.

Також варто звернути увагу на те, що площа білої пульпи перебуває не лише під впливом процесів мітозу білих клітин і збільшення їх кількості, але також може дещо зменшуватись у зв'язку із загибеллю частини з них шляхом апоптозу. При морфологічному дослідженні нами в білій пульпі виявлялись не лише процеси проліферації лімфоцитів, але і їх загибель, з типовими ознаками апоптозу: клітини зморщувались, їх ядра мали ознаки пікнозу. Дані процеси загалом не сприяли розростанню цієї складової паренхіми.

При вивченні стану червоної пульпи тварин з моделюванням гострої інтоксикації отрутою гадюк *Vipera berus nikolskii* нами було відмічено вогнища геморагії через порушення цілісності судин внаслідок вазотоксичної дії отрути. Імовірно, через гемотоксичну дію отрути розширювались просвіти вен, заповнені агрегованими форменими елементами крові. Як відомо, внутрішньосудинна складова червоної пульпи також впливає на загальну її площу, тож повнокрів'я в просвітах вен та стаз формених елементів крові додали до розширення площі червоної пульпи.

Таким чином, за результатами оцінки співвідношення білої пульпи до червоної у контрольній групі та групах з моделюванням гострої інтоксикації двома типами отрут, нами було виявлено тенденцію до збільшення долі білої пульпи у групі, на яку діяли отрутою Гадюки звичайної і що ми пов'язуємо з активним перебігом імунних процесів в ній. При цьому значний деструктивний вплив отрути Гадюки Нікольського як на білу, так і а червону пульпу, призвів до збільшення площі обох і мало повпливав на співвідношення між ними. При цьому, беручи до уваги дані морфологічного опису, стає зрозумілим, що значний вплив складових отрути даної гадюки саме на кров і судини у складі червоної пульпи є більш агресивним, ніж у іншій експериментальній групі.

5.4. Оцінка кількості макрофагів з включеннями ліпофусцину у червоній пульпі селезінки тварин контрольних та експериментальних груп

Визначення кількості тканинних макрофагів, що включають у себе гранули ліпофусцину, є показовим у оцінці рівня оксидативного стресу в тканинах селезінки у тварин з експериментальних груп при моделюванні гострої інтоксикації двома типами отрут, адже, як відомо, дія зовнішніх токсинів призводить до підвищення концентрації активних форм кисню в тканинах [147]. Побудова графіків нормального розподілу на основі даних підрахунку не показала кривої Гауса, тож нами знову було застосовано критерій Манна-Уїтні для порівняння груп.

При аналізі даного параметру було виявлено статистично достовірне згідно критерію Манна-Уїтні збільшення кількості макрофагів з включеннями ліпофусцину не лише в обох експериментальних групах відносно групи контролю, але і між двома групами, в яких моделювали отруєння (рис. 5.6). Загалом це свідчить на користь зростання оксидативного стресу і боротьби з реактивними формами кисню.

Якщо у тварин в контрольній групі в середньому в полі зору при збільшенні $\times 1000$ спостерігається 6,2 клітин з ліпофусцином (перший квартиль 5; третій квартиль 7), то для групи, тварини якої піддавались дії отрути Гадюки звичайної, кількість клітин в середньому складає 14,55 (перший квартиль 12; третій квартиль 16,25) (див. рис. 5.6). Статистично достовірне зростання кількості клітин з включеннями ліпофусцину характерного золотисто-коричневого відтінку свідчить про накопичення надмірної кількості агрегованих білків. Можна стверджувати, що цей процес підсилюється окисним стресом, спричиненим інтоксикацією. З літератури відомо, що агрегати білків поглинаються макроаутофагією та внаслідок реакції з іншими

клітинними компонентами утворюють ліпофусцин, який акумулюється в лізосомальній системі клітин [79].

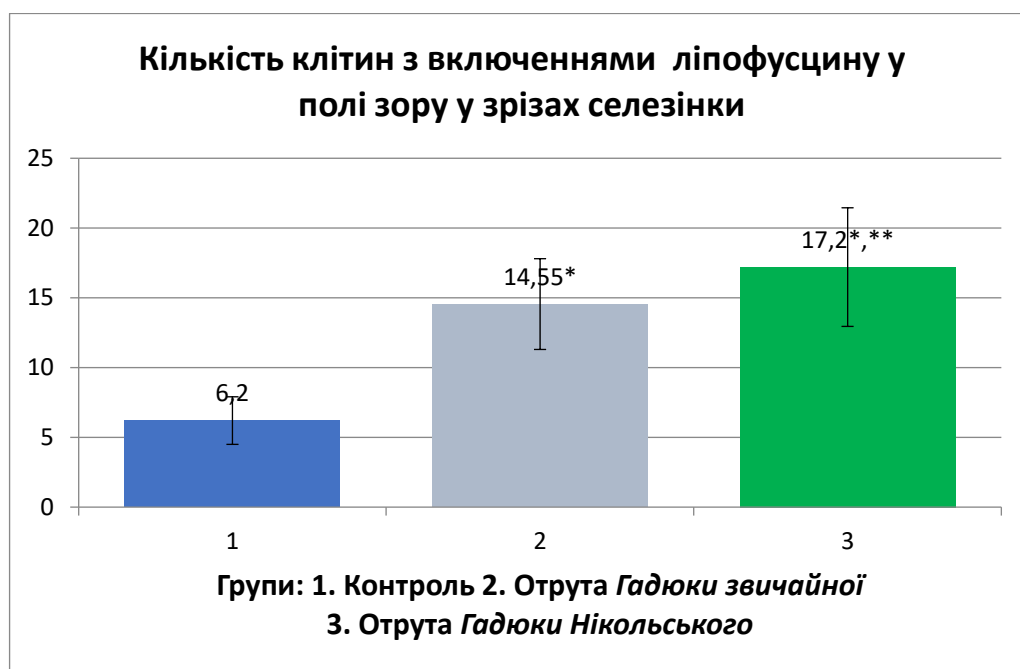


Рис. 5.6. Середнє значення кількості макрофагів з включеннями ліпофусцину у полі зору в контрольній та експериментальних групах. * – відмінність від контрольної групи достовірна при $p \leq 0,05$; ** – відмінність від експериментальної групи із введенням отрути *Vipera berus berus* достовірна при $p \leq 0,05$.

Морфологічний опис контрольної та даної експериментальної групи допомагає зрозуміти саме такі результати морфометричних досліджень. У групі, де щури піддавались дії отрути Гадюки звичайної, в червоній пульпі спостерігались численні макрофаги великих розмірів, що характеризувались численними відростками. Така морфологія цих клітин свідчить про їх підвищену фагоцитарну активність. Клітини намагаються поглинати шкідливі часточки з оточуючого середовища, лізосоми в них накопичують продукти метаболізму цих часточок, частину з яких у вигляді ліпофусцину. Те, що при цьому нами відзначались ознаки набряку, нерівномірне забарвлення цитоплазми макрофагів і накопичені в них залишки фагоцитованого матеріалу

свідчить про те, що, імовірно, ці клітини не завжди справлялись з надмірною кількістю шкідливих речовин, не могли перетравити все поглинуте і вивести екзоцитозом назовні. Клітини піддавались патологічним змінам і акумулювали недоперетравлені рештки токсинів, у тому числі у вигляді так званого «пігменту накопичення» – ліпофусцину.

У щурів, що зазнали впливу потенційно більш токсичної отрути Гадюки Нікольського, в середньому в полі зору при збільшенні $\times 1000$ спостерігається 17,2 клітин з включеннями пігменту ліпофусцину (перший квартал 14,75; третій квартал 18,50), що статистично достовірно більше кількості даних клітин не лише в контрольній групі, але і в групі із введенням отрути Гадюки звичайної, що в черговий раз підтверджує її вищу токсичність. Статистично достовірне зростання частки макрофагів з включеннями ліпофусцину показує боротьбу цих клітин з часточками токсину та наслідками підвищення рівня реактивних форм кисню в тканинах селезінки, як одного із наслідків отруєння.

Згідно з результатами морфологічного дослідження можна пояснити таке зростання кількості макрофагів з включеннями ліпофусцину патологічними процесами в цих клітинах, що перешкоджали остаточному перетравленню поглинутих чужорідних часточок і сприяли накопиченню цього золотисто-коричневого пігменту в них. В цій групі, як і в іншій експериментальній, спостерігалось збільшення у розмірах макрофагів і кількості їх відростків, але морфологічною особливістю, унікальною для цієї групи, є пінистість цитоплазми цих клітин з фагоцитованими рештками елементів крові. Цілком імовірно, загибель клітин крові внаслідок гемотоксичної дії отрути Гадюки Нікольського призводила до перевантаження фагоцитуючих клітин селезінки, які не могли перетравити таку кількість часток чужорідного походження та залишків власних клітин, що призводило до набряку, сповільнення процесів метаболізму і накопичення продуктів обміну.

Також варто звернути увагу на те, що в обох експериментальних групах стандартне відхилення є більшим, ніж у контрольній, а отже, на зрізах

селезінки тварин з цих груп кількість макрофагів зростає нерівномірно (табл. 5.2).

Таблиця 5.2

Показники кількості макрофагів з включеннями ліпофусцину у контрольній і експериментальних групах.

Поле зору	Контрольна група	Експериментальна група із введенням отрути <i>Vipera berus berus</i>	Експериментальна група із введенням отрути <i>Vipera berus nikolskii</i>
1	5	15	14
2	3	18	18
3	5	17	15
4	7	19	18
5	3	21	12
6	8	12	17
7	6	10	14
8	5	12	14
9	7	19	20
10	7	14	12
11	10	10	15
12	6	15	15
13	7	15	17
14	6	16	20
15	8	14	22
16	5	10	15
17	7	16	17
18	6	14	31
19	8	10	20
20	5	14	18

Загалом, за результатами обробки дискретних та безперервних даних підрахунків та вимірювань у селезінці тварин контрольної групи та експериментальних груп з моделюванням гострої інтоксикації двома типами отрут, варто відмітити, що зростання загальної площі білої пульпи притаманне обом експериментальним групам у порівнянні з групою контролю, проте патологічний вплив отрути Гадюки Нікольського на червону пульпу призводить до сукупності процесів, які збільшують її загальну площу, таким чином вирівнюючи співвідношення білої пульпи до червоної у цій групі. Тож найбільш яскраво вираженим зростання частки лімфатичних вузликів відносно червоної пульпи є саме у щурів, що зазнали дії отрути Гадюки звичайної, що свідчить про інтенсивні процеси проліферації лімфоцитів саме при дії цього токсину.

На відміну від частки білої пульпи, кількість макрофагів з включеннями ліпофусцину є статистично достовірно більшою за критерієм Манна-Уїтні для обох експериментальних груп відносно групи контролю, що говорить про реакцію на токсичну дію обох отрут не лише лімфоцитів, а і макрофагів та про вплив токсинів у надмірних кількостях на метаболічні процеси в клітинах. При цьому сильна гемолітична дія отрути Гадюки Нікольського призводить до руйнування формених елементів крові і накопичення їх часточок, які теж фагоцитують макрофаги. Це додає ще один фактор навантаження на фагоцитуючі клітини, призводячи до їх перевантаження і порушення нормальних процесів метаболізму і екзоцитозу. Клітини набрякають і накопичують проміжні продукти метаболізму, неперетравлені рештки і в тому числі ліпофусцин. Тому кількість макрофагів з накопиченнями ліпофусцину в цій групі достовірно більша не лише за контрольну, але і за іншу експериментальну групу.

Результати досліджень даного розділу дисертації відображені нами в двох статтях фахового журналу (Україна) [35, 36] та одних тезах науково-практичної конференції [4].

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Кардіотоксичність і значні електрокардіографічні зміни часто виникають як ускладнення укусів змій [104, 146, 172]. Найбільш поширеними проблемами є синусова аритмія, атріовентрикулярна блокада та синусова брадикардія. Укуси змій родини Viperidae часто пов'язують із такими станами, як інфаркт міокарда та ішемічний інсульт, які виникають внаслідок активації каскаду згортання крові та прямого кардіотоксичного ефекту протеолітичних ферментів отрути, особливо металопротеїназ. Крім того, компоненти їх токсинів призводять до гіпофібриногенемії, пошкодження ендотелію кровоносних судин і порушення агрегації тромбоцитів [111, 181, 183].

Патогенез інфаркту міокарда, спричиненого укусами змій, включає порушення доставки кисню до кардіоміоцитів. Це порушення є наслідком надмірного гемолізу еритроцитів, вазоконстрикції коронарних судин через збільшення продукції ендотеліну та ефектів сафатоксинів отрути. Дослідники відзначають можливість розвитку міокардиту, що характеризується значним некрозом скорочувальних міоцитів, крововиливами та накопиченням тромбів у мікроциркуляторних судинах серцевого м'яза [34, 87, 165].

Введення зміїної отрути *Crotalus durissus cascavella* викликає морфологічні зміни в тканинах серця. При світловій мікроскопії виявлено ознаки запалення та крововиливів, зменшення об'єму клітин, еозинофільну інфільтрацію, втрату поперечної смугастості міофібрил, зміни в ядрах кардіоміоцитів, накопичення гранул у саркоплазматичному ретикулумі та порушення цілісності м'язового волокна. Крім того, отрута спричиняє сильний інотропний ефект шляхом активації шляху NO/cGMP/протеїнкінази G, що призводить до гіпотензії та брадикардії *in vivo*. Оксид азоту зменшує надходження іонів Ca^{2+} через канали L-типу в міокарді щурів. Він також

посилює опосередковане цГМФ/протеїнкіназою G фосфорилування серцевого тропоніну I та білка C, що зв'язує міозин, сприяючи розслабленню м'язів і негативному інотропному ефекту [164].

Отрута гадюки амодитової та інших європейських гадюк може проявляти кардіотоксичну дію. Основним фактором, що впливає на структуру ураження серця, є аналог секреторного PLA2, відомий як амодитилін L. В експериментах із використанням ізольованої моделі серця щура він викликав значні та незворотні порушення провідності, зокрема важкі атріовентрикулярні блокади. Цей процес асоціювався з підвищенням рівня КФК, ЛДГ, АСТ і тропоніну I в крові піддослідних тварин, що свідчило про пошкодження серцевої тканини [85, 86].

Імунна система має вирішальне значення для реакції організму на різні фактори зовнішнього середовища, що впливають на фізіологічні процеси. Будь-які зміни гомеостазу викликають імунну відповідь. Така реакція також викликана укусами отруйних тварин, наприклад змій. Хоча відомо, що їхні токсини можуть викликати імунну відповідь II типу, останні дослідження показують, що взаємодія між цією імунною системою та отрутою гадюки складніша, ніж вважалося раніше. Враховуючи безліч ферментів і неферментативних елементів, присутніх в отруті, не дивно, що розвивається виражена запальна реакція, яка все ще досліджується. Ключовими учасниками цього процесу є PLA2 і SVMP. Висока активність PLA2 у зміїній отруті призводить до підвищення рівня арахідонової кислоти та пов'язаних з нею цитокінів. Крім того, токсини стимулюють вивільнення IL-6, TNF- α , IL-1, хемокінів і ліпідних медіаторів, полегшуючи активацію та рух лейкоцитів. Ліпідні медіатори, такі як простагландини, лейкотрієни та тромбосани, беруть участь у запальній відповіді, що призводить до різних патологічних ефектів, таких як набряк і біль. Добре встановлено, що зміїні токсини можуть активувати ендогенний PLA2, який впливає на рецептори ріанодину, активує протеїнкіназу C, вивільняє Ca²⁺ і таким чином створює стійку гуморальну імунну відповідь.

Отрута гадюк значно впливає як на клітинну, так і на гуморальну імунну відповідь. В експериментах з видами *Naja naja atra* нормальні миші продемонстрували підвищену активність NK-клітин і посилену проліферацію В-лімфоцитів. Крім того, у цій групі спостерігалось зменшення реакцій гіперчутливості уповільненого типу, викликаних динітрофторбензолом, і пригнічення проліферації Т-лімфоцитів, стимульованої конкаваліном А. У мишей із помірним імунодефіцитом введення отрути цього виду гадюки призводило до підвищення рівня Ig G та Ig M, а також до відновлення зародкових центрів у селезінці. Аналіз проточної цитометрії клітин селезінки виявив селективне підвищення Th1, Th2, IFN- γ та IL-4, тоді як рівні IL-17 знизилися [92, 186].

Наукові дослідження показують, що PLA2, який міститься в зміїній отруті, викликає запалення, які є мультибілковими структурами в цитоплазмі імунних клітин. Ці комплекси можуть виявляти інфекції, пошкодження та інші подразники та реагувати на них. Серед них інфламасома NLRP3 (домен олігомеризації, що зв'язує нуклеотиди, багатий лейцином білок, що містить повтори) є однією з найбільш досліджених. Коли PLA2, який характеризується своїм каталітичним доменом з лізином у положенні 49 (замість аспартату), взаємодіє з клітинними мембранами, зокрема в отруті змії *Bothrops jararacussu*, він активує NLRP3, що призводить до збирання інфламмасомного комплексу. Активація NLRP3 сприяє взаємодії між прокаспазою-1 і ASC (асоційований з апоптозом білок, що містить CARD). Отже, це запускає утворення каспази-1, вивільнення IL-1 β та ініціацію апоптозу.

Зміїна отрута може модулювати імунну систему, особливо щодо продукції цитокінів. Компоненти отрути сімейства Elapidae продемонстрували антиартритну та протизапальну дію на щурах, головним чином шляхом зниження рівня прозапальних цитокінів у сироватці крові, таких як IL-1 β , IL-17 та TNF- α . Навпаки, коли отрути *Bothrops atrox* і *Bothrops erythromelas* вводили внутрішньоочеревинно мишам, вони викликали

запальну реакцію, яка відзначалася підвищенням рівня різних цитокінів у сироватці крові та селезінці, включаючи TNF- α , IL-6, IL-10, IL-12p70 та IFN- γ .

Отрута *Montivipera bornmuelleri* проявляє антимікробні властивості як щодо грампозитивних, так і грамнегативних бактерій, зокрема, впливає на *Staphylococcus aureus* і *Morganella morganii*, а також на гриб *Candida albicans*. Дослідження показують, що ця змія володіє токсичними речовинами, які можуть впливати на імунні реакції в селезінці мишей. Досліджений вплив багаторазових доз отрути *Montivipera bornmuelleri* шляхом внутрішньоочеревинної ін'єкції, що виявило зміни в рівнях цитокінів (TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-1 β та IL-17) у селезінці мишей BALB/c, тим самим підкреслюючи потенціал отрути для імунотерапевтичного застосування. Отримані дані свідчать про те, що отрута стимулює прозапальну імунну відповідь Th1/Th17 замість протизапальної відповіді Th2/Treg [192]. Ймовірно, цей зсув викликаний збільшенням прозапальних цитокінів, таких як IL-1 β , TNF- α та IFN- γ , у поєднанні зі зниженням протизапального цитокіну IL-10, на який впливає здатність отрути стимулювати вироблення IL-4. Крім того, селективна цитотоксичність отрути по відношенню до ліній ракових клітин кератиноцитів людини (П4 низького ступеня) на відміну від непухлинних клітин HaCaT вказує на його потенційну корисність в імунотерапії [71].

Основну причину дослідження впливу отрут на окремі органи та системи можна пояснити через потребу розуміння прямого та/або опосередкованого впливу на компоненти протеолітичних систем. Ця інформація може розширити знання про патологію укусів змій і надати можливості для розробки ліків, терапевтичних засобів і протиотрут. Серце було обрано як цільовий орган дослідження, ґрунтуючись на даних про серцево-судинну дію зміїних токсинів [24, 52, 90, 178] та необхідності вивчення впливу отрут гадюки на протеїновий профіль серця. Селезінка відіграє важливу роль у забезпеченні належного функціонування імунної

системи. Тому, існує великий інтерес до вивчення змін молекулярного вмісту органу після впливу отрути гадюк, що, можливо, може вплинути на фізіологічний стан організму, що призведе до впливу на імунну систему. Для розширення наявних і очевидних даних у цій сфері було проведено дослідження впливу отрут гадюк *V. berus berus* та *V. berus nikolskii* на селезінку та серце.

На початковому етапі дослідження, ми перевірили, вплив зміїної отрута як на загальний рівень протеїна, так і на протеїновий склад у тканинах серця та селезінки, щоб оцінити його вплив на організм жертви. Протеїновий баланс вважається потенційною основною мішенню для впливу зміїної отрути, враховуючи наявність численних протеїназ в отруті різних видів змій.

Оцінка загального протеїнового балансу в селезінці та серці після впливу отрут змій *V. berus* продемонструвала зниження рівня протеїна в обох органах: на 59 % у селезінці та на 24 % у серці при впливі отрути *V. berus nikolskii*, і до 17 % зниження загального рівня протеїна в селезінці з невеликим зниженням, що спостерігається в серці при впливі отрути *V. berus berus*. Таким чином, селезінка відчувала більш виражений вплив, ніж серце.

Зменшення загального вмісту протеїнів може бути пов'язане з ініціацією процесів деструкції, надмірною активацією протеолітичних систем і катаболічної активності, або змінами в синтезі протеїна, викликаними ферментами або ефекторами, знайденими в зміїній отруті. Крім того, це може бути наслідком змін гомеостазу тканин, особливо за участю окисного стресу та запальних реакцій через комплексні ефекти зміїних отрут [140, 148, 175]. Важливо відзначити, що вплив отрути *V. berus nikolskii* на органи-мішені значно більший, ніж у *V. berus berus*, що може свідчити про відмінності у складі отрут [37]. Зниження рівня протеїна значно впливає на гомеостаз організму, що призводить до змін фізіологічних функцій.

Це спостереження спонукало до дослідження основних причин порушення протеїнового балансу та викликало необхідність проведення якісного аналізу протеїнового складу тканин досліджуваних органів. Відзначено перерозподіл протеїнових молекул, про що свідчить зменшення їх молекулярної маси. Кількість протеїнів зросла майже вдвічі порівняно з контрольними тканинами; у селезінці протеїнові фракції були переважно в діапазоні 10-35 кДа, тоді як у тканині серця спостерігалось зменшення цього діапазону та збільшення протеїнових молекул 35-67 кДа.

Ці дані підтверджують гіпотезу про те, що отрути *V. berus* безпосередньо активують протеолітичну систему в досліджуваних органах. Ми припускаємо, що поява нової протеїнової фракції вагою 100-150 кДа в серці при дії отрути *V. berus nikolskii* є результатом утворення ковалентних комплексів зі специфічних деградованих протеїнів, або агрегації ферментів з інгібіторами у відповідь на дію отрути. Ця зміна в профілі та вмісті тканинного протеїна вказує на те, що ін'єкція зміїної отрути призводить до загальної дисфункції організму.

Щоб дослідити активацію протеолітичних процесів у селезінці та серці за рахунок впливу отрут *V. berus*, було необхідно проведення ферментативного аналізу цих органів, а саме вимірювання різноманітних субстратних специфічностей, включаючи желатинолітичну, фібриногенолітичну та колагенолітичну активність. Загальна протеолітична активність, оцінена з використанням желатину як субстрату, показала помітне збільшення активних протеолітичних молекул, здатних розщеплювати желатин у селезінці під час дії обох отрут. Ці процеси, викликані досліджуваними отрутами, змінюють метаболізм уражених клітин, підсилюють активність раніше неактивних ферментів, і підвищують рівні змінених і дещо деградованих протеїнів зі зміненою субстратною специфічністю.

Фібриногенолітична активність, яка є показником патологічних процесів, пов'язаних з ферментами крові, була відсутня у тканинах

контрольних тварин. Проте, як тканини селезінки, так і серця, піддані впливу отрути *V. berus berus* і *V. berus nikolskii*, продемонстрували присутність ферментів з молекулярною масою 10-35 кДа і 35-67 кДа, які здатні розщеплювати фібриноген. На підставі оцінки активних протеолітичних ферментів з фібриногенолітичною активністю в цих тканинах, а також кореляції між появою активного ферменту та субстратною специфічністю до фібриногену та патологічних процесів можна зробити висновок, що вплив отрут *V. berus* на органи-мішені та організм в цілому призводить до змін біохімічного шляху, посилюючи патологічні зміни. Цей патологічний зсув може бути результатом синтезу активних фібриногенолітичних ферментів, викликаних цими отрутами, або утворенням деградованих або аномальних молекул зі зміненою субстратною специфічністю.

Перерозподілу зазнали і протеолітичні молекули, що виявляють більш специфічну колагенолітичну активність. Після впливу *V. berus berus* рівень ферментів, здатних розщеплювати колаген, у межах 10-35 кДа, значно знизився. Навпаки, *V. berus nikolskii* призвело до збільшення цих специфічних молекул. Обидві отрути гадюк призвели до збільшення протеїнів з молекулярною масою між 67-100 кДа. Проте кількість протеолітичних молекул у діапазоні 35-67 кДа зменшилася. Спостерігалось збільшення фракцій активних протеолітичних ферментів порівняно з контролем для молекул масою 10-35 кДа та 67-100 кДа.

Зміни ферментативного профілю активних протеолітичних молекул, здатних розщеплювати колаген, свідчать про прямий вплив укусів *V. berus* на патологічне посилення протеолітичних процесів, що завершується активацією специфічних колагенолітичних ферментів.

Дослідження активності протеолітичних ферментів у серці з ідентичними субстратами вказує на результати, порівняні з тими, що спостерігаються в тканинах селезінки. Результати виявляють незначну варіацію в кількості активних фракцій протеази, поряд зі збільшенням

молекул у діапазоні від 67 до 100 кДа та зменшенням кількості ферментів у категорії від 35 до 67 кДа, які можуть руйнувати желатин.

Все це свідчить про суттєві зміни протеїнового балансу, що вказує на зниження рівня загального протеїна та зсув ферментативного профілю, а отже - про потенційні механізми, за допомогою яких отрути гадюк видів *V. berus* можуть впливати на цільові органи. Крім того, вплив на ці органи може призвести до внутрішньої інтоксикації, яка пов'язана з появою низькомолекулярних молекул.

В нашій роботі були оцінені рівні молекул з низькою молекулярною масою у тканинах серця та селезінки тварин. Спектрофотометричні аналізи показали підвищення рівня цих молекул в обох органах. Через неоднорідний склад фракції, вимірювання проводилися на різних довжинах хвиль – 210, 238 і 254 нм – щоб оцінити внески молекул з різними хімічними структурами. Незначне збільшення молекул з низькою молекулярною масою, що виявляється при 210 нм, було відмічено як у тканинах серця, так і в селезінці після впливу отрути, порівняно з переважно неароматичними пептидами, зі збільшенням від 8 до 14 разів в обох органах. У селезінці спостерігалася найбільш значна зміна рівнів даних молекул, виміряних при 254 нм. Примітно, що селезінка продемонструвала найбільший приріст порівняно з контролем: кількість молекул при 238 нм була в 47,9 і 37 разів більше після введення отрут *V. berus berus* і *V. berus nikolskii* відповідно. Цей зсув знаменує перехід від нормального фізіологічного стану до помітно аномального, що пояснюється новими взаємодіями ліганд-рецептор, що виникають внаслідок змін у профілі протеїна. Ця трансформація призвела до порушення нормального функціонування організму та виникнення внутрішньої інтоксикації обох органів.

В ході дослідження встановлено, що при впливі отрути *Vipera berus berus* спостерігаються значні зміни в нормальній гістоструктурі всіх шарів серця. Епікард складається з інтенсивно профарбованих колагенових волокон, які розростаються, утворюючи сітку, що перепліталася з сусідньою

тканиною міокарда. Крім них, спостерігається підвищена кількість більш молодих волокон, в результаті чого шар мезотелію майже непомітний. У міокарді спостерігаються набряклі м'язові волокна, які втрачають типову поздовжню орієнтацію та набувають звивистої форми. Згладжування та лізис м'язових волокон були частими знахідками разом із вогнищами некрозу. Лейкоцитарні клітини в цих умовах спостерігалися рідко, що вказує на те, що інфільтрація міокарда лише помірно виражена. Визначається збільшення колагенових волокон у тканині міокарда, їх кількість зростала між скорочувальними та провідними кардіоміоцитами, маючи подовжену веретеноподібну або зіркоподібну форму. Стінки артерій значно потовщуються. Виражене збільшення колагенових волокон характерне для оболонки артеріальних судин при зменшенні кількості гладком'язових клітин. Спостерігаються ділянки значних крововиливів, деякі з яких були дифузними. В ендокарді тварин відмічено набухання ендотеліальних клітин з наявністю гіперхроматичних ядер. У зовнішньому сполучнотканинному шарі ендокарда посилюється активність фібробластів, що супроводжується розростанням колагенових волокон, подібно до того, що спостерігалось в раніше описаних шарах серця.

При гістологічному дослідженні серця за умов впливу отрути гадюк *Vipera berus nikolskii* кровоносні судини епікарду деформовані, спостерігається руйнування їх стінок. Внутрішня та середня оболонки набряклі, адвентиція потовщена за рахунок розростання в ній колагенових волокон. При гістологічному дослідженні міокарду виявлено деструктивні зміни, ступінь вираженості яких був значно вищим, ніж у тварин з гострою інтоксикацією отрутою гадюк *Vipera berus berus*: хаотичне розміщення та фрагментація звивистих м'язових волокон; вони потовщені, набряклі, без типової поперечної посмугованості. Відзначаються вогнища некрозу та міоцитолізу, майже всі волокна міокарду зазнають деструкції, розшаровані, з зонами повного руйнування сарколеми. Навколо вогнищ некрозу та міоцитолізу - значний набряк тканини міокарду, проміжки між м'язовими

волокнами заповнені елементами пухкої сполучної тканини. Характерною особливістю є масивна гістіолейкоцитарна інфільтрація, в міжміофібрилярних проміжках спостерігаються активні фібробласти. В просвітах артерій виявляються складжі та адгезія еритроцитів, нечисельні елементи білої крові, а також периваскулярний набряк та виражена периваскулярна лейкоцитарна інфільтрація. Виявлялись лейкоцитарна інфільтрація навколо провідних клітин, характерним був також екстрацелюлярний набряк. Ендотеліоцити ендокарда мають витягнуту форму та не щільно фіксуються до базальної мембрани. В зовнішньому сполучнотканинному шарі зростає об'єм колагенових волокон, також спостерігається значна лейкоцитарна інфільтрація.

Мікроскопічне дослідження селезінки на тлі гострої інтоксикації отрутою *Viper a berus berus* показало дезорганізацію структури білої пульпи. Зокрема, лімфоїдні вузлики мали нечіткі контури, їх крайові зони не чітко виражені. Крім того, спостерігалися збільшені гермінативні центри, що містять численні лімфобласти, які характеризуються великими розмірами, гіпохромними ядрами та блідою цитоплазмою. Зрілих В-лімфоцитів у реактивних центрах лімфоїдних вузликів було значно менше, ніж у лімфобластах. У періартеріальних зонах лімфоїдних вузликів відзначено помірну популяцію Т-лімфоцитів і макрофагів, причому переважно присутні як дрібні світлі, так і темні лімфоцити. У червоній пульпі селезінки виявлено численні еритроцити, тромбоцити, лімфоцити, плазматичні клітини та макрофаги. Деякі ділянки червоної пульпи виявили деструкцію тканини та крововиливи. Плазматичні клітини в селезінці виглядали або округлими, або злегка витягнутими, з гіперхромними ядрами, які були розташовані до полюсів клітин. У червоній пульпі були численні великі макрофаги з відростками, ядра яких розташовані ексцентрично. Їхня цитоплазма іноді здавалася освітленою та набряклою, містила залишки фагоцитованого матеріалу. Трабекули селезінки були потовщені, гладкі міоцити мали подовжені ядра. Проміжки між м'язовими волокнами розширені, волокна

набряклі. Трабекулярні вени мали чіткі контури, в їх просвіті спостерігався стаз і утворення еритроцитарного складжу, а також адгезія еритроцитів до стінок вен.

У білій пульпі селезінки при впливі отрути *Vipera berus nikolskii* виявлено численні лімфоїдні вузлики, більшість яких мали нечіткі межі через зменшення кількості лімфоцитів у крайовій зоні. У гермінативних центрах лімфоїдних вузликів спостерігалися клітини, що демонструють мітотичні фігури, поряд із підвищеною присутністю лімфобластів. Ці лімфобласти були більшими за диференційовані В-лімфоцити, виявлені в реактивних центрах, із блідою цитоплазмою та гіпохромними ядрами. Активація зародкових центрів у лімфоїдних вузликах відображає реакцію селезінки на гостре пошкодження, що призводить до підвищення клітин імунного захисту. Крім того, в періартеріальних лімфоїдних зонах відзначали Т-лімфоцити та макрофаги. У порівнянні з щурами, яким вводили отруту гадюки *Vipera berus berus*, спостерігалось помітне збільшення лімфоцитів, макрофагів і плазматичних клітин у червоній пульпі селезінки. Підвищення кількості плазматичних клітин, ймовірно, стало результатом отруєння. Відзначаються пінисті макрофаги, що містять фагоцитовані залишки клітин крові; часті ділянки некрозу лімфоцитів зі зменшеними розмірами і пікнозом ядер. Водночас у червоній пульпі були виявлені вогнища крововиливу, ймовірно, завдяки впливу вазо- та гемотоксинів отрути, а також порушення міжклітинного зв'язку в ендотеліальному шарі судин. У трабекулах селезінки спостерігався набряк гладком'язових клітин з лімфоцитарною інфільтрацією навколо трабекулярних судин.

При проведенні морфометричного дослідження ми виявили помітну різницю в ширині клітин серцевого м'яза не тільки між контрольною групою та щурами, які зазнали впливу отрути обох видів гадюк, але й між двома експериментальними групами. Значне збільшення ширини кардіоміоцитів у групі тварин, які зазнали впливу отрути *Vipera berus berus*, порівняно з контрольною, закономірно є результатом впливу отрути на структури серця.

Цей висновок повністю узгоджується з морфологічними змінами, що спостерігаються в цьому органі: виявлено набряк м'язових волокон, ймовірно, внаслідок вакуолізації саркоплазми, що в свою чергу викликано гострою гіпоксією міокарда. Крім того, при морфологічному описі кардіоміоцитів було помітно порушення смугастості міокарда, що вказує на порушення в цитоплазмі, пов'язане з правильною і чіткою організацією актинових і міозинових волокон - розшарування цих структур також збільшує об'єм цитоплазми, і, відповідно, ширину клітини.

Істотні патологічні зміни в стінці серця щурів на тлі дії отрути *Vipera berus nikolskii* виявляються як при морфологічному, так і при морфометричному дослідженнях. Середня ширина кардіоміоцитів у цих тварин, становить 19,45 мкм. Це не тільки більше, ніж у контрольній групі, але також показує статистично значущу різницю порівняно з шириною цих клітин у щурів, які зазнали впливу отрути *Vipera berus berus*, і свідчить про серйозну деструктивну дію досліджуваної отрути, посилення набряку, дезорганізацію внутрішньоклітинних структур і поверхневого апарату кардіоміоцитів. М'язові волокна цієї групи були помітно більш фрагментованими та зміщеними, вони демонстрували потовщення, припухлість і вигляд скручених. Сарколема була не просто частково пошкоджена; на деяких ділянках вона взагалі була відсутня. Ці морфологічні зміни вказують на більш виражений розвиток набряку, деструкції клітин і некрозу в кардіоміоцитах тварин цієї групи, що призводить до помітного збільшення розмірів і ширини волокон. Таким чином, ми можемо стверджувати про морфометрично підтверджену дію отрути *Vipera berus nikolskii*, яка продемонструвала більш згубний вплив порівняно з іншими видами отрути, дослідженими в цьому дослідженні, що призвело до статистично значущого збільшення ширини волокон міокарда порівняно не лише з контрольною групою, але й з другою дослідною групою, яка отримувала отруту.

Щоб кількісно оцінити стан серцевої стінки, ми вирішили виміряти площу, зайняту ендомізієм, у поперечних зрізах. Морфометричне дослідження виявило статистично достовірне збільшення в обох дослідних групах порівняно з контрольною, що підтверджує дані морфологічних досліджень тканин міокарда. Примітно, що експериментальні групи демонстрували підвищену синтетичну активність у фібробластах, про що свідчить їх підвищений ядерно-цитоплазматичний індекс. Ця підвищена активність призвела до більшого синтезу колагену в навколишньому матриксі, утворюючи мережу волокон серед кардіоміоцитів – саме цю область і вимірювали в ендомізіумі.

Середня ширина кардіоміоцитів у тварин, які зазнали впливу отрути *Vipera berus nikolskii*, становить 7113 мкм², що значно більше, ніж у контрольної групи. Не було виявлено помітних відмінностей між двома експериментальними групами щодо цього вимірювання. Ці дані узгоджуються з нашими спостереженнями за морфологічним станом міокарда щурів із цих груп: спостерігаються вогнища некрозів та міоцитолізу, які оточені ділянками значного набряку тканини міокарда. Як у сполучнотканинному, так і у м'язовому компонентах міокарда відмічались набряки. Крім того, під час морфологічного аналізу тканин міокарда ми відзначали фрагментацію кардіоміоцитів, яка була пов'язана з порушенням цілісності сарколеми, що призводило до збільшення їх площі. Це вказує на те, що на фоні цілеспрямованої активації фібробластів і пов'язаного з цим підвищення колагену та інших елементів сполучної тканини в позаклітинному матриксі різні фактори, які підвищують індекс площі, зокрема набряк, структурне розшарування та спотворення форми, постійно впливають як на ендомізіальні компоненти сполучної тканини, так і на самі кардіоміоцити.

При проведенні морфометричного дослідження ми не виявили помітної різниці у співвідношенні білої та червоної пульпи селезінки при порівнянні експериментальних груп з контролем. Проте була помітна тенденція до

збільшення частки білої пульпи при впливі отрути *Vipera berus berus*. Водночас фіксується трохи більше стандартне відхилення для цього параметра порівняно з контрольною групою, що свідчить про більшу різноманітність процесів росту білої пульпи. Ці результати узгоджуються з нашим морфологічним аналізом паренхіми селезінки: збільшення площі білої пульпи порівняно з червоною є наслідком загальної дезорганізації її структури, про що свідчать нечіткі контури лімфоїдних вузликів, що робить їх крайову зону практично неможливою для диференціювання. Крім того, ріст білої пульпи був посилений розширенням гермінативних центрів, що характерно для потрапляння токсинів в кров, оскільки у відповідь на негативний вплив антигенів відбувається регенерація і активна проліферація, що характеризується переважанням молодих лімфобластів над зрілими В-лімфоцитами. Водночас, у червоній пульпі селезінки цієї групи тварин зміни не були настільки значними, щоб змінити її загальну площу. Ці результати в сукупності свідчать про те, що біла пульпа селезінки у щурів більше вражається у відповідь на токсини отрути *Vipera berus berus*.

Оцінка співвідношення білої та червоної м'якоті показала, що в контрольній групі та у тварин, які зазнали гострої інтоксикації двома видами отрут, відмічено помітне збільшення частки білої пульпи, що свідчить про підвищену імунну активність. Навпаки, отрута *Vipera berus nikolskii* спричинила значне руйнування як білої, так і червоної пульпи, що призвело до збільшення обох частин паренхіми органу з мінімальним впливом на їх співвідношення. Крім того, морфологічний аналіз показує, що компоненти отрути цієї гадюки мають більш виражений і агресивний вплив на кров і кровоносні судини червоної пульпи порівняно з іншою дослідною групою.

Оцінка кількості тканинних макрофагів, що містять гранули ліпофусцину, дозволяє отримати уявлення про рівень окислювального стресу в тканинах селезінки тварин, які перенесли гостру інтоксикацію двома видами отрут. Аналізуючи цей параметр, ми спостерігали статистично значуще зростання кількості макрофагів, що містять включення

ліпофусцину. Це збільшення було очевидним не тільки в обох експериментальних групах порівняно з контрольною групою, але також між двома групами. Статистично значуще збільшення клітин з включеннями ліпофусцину свідчить про накопичення надлишку агрегованих протеїнів, що, ймовірно, посилюється окислювальним стресом під впливом отрути. Макроаутофагія поглинає білкові агрегати, що призводить до взаємодії з іншими клітинними компонентами, які зрештою утворюють ліпофусцин, який накопичується в лізосомальній системі клітин [14].

У групі щурів, які зазнали впливу отрути *Vipera berus berus*, спостерігаються численні великі макрофаги з багатьма відростками, присутніми в червоній пульпі. Ця клітинна морфологія свідчить про підвищену фагоцитарну активність. Одночасно відзначаються ознаки набряку, нерівномірне фарбування цитоплазми в макрофагах і присутність фагоцитованого матеріалу в цих клітинах. Це вказує на те, що ці макрофаги можуть боротися з надлишковою кількістю шкідливих речовин; вони можуть не переварити весь поглинений матеріал і видалити його через екзоцитоз. Як наслідок, клітини зазнали патологічних змін, що призвело до накопичення неперетравлених токсинів, відомих як «пігмент накопичення» або ліпофусцин.

У дослідженнях на щурах, які зазнали впливу більш токсичної отрути *Vipera berus nikolskii*, було виявлено в середньому 17,2 клітини, що містять включення пігменту ліпофусцину. Це число значно вище не тільки порівняно з контрольною групою, але й з групою, яка отримувала отруту *Vipera berus berus*, що ще раз підтверджує її підвищену токсичність. Помітне збільшення частки макрофагів з включеннями ліпофусцину вказує на спробу клітин боротися з частинками токсину, підкреслюючи результуюче збільшення рівнів активних форм кисню в тканинах селезінки як наслідок отруєння.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі подано теоретичне узагальнення та нове вирішення науково-практичного завдання щодо встановлення змін структур серця та селезінки щурів, що спостерігаються на тлі впливу отрути гадюк виду *Vipera berus*.

1. Гостра інтоксикація отрутою гадюк *Vipera berus berus* спричинила патологічні зрушення структурної організації всіх шарів серця. В епікарді спостерігається збільшення об'єму колагенових волокон, потовщення стінок судин; в міокарді – набряк, дезорганізація та фрагментація м'язових волокон, лізис, деструкція, втрата характерної поперечної посмугованості, некроз. Фіксується зростання чисельності фібробластів, їх активація, розростання компонентів сполучної тканини, в тому числі колагенових волокон. В ендокарді – десквамація ендотеліального вистелення та збільшення кількості активних фібробластів в зовнішньому сполучнотканинному шарі.

За умов впливу отрути гадюк *Vipera berus nikolskii* в епікарді щурів відмічається деструкція стінок судин; в міокарді – хаотичне розміщення, фрагментація та втрата поперечної посмугованості волокон серцевого м'язу, наявність вогнищ некрозу та міоцитолізу. Виявляються: виражена гістіолейкоцитарна інфільтрація, зростання чисельності фібробластів; деформація та набряк стінки судин міокарда; зростання проникності стінок судин, геморагії.

2. Токсичний вплив отрути гадюк *Vipera berus berus* спричиняє дезорганізацію білої пульпи селезінки: втрата чіткості та впорядкованості розміщення її структурних елементів, погана візуалізація крайової зони лімфоїдних вузликів; гермінативні центри характеризувались зростанням чисельності лімфобластів. В червоній пульпі – ділянки деструкції тканини селезінки, геморагії; наявні вогнища апоптозу лімфоцитів, потовщення трабекул, стази і складжі еритроцитів в просвітах трабекулярних вен.

При введенні отрути гадюк *Vipera berus nikolskii* відмічається зростання чисельності лімфоїдних вузликів з великою кількістю лімфобластів, клітин з фігурами мітозів; в периартеріальних зонах – збільшення Т-лімфоцитів, розширення просвітів та потовщення стінок центральних артерій. В червоній пульпі значно підвищувалась кількість лімфоцитів, макрофагів, плазмоцитів; спостерігаються ділянки апоптозу лімфоцитів, пінисті макрофаги, вогнища геморагій; лімфоцитарна інфільтрація трабекулярних судин, повнокрів'я та розширення просвітів вен, складж еритроцитів.

3. При проведенні морфометричного дослідження серця спостерігається значне збільшення ширини кардіоміоцитів у групі тварин, які зазнали впливу отрути *Vipera berus berus*, порівняно з контрольною (14,94 мкм проти 11,73 мкм в контрольній групі). На тлі дії отрути *Vipera berus nikolskii* виявляються ще більш значне збільшення ширини кардіоміоцитів (19,45 мкм проти 11,73 мкм в контрольній групі). Також спостерігається значне збільшення середнього показника площі ендомізію (5119 мкм² при впливі отрути *Vipera berus berus* та 7113 мкм² проти 2513 мкм² контрольної групи).

У селезінці тварин на фоні впливу отрути гадюк *Vipera berus*, при морфометричному підрахунку встановлено, що немає помітної різниці у співвідношенні білої та червоної пульпи селезінки при порівнянні експериментальних груп з контролем, проте була помітна тенденція до збільшення частки білої пульпи при впливі отрути *Vipera berus berus* (середнє значення цього показника складало 0,443 проти 0,277 контрольної групи). Навпаки, отрута *Vipera berus nikolskii* спричинила значне руйнування як білої, так і червоної пульпи, що призвело до збільшення обох частин паренхіми органу з мінімальним впливом на їх співвідношення (середнє значення цього показника складало 0,278 проти 0,277 контрольної групи). При оцінці кількості тканинних макрофагів з включеннями ліпофусцину встановлено статистично значуще зростання цього показника не тільки в обох експериментальних групах порівняно з контрольною групою, але також між двома групами (14,55 клітин з ліпофусцином у групі тварин під впливом

отрути *Vipera berus berus* та 17,2 клітин з включеннями ліпофусцину при впливі отрути *Vipera berus nikolskii* проти 6,2 клітин з ліпофусцином у контрольній групі).

4. Результати якісного та кількісного аналізу загального протеїна, дослідження протеолітичної активності та вмісту молекул середньої маси свідчать про зниження рівня протеїна в обох органах (отрута *V. berus nikolskii* знижує рівень протеїна на 59 % у селезінці та на 24 % у серці; отрута *V. berus berus* – на 17 % в селезінці). Відзначено перерозподіл протеїнових молекул, із зменшенням їх молекулярної маси (збільшення вмісту протеїнових фракцій в селезінці в діапазоні 10-35 кДа, в серці – в діапазоні 35-67 кДа; у серці під впливом *V. berus nikolskii* спостерігається поява білкової фракції в діапазоні 100-150 кДа). Вплив отрут *V. berus* на органи-мішені та організм в цілому призводить до синтезу активних фібриногенолітичних ферментів (поява ферментів у діапазоні молекулярних мас 10-35 кДа і 35-67 кДа), утворенням деградованих або аномальних молекул зі зміненою субстратною специфічністю. Перерозподілу зазнають і протеолітичні молекули (зменшення кількості протеїнів з молекулярною масою 35-67 кДа і збільшення протеїнових молекул в діапазоні 67-100 кДа), що показує прямий вплив дії отрути *V. berus berus* і *V. berus nikolskii* на патологічне посилення протеолітичних процесів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Багрій, М.М., Діброва, В.А., Попадинець, О.Г. & Гришук, М.І. (Ред.). (2016). *Методики морфологічних досліджень*. Вінниця: Нова Книга.
2. Бобр А.М., & Маєвський О.Є. (2023). *Зміни біохімічних параметрів міокарду та селезінки щурів при впливі отрути гадюк виду у Vipera berus berus та Vipera berus nikolskii*. Збірник наукових праць: XIX Наукова - конференція «Львівські хімічні читання – 2023», Львів, 29–31 травня 2023 року – Львів: Видавництво від А до Я, 2023. – 254 с.
3. Бобр А.М., & Маєвський О.Є. (2023). *Молекулярний вміст отрути гадюк виду Vipera berus berus та Vipera berus nikolskii та його вплив на зміни біохімічних параметрів міокарду і селезінки щурів*. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю: XX Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська Весна: досягнення в науках про життя», Київ, 27–28 квітня 2023 року – Київ – 214 с.
4. Бобр А.М., & Маєвський О.Є. (2023). *Analytical and quantitative assessment of the state of the spleen and immune processes in rats under administering Vipera berus*. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю: «Теорія та практика сучасної морфології», Дніпро, 6–8 листопада 2024 року – Дніпро – 184 с.
5. Булько, І.В. (2015). Динаміка гістологічних змін селезінки щурів у віддалений період після опікової травми шкіри. *Клінічна анатомія та оперативна хірургія*, 2(14), 29-32.
6. Ветрова, К.В., & Сахарова, Т.С. (2020). Оцінка впливу комбінації похідних глюкозаміну з кверцитином на морфофункціональний стан тимусу та селезінки щурів за умов токсичної дії доксорубіцину. *Клінічна фармація*, 4(24), 47-54.
7. Гетманюк, І.Б., Небесна, З.М., Лихацький, П.Г., & Шутурма, О.Я. (2019). Особливості ультраструктурної реорганізації передсердних

кардіоміоцитів при експериментальній термічній травмі та за умов застосування ліофілізованих ксенодермотрансплантатів. *Вісник наукових досліджень*, 2, 105-109.

8. Горальський, Л.П., Хомич, В.Т., & Кононський, О.І. (2011). *Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології*. Житомир: Полісся.

9. Демків, І.Я., Лісничук, Н.Є., Сорока, Ю.В., & Чихира, О.В. (2016). Окисно-відновна рівновага в селезінці білих щурів за умов індукованого канцерогенезу. *Медична та клінічна хімія*, 3(18), 38-42.

10. Добреля, Н.В., Бойцова, Л.В. & Данова, І.В. (2015). Правова база для проведення етичної експертизи доклінічних досліджень лікарських засобів з використанням лабораторних тварин. *Фармакологія та лікарська токсикологія*, 2, 95-100.

11. Лісничук, Н.Є., Андрійчук, І.Я., & Сорока, Ю.В. (2017). Зміни органометричних показників селезінки білих щурів за умов індукованого онкогенезу в динаміці експерименту. *Світ медицини та біології*, 3(61), 134-138.

12. Маляр-Газда, Н.М., & Борсенко, М.І. (2014). Гемодинамічні параметри кровоплину та динаміка інтоксикаційного синдрому у пацієнтів після укусу отруйних змій. *Науковий вісник Ужгородського університету, серія «Медицина»*, 2(50), 17-20.

13. Мельницька, Г.М., & Погоріла, І.О. (2015). *Отруйні змії України. Біологічні дослідження: збірник наукових праць*. Житомир: ПП «Рута», 394-397.

14. Окунцев, Д.В., & Крутилина, Н.И. (2013). Особенности патогенеза, факторы риска и возможности профилактики поздних лучевых повреждений сердца у больных раком грудной железы. *Український Радіологічний Журнал*, 21, 439-453.

15. Сорокина, И.В., & Бочарова, Т.В. (2016). Динамика изменений в органах иммунной системы при действии хронического светового стресса. *Експериментальна і клінічна медицина*, 2(71), 183-188.
16. Шальнєв, О.Ю., Шилан, В.І., & Шилан, К.В. (2016). Смерть від отруєння зміїною отрутою, як наслідок укусу гадюки. *Судово-медична експертиза*, 2, 85-87.
17. Abass, M.A., Selim, S.A., Selim, A.O., El-Shal, A.S., & Gouda, Z.A. (2017). Effect of orally administered zinc oxide nanoparticles on albino rat thymus and spleen. *IUBMB Life*, 69(7), 528-539.
18. Al-Sadoon, M.K., Diab, M.S., Bauomy, A.A., & Abdel Moneim, A.E. (2014). Cerastes cerastes gasperetti venom induced hematological alterations and oxidative stress in male mice. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 8, 693-702.
19. Al-Shekhadat, R.I., Lopushanskaya, K.S., Segura, Á., Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., & Pla, D. (2019). Vipera berus berus venom from Russia: Venomics, bioactivities and preclinical assessment of microgen antivenom. *Toxins (Basel)*, 11(2), 90.
20. Alangode, A., Rajan, K., & Nair, B.G. (2020). Snake antivenom: Challenges and alternate approaches. *Biochem Pharmacol*, 81, 114135.
21. Alekseeva, A.S., Tretiakova, D.S., Chernikov, V.P., Utkin, Yu. N., Molotovskiy, J.G., Vodovozova, E.L., ... & Boldyrev, I.A. (2017). Heterodimeric V. nikolskii phospholipases A₂ induce aggregation of the lipid bilayer. *Toxicon*, 133, 169-179.
22. Almeida, J.R., Resende, L.M., Watanabe, R.K., Carregari, V.C., Huancahuire-Vega, S., da S Caldeira, C.A., ... & Da Silva, S.L. (2017). Snake venom peptides and low mass proteins: Molecular tools and therapeutic agents. *Curr Med Chem*, 4(30), 3254-3282.
23. Aloulou, A., Rahier, R., Arhab, Y., Noiriél, A., & Abousalham, A. (2018). Phospholipases: An overview. *Methods Mol Biol*, 1835, 69-105.
24. Angel-Camilo, K.L., Guerrero-Vargas, J.A., Carvalho, E.F., Lima-Silva, K., de Siqueira, R.J.B., Freitas, L.B.N., ... & Magalhães, P.J.C. (2020).

Disorders on cardiovascular parameters in rats and in human blood cells caused by *Lachesis acrochorda* snake venom. *Toxicon*, 184, 180-191.

25. Arruda Macedo, J.K., Fox, J.W., & de Souza Castro, M. (2015). Disintegrins from snake venoms and their applications in cancer research and therapy. *Curr Protein Pept Sci*, 16(6), 532-548.

26. Averin, A.S., & Utkin, Yu.N. (2021). Cardiovascular effects of snake toxins: cardiotoxicity and cardioprotection. *Acta Naturae*, 13(3), 4-14.

27. Avilova, O., Shyian, D., Marakushin, D., Erokhina, V., & Gargin, V. (2018). Ultrastructural changes in the organs of the immune system under the influence of xenobiotics. *Georgian Med News*, 279, 132-137.

28. Azevedo, E., Figueiredo, R.G., Pinto, R.V., Ramos, T.C.F., Sampaio, G.P., Bulhosa Santos, R.P., ... & Trindade, S.C. (2020). Evaluation of systemic inflammatory response and lung injury induced by *Crotalus durissus cascavella* venom. *PLoS One*, 15(2), e0224584.

29. Balijs, T., Leonardi, A., Brgles, M., Sviben, D., Kurtovic, T., Halassy, B., ... & Krizaj, I. (2020). Biological activities and proteomic profile of the venom of *Vipera ursinii* ssp., a very rare Karst Viper from Croatia. *Toxins (Basel)*, 12(3), 187.

30. Bauwens D, & Claus K. (2019). Seasonal variation of mortality, detectability, and body condition in a population of the adder (*Vipera berus*). *Ecol Evol*, 9, 5821-34.

31. Bhattacharya, S., Krishnamurthy, A., Gopalakrishnan, M., Kalra, S., Kantroo, V., Aggarwal, S., ... & Surana, V. (2020). Endocrine and metabolic manifestations of snakebite envenoming. *Am J Trop Med Hyg*, 103(4), 1388-1396.

32. Bickler, P.E. (2020). Amplification of snake venom toxicity by endogenous signaling pathways. *Toxins (Basel)*, 12(2), 68.

33. Binu, A.J., Mishra, A.K., Gunasekaran, K., & Iyadurai, R. (2019). Cardiovascular manifestations and patient outcomes following snake envenomation: a pilot study. *Trop Doct*, 49(1), 10-13.

34. Binu, A., Mishra, A., Abraham, G., Vanjare, H., George, T., & Iyadurai, R. (2018). Cerebrovascular Injury Following Scorpion Sting and Snake Envenomation: A Case Series. *Can J Neurol Sci*, 45(6), 669-674.
35. Bobr, A.M. (2024). Analytical and quantitative assessment of the state of the spleen and immune processes in rats under administering *Vipera berus* venom. *Morphologia*, 18(3), 20-25.
36. Bobr, A.M. (2024). Analytical and quantitative assessment of the condition of the heart wall of rats exposed to the venom of the vipers *Vipera berus* *berus* and *Vipera berus nikolskii*. *Morphologia*, 18(4), 15-21.
37. Bocian, A., Urbanik, M., Hus, K., Łyskowski, A., Petrilla, V., Andrejčáková, Z., ... & Legath, J. (2016). Proteome and peptidome of *vipera berus* *berus* venom. *Molecules*, 21(10), 1398.
38. Boda, F., Banfai, K., Garai, K., Curticapean, A., Berta, L., Sipos, E., ... & Kvell, K. (2018). Effect of *vipera ammodytes ammodytes* snake venom on the human cytokine network. *Toxins (Basel)*, 10(7), 259.
39. Boeno, C.N., Paloschi, M.V., Lopes, J.A., Pires, W.L., Setúbal, S.D.S., Evangelista, J.R., ... & Zuliani, J.P. (2019). Inflammasome activation induced by a snake venom Lys49-phospholipase A₂ homologue. *Toxins (Basel)*, 12(1), 22.
40. Boldrini-Franca, J., Cologna, C.T., Pucca, M.B., Bordon, K.C., Amorim, F.G., Anjolette, F.A., ... & Arantes, E.C. (2016). Minor snake venom proteins: Structure, function and potential application. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 1861(4), 824-838.
41. Bolon, I., Durso, A.M., Mesa, S.B., Ray, N., Alcoba, G., Chappuis, F., ... & Ruiz de Castaneda, R. (2020). Identifying the snake: first scoping review on practices of communities and healthcare providers confronted with snakebite across the world. *PLoS One*, 15(3), e0229989.
42. Borges, R.J., Lemke, N., & Fontes, M.R.M. (2017). PLA₂-like proteins myotoxic mechanism: a dynamic model description. *Sci Rep*, 7(1), 15514.

43. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
44. Burin, S.M., Menaldo, D.L., Sampaio, S.V., Frantz, F.G., & Castro, F.A. (2018). An overview of the immune modulating effects of enzymatic toxins from snake venoms. *Int J Biol Macromol*, 109, 664-671.
45. Calderón, L., Lomonte, B., & Gutiérrez, J.M. (1993). Biological and biochemical activities of *Vipera berus* (European viper) venom. *Toxicon*, 31, 743-753.
46. Canas, C.A., Castro-Herrera, F., & Castano-Valencia, S. (2021). Clinical syndromes associated with Viperidae family snake envenomation in southwestern Colombia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 115(1), 51-56.
47. Casewell, N.R., Jackson, T.N.W., Laustsen, A.H., & Sunagar, K. (2020). Causes and consequences of snake venom variation. *Trends Pharmacol Sci*, 41(8), 570-581.
48. Castro, A.C., Escalante, T., Rucavado, A., & Gutiérrez, J.M. (2021). Basement membrane degradation and inflammation play a role in the pulmonary hemorrhage induced by a P-III snake venom metalloproteinase. *Toxicon*, 197, 12-23.
49. Cavalcante, W.L.G., Noronha-Matos, J.B., Timóteo, M.A., Fontes, M.R.M., Gallacci, M., & Correia-de-Sá, P. (2017). Neuromuscular paralysis by the basic phospholipase A₂ subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom needs its acid chaperone to concurrently inhibit acetylcholine release and produce muscle blockage. *Toxicol Appl Pharmacol*, 334, 8-17.
50. Cerdo, R.C.A., Menaldo, D.L., Costa, T.R., Zoccal, K.F., Sartim, M.A., Santos-Filho, N.A., ... & Sampaio, S.V. (2018). Cytotoxic and inflammatory potential of a phospholipase A₂ from *Bothrops jararaca* snake venom. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 24, 33.

51. Cesar, P.H.S., Braga, M.A., Trento, M.V.C., Menaldo, D.L. & Marcussi, S. (2019). Snake venom disintegrins: An overview of their interaction with integrins. *Curr Drug Targets*, 20(4), 465-477.
52. Chaisakul, J., Isbister, G.K., Kuruppu, S., Konstantakopoulos, N. & Hodgson, W.C. (2013). An examination of cardiovascular collapse induced by eastern brown snake (*Pseudonaja textilis*) venom. *Toxicology Letters*, 221(3), 205-211.
53. Chaisakul, J., Khow, O., Wiwatwarayos, K., Rusmili, M.R.A., Prasert, W., Othman, I., ... & Chaiyabutr, N. (2021). A biochemical and pharmacological characterization of phospholipase A₂ and metalloproteinase fractions from eastern Russell's viper (*Daboia siamensis*) venom: two major components associated with acute kidney injury. *Toxins (Basel)*, 13(8), 521.
54. Chaiyabutr, N., Chanhom, L., Vasaruchapong, T., Laoungbua, P., Khow, O., Rungsipipat, A., ... & Sitprija, V. (2020). The pathophysiological effects of Russell's viper (*Daboia siamensis*) venom and its fractions in the isolated perfused rabbit kidney model: A potential role for platelet activating factor. *Toxicon X*, 7, 100046.
55. Chan, Y.S., Cheung, R.C.F., Xia, L., Wong, J.H., Ng, T.B., & Chan, W.Y. (2016). Snake venom toxins: toxicity and medicinal applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100(14), 6165-6181.
56. Charvat, R.A., Strobel, R.M., Pasternak, M.A., Klass, S.M., & Rheubert, J.L. (2018). Analysis of snake venom composition and antimicrobial activity. *Toxicon*, 150, 151-167.
57. Constantine, V.S., & Mowry, R.W. (1968). Selective staining of human dermal collagen. II. The use of picosirius red F3BA with polarization microscopy. *J Invest Dermatol*, 50(5), 419-423.
58. Costal-Oliveira, F., Stransky, S., Guerra-Duarte, C., Naves de Souza, D.L., Vivas-Ruiz, D.E., Yarlequé, A., ... & Braga, V.M.M. (2019). L-amino acid oxidase from Bothrops atrox snake venom triggers autophagy, apoptosis and necrosis in normal human keratinocytes. *Sci Rep*, 9(1), 781.

59. Cristina, R.T., Kocsis, R., Tulcan, C., Alexa, E., Boldura, O.M., Hulea, C.I., ... & Muselin, F. (2020). Protein structure of the venom in nine species of snake: from bio-compounds to possible healing agents. *Braz J Med Biol Res*, 53(1), e9001.
60. Damm, M., Hempel, B.F., & Süssmuth, R.D. (2021). Old world vipers- a review about snake venom proteomics of Viperinae and their variations. *Toxins (Basel)*, 13, 427.
61. De Carvalho, A.E.Z., Giannotti, K., Junior, E.L., Matsubara, M., Santos, M.C.D., Fortes-Dias, C.L., ... & Teixeira, C. (2019). *Crotalus durissus ruruima* snake venom and a phospholipase A₂ isolated from this venom elicit macrophages to form lipid droplets and synthesize inflammatory lipid mediators. *J Immunol Res*, 2019, 2745286.
62. De Oliveira, N.A., Cardoso, S.C., Barbosa, D.A., & da Fonseca, C.D. (2021). Acute kidney injury caused by venomous animals: inflammatory mechanisms. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 27, 20200189.
63. Dehghani, F., Hossieni, S.A., Noorafshan, A., Panjehshahin, M.R., & Esmaeilpour, T. (2021). Effect of selenium on quantitative structural changes in dexamethasone-induced immunodeficiency rat models. *Iran J Med Sci*, 46(2), 128-135.
64. Di Nicola, M.R., Pontara, A., Kass, G.E.N., Kramer, N.I., Avella, I., Pampena, R., ... & Paolino, G. (2021). Vipers of major clinical relevance in Europe: Taxonomy, venom composition, toxicology and clinical management of human bites. *Toxicology*, 453, 152724.
65. Dyachenko, I.A., Murashev, A.N., Andreeva, T.V., Tsetlin, V.I., & Utkin, Y.N. (2013). Analysis of nociceptive effects of neurotoxic phospholipase A₂ from *Vipera nikolskii* venom in mice. *J Venom Res*, 4, 1-4.
66. Feriani, D.J., Sousa, A.S., Delbin, M.A., Ruberti, O.M., Crestani, C.C., & Rodrigues, B. (2021). Spleen tissue changes after restraint stress: effects of aerobic exercise training. *Stress*, 24(5), 572-583.

67. Fernández-Solà, J. (2020). The effects of ethanol on the heart: alcoholic cardiomyopathy. *Nutrients*, 12(2), 572.
68. Ferras, C.R., Arrahman, A., Xie, C., Casewell, N.R., Lewis, R.J., Kool, J., ... & Cardoso, F.C. (2019). Multifunctional toxins in snake venoms and therapeutic implications: from pain to hemorrhage and necrosis. *Front Ecol Evol*, 7.
69. Ferreira, B.A., Deconte, S.R., de Moura, F.B.R., Tomiosso, T.C., Clissa, P.B., Andrade, S.P., ... & Araujo, F.A. (2018). Inflammation, angiogenesis and fibrogenesis are differentially modulated by distinct domains of the snake venom metalloproteinase jararhagin. *Int J Biol Macromol*, 119, 1179-1187.
70. Ferreira, I.G., Pucca, M.B., Oliveira, I.S., Cerni, F.A., Jacob, B.C.D.S., & Arantes, E.C. (2021). Snake venom vascular endothelial growth factors (svVEGFs): Unravelling their molecular structure, functions, and research potential. *Cytokine Factor Rev*, 60, 133-143.
71. Frangieh, J., Rima, M., Fajloun, Z., Henrion, D., Sabatier, J.M., Legros, C., ... & Mattei, C. (2021). Snake Venom Components: Tools and cures to target cardiovascular diseases. *Molecules*, 26(8), 2223.
72. Giannotti, K.C., Leiguez, E., Carvalho, A.E.Z., Nascimento, N.G., Matsubara, M.H., Fortes-Dias, C.L., ... & Teixeira, C. (2017). A snake venom group IIA PLA₂ with immunomodulatory activity induces formation of lipid droplets containing 15-d-PGJ₂ in macrophages. *Sci Rep*, 7(1), 4098.
73. Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., Habib, A.G., Harrison, R.A., Williams, D.J., & Warrell, D.A. (2017). Snakebite envenoming. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 17063.
74. Gutiérrez, J.M., Escalante, T., Rucavado, A., Herrera, C., & Fox, J.W. (2016). A comprehensive view of the structure and functional alterations of extracellular matrix by snake venom metalloproteinases (SVMPs): novel perspectives on the pathophysiology of envenoming. *Toxins (Basel)*, 8(10), 304.
75. Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Escalante, T., Herrera, C., Fernández, J., Lomonte, B., ... & Fox, J.W. (2018). Unresolved issues in the understanding of

the pathogenesis of local tissue damage induced by snake venoms. *Toxicon*, 148, 123-131.

76. Hermansen, M.N., Krug, A.H., Tjønnfjord, E., & Brabrand, M. (2019). Envenomation by the common European adder (*Vipera berus*): a case series of 219 patients. *Eur J Emerg Med*, 26(5), 362-365.

77. Herzig, V., Cristofori-Armstrong, B., Israel, M.R., Nixon, S.A., Vetter, I., & King, G.F. (2020). Animal toxins – nature’s evolutionary-refined toolkit for basic research and drug discovery. *Biochem Pharmacol*, 181, 114096.

78. Hiu, J.J., & Yap, M.K.K. (2020). Cytotoxicity of snake venom enzymatic toxins: phospholipase A₂ and L-amino acid oxidase. *Biochem Soc Trans*, 48(2), 719-731.

79. Höhn A., & Grune T. (2013). Lipofuscin: formation, effects and role of macroautophagy. *Redox Biology*, 1(1), 140-144.

80. Izidoro, L.F., Sobrinho, J.C., Mendes, M.M., Costa, T.R., Grabner, A.N., Rodrigues, V.M., ... & Soares, A.M. (2014). Snake venom L-amino acid oxidases: trends in pharmacology and biochemistry. *Biomed Res Int*, 2014, 196754.

81. Jayakrishnan, M.P., Geeta, M.G., Krishnakumar, P., Rajesh, T.V., & George, B. (2017). Snake bite mortality in children: beyond bite to needle time. *Arch Dis Child*, 102(5), 445-449.

82. Jenkins, T.P., Sánchez, A., Segura, Á., Vargas, M., Herrera, M., Stewart, T.K., ... & Gutiérrez, J.M. (2017). An improved technique for the assessment of venom-induced haemorrhage in a murine model. *Toxicon*, 139, 87-93.

83. Jeon, Y.J., Kim, J.W., Park, S., & Shin, D.W. (2019). Risk factor, monitoring, and treatment for snakebite induced coagulopathy: a multicenter retrospective study. *Acute Crit Care*, 34(4), 269-275.

84. Kalita, B., Patra, A., Das, A., & Mukherjee, A.K. (2018). Proteomic analysis and immune-profiling of Eastern India Russell’s Viper (*Daboia russelii*) venom: correlation between RVV composition and clinical manifestations post RV bite. *J Proteome Res*, 17(8), 2819-2833.

85. Karabuva, S., Brizic, I., Latinovic, Z., Leonardi, A., Krizaj, I., & Luksic, B. (2016). Cardiotoxic effects of the *Vipera ammodytes ammodytes* venom fractions in the isolated perfused rat heart. *Toxicon*, 121, 98-104.
86. Karabuva, S., Lukšić, B., Brizić, I., Latinović, Z., Leonardi, A., & Križaj, I. (2017). Ammodytin L is the main cardiotoxic component of the *Vipera ammodytes ammodytes* venom. *Toxicon*, 139, 94-100.
87. Kariyanna, P.T., Jayarangaiah, A., Kamran, H., Schechter, J., Soroka, S., Amarnani, A., ... & McFarlane, S.I. (2018). Myocardial infarction after snakebite envenomation: a scoping study. *Scifed J Cardiol*, 2(3), 21.
88. Kebir-Chelghoum, H., & Laraba-Djebari, F. (2017). Cytotoxicity of *Cerastes cerastes* snake venom: involvement of imbalanced redox status. *Acta Trop*, 173, 116-124.
89. Kerkkamp, H.M., Kini, R.M., & Pospelov, A.S. (2016). Snake genome sequencing: results and future prospects. *Toxins (Basel)*, 8, 360.
90. Khader, S. & Sivagnanam, H., (2022). A rare presentation of vasculotoxic and neurotoxic ophthalmic manifestations of snakebite. *Indian Journal of Ophthalmology*, 2(1), 177-178.
91. Kini, R.M., & Koh, C.Y. (2016). Metalloproteases affecting blood coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation from snake venoms: definition and nomenclature of interaction sites. *Toxins (Basel)*, 8(10), 284.
92. Kou, J.Q., Han, R., Xu, Y.L., Ding, X.L., Wang, S.Z., Chen, C.X., ... & Qin, Z.H. (2014). Differential effects of *Naja naja atra* venom on immune activity. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 287631.
93. Kovalchuk, S.I., Ziganshin, R.H., & Starkov, V.G. (2016). Quantitative proteomic analysis of venoms from Russian vipers of *Pelias* group: phospholipases A₂ are the main venom components. *Toxins (Basel)*, 8, 105.
94. Kryukova, E.V., Potapenko, A.S., Andreeva, T.V., Ivanov, I.A., Ryabinin, V.V., Ziganshin, R.H., ... & Utkin, Y.N. (2019). Dimeric disintegrins from the steppe viper *V. ursinii* venom. *Dokl Biochem Biophys*, 488(1), 338-341.

95. Kuo, Y.J., Chung, C.H., & Huang, T.F. (2019). From discovery of snake venom disintegrins to a safer therapeutic antithrombotic agent. *Toxins (Basel)*, 11(7), 372.
96. Kvachadze, T., Dgebuadze, M., Nikobadze, E., & Tsagareli, Z. (2018). Histological and immunohistochemical profile of the myocardium during alcohol intoxication in the experiment. *Georgian Med News*, 282, 145-150.
97. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
98. Latinović, Z., Leonardi, A., & Šribar, J (2016). Venomics of *Vipera berus berus* to explain differences in pathology elicited by *Vipera ammodytes ammodytes* envenomation: therapeutic implications. *J Proteomics*, 146, 34-47.
99. Latinović, Z., Leonardi, A., Koh, C.Y., Kini, R.M., Trampuš Bakija, A., Pungerčar, J., ... & Križaj, I. (2020). The procoagulant snake venom serine protease potentially having a dual, blood coagulation factor V and X-activating activity. *Toxins (Basel)*, 12(6), 358.
100. Latinovic, Z., Leonardi, A., Petan, T., Zlajpah, M., & Krizaj, I (2017). Disintegrins from the venom of *Vipera ammodytes ammodytes* efficiently inhibit migration of breast cancer cells. *Acta Chim Slov*, 64(30), 555-559.
101. Lazarovici, P., Marcinkiewicz, C., & Lelkes, P.I. (2019). From snake venom's disintegrins and C-type lectins to anti-platelet drugs. *Toxins (Basel)*, 11(5), 303.
102. Le Geyt, J., Pach, S., Gutiérrez, J.M., Habib, A.G., Maduwage, K.P., Hardcastle, T.C., ... & Halbert, J. (2021). Paediatric snakebite envenoming: recognition and management of cases. *Arch Dis Child*, 106(1), 14-19.
103. Leonardi, A., Sajevic, T., Pungerčar, J., & Križaj, I. (2019). Comprehensive study of the proteome and transcriptome of the venom of the most venomous european viper: Discovery of a new subclass of ancestral snake venom metalloproteinase precursor-derived proteins. *J Proteome Res*, 18(5), 2287-2309.

104. Li, F., Shrivastava, I.H., Hanlong, P., Dagda, R.K., & Gasanoff, E.S. (2020). Molecular mechanism by which cobra venom cardiotoxins interact with the outer mitochondrial membrane. *Toxins (Basel)*, 12(7), 425.
105. Li, Y., Du, X., Zhao, Y., Wang, J., & Wang, J. (2021). Fluoride can damage the spleen of mice by perturbing Th1 / Th2 cell balance. *Biol Trace Elem Res*, 199(4), 1493-1500.
106. Liao, C., Jin, Y., Li, Y., & Tjong, S.C. (2020). Interactions of zinc oxide nanostructures with mammalian cells: cytotoxicity and photocatalytic toxicity. *Int J Mol Sci*, 21(17), 6305.
107. Lisnychuk, N., Soroka, Y., Andrijchuk, I., Nebesna, Z., & Volkov, K. (2018). Histological changes in spleen under conditions of toxic carcinogenesis. *Georgian Med News*, 280-281, 160-164.
108. Liu, J., Wang, H.W., Zhao, W.P., Li, X.T., Lin, L., & Zhou, B.H. (2019). Induction of pathological changes and impaired expression of cytokines in developing female rat spleen after chronic excess fluoride exposure. *Toxicol Ind Health*, 35(1), 43-52.
109. Lomonte, B., & Calvete, J.J. (2017). Strategies in 'snake venomomics' aiming at an integrative view of compositional, functional, and immunological characteristics of venoms. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 23, 26.
110. Long, C., Liu, M., Tian, H., Li, Y., Wu, F., Mwangi, J., ... & Shen, C. (2020). Potential role of platelet-activating C-type lectin-like proteins in viper envenomation induced thrombotic microangiopathy symptom. *Toxins (Basel)*, 12(12), 749.
111. López-Dávila, A.J., Weber, N., Kraft, T., Matinmehr, F., Arias-Hidalgo, M., Fernández, J., ... & Gutiérrez J.M. (2021). Cytotoxicity of snake venom Lys49 PLA₂-like myotoxin on rat cardiomyocytes ex vivo does not involve a direct action on the contractile apparatus. *Sci Rep*, 11(1), 19452.
112. Magdalan, J., Trocha, M., & Merwid-Lad, A. (2010). *Vipera berus* bites in the region of southwest Poland: A clinical analysis of 26 cases. *Wilderness Environ Med*, 21, 114-119.

113. Maievskyi, O.Y., Bobr, A.M., & Gunas, I.V. (2023). Structural changes in the heart tissue of rats under conditions of acute intoxication with *Vipera berus berus* venom. *Reports of Morphology*, 29(3), 20-25.
114. Maievskyi, O.Ye., Bobr, A.M., Gunas, I.V., Tkach, G.F., Maslii, V.P., Kyrychenko, I.M., & Ihnatishchev, M.R. (2024). Histological organization of the spleen of rats under conditions of acute intoxication with viper venom *Vipera berus berus*. *Reports of Morphology*, 30(4), 52-57.
115. Makarova, Y.V., Kryukova, E.V., Shelukhina, I.V., Lebedev, D.S., Andreeva, T.V., Ryazantsev, D.Y., ... & Utkin, Y.N. (2018). The First recombinant viper three-finger toxins: Inhibition of muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Dokl Biochem Biophys*, 479(1), 127-130.
116. Malina, T., Krecsák, L., Westerström, A., Szemán-Nagy, G., Gyémánt, G., M-Hamvas, M., ... & Vasas, G. (2017). Individual variability of venom from the European adder (*Vipera berus berus*) from one locality in Eastern Hungary. *Toxicon*, 135, 59-70.
117. Mamede, C.C.N., de Sousa Simamoto, B.B., da Cunha Pereira, D.F., de Oliveira Costa, J., Ribeiro, M.S.M., & de Oliveira, F. (2020). Edema, hyperalgesia and myonecrosis induced by Brazilian bothropic venoms: overview of the last decade. *Toxicon*, 187, 10-18.
118. Mariia Palamarchuk, Anna Bobr, Aleksandr Mudrak, Igor Gunas, Oleksandr Maievskyi, Inga Samborska & Ludmila Ostapchenko (2023). Proteolytic Homeostasis in the Tissue of the Spleen and the Heart of Rats Injected with the Venom of *Vipera berusberus* and *Vipera berus nikolskii*. *Current Applied Science and Technology*, 23(6).
119. Marinho, A.D., Silveira, J.A.M., Chaves Filho, A.J.M., Jorge, A.R.C., Nogueira Júnior, F.A., Pereira, V.B.M., ... & Monteiro, H.S.A. (2021). Bothrops pauloensis snake venom-derived Asp-49 and Lys-49 phospholipases A₂ mediates acute kidney injury by oxidative stress and release of inflammatory cytokines. *Toxicon*, 190, 31-38.

120. Medeiros-Lima, D.J.M., Carvalho, J.J., Tibirica, E., Borges, J.P., & Matsuura, C. (2019). Time course of cardiomyopathy induced by doxorubicin in rats. *Pharmacol Rep*, 71(4), 583-590.
121. Megale, Â.A.A., Magnoli, F.C., Kuniyoshi, A.K., Iwai, L.K., Tambourgi, D.V., Portaro, F.C.V., ... & da Silva, W.D. (2018). Kn-Ba: a novel serine protease isolated from Bitis arietans snake venom with fibrinogenolytic and kinin-releasing activities. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 24, 38.
122. Minghui, R., Malecela, M. N., Cooke, E., & Abela-Ridder, B. (2019). WHO's snakebite envenoming strategy for prevention and control. *Lancet Glob Health*, 7(7), 837-838.
123. Mitevska, E., Kostadinova-Petrova, I., & Kostovska, N. (2015). Changes of spleen in Wistar rats exposed to therapeutic doses of dexamethasone and medroxyprogesterone acetate evaluated by stereological parameters. *Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki)*, 36(3), 13-25.
124. Modahl, C.M., Brahma, R.K., & Koh, C.Y. (2020). Omics technologies for profiling toxin diversity and evolution in snake venom: impacts on the discovery of therapeutic and diagnostic agents. *Annu Rev Anim Biosci*, 8, 91-116.
125. Mouchbahani-Constance, S., & Sharif-Naeini, R. (2020). Proteomic and transcriptomic techniques to decipher the molecular evolution of venoms. *Toxins (Basel)*, 13, 154.
126. Moura-da-Silva, A.M., Almeida, M.T., Portes-Junior, J.A., Nicolau, C.A., Gomes-Neto, F., & Valente, R.H. (2016). Processing of snake venom metalloproteinases: generation of toxin diversity and enzyme inactivation. *Toxins (Basel)*, 8(6), 183.
127. Munavar, A., Ali, S.A., Akrem, A., & Betzel, C. (2018). Snake venom peptides: tools of biodiscovery. *Toxins (Basel)*, 10(11), 474.
128. Nicolas, J.D., Aeffer, S., & Salditt, T. (2019). Radiation damage studies in cardiac muscle cells and tissue using microfocused X-ray beams: experiment and simulation. *J Synchrotron Radiat*, 26(4), 980-990.

129. Nirthanan, S. (2020). Snake three-finger α -neurotoxins and nicotinic acetylcholine receptors: molecules, mechanisms and medicine. *Biochem Pharmacol*, 181, 114168.
130. Nourreddine, F.Z., Onssedik-Oumehdi, H., & Laraba-Djebari, F. (2020). Myotoxicity induced by *Cerastes cerastes* venom: Beneficial effect of heparin in skeletal muscle tissue regeneration. *Acta Trop*, 2020, 105274.
131. Nykolaychyk, B.B., Moyn, V.M., & Kyrkovskyy, V.V. (1991). Method for determining of the peptide pool molecular. *Laboratory case*, 10, 13-18.
132. O'Connell, J.L., Romano, M.M., Campos Pulici, E.C., Carvalho, E.E., de Souza, F.R., Tanaka, D.M., ... & Simões, M.V. (2017). Short-term and long-term models of doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats: A comparison of functional and histopathological changes. *Exp Toxicol Pathol*, 69(4), 213-219.
133. Ojeda, P.G., Ramirez, D., Alzate-Morales, J., Caballero, J., Kaas, Q., & Gonzalez, W. (2017). Computational studies of snake venom toxins. *Toxins (Basel)*, 10(1), 8.
134. Olaoba, O.T., Karina Dos Santos, P., Selistre-de-Araujo, H.S., & Ferreira de Souza, D.H. (2020). Snake venom metalloproteinases (SVMPs): a structure-function update. *Toxicon X*, 7, 100052.
135. Oliveira Neto, J., Silveira, J.A.M., Serra, D.S., Viana, D.A., Borges-Nojosa, D.M., Sampaio, C.M.S., ... & Evangelista, J.S.A.M. (2017). Pulmonary mechanic and lung histology induced by *Crotalus durissus cascavella* snake venom. *Toxicon*, 137, 144-149.
136. Ostapchenko, L., Savchuk, O. & Burlova-Vasilieva, N (2011). Enzyme electrophoresismethod in analysisof activecomponents of haemostasis system. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2, 20-26.
137. Paloschi, M.V., Pontes, A.S., Soares, A.M., & Zuliani, J.P. (2018). An update on potential molecular mechanisms underlying the actions of snake venom L-amino acid oxidases (LAAOs). *Curr Med Chem*, 25(21), 2520-2530.

138. Paolino, G., Di Nicola, M.R., Pontara, A., Didona, D., Moliterni, E., Mercuri, S.R., ... & Pampena, R. (2020). Vipera snakebite in Europe: a systematic review of a neglected disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 34(10), 2247-2260.
139. Peterfi, O., Boda, F., Szabo, Z., Ferencz, E., & Baba, L. (2019). Hypotensive snake venom components – a mini-review. *Molecules*, 24(15), 2778.
140. Pidde-Queiroz, G., Magnoli, F.C., Portaro, F.C.V., Serrano, S.M.T., Lopes, A.S., Leme, A.F.P., ... & Tambourgi, D.V. (2013). P-Isnakevenom metalloproteinase is able to activate the complement system by direct cleavage of central components of the cascade. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(10).
141. Ping, Z., Peng, Y., Lang, H., Xinyong, C., Zhiyi, Z., Xiaocheng, W., ... & Liang, S. (2020). Oxidative stress in radiation-induced cardiotoxicity. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 3579143.
142. Pinyachat, A. (2016). Comparative studies of structural and functional properties of snake venom metalloproteinases. *J Med Assoc Thai*, 1, 76-88.
143. Preciado, L.M., Pereañez, J.A., & Comer, J. (2019). Potential of matrix metalloproteinase inhibitors for the treatment of local tissue damage induced by a type P-I snake venom metalloproteinase. *Toxins (Basel)*, 12(1), 8.
144. Puukila, S., Lemon, J.A., Lees, S.J., Tai, T.C., Boreham, D.R., & Khaper, N. (2017). Impact of ionizing radiation on the cardiovascular system: A review. *Radiat Res*, 188(4.2), 539-546.
145. Rathnayaka, R.M.M.K.N., Ranathunga, P.E.A.N., & Kularatne, S.A.M. (2019). Systemic bleeding including pulmonary haemorrhage following hump-nosed pit viper (*Hypnale hypnale*) envenoming: A case report from Sri Lanka. *Toxicon*, 170, 21-28.
146. Razok, A., Shams, A., & Yousaf, Z. (2020). Cerastes cerastes snakebite complicated by coagulopathy and cardiotoxicity with electrocardiographic changes. *Toxicon*, 188, 1-4.
147. Reddy, R.V., Taylor, M.J., & Sharma, R.P. (1988). Evaluation of citrinin toxicity on the immune functions of mice. *J. Food Prot*, 51, 32-36.

148. Resiere, D., Mehdaoui, H. & Nevieri, R., (2022). Inflammation and oxidativestress insnakebite envenomation: Abrief descriptivereview andclinical implications. *Toxins*, 14(11).
149. Roldán-Padrón, O., Castro-Guillén, J.L., García-Arredondo, J.A., Cruz-Pérez, M.S., Díaz-Peña, L.F., Saldaña, C., ... & García-Gasca, T. (2019). Snake venom hemotoxic enzymes: biochemical comparison between *Crotalus* species from Central Mexico. *Molecules*, 24(8), 1489.
150. Rucavado, A., Escalante, T., Camacho, E., Gutiérrez, J.M., & Fox, J.W. (2018). Systemic vascular leakage induced in mice by Russell's viper venom from Pakistan. *Sci Rep*, 8(1), 16088.
151. Saganelidze, K., & Kavtaradze, N. (2018). Modern aspects of diagnosis and treatment of heart failure, as a manifestation of anthracycline cardiotoxicity (Review). *Georgian Med News*, 278, 87-93.
152. Sanchez, E.F., Flores-Ortiz, R.J., Alvarenga, V.G., & Eble, J.A. (2017). Direct fibrinolytic snake venom metalloproteinases affecting hemostasis: structural, biochemical features and therapeutic potential. *Toxins (Basel)*, 9(12), 392.
153. Sang X., Zheng L., Sun Q., Li N., Cui Y., Hu R., ... & Gui S. (2012). The chronic spleen injury of mice following long-term exposure to titanium dioxide nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res, Part A*, 100, 894-902.
154. Sanhajariya, S., Duffull, S.B., & Isbister, G.K. (2018). Pharmacokinetics of snake venom. *Toxins (Basel)*, 10(2), 73.
155. Santos-Filho, N.A., & Santos, C.T. (2017). Alpha-type phospholipase A₂ inhibitors from snake blood. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 23, 19.
156. Sarkar, S., Sinha, R., Chaudhury, A.R., Maduwage, K., Abeyagunwardena, A., Bose, N., ... & McCulloch, M. (2020). Snake bite associated with acute kidney injury. *Pediatr Nephrol*, 36(12), 3829-3840.
157. Sartim, M.A., Cezarette, G.N., Jacob-Ferreira, A.L., Frantz, F.G., Faccioli, L.H., & Sampaio, S.V. (2017). Disseminated intravascular coagulation caused by moojenactivase, a procoagulant snake venom metalloprotease. *Int J Biol Macromol*, 103, 1077-1086.

158. Sciani, J.M., & Pimenta, D.C. (2017). The modular nature of bradykinin-potentiating peptides isolated from snake venoms. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 23, 45.
159. Segnani, C., Ippolito, C., Antonioli, L., Pellegrini, C., Blandizzi, C., Dolfi, A., ... & Bernardini, N. (2015). Histochemical Detection of Collagen Fibers by Sirius Red/Fast Green Is More Sensitive than van Gieson or Sirius Red Alone in Normal and Inflamed Rat Colon. *PLoS One*, 10(12), e0144630.
160. Serrano, S.M.T., Zelanis, A., Kitano, E.S., & Tashima, A.K. (2018). Analysis of the snake venom peptidome. *Methods Mol Biol*, 1719, 349-358.
161. Siigur, J., & Siigur, E. (2022). Biochemistry and toxicology of proteins and peptides purified from the venom of *Vipera berus berus*. *Toxicon*, 15, 100131.
162. Silva, A., Kuruppu, S., Othman, I., Goode, R.J., Hodgson, W.C., & Isbister, G.K. (2017). Neurotoxicity in Sri Lankan Russell's viper (*Daboia russelii*) envenoming is primarily due to U₁-viperitoxin-Dr_{1a}, a pre-synaptic neurotoxin. *Neurotox Res*, 31(1), 11-19.
163. Simoes-Silva, R., Alfonso, J., Gomez, A., Holanda, R.J., Sobrinho, J.C., Zaqueo, K.D., ... & Soares, A.M. (2018). Snake venom, a natural library of new potential therapeutic molecules: challenges and current perspectives. *Curr Pharm Biotechnol*, 19(4), 308-335.
164. Simoes, L.O., Alves, Q.L., Camargo, S.B., Araujo, F.A., Hora, V.R.S., Jesus, R.L.C., ... & Silva, D.F. (2021). Cardiac effect induced by *Crotalus durissus cascavella* venom: morphofunctional evidence and mechanism of action. *Toxicol Lett*, 337, 121-133.
165. Simpson, C.H., Richardson, W.H., Swartzentruber, G.S., & Lloyd, V.J. (2018). ST segment elevation myocardial infarction following a *Crotalus horridus* envenomation. *Wilderness Environ Med*, 29(3), 383-387.
166. Slagboom, J., Kool, J., Harrison, R.A., & Casewell, N.R. (2017). Haemotoxic snake venoms: their functional activity, impact on snakebite victims and pharmaceutical promise. *Br J Haematol*, 177(6), 947-959.
167. Soares, T.G., Santos, J.L.D., Alvarenga, V.G., Santos, J.S.C., Leclercq, S.Y., Faria, C.D., ... & Borges, M.H. (2020). Biochemical and functional properties of a new l-

amino acid oxidase (LAAO) from *Micrurus lemniscatus* snake venom. *Int J Biol Macromol*, 154, 1517-1527.

168. Spolaore, B., Fernández, J., Lomonte, B., Massimino, M.L., & Tonello, F. (2019). Enzymatic labelling of snake venom phospholipase A₂ toxins. *Toxicon*, 170, 99-107.

169. Srirangan, A., Pushpakumara, J., & Wanigasuriya, K. (2020). A life-threatening complication due to pulmonary haemorrhage following hump-nosed viper bite. *BMC Pulm Med*, 20(1), 35.

170. Šteiner, I. (2020). Pathology of radiation induced heart disease. *Rep Pract Oncol Radiother*, 25(2), 178-181.

171. Sun, Q.Y., Wang, C.E., Li, Y.N., & Bao, J. (2020). Inhibition of platelet aggregation and blood coagulation by a P-III class metalloproteinase purified from *Naja atra* venom. *Toxicon*, 187, 223-231.

172. Sunil, K.K., Joseph, J.K., Joseph, S., Varghese, A.M., & Jose, M.P. (2020). Cardiac involvement in vasculotoxic and neurotoxic snakebite – a not so uncommon complication. *J Assoc Physicians India*, 68(11), 39-41.

173. Takeda, S., Takeya, H., & Iwanaga, S. (2012). Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM / ADAMTS family proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1824(1), 164-176.

174. Tan, K.K., Bay, B.H., & Gopalakrishnakone, P. (2018). L-amino acid oxidase from snake venom and its anticancer potential. *Toxicon*, 144, 7-13.

175. Tans, G. & Rosing, J. (1993). Prothrombin activation by snake venomproteases. *Toxin Reviews*, 12(2), 155-173.

176. Tasoulis, T., & Isbister, G.K. (2017). A review and database of snake venom proteomes. *Toxins (Basel)*, 9(9), 290.

177. Thakur, R., & Mukherjee, A. (2017). Pathophysiological significance and therapeutic applications of snake venom protease inhibitors. *Toxicon*, 131, 37-47.

178. Tibballs, J., Kuruppu, S., Hodgson, W.C., Carroll, T., Hawdon, G., Sourial, M., ... & Winkel, K. (2003). Cardiovascular, haematological and neurological effects of the venom of the Papua New Guinean small-eyed snake (*Micropechis ikaheka*) and their neutralisation with CSL polyvalent and black snake antivenoms. *Toxicon*, 42(6), 647-655.

179. Ullah, A. (2020). Structure-function studies and mechanism of action of snake venom L-amino acid oxidases. *Front Pharmacol*, 11, 110.
180. Ullah, A., Masood, R., Ali, I., Ullah, K., Ali, H., Akbar, H., ... & Betzel, C. (2018). Thrombin-like enzymes from snake venom: Structural characterization and mechanism of action. *Int J Biol Macromol*, 114, 788-811.
181. Variawa, S., Buitendag, J., Marais, R., Wood, D., & Oosthuizen, G. (2021). Prospective review of cytotoxic snakebite envenomation in a paediatric population. *Toxicon*, 190, 73-78.
182. Vikrant, S., & Parashar, A. (2017). Snake bite-induced acute kidney injury: report of a successful outcome during pregnancy. *Am J Trop Med Hyg*, 96(4), 885-886.
183. Virmani, S., Bhat, R., Rao, R., Kapur, R., & Dsouza, S. (2017). Paroxysmal atrial fibrillation due to venomous snake bite. *J Clin Diagn Res*, 11(6), OD01-OD02.
184. Waiddyanatha, S., Silva, A., Siribaddana, S., & Isbister, G.K. (2019). Long-term effects of snake envenoming. *Toxins (Basel)*, 1(4), 193.
185. Wang, M., Scott, S.R., Koniaris, L.G., & Zimmers, T.A. (2020). Pathological responses of cardiac mitochondria to burn trauma. *Int J Mol Sci*, 21(18), 6655.
186. Wang, S.Z., & Qin, Z.H. (2018). Anti-Inflammatory and immune regulatory actions of *Naja naja atra* venom. *Toxins (Basel)*, 10(3), 100.
187. Williams, H.F., Layfield, H.J., Vallance, T., Patel, K., Bicknell, A.B., Trim, S.A., ... & Vaiyapuri, S. (2019). The urgent need to develop novel strategies for the diagnosis and treatment of snakebites. *Toxins (Basel)*, 11(6), 363.
188. Williams, H.F., Mellows, B.A., Mitchell, R., Sfyri, P., Layfield, H.J., Salamah, M., ... & Vaiyapuri, S. (2019). Mechanisms underpinning the permanent muscle damage induced by snake venom metalloprotease. *PLoS Negl Dis*, 13(1), e0007041.
189. Wong, K.Y., Tan, K.Y., Tan, N.H., & Tan, C.H. (2021). A neurotoxic snake venom without phospholipase A₂: Proteomics and cross-neutralization of the venom from Senegalese Cobra, *Naja senegalensis* (Subgenus: *Uraeus*). *Toxins (Basel)*, 13(1), 60.
190. Xiao, H., Li, H., Zhang, D., Li, Y., Sun, S., & Huang, C. (2018). Inactivation of venom PLA₂ alleviates myonecrosis and facilitates muscle regeneration in envenomed mice: A time course observation. *Molecules*, 23(8), 1911.

191. Xiao, H., Pan, H., Liao, K., Yang, M., & Huang, C. (2017). Snake venom PLA₂, a promising target for broad-spectrum antivenom drug development. *Biomed Res Int*, 2017, 6592820.
192. Yacoub, T., Rima, M., Sadek, R., Hleihel, W., Fajloun, Z., & Karam, M. (2018). Montivipera bornmuelleri venom has immunomodulatory effects mainly up-regulating pro-inflammatory cytokines in the spleens of mice. *Toxicol Rep*, 5, 318-323.
193. Yee, K.T., Tongsima, S., Vasieva, O., Ngamphiw, C., Wilantho, A., Wilkinson, M.C., ... & Rojnuckarin P. (2018). Analysis of snake venom metalloproteinases from Myanmar Russell's viper transcriptome. *Toxicon*, 146, 31-41.
194. Zambelli, V.O., Picolo, G., Fernandes, C.A.H., Fontes, M.R.M., & Cury, Y. (2017). Secreted phospholipases A₂ from animal venoms in pain and analgesia. *Toxins (Basel)*, 9(12), 406.
195. Zanetti, G., Duregotti, E., Locatelli, C.A., Giampreti, A., Lonati, D., Rossetto, O., ... & Pirazzini, M. (2018). Variability in venom composition of European viper subspecies limits the cross-effectiveness of antivenoms. *Sci Rep*, 8(1), 9818.
196. Zhang, J., Yu, C., Yao, B.W., Wang, H., Zhao, L., Xu, X.P., ... & Peng, R.Y. (2020). Dose-dependent cardiac dysfunction and structural damage in rats after short-wave radiation. *Biomed Environ Sci*, 33(8), 603-613.
197. Zinenko, O., Tovstukha, I., & Korniyenko, Y. (2020). PLA₂ Inhibitor Varespladib as an Alternative to the Antivenom Treatment for Bites from Nikolsky's Viper *Vipera berus nikolskii*. *Toxins (Basel)*, 12(6), 356.
198. Zuliani, J.P., Soares, A.M., & Gutiérrez, J.M. (2020). Polymorphonuclear neutrophil leukocytes in snakebite envenoming. *Toxicon*, 187, 188-197.

ДОДАТКИ

Додаток А

НАУКОВІ ПРАЦІ, В ЯКИХ ОПУБЛІКОВАНІ ОСНОВНІ НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Palamarchuk, M., Bobr, A., Mudrak, A., Gunas, I., Maievskyi, O., Samborska, I., & Ostapchenko, L. (2023). Proteolytic Homeostasis in the Tissue of the Spleen and the Heart of Rats Injected with the Venom of *Vipera berusberus* and *Vipera berus nikolskii*. *Current Applied Science and Technology*, 23(6). <https://doi.org/10.55003/cast.2023.06.23.015> (Закордонне фахове видання, Таїланд. Видання включено до міжнародної наукометричної бази Scopus)

Palamarchuk M. – написання та редагування огляду;

Bobr A. M. – дослідження та написання оригінального проекту, формальний аналіз і валідація;

Mudrak A. – методологія;

Gunas I. – концептуалізація;

Maievskyi O. – адміністрування проекту;

Samborska I. – програмне забезпечення, ресурси;

Ostapchenko L. – формальний аналіз.

2. Maievskyi, O. Y., Bobr, A. M., & Gunas, I. V. (2023). Structural changes in the heart tissue of rats under conditions of acute intoxication with *Vipera berus berus* venom. *Reports of Morphology*, 29(3), 20-25. [https://doi.org/10.31393/morphology-journal-2023-29\(3\)-03](https://doi.org/10.31393/morphology-journal-2023-29(3)-03) (Фахове видання України. Видання включено до міжнародної наукометричної бази Scopus)

Maievskyi O. Y. – концептуалізація, нагляд, формальний аналіз;

Bobr A. M. – дослідження, методологія та написання оригінального проекту, написання та редагування огляду, програмне забезпечення, ресурси;

Gunas I. V. – візуалізація даних, адміністрування проекту.

3. Bobr, A. M. (2024). Analytical and quantitative assessment of the state of the spleen and immune processes in rats under administering *Vipera berus* venom. *Morphologia*, 18(3), 20-25. <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.3.20-25> (Фахове видання України)

4. Maievskiy, O. Ye., Bobr, A. M., Gunas, I. V., Tkach, G. F., Maslii, V. P., Kyrychenko, I. M., & Ihnatishchev, M. R. (2024). Histological organization of the spleen of rats under conditions of acute intoxication with viper venom *Vipera berus berus*. *Reports of Morphology*, 30(4), 52-57. [https://doi.org/10.31393/morphology-journal-2024-30\(4\)-06](https://doi.org/10.31393/morphology-journal-2024-30(4)-06) (Фахове видання України. Видання включено до міжнародної наукометричної бази Scopus)

Maievskiy O. Ye. – дослідження, написання та редагування огляду;

Bobr A. M. – концептуалізація, дослідження, написання оригінального проекту;

Gunas I. V. – адміністрування проекту;

Tkach G. F. – методологія;

Maslii V. P. – валідація;

Kyrychenko I. M. – формальний аналіз;

Ihnatishchev M. R. – програмне забезпечення, ресурси.

5. Bobr, A. M. (2024). Analytical and quantitative assessment of the condition of the heart wall of rats exposed to the venom of the vipers *Vipera berus berus* and *Vipera berus nikolskii*. *Morphologia*, 18(4), 15-21. <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.15-21> (Фахове видання України)

НАУКОВІ ПРАЦІ, ЯКІ ЗАСВІДЧУЮТЬ АПРОБАЦІЮ МАТЕРІАЛІВ ДИСЕРТАЦІЇ

6. Бобр, А. М. (2023). Молекулярний вміст отрути гадюк виду *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii* та його вплив на зміни біохімічних параметрів міокарду і селезінки щурів. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю: XX Міжнародна наукова конференція

студентів та молодих вчених «Шевченківська Весна: досягнення в науках про життя», Київ, 27–28 квітня 2023 року – Київ – 214 с.

7. Бобр, А. М. (2023). *Зміни біохімічних параметрів міокарду та селезінки щурів при впливі отрути гадюк виду у Vipera berus berus та Vipera berus nikolskii*. Збірник наукових праць: XIX Наукова – конференція «Львівські хімічні читання – 2023», Львів, 29–31 травня 2023 року – Львів: Видавництво від А до Я, 2023. – 254 с.

8. Бобр, А. М. (2023). *Analytical and quantitative assessment of the state of the spleen and immune processes in rats under administering Vipera berus*. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю: «Теорія та практика сучасної морфології», Дніпро, 6–8 листопада 2024 року – Дніпро – 184 с.

Апробація результатів дисертації:

- науково-практична конференція з міжнародною участю: XX Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська Весна: досягнення в науках про життя» (м. Київ, 2023) – публікація, стендова доповідь;
- XIX наукова конференція «Львівські хімічні читання – 2023» (м. Львів, 2023) – публікація, стендова доповідь;
- науково-практична конференція з міжнародною участю: «Теорія та практика сучасної морфології» (м. Дніпро, 2024) – публікація, стендова доповідь.

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор закладу вищої освіти
з наукової роботи

Тернопільського національного
медичного університету
імені І. Я. Горбачевського

Міністерства охорони здоров'я
України

д. б. н., проф.  Іван КЛІЩ

« 14 » березня 2025 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція для впровадження: матеріали дисертаційної роботи на здобуття наукового ступеня доктора філософії «Зміни гістоархітекτονіки і біохімічних параметрів міокарду та селезінки щурів при впливі отрути гадюк виду *Vipera berus*».

2. Установа-розробник та автор: Національний медичний університет імені О. О. Богомольця МОЗ України, Бобр Анна Миколаївна, аспірант кафедри анатомії людини Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова.

3. Пропозиція до впровадження: Вперше встановлено, що за умов впливу отрути *V. berus berus* спостерігається дезорганізація білої пульпи селезінки: втрата чіткості та впорядкованості розміщення її структурних елементів, погана візуалізація крайової зони лімфоїдних вузликів; в гермінативних центрах - зростання чисельності лімфобластів. В червоній пульпі органу відмічаються ділянки деструкції тканини селезінки, геморагії; наявність вогнищ апоптозу лімфоцитів, потовщення трабекул, стази і складжі еритроцитів в просвітах трабекулярних вен. За умов впливу отрути *V. berus nikolskii* в білій пульпі селезінки відмічається зростання чисельності лімфоїдних вузликів з великою кількістю лімфобластів, клітин з фігурами мітозів. В периартеріальних зонах виявляється збільшення Т-лімфоцитів, розширення просвітів центральних артерій, потовщення їх стінок, розпушення та дезорганізація ендотеліального вистелення внутрішньої оболонки. В червоній пульпі значно підвищується кількість лімфоцитів, макрофагів, плазмочитів; спостерігаються ділянки апоптозу лімфоцитів, пінисті макрофаги, вогнища геморагій, лімфоцитарна інфільтрація трабекулярних судин, розширення просвітів вен, їх виражене повнокрів'я, складжі еритроцитів.

4. Актуальність дослідження: Імунна система відіграє важливу роль в реакції організму на чисельні фактори середовища, що впливають на нормальний перебіг фізіологічних процесів. Будь-які зміни гомеостазу супроводжуються імунною відповіддю, яка індукується і у випадку укусів отруйних тварин, в тому числі змій. Їх токсини здатні активувати II тип імунної відповіді, однак, особливості патогенезу взаємодії даної системи організму та отрути гадюк є значно складнішими. Враховуючи велике різноманіття ферментів та неферментних компонентів в її складі, зовсім не дивує той факт, що наслідком є розвиток вираженого запального процесу. Не зважаючи на достатньо ґрунтовні і масштабні дослідження науковців світу, досі не встановленими є окремі складові елементи токсинів змій, особливості їх дії та патогенез ураження

внутрішніх органів. Зокрема, механізми пошкодження селезінки за даних умов розкриті не в повній мірі і не надають інформації щодо особливостей морфологічних змін органу на світлооптичному та біохімічному рівнях. Крім того, дані про вплив токсинів гадюк *V. berus berus* та *V. berus nikolskii* на структуру та функції імунної системи на даний момент повністю відсутні. Тому дослідження даного питання з метою ранньої діагностики, попередження ускладнень та можливостей покращення методів лікування є актуальною задачею.

5. Джерела інформації:

1. Bobr, A. M. (2024). Analytical and quantitative assessment of the state of the spleen and immune processes in rats under administering *Vipera berus* venom. *Morphologia*, 18(3), 20-25. <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.3.20-25>
2. Maievskiy, O. Ye., Bobr, A. M., Gunas, I. V., Tkach, G. F., Maslii, V. P., Kyrychenko, I. M., & Ihnatchichev, M. R. (2024). Histological organization of the spleen of rats under conditions of acute intoxication with viper venom *Vipera berus berus*. *Reports of Morphology*, 30(4), 52-57. [https://doi.org/10.31393/morphology-journal-2024-30\(4\)-06](https://doi.org/10.31393/morphology-journal-2024-30(4)-06)

6. Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра гістології та ембріології Тернопільського національного медичного університету імені І.Я.Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України.

7. Форма впровадження: у навчальний процес - в матеріали лекцій і практичних занять для студентів медичного та стоматологічного факультетів та в наукову роботу кафедри.

8. Термін впровадження: березень-квітень 2025 року.

9. Зауваження та пропозиції: немає.

10. Протокол засідання кафедри № 3 від 13 березня 2025 р.

Відповідальний за впровадження:
завідувач кафедри гістології та ембріології
Тернопільського національного
медичного університету
імені І. Я. Горбачевського
Міністерства охорони здоров'я України
доктор біологічних наук, професор



Зоя НЕБЕСНА

«Затверджую»

Директор ННЦ

«Інститут біології та медицини»

Київського національного

університету імені Тараса Шевченка

14 березня 2025 р. Остапченко Л.І.



А К Т В П Р О В А Д Ж Е Н Н Я

Назва роботи: “Зміни гістоархітекτονіки і біохімічних параметрів міокарду та селезінки щурів при впливі отрути гадюк виду *Vipera berus*”.

1. Автор: Бобр Анна Миколаївна, аспірант кафедри анатомії людини Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова.

2. Пропозиція до впровадження: Результати якісного та кількісного аналізу загального протеїна, дослідження протеолітичної активності та вмісту молекул середньої маси вперше свідчать про зниження рівня протеїна в обох органах. Відзначено перерозподіл протеїнових молекул, із зменшенням їх молекулярної маси. Вплив отрут *V. berus* на органи-мішені та організм в цілому призводить до синтезу активних фібриногенолітичних ферментів, утворенням деградованих або аномальних молекул зі зміненою субстратною специфічністю. Перерозподілу зазнають і протеолітичні молекули, що показує прямий вплив укусів *V. berus berus* і *V. berus nikolskii* на патологічне посилення протеолітичних процесів.

3. Актуальність дослідження: Кардіотоксичність та виражені ЕКГ зміни є частими ускладненнями укусів змій. Найбільш поширеними є синусова аритмія, атріовентрикулярна блокада та синусова брадикардія. Випадки укусів змій сімейства Viperidae часто асоціюються з такими патологіями як інфаркт міокарда та ішемічний інсульт, що виникають внаслідок активації коагуляційного каскаду і прямої кардіотоксичності протеолітичних ферментів, зокрема металопротеїназ. Також компоненти отрути спричиняють розвиток гіпофібриногенемії, ураження ендотелію судин та порушення агрегації тромбоцитів. Імунна система відіграє важливу роль в реакції організму на чисельні фактори середовища, що впливають на нормальний перебіг фізіологічних процесів. Будь-які зміни гомеостазу супроводжуються імунною відповіддю, яка індукується і у випадку укусів отруйних тварин, в тому числі змій. Їх токсини здатні активувати II тип імунної відповіді, однак, особливості патогенезу взаємодії даної системи організму та отрути гадюк є значно складнішими. Враховуючи велике різноманіття ферментів та неферментних компонентів в її складі, зовсім не дивує той факт, що наслідком є розвиток вираженого запального процесу. Не зважаючи на достатньо ґрунтовні і масштабні дослідження науковців світу, досі не встановленими є окремі складові елементи токсинів змій, особливості їх дії та патогенез ураження внутрішніх органів. Зокрема, механізми пошкодження серця та селезінки за даних умов

розкриті не в повній мірі і не надають інформації щодо особливостей морфологічних змін органів на світлооптичному та біохімічному рівнях. Крім того, дані про вплив токсинів гадюк *V. berus berus* та *V. berus nikolskii* на структуру та функції серцево-судинної та імунної системи на даний момент повністю відсутні. Тому дослідження даного питання з метою ранньої діагностики, попередження ускладнень та можливостей покращення методів лікування є актуальною задачею.

4. Установа-розробник: Національний медичний університет імені О. О. Богомольця МОЗ України

5. Джерела інформації:

Palamarchuk, M., Bobr, A., Mudrak, A., Gunas, I., Maievskyi, O., Samborska, I., & Ostapchenko, L. (2023). Proteolytic Homeostasis in the Tissue of the Spleen and the Heart of Rats Injected with the Venom of *Vipera berusberus* and *Vipera berus nikolskii*. *Current Applied Science and Technology*, 23(6). <https://doi.org/10.55003/cast.2023.06.23.015>

6. Ким і коли впроваджено: кафедра біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка

Початок впровадження: березень 2025 р.

Протокол засідання кафедри № 3 від 10 березня 2025р.

7. Форма впровадження: результати дослідження впроваджено у навчальний процес та лекційний курс.

8. Соціально-економічний ефект: покращення підготовки молодих спеціалістів.

Завідувач кафедри біохімії
ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка
д.біол.н., професор



Олексій САВЧУК



ЗАТВЕРДЖУЮ
Проректор з наукової роботи
Львівського національного медичного
університету імені Данила Галицького
проф. Вікторія СЕРГІЄНКО
10. 04 2025 року

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Назва роботи: “Зміни гістоархітекτονіки і біохімічних параметрів міокарду та селезінки щурів при впливі отрути гадюк виду *Vipera berus*”.

1. Автор: Бобр Анна Миколаївна, аспірант кафедри анатомії людини Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова.

2. Пропозиція до впровадження: Вперше встановлено, що за умов впливу отрути *V. berus berus* спостерігаються патологічні зрушення структурної організації всіх шарів стінки серця. В епікарді відбувається збільшення об'єму колагенових волокон, потовщення стінок судин; в міокарді - набряк, дезорганізація м'язових волокон, їх фрагментація, лізис, деструкція, втрата характерної поперечної посмугованості, некроз. Крім того, виявлено зростання чисельності фібробластів, їх активація та, як результат, розростання в тканині міокарду компонентів сполучної тканини, в тому числі колагенових волокон. Ендокард відрізнявся десквамацією ендотеліального вистелення та збільшенням кількості активних фібробластів в зовнішньому сполучнотканинному шарі. За умов впливу отрути *V. berus nikolskii* встановлено деструкцію стінок судин серця, набряк їх внутрішньої та середньої оболонок. Для міокарду характерним є значно вищий ступінь морфологічних змін, в порівнянні зі щурами, яким вводили отруту гадюк *Vipera berus berus*: хаотичне розміщення та фрагментація волокон серцевого м'язу, втрата ними поперечної посмугованості, наявність вогнищ некрозу та міоцитолізу. Виявляється виражена гістіолейкоцитарна інфільтрація, зростання чисельності фібробластів; кровоносні судини міокарда зазнають деформації, стінки їх набряклі; зростає проникність стінок судин та, як результат, спостерігається поява геморагій.

3. Актуальність дослідження: Кардіотоксичність та виражені ЕКГ зміни є частими ускладненнями укусів змій. Найбільш поширеними є синусова аритмія, атріовентрикулярна блокада та синусова брадикардія. Випадки укусів змій сімейства *Viperidae* часто асоціюються з такими патологіями як інфаркт міокарда та ішемічний інсульт, що виникають внаслідок активації коагуляційного каскаду і прямої кардіотоксичності протеолітичних ферментів, зокрема металопротейназ. Також компоненти отрути спричиняють розвиток гіпофібриногенемії, ураження ендотелію судин та порушення агрегації тромбоцитів. Не зважаючи на достатньо ґрунтовні і масштабні дослідження науковців світу, досі не встановленими є окремі складові елементи токсинів змій, особливості їх дії та патогенез ураження внутрішніх органів. Зокрема, механізми пошкодження серця та селезінки за даних умов розкриті не в повній мірі і не надають інформації щодо особливостей морфологічних змін органів на світлооптичному та біохімічному рівнях. Крім того, дані про вплив токсинів гадюк *V. berus berus* та *V. berus nikolskii* на структуру та функції серцево-судинної системи на даний момент повністю відсутні. Тому дослідження даного питання з метою ранньої діагностики, попередження ускладнень та можливостей покращення методів лікування є актуальною задачею.

4. Установа-розробник: Національний медичний університет імені О. О. Богомольця МОЗ України

5. Джерела інформації:

1. Maievskiy, O. Y., Bobr, A. M., & Gunas, I. V. (2023). Structural changes in the heart tissue of rats under conditions of acute intoxication with *Vipera berus berus* venom. *Reports of Morphology*, 29(3), 20-25. [https://doi.org/10.31393/morphology-journal-2023-29\(3\)-03](https://doi.org/10.31393/morphology-journal-2023-29(3)-03)

2. Bobr, A. M. (2024). Analytical and quantitative assessment of the condition of the heart wall of rats exposed to the venom of the vipers *Vipera berus berus* and *Vipera berus nikolskii*. *Morphologia*, 18(4), 15-21. <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.15-21>

6. Ким і коли впроваджено: Кафедра оперативної хірургії з топографічною анатомією Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького
Початок впровадження: квітень 2025 р.

Протокол засідання кафедри № 13 від 10 квітня 2025 р.

7. Форма впровадження: результати дослідження впроваджено у наукову роботу кафедри.

8. Соціально-економічний ефект: підвищення рівня підготовки наукових кадрів.

Завідувач кафедри оперативної хірургії з топографічною анатомією
Львівського національного медичного
університету імені Данила Галицького
д.мед.н., професор



Зоряна МАСНА



ЗАТВЕРДЖУЮ

Перший проректор

з науково-педагогічної роботи

Львівського національного медичного

університету імені Данила Галицького

проф. Ірина СОЛОНИНКО

04 лютого 2025 року

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Назва роботи: “Зміни гістоархітекτονіки і біохімічних параметрів міокарду та селезінки щурів при впливі отрути гадюк виду *Vipera berus*”.

1. Автор: Бобр Анна Миколаївна, аспірант кафедри анатомії людини Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова.

2. Пропозиція до впровадження: Морфометричне дослідження серця вперше виявило суттєве збільшення ширини кардіоміоцитів у групі тварин, які зазнали впливу отрути *Vipera berus berus*, порівняно з контрольною. На тлі дії отрути *Vipera berus nikolskii* виявляються ще більш значне збільшення ширини кардіоміоцитів. Також спостерігається значне збільшення середнього показника площі ендомізії. Вперше встановлено, що у селезінці тварин на фоні впливу отрути гадюк *Vipera berus*, при морфометричному підрахунку немає помітної різниці у співвідношенні білої та червоної пульпи селезінки при порівнянні експериментальних груп з контролем, проте була помітна тенденція до збільшення частки білої пульпи при впливі отрути *Vipera berus berus*. Навпаки, отрута *Vipera berus nikolskii* спричинила значне руйнування як білої, так і червоної пульпи, що призвело до збільшення обох частин паренхіми органу з мінімальним впливом на їх співвідношення. При оцінці кількості тканинних макрофагів з включеннями ліпофусцину встановлено статистично значуще зростання цього показника не тільки в обох експериментальних групах порівняно з контрольною групою, але також між двома групами.

3. Актуальність дослідження: Кардіотоксичність і зміни на ЕКГ - часті ускладнення після укусів змій. Укуси *Viperidae* можуть призводити до інфаркту міокарда та інсульту через активацію коагуляції та пряму кардіотоксичність протеолітичних ферментів. Отрута також викликає гіпофібриногенемію, ураження ендотелію та порушення агрегації тромбоцитів. Імунна система реагує на отруту, запускаючи запальний процес. Незважаючи на дослідження, механізми пошкодження серця та селезінки, а також вплив токсинів гадюк *V. berus berus* та *V. berus nikolskii* на серцево-судинну та імунну систему, вивчені недостатньо. Дослідження даного питання є актуальним для ранньої діагностики, профілактики ускладнень та вдосконалення лікування.

4. Джерела інформації: Bobr, A. M. (2024). Analytical and quantitative assessment of the state of the spleen and immune processes in rats under administering *Vipera berus* venom. *Morphologia*, 18(3), 20-25. <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.3.20-25>;

Bobr, A. M. (2024). Analytical and quantitative assessment of the condition of the heart wall of rats exposed to the venom of the vipers *Vipera berus berus* and *Vipera berus nikolskii*. *Morphologia*, 18(4), 15-21. <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.15-21>

5. Установа-розробник: Національний медичний університет імені О. О. Богомольця МОЗ України

6. Базова установа, яка проводить впровадження: Кафедра гістології, цитології та ембріології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького

7. Форма впровадження: результати дослідження впроваджено у навчальний процес та лекційний курс.

8. Термін впровадження: січень-лютий 2025 навчального року.

9. Зауваження та пропозиції: немає.

10. Протокол засідання кафедри: № 1 від 30 січня 2025 р.

11. Соціально-економічний ефект: покращення підготовки молодих спеціалістів.

Відповідальний за впровадження:
завідувач кафедри гістології,
цитології та ембріології
Львівського національного
медичного університету
імені Данила Галицького,
канд. мед. наук, доцент



Ілона ЧЕЛПАНОВА