

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

БІОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ

**Кафедра фізіології, імунології і біохімії з курсом цивільного захисту та
медицини**

**Кваліфікаційна робота
магістра**

**на тему: МІТОТИЧНА АКТИВНІСТЬ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ ЩУРІВ
НА ПОЧАТКУ СТАТЕВОГО ДОЗРІВАННЯ ПІСЛЯ ГІРУДОЛОГІЧНОГО
ВПЛИВУ**

Виконала: студентка 2 курсу, групи 8.0911-б

спеціальності 091 Біологія

освітньої програми Біологія

Свириденко А. П.

Керівник доцент, к.б.н. Литвиненко Р. О.

Рецензент завідувач кафедри, проф., д.б.н. Куш О. Г.

Запоріжжя – 2022

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет біологічний

Кафедра фізіології, імунології і біохімії з курсом цивільного захисту та медицини

Рівень вищої освіти магістр

Спеціальність 091 Біологія

Освітня програма Біологія

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

О.Г. Куш

“ ___ ” _____ 20__ року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТЦІ

Свириденко Аліні Петрівні

1 Тема роботи: Мітотична активність клітин кісткового мозку щурів на початку статевого дозрівання після гірудологічного впливу

керівник роботи Литвиненко Раїса Олександрівна, к.б.н.

затверджені наказом ЗНУ від « 12 » липня 2022 року № 834-с

Строк подання студентом роботи грудень 2022 року

3 Вихідні дані до роботи: Курсова робота на тему: «Зрушення в імунній системі під впливом грудотерапії. Вплив ендоксану на імуну систему щурів концентрації 150 мг/кг»

4 Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити): 1. Проаналізувати показники загальної кількості еритроцитів та лейкоцитів у нелінійних лабораторних щурів на початку їх статевого дозрівання після гірудовпливу. 2. Дослідити лейкоцитарну формулу крові у нелінійних лабораторних щурів на початку їх статевого дозрівання після гірудовпливу. 3. Визначити мітотичний індекс кісткового мозку у нелінійних лабораторних щурів на початку статевого дозрівання після гірудовпливу.

5 Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень): 3.1-3.3 (загальна кількість еритроцитів та лейкоцитів, лейкоцитарна формула, мітотичний індекс кісткового мозку щурів на початку статевого дозрівання), рис. 2.1-2.2 (проліферативна активність кісткового мозку щурів на 35 добу контроль та дослід).

6 Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
1-3	Амінов Р.Ф., старший викладач, к.б.н.		
4	Гороховський Є. Ю., доцент, к.б.н.		

7 Дата видачі завдання _____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Підбір літературних джерел за темою кваліфікаційної роботи	Жовтень – листопад 2021	Виконано
2.	Оформлення розділу «Огляд наукової літератури». Підбір методів дослідження	Листопад – грудень 2021	Виконано
3.	Оформлення розділу «Матеріали та методи дослідження»	Січень – лютий 2022	Виконано
4.	Формування розділу «Охорона праці»	Березень – квітень 2022	Виконано
5.	Поповнення та формування бази даних експериментального дослідження	Травень 2022	Виконано
6.	Статистичний аналіз та інтерпретація експериментальних даних	Вересень – жовтень 2022	Виконано
7.	Формування розділу «Експериментальна частина»	Листопад 2022	Виконано
8.	Оформлення та попередній захист кваліфікаційної роботи	Листопад 2022	Виконано

Студент

(підпис)

А. П. Свириденко

(прізвище та ініціали)

Керівник роботи

(підпис)

Р. О. Литвиненко

(прізвище та ініціали)

Нормоконтроль пройдено

Нормоконтролер

(підпис)

Є. Ю. Гороховський

(прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Дана робота викладена на 49 сторінках друкованого тексту, містить 5 таблиць, 2 рисунки. Список літератури включає 44 джерел, в тому числі 22 із них латиницею та 9 за останні 5 років.

Об'єкт дослідження – кістковий мозок та периферична кров нелінійних лабораторних щурів на початку статевого дозрівання після гірудологічного впливу.

Мета роботи – визначення гематологічних показників та мітотичного індексу кісткового мозку лабораторних щурів на початку статевого дозрівання на фоні гірудологічного впливу.

Методи дослідження: гематологічні (кількість еритроцитів) імунологічні (кількість лейкоцитів, лейкоцитарна формула крові, мітотичний індекс кісткового мозку), статистичні.

У результаті дослідження встановлено, що гірудологічний корегує на показники крові, мітотичний індекс. При статистичній обробці даних було виявлено, що гірудологічний вплив відзначився на збільшені числа еритроцитів та лейкоцитів, але значення відповідали референтним. А також збільшився мітотичний індекс без морфологічних змін клітин і також знаходився в референтних межах. Лейкоцитарна формула не зазнала значних змін.

Новизна роботи: доповнено дані щодо впливу біологічно активних речовин медичної п'явки на мітотичну активність клітин кісткового мозку лабораторних щурів на початку статевого дозрівання.

Практичне значення: отримані результати можуть бути використані при плануванні проведення курсів гірудовпливу в ветеринарії.

МЕДИЧНА П'ЯВКА, ГІРУДОВПЛИВ, ЛАБОРАТОРНІ ЩУРИ, БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ РЕЧОВИНИ, МІТОТИЧНИЙ ІНДЕКС

ABSTRACT

This work is laid out on 49 pages of printed text, contains 5 tables, 2 figures. The list of literature includes 44 resources, including 22 of them in Latin and 9 in the last 5 years.

The object of the study is the bone marrow and peripheral blood of nonlinear laboratory rats at the beginning of puberty after hirudological influence.

The purpose of the work is to determine the hematological indicators and the mitotic index of the bone marrow of laboratory rats at the beginning of puberty against the background of hirudological influence.

Research methods: hematological (number of erythrocytes), immunological (number of leukocytes, leukocyte blood formula, bone marrow mitotic index), statistical.

As a result of the study, it was established that the hirudological influence corrects blood parameters, the mitotic index. During the statistical processing of the data, it was found that the hirudological influence was marked by increased numbers of erythrocytes and leukocytes, but the values corresponded to the reference values. And the mitotic index also increased without morphological changes of the cells and was also within the reference limits. The leukocyte formula did not undergo significant changes.

The novelty of the work: the data on the effect of biologically active substances of medical leech on the mitotic activity of bone marrow cells of laboratory rats at the beginning of puberty have been supplemented.

Practical significance: the obtained results can be used in the planning of hirudological influence courses in veterinary medicine.

MEDICAL LEECH, HIRUDOINFLUENCE, LABORATORY RATS, BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES, MITOTIC INDEX

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	8
ВСТУП.....	9
1.1 Історія розвитку гірудотерапії	11
1.2 Загальна характеристика медичної п'явки.....	13
1.2.1 Терапевтичні ефекти біологічно активних речовин медичної п'явки	15
1.2.2 Застосування гірудотерапії в клінічній практиці та ветеринарії.....	17
1.2.3 Розведення медичної п'явки та транспортування.....	20
1.3 Ускладнення після гірудотерапії	21
1.4 Використання механічної п'явки.....	22
1.5 Антибактеріальні властивості медичної п'явки.....	22
2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	25
2.1 Матеріали та об'єкти дослідження	25
2.2 Методи дослідження	26
2.2.1 Моделювання гірудологічного впливу.....	26
2.2.2 Підрахунок еритроцитів в камері Горяєва	26
2.2.3 Визначення загальної кількості лейкоцитів	27
2.2.4 Визначення лейкоцитарної формули крові	28
2.2.5 Визначення мітотичного індексу кісткового мозку.....	29
2.3 Статистичні методи дослідження	30
3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	32
3.1 Загальна кількість еритроцитів та лейкоцитів крові у лабораторних щурів на початку статевого дозрівання після гірудовпливу.....	32
3.2 Оцінка лейкоцитарної формули крові у нелінійних лабораторних щурів на початку статевого дозрівання після гірудовпливу	33
3.3 Мітотичний індекс кісткового мозку у нелінійних лабораторних щурів на початку статевого дозрівання після гірудологічного впливу	35

4 ОХОРОНА ПРАЦІ	38
ВИСНОВКИ	42
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	43
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ	44

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ
І ТЕРМІНІВ

ГТ – гірудотерапія

БАР – біологічно активні речовини

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

МПА – м'ясо пептидний агар

Me – медіана

Q1 – перший кuartиль

Q3 – третій кuartиль

ВСТУП

Основним органом кровотворення у дорослої людини є кістковий мозок, головним компонентом якого є стовбурові клітини, які дають початок усім клітинам крові. Визначення якісних і кількісних характеристик периферичної крові й кісткового мозку дає змогу виявити наявність патології або нормального фізіологічного стану. На основі дослідження мітотичного індексу можна оцінити стан проліферативної активності клітин кісткового мозку. Зростання частоти різних онкологічних захворювань кровотворної системи серед населення, особливо дитячого, сприяло підвищенню інтересу до пошуку різних методів та способів, які б здатні були відновлювати фізіологічний стан кісткового мозку та сприяти відновленню загального стану організму [1]. Зважаючи на широкий спектр терапевтичних ефектів гірудотерапії, перспективним є дослідження дії біологічно активних речовин (БАР) секрету слинних залоз медичної п'явки (МП) на показники імунної системи [2, 3].

Мета роботи: визначення гематологічних показників та мітотичного індексу кісткового мозку лабораторних щурів на початку статевого дозрівання на фоні гірудологічного впливу.

Відповідно до мети дослідження було сформульовано наступні завдання:

1) визначити загальну кількість еритроцитів та лейкоцитів крові у нелінійних лабораторних щурів на початку статевого дозрівання після гірудовпливу;

2) дослідити лейкоцитарну формулу крові у нелінійних лабораторних щурів на початку статевого дозрівання після гірудовпливу;

3) визначити мітотичний індекс кісткового мозку у нелінійних лабораторних щурів на початку статевого дозрівання після гірудовпливу.

Об'єкт дослідження – кістковий мозок та периферична кров нелінійних лабораторних щурів на початку статевого дозрівання після гірудологічного впливу.

Предмет дослідження – мітотична активність, еритроцитарні та лейкоцитарні показники крові нелінійних лабораторних щурів на початку статевого дозрівання після гірудологічного впливу.

Методи дослідження: гематологічні (кількість еритроцитів) імунологічні (кількість лейкоцитів, лейкоцитарна формула крові, мітотичний індекс кісткового мозку), статистичні.

Новизна роботи: доповнено дані щодо впливу біологічно активних речовин медичної п'явки на мітотичну активність клітин кісткового мозку лабораторних щурів на початку статевого дозрівання.

Теоретичне значення: у результаті дослідження було встановлено, що БАР має стимулюючий вплив на показники крові (кількість еритроцитів та лейкоцитів) та мітотичний індекс кісткового мозку.

Практичне значення: отримані результати можуть бути використані при плануванні проведення курсів гірудовпливу в ветеринарії.

Апробацію результатів дослідження було проведено на X регіональній науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Актуальні проблеми та перспективи розвитку природничих, медичних та фармацевтичних наук» (Запоріжжя, 2022) та на міжнародній науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біологічні, медичні та науково-педагогічні аспекти здоров'я людини» (Полтава, 2022) з публікацією тез.

1 ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Історія розвитку гірудотерапії

Терапія п'явками є однією з найстаріших незначних інвазійних процедур у медицині, яка вже згадувалася в Єгипті 1500 р. до н.е. В санскритських творах описана терапія п'явкою з 1300 р. до н.е. Гіппократ запровадив терапію п'явками у Греції, але цей метод також був відомий ще древнім месопотамцям, єгиптянам і ацтекам, а також майям. Медична терапія п'явкою є частиною концепції медико-санітарної системи греко-арабських уніанів. Процедура першого ренесансу спостерігалася в XVIII і на початку XIX століття, коли вона знову стала дуже популярною. Це призвело до викорінення природних п'явок в Ірландії, де експорт п'явки був важливою торгівлею [4].

У 2004 році Управління з санітарного нагляду харчових продуктів та медикаментів схвалило МП як медичні прилади в пластичній та реконструктивній хірургії [5].

Лікування п'явками зародилось в глибоку давнину. Вірогідно, що доісторичні люди випадково помітили позитивний ефект, який слідує за укусом п'явки. Згадки про користь п'явок зустрічаються в персидських, давньоєврейських та давньо-індійських текстах. Оскільки протягом тисячоліть найбільш популярним засобом лікування багатьох захворювань був метод кровопускання, то гірудотерапія (ГТ) з початку сформувалася як один із напрямків цієї медичної методики [6].

Давньоримський вчений Пліній Старший (I століття до н.е.) перший з античних авторів звернув увагу на позитивні зміни в організмі людини, які виникають під впливом МП. Після Плінія можливості використання МП вивчали Клавдій Гален (131 – 200 рр.), Аеций (335 – 454 рр.), Ібн Сина (Авіценна). Спочатку кровопускання вважалось діючим методом лікування,

але коли медична практика, особливо в лікарнях, перейшла в руки монах, цей вид лікування був заборонений [7].

В епоху Відродження медики повернулися до прийомів ГТ. Розквіт цього методу лікування приходить на кінець XVIII – початок XIX сторіччя, коли більшість вважала, що кровопускання може врятувати від неминучої смерті.

В першій половині XIX сторіччя виникає п'якководення. Це було пов'язано з майже повним зникненням п'явок в природних водоймах як наслідок перепромислу [8].

Ловля п'явок проводилася спеціалістами, які багато років присвятили цьому заняттю. Однак, незважаючи на професіоналізм ловців, з екологічної точки зору методи п'якководення залишалися нераціональними.

Нераціональна експлуатація даного ресурсу призвела до масового вимирання МП у природному середовищі, тому з метою збереження виду та для того, щоб задовольнити зростаючий попит на них, деякі підприємці відкрили фабрики з розведення п'явок.

В ході медико-біологічних експериментів лікарям вдалося виявити, що людська кров в шлунку МП протягом тривалого часу не згортається. Більше того, сама рана від укусу п'явки, змочена її слиною, кровоточить близько 6 годин, а іноді і до доби. Це навело на думку про надзвичайні властивості п'явочної слини. Вперше про наявність в слині речовин, які протидіють згортанню крові, заявив професор К. Дьяконов в 1868 р. В цьому ж році дослідник Дж. Хайкрафт отримав з тіла п'явки, а саме, з її головного кінця активний екстракт, з якого був виділений чистий антикоагулянт – гірудин.

Великий вклад у розвиток ГТ внесли також і українські вчені. Співробітник Українського науково-дослідного інституту охорони материнства та дитинства В. В. Орлов у 1950 році провів вивчення позитивних результатів використання п'явок в акушерстві та гінекології.

У другій половині минулого століття в справі вивчення п'явок було досягнуто немало, хоча після 1950-х років науковий інтерес до ГТ поступово

згасав. Ця сумна подія мала свої об'єктивні причини. В той час медицина більше покладалася на хімічно синтезовані препарати, ніж на природні засоби. В той же час довгострокове приймання антибіотиків та хіміотерапевтичних засобів викликає у багатьох серйозні порушення зі сторони різних органів та систем, зсуви в імунологічному статусі, ріст алергійних захворювань. Шкода тільки, що масштабне впровадження ГТ у широку медичну практику йде повільно, так як потребує індивідуального підходу до хворого.

Завдяки науковим досягненням останнього часу вчені дали чітке наукове обґрунтування метода, виділили з слини МП цілий комплекс БАР, які спричиняють лікувальний ефект та корисні для організму людини. Ці речовини, потрапляючи до організму людини, спричиняють не тільки знеболюючу, протизапальну та протинабрякову дії, але й знижують вірогідність утворення тромбів, активують мікроциркуляторну динаміку крові та лімфи. В самий останній час стало доведеним фактом, що ГТ, проведена належним чином, стабілізує та укріплює імунну систему людини в цілому [1].

1.2 Загальна характеристика медичної п'явки

П'явки — це гермафродитні, кровососні черв'яки. Лікарські п'явки належать до порядку *Arhynchobdellida*, сімейства *Hirudinidae*. Лише 15 з більш ніж 600 відомих видів класифікуються як МП [9].

H. medicinalis має від 33 до 34 сегментів тіла, коричневий або чорний колір, і має шість довгих червоних смуг на спині. Циліндричне тіло злегка сплюснуте і може витягуватися до 20 см. Незважаючи на те, що вони мають 5 пар очей, вони використовують нюхову систему, щоб знайти своїх господарів. Дорослі тварини мають дві присоски на кінцях свого тіла, великі

задні присоски і менші дископодібні розташовані на голові, що містять гирлі з щелепами, де знаходяться більше 100 відомих речовин.

Серед БАР розрізняють наступні.

Гірудин є найпотужнішим природним інгібітором тромбіну. Він діє в синергії з двома інгібіторами антистазином, які також виявляються в слині цього хробака [5].

Гіалуронідаза підтримує поширення активних сполук слини в тканини.

Дестабілаза розчиняє фібрин [10].

Бделіни, егліни та гірустазин є протизапальними речовинами з інгібіторною активністю протеази [11].

У слині є ряд нейротрансмітерів, таких як дофамін або серотонін, які зменшують сприйняття болю у господаря.

Ацетилхолін працює як судинорозширювальний апарат.

Таблиця 1.1 - Основні ферменти слини слизу та їх функції [1]

№	Ферменти / речовини	Функція
1.	Гірудин	Найбільш відомий фермент, потужний антикоагулянт
2.	Бделін, елгін	Інгібітор протеази, має протизапальний ефект.
3.	Апіраза	Потужний тромбоцитарний антиагрегаційний фактор, що робить кровообіг більш текучим
4.	Дестабіліаза	Фермент має дуже потужну антиагрегаційну активність тромбоцитів, яка діє шляхом розчинення тромбів, що відкриває дуже цікаві терапевтичні шляхи
5.	Ліпаза і естераза	Використовується при гіперліпідемії

Продовження таблиці 1.1

6.	Антиеластаза	Ця речовина діє шляхом обмеження дії еластази, яка погіршує шкірний еластин
----	--------------	---

1.2.1 Терапевтичні ефекти біологічно активних речовин медичної п'явки

Основні механізми ефективності гірудотерапії:

– рефлекторний – п'явки прокушують шкіру в біологічно активних точках, які «відповідають» за стан певного органу; п'явки виконують роль акупунктурних голок;

– механічний – розвантажується регіональний кровообіг, як наслідок активується кровотік в області ураженого органу;

– біологічний – найцінніший, тому що секрет залоз п'явок містить більше 100 БАР природного походження, які потрапляючи в організм, сприяють оновленню крові (кажуть п'явки «чистять кров»). А ще їх називають маленькими «фабриками» з виробництва БАР. Іншими словами, ефект МП комплексний: посилюється кровопостачання тіла, усувається венозний застій, в організм потрапляють знеболюючі, протизапальні, імуностимулюючі та інші речовини як наслідок покращується циркуляція крові, руйнуються тромби (профілактика інсульту та інфаркту), зникають набряки.

БАР, які продукуються МП, забезпечують:

– протитромботичну дію за рахунок блокування тромбоцитарно-судинних та плазменних ланок внутрішнього механізму згортання крові, а також плазмені ланки гемостатичного процесу на більше пізніх стадіях його розвитку й таким чином перешкоджають тромбоутворенню [12];

– тромболітичну дію, при цьому БАР впливають тільки на сформовані («старі») фібринові згустки, у яких полімери фібрину прошиті ізопептидними зв'язками. Існує гіпотеза, що дестабілізний комплекс адсорбується і на новостворених («молодих») тромбах, стимулюючи їх міцне закріплення на судинній стінці й швидкій стабілізації і лише згодом починається «плавне» розчинення сформованого тромбу [13];

– гіпотензивну дію. Вірніше, «нормотензивна» дія, обумовлена в першу чергу низькомолекулярними речовинами простагландинової природи. Механізм дії в теперішній час вивчається, однак можна припустити, що зменшення тиску обумовлене стабільним аналогом простагландіну, а збільшення – речовинами, що володіють кіниназною активністю (природа цих речовин в теперішній час не ідентифікована).

– антиатерогенну дію. БАР активно втручаються в процеси обміну ліпідів, приводячи його до нормальних умов функціонування; знижують рівень холестерину й тригліцеридів у крові, забезпечують регрес атероматозних бляшок.

– антигіпоксичну дію. Підвищення відсотку виживання в умовах зниженого вмісту кисню (гіпоксія), що є немало важливим чинником для виношування плоду при вагітності, ускладненої рядом патологічних процесів.

– імуностимулюючу дію. Активація захисних функцій організму забезпечується впливом на рівні системи комплементу. Відмічено також і підвищення фагоцитарної активності крові після сеансу ГТ, що забезпечує протизапальну дію п'явок поряд з інгібіторним (стосовно до еластази, катепсину G та іншим нейтральним протеазам гранулоцитів) потенціалом.

– анальгезивну дію, тобто знеболювання як у місці постановки п'явок, так і результату загальноорганного впливу.

– захисну дію. П'явки нейтралізують агресивну дію мутагенів (радіоактивні опромінювання, активні сонячні промені та ін.), стимулюючи ефект суперметилування ДНК [1].

1.2.2 Застосування гірудотерапії в клінічній практиці та ветеринарії

Дослідження на тваринах показали, що терапія п'явками замінює застійну венозну кров свіжою артеріальною кров'ю, що покращує виживання тканин. Спочатку п'явки можуть знадобитися частіше, ніж раз на день. Лікування продовжують через пару днів до повного відновлення клаптя і подолання венозного застою [14]. Однак рівень успішності не є 100%, особливо у пацієнтів з більш низьким рівнем гемоглобіну та необхідністю переливання еритроцитів. П'явки не прикріпляються до мертвих клаптів. Показник успішності — повне і часткове — 81,9%. МП також успішно використовувалися для компенсації венозної гіперемії в репелентах пальців, ніг або носа. Лікувальна терапія підвищує перфузію, що призводить до гіперемії в динамічних і кров'яних фазах сцинтиграфії кісткової тканини Tc^{99m}. Гірудин в слині МП підвищує рівень РНК для судинного ендотеліального фактора росту (VEGF) і експресії VEGF в судинах клаптя.

Секрет, який виділяється МП в кровотік пацієнта, має спазмолітичний ефект, зміцнює судини, сприяє підтриманню фізіологічних параметрів роботи серця, зниженню згущення крові та поліпшенню мікроциркуляції. ГТ чинить комплексну оздоровчу дію на систему кровообігу, забезпечує гарний результат при лікуванні артеріальної гіпертензії, ішемічної хвороби серця, порушень мозкового кровообігу, варикозного розширення вен, тромбофлебиту та геморою і є визнаним методом відновлення після інфаркту та інсульту [15]. Метод використовують при деяких захворюваннях у гінекології, урології, стоматології (гінгівіт і парадонтоз), в комплексному лікуванні бронхіальної астми і цукрового діабету. Крім того, секрет слинних залоз МП справляє протизапальну, тромболітичну, імуностимулюючу, протитромбічну, антисклеротичну, а також сприяє посиленню лімфоток у тканинах, активації фагоцитозу і поліпшенню обмінних процесів. Також МП має енергетичний ефект. Розміщення МП на шкірі у скроневій ділянці мозку

сприяє зниженню внутрішньоочного тиску, тому широко застосовується при глаукомі. ГТ добре проявила себе при ураженнях периферичної нервової системи та деяких неврологічних захворюваннях. Укус МП нагадує укуси комара або щіпок кропиви. Дана процедура дає гарні результати як сама по собі так і в комплексі з іншими методами лікування, наприклад: гомеопатія, фітотерапія, фізіотерапія.

У медицині МП нещодавно були відкриті і використовуються щелепно-лицьовими та іншими мікрохірургами, щоб допомогти уникнути скомпрометованої венозної тканини, включаючи вільні і відшліфовані закрилки, вуха і носові кінчики. Докази свідчать про те, що виживання скомпрометованого, венозно-перевантаженого клаптя поліпшується завдяки ранньому застосуванню п'явки. Вони забезпечують ефективний засіб зниження згортання крові, зняття венозного тиску від об'єднання крові (венозна недостатність) та реконструктивної хірургії з метою стимулювання кровообігу в операціях прикріплення органів з критичним кровотоком. Терапія п'явки корисна у випадках аварійних травм обличчя при наявності артеріального кровопостачання, але за відсутності венозного відтоку. Ефект збереження м'яких тканин забезпечує адекватні результати [16].

Досліджується ефективність застосування МП при онкопатології. Виділення слинних залоз мексиканської п'явки, *Haementeria officinalis* має антиметастатичну активність. У слині міститься білок, який називається антистазин, що запобігає колонізації раку легенів. Існують інгібітори агрегації тромбоцитів, антикоагулянти і антипротеолітичні ферменти в секретах. Слина іншої тропічної п'явки, *H. manillensis*, виявила антипроліферативну активність *in vitro* проти дрібноклітинного раку легенів (SW1271) [17].

Вивчається ефективність застосування МП при діабеті. Одним з периферичних судинних ускладнень діабету є гангрена [18]. Вид дикої п'явки *Whitmania pigra* був використаний традиційними китайськими терапевтами для збільшення припливу крові до дистальних відділів тіла і для

полегшення порушень коагуляції внаслідок антикоагулянтної активності водних і алкогольних екстрактів організму цього виду.

Терапія МП також застосовується в стоматології. Ще в 1817 році Томас Белл лікував випадок ороантрального свищу з набряком обличчя з шістьма п'явками, "нанесеними на обличчя". Спенсер Бейт в 1854 р. Лікував грубо каріозні верхньощелепні центральні різці за допомогою п'явки, прикріпленої до ясен [19]. П'явки використовувалися при лікуванні багатьох педіатричних станів, при лікуванні означених симптомів, зумовлених прорізуванням зубів [2]. У літературі існують повідомлення про переваги застосування п'явок у зубних відхиленнях. Кровопускання п'явками використовувалося як доповнення в лікуванні важких післяопераційних макрогосій, крім загального методу лікування. Повідомлялося про випадки застосування п'явки при лікуванні сублінгвальної гематоми та масової лінгвальної гематоми, при захворюваннях ясен, як засіб від абсцесу та запалення. П'явки зменшують запалення на місці абсцесу. Антикоагулянти збільшують приплив крові в яснах, усуваючи токсини, збільшуючи харчування на ураженій ділянці. Антибактеріальні компоненти в слині п'явки зменшують ріст бактерій. ГТ застосовується також для лікування корневих каналів [20].

Абсолютним протипоказанням до ГТ є гемофілія [1]. Відносними є різко виражені астенія, анемія, гіпотонія, алергічні реакції, вторинні імунodefіцити, кахексія й деякі інші. Особливу обережність треба дотримувати при лікуванні вагітних жінок, тому що вагітність ставиться до числа відносних протипоказань для ГТ [21].

У слині МП виявлено понад 100 біологічно активних речовин, які викликають широкий спектр профілактично-лікувальних ефектів [3]. ГТ ефективно застосовується у ветеринарії при різних захворюваннях котів, собак, коней, наприклад, для лікування маститів і підвищення репродуктивної здатності у корів, при лікуванні судинних захворювань коней та інших сільськогосподарських та домашніх тварин.

Дослідниками вже встановлено позитивний вплив БАР МП *Hirudo verbana* на мітотичну активність кісткового мозку статевозрілих лабораторних щурів та гематологічні показники крові: загальну кількість лейкоцитів, еритроцитів, гемоглобін, кольоровий показник та лейкоцитарну формулу крові самок нелінійних щурів після вигодовування приплоду, яким за два тижні до спарування та два тижні після приставляли по одній МП кожного тижня (масою 400 мг) [1].

В результаті досліджень виявлено імуномодельючу дію слини МП, відмічено тенденцію до збільшення мітотичної активності клітин кісткового мозку у самок щурів. Кольоровий показник і лейкоцитарна формула крові залишились у межах норми. Отримані результати можуть свідчити про імуномодулюючий вплив БАР слини *H. verbana* на організм щурів [1].

1.2.3 Розведення медичної п'явки та транспортування

Хоча терапія МП може використовуватися в дуже широкому діапазоні, вона має певні ризики. Найбільш серйозною складовою є інфекція. *Aeromonas hydrophila* і деякі інші бактерії, що знаходяться в кишковому тракту п'явки. Крім того, п'явки можуть бути переносниками хвороби крові, таких як гепатит і ВІЛ, якщо вони взяті від несанкціонованого постачальника. Тому важливим є розведення гігієнічних лікарських п'явок для медичних застосувань. Крім того, селекція п'явки є важливою, щоб уникнути зменшення популяції лікарської п'явки. Існує 3 загальноприйнятих методики вирощування п'явок: розведення в лабораторних умовах, інтенсивне розведення в штучних водоймах і напів інтенсивне розведення в природних ставках. МП — це гермафродити, і прісноводні черв'яки [9]. Вони живляться тільки кров'ю. Оскільки вони є амфібічними, вони потребують міцних місць для осадження коконів. Зростання та розвиток п'явок залежать

від параметрів навколишнього середовища та режиму харчування. Кров ссавців дуже важлива для росту п'явки.

Метод напівінтенсивного розмноження є найдешевшим методом, достатньо контролювати природний ставок і годування, але він відкритий для ризиків забруднення через відкрите середовище. Метод інтенсивного розведення вимагає повністю контрольованих ставків і вся їжа перебуває під контролем. Цей метод зводить до мінімуму ризик контамінації, але не як лабораторних.

Лабораторне розведення зазвичай обирають країни холодної погоди через п'явок, які знаходяться в теплому середовищі існування. Якщо ця система діє чітко і належним чином, то це найкращий спосіб вирощувати гігієнічних п'явок для використання людиною [1].

1.3 Ускладнення після гірудотерапії

П'явок не слід насильно видаляти, тому що щелепи можуть залишатися в рані, викликаючи інфекцію, бешиху, підслизові абсцеси, екхімоз і рубці. *Mycobacterium marinum* паразитарні бактерії, присутні в кишечнику п'явки, також можуть призвести до інфекції [22].

Ускладненням при ГТ може бути кровотеча. Втрата крові є одним з найпоширеніших ускладнень, тяжкість яких залежить від укушеної області. Є повідомлення про кровотечі з піхви, прямої кишки, сечового міхура і глотки. Анемія і смерть від тривалої кровотечі також була відома [23].

Алергічні реакції, такі як свербіж і висип, є загальними ознаками, а також повідомляється про анафілаксію при ГТ [24].

Таким чином, гемофілікам і імунокомпрометованим пацієнтам, тим, хто приймає медикаментозну терапію або вітаміни, що підвищує ризик надмірної кровотечі, слід бути обережним.

Мертві МП є потенційними джерелами інфекції і повинні розглядатися як небезпечні відходи, тому їх вивільнення є потенційним порушенням законодавства про захист ліків та навколишнього середовища [3].

1.4 Використання механічної п'явки

Дослідники на чолі з хірургом Грегорі Хартігом з університету Вісконсіна в Медісоні в США розробляють механічну п'явку, яка має виразні переваги перед аналогом тіла і крові. Був розроблений пристрій, який може доставляти і диспергувати гепарин краще до скомпрометованої тканини. Пористий кінчик пристрою імплантується під шкіру і обертається для подальшого пригнічення коагуляції. Психологічно пацієнти відчують себе більш комфортно при використанні машини, ніж живих істот [25].

1.5 Антибактеріальні властивості медичної п'явки

Впровадження ГТ в лікувально-профілактичну практику стримує упередження про можливості первинного бактеріологічного інфікування. При аналізі 750 випадків постановки МП виду *Hirudo verbana* виділені фізіологічні ознаки її трофічної поведінки, виключаючи первинне бактеріальне зараження: вакуумне обмеження ділянки шкіри донора передньою присоскою з абсорбційним способом харчування тканинними рідинами (кров, лімфа, тканинна рідина); тривала кровотеча з ранки; закупорення ранки щільним гемостатичним тромбом; протизапальну дію БАР МП; заживання укусів первинним натягом без рубцьованої тканини [26].

Вивчено органотропність до шлунково-кишковому тракту МП бактерії ендосімбіонта *Aeromonas hydrophila*. Інокуляти брали з кишкового епітелію і просвітної крові у 10 голодних МП, а також 10 ситих МП відразу після сеансу ГТ. Інокуляти висівали на скошений м'ясо-пептонний агар (МПА), цукорний м'ясопептонний бульйон (МПБ). Позитивне бактеріальне зростання зафіксоване у всіх зразках інокуляти, крім зразків з просвітної крові ситих МП. Виділена з кожного зразка чиста баккультура за своїми фенотипічними ознаками відповідала *A. hydrophila*. Отримані результати вказують на специфічну цитофільність *A. hydrophila* до епітелію кишечника МП, що виключає її потрапляння в ранку при акті харчування.

Досліджено бактеріостатичні властивості БАР культуральної рідини при біотехнології МП і бактеріального фільтрата 8-годинної культури *A. hydrophila* в концентрації 1, 5, 10, 15%. У досвід взяті пігментоутворюючі сапрофітні штами бактерій *Serratia marcescens*, *Azotobacter chroococcum* і умовнопатогенні і патогенні штами *Staphylococcus aureus* (АТСС 25923 F-49), *Salmonella typhi murium* (б/в а), лактозопозитивний штам *Escherichia coli* 3912/41 (0-55 До 59). Пригнічення інтенсивності росту культур бактерій на МПА було помітним при 5% концентрації досліджуваних рідин з максимальним ефектом при 10 і 15% концентраціях, при яких спостерігалися дрібні, поодинокі колонії. Інгібіція культуральних властивостей мікроорганізмів виявлялася зменшенням розмірів бактеріальних тіл (0,9-1,0 мкм, при 2,3 мкм в нормі для *E. coli*), втратою тинкторіальних особливостей (виділення Грам-позитивних форм). Зміна культуральних і морфологічних властивостей бактерій під впливом БАР, культуральної води і бактеріального фільтрата обумовлені порушенням метаболізму, яке втратою специфічних ознак проаналізованих штамів мікроорганізмів; інтенсивності пігментоутворення, ферментативної активності та антигенних властивостей бактеріальних стінок. Бактеріостатичний ефект БАР культуральної води проявилися сильніше, ніж у бактеріологічному фільтраті [26].

Під впливом БАР МП лактозопозитивний штам *E. coli* втрачав антигенні властивості в реакції слайд-аглютинації з діагностичною ешеріхіозною полівалентної ОКА сироваткою, а на середовищі Ендо була відсутня здатність розщеплювати лактозу. Змінювалися антигенні властивості штаму *S. typhi murium*. У штамі *S. aureus* знижувалася лецитиназна активність і його пігментоутворення. Сапрофітних штами *S. marcescens*, *A. chroococcum* знижували синтез пігментів під впливом БАР культуральної води і бактеріального фільтрата [26].

Таким чином, ГТ виключає первинне бактеріальне зараження, яке засноване на філогенетично адаптованому мутуалістичному симбіозі МП і господаря-прогодувальника. Отримані результати також відкривають перспективу отримання бактеріостатичних БАР з культуральною водою і бактеріального фільтрата для лікувально-профілактичної медицини та ветеринарії [6].

Отже з обробленої інформацією можна зробити висновок, що медична п'явка володіє великим спектром дії на різні показники, має велике значення в лікуванні різних захворюваннях ще з давнини. Тому актуально було використати отримані знання в своїй дипломній роботі.

2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Матеріали та об'єкти дослідження

Експериментальні досліді з тваринами проведені на базі навчально-науково-дослідної лабораторії клітинної та організменної біотехнології з дотриманням Закону України №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006 р.), Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Страсбург, 1986 р.).

Експериментальне дослідження включало визначення гірудологічного впливу на 12 білих нелінійних статевозрілих щурах. Дослідження виконували на тваринах, що не мали зовнішніх проявів захворювань і попередньо пройшли карантинний режим. Гірудологічний вплив на тварин здійснювали шляхом приставки МП віком 7 місяців, вирощених на базі навчально-науково-дослідної лабораторії клітинної та організменної біотехнології Запорізького національного університету (ТУ У 05.0-02125243002:2009 «П'явка медична», санітарно-епідеміологічний висновок МОЗ України № 05.03.02-06/49982, від 12.08.2009 р.), у яких останнє годування кров'ю великої рогатої худоби було 4 місяці тому.

В експерименті приймали участь 3 самки та 3 самця в дослідній та контрольній групі. Приставки МП тваринам дослідної групи робили 5 разів: 1 раз до злучки та 4 під час. Приставки робили лише самкам. Після проведеної процедури самців від самок відсаджували на добу. У кожній парі тварин було відібрано потомство на 30 добу статевого дозрівання. Дослід проводився з урахуванням загальної класифікації статевого дозрівання щурів. Приплід від самиць відсаджували в середньому на 30 добу.

Аналіз показників крові та кісткового мозку приплоду здійснювали на 35 добу, що відповідає початку статевого дозрівання.

Декапітацію проводили після фіксування щура у фіксаторі, проводили швидко за допомогою здвигу шийних хребців [4]. Тому це не призвело впливу на гематологічні показники. Отримані зразки крові аналізували негайно.

У приплоду досліджували загальну кількість еритроцитів, лейкоцитів, лейкоцитарну формулу крові та загальний мітотичний індекс кісткового мозку [1].

2.2 Методи дослідження

2.2.1 Моделювання гірудологічного впливу

Медичні п'явки ставилися на холку та куприкову зону самицям в період злучки згідно зі схемою: 1 раз до злучки та 4 під час. Попередньо щурів фіксували за допомогою фіксатора [27], хутро на місці постановки стригли. Після постановки ранки обробляли стерильною крейдою. П'явок тримали до повного насичення та відпадання приблизно 20-30 хвилин.

2.2.2 Підрахунок еритроцитів в камері Горяєва

Покласти скло камери Горяєва під об'єктив мікроскопа і розглянути сітку камери під великим і малим збільшенням. Накрити камеру покривним склом. Занурити кінчик мікропіпетки в 3% розчин натрію хлориду, який налитий в робочу пробірку. Таким чином кров буде розбавлена в 200 разів.

Обережно струшуючи, перемішати розчин крові в пробірці, краплю розчину помістити в камеру. Для цього кінчик мікропіпетки поставити біля покривного скла і легенько натиснути на грушу. Розчин зайде під покривне

скло в камеру і заповнить її. Почекаати 1-2 хв, щоб еритроцити осіли на дно камери. При малому збільшенні мікроскопа знайти сітку камери. Перевести мікроскоп на велике збільшення і почати підрахунок еритроцитів в 5 великих квадратах, які розділені на маленькі. Найкраще рахувати еритроцити в великих квадратах, які поміщаються по діагоналі поля зору. Під час підрахунку еритроцитів треба пам'ятати правило Єгорова: в маленьких квадратах рахувати ті клітини, які містяться як всередині квадрата сітки, так і на його верхній і лівій гранях. Це потрібно для того, щоб двічі не брати до уваги еритроцити, які знаходяться на сторонах суміжних квадратиків [28].

Кількість еритроцитів в 1 мкл крові розраховують за формулою (2.1):

$$X = a \times 4000 \times 200/80, \quad (2.1)$$

де X — кількість еритроцитів в 1 мкл; a — кількість еритроцитів в 80 маленьких квадратах;
 80 — кількість підрахованих маленьких квадратів ($5 \times 16 = 80$);
 200 — ступінь розведення крові;
 4000 — множник, який призводить результат обсягу в 1 мкл крові, оскільки обсяг маленького квадратика становить $1/4000 \text{ мм}^2$ (сторона $1/20$, а всередині $1/10 \text{ мм}^2$).

Референтні показники для лабораторних щурів $3,0 - 6,5 \times 10^{12}/\text{л}$ [28].

2.2.3 Визначення загальної кількості лейкоцитів

Підготувати камеру Горяєва для підрахунку лейкоцитів (так як і для підрахунку еритроцитів). В окрему пробірку налити 0,38 мл 5% розчину оцтової кислоти, забарвленої метиленовим синім. Оцтова кислота потрібна під час підрахунку лейкоцитів для того, щоб зумовити гемоліз еритроцитів, а

метиленовий синій — для контрастування ядер лейкоцитів, тобто, для зручності підрахунку.

Рахувати лейкоцити потрібно на маленькому збільшенні мікроскопа в 25 великих квадратах сітки, що не розділені на маленькі. Для більшої точності підрахунок слід проводити по площині всієї камери та керуватися правилом Єгорова.

Кількість лейкоцитів (a) в 25 великих квадратах (кожен з них на своїй площині вмістив би 16 маленьких — $25 \times 16 = 400$ квадратиків) підставити в формулу. У такому випадку кількість лейкоцитів в 1 мкл крові становитиме:

$$L = a \times 4000 \times 20/400 \quad (2.2)$$

Референтні показники для лабораторних щурів $3,0 - 7,0 \times 10^9/\text{л}$ [29].

2.2.4 Визначення лейкоцитарної формули крові

Лейкоцитарна формула — відсоткове співвідношення різних видів лейкоцитів в мазку крові.

Мазок фарбувався за допомогою метода Романовського – Гімзе. Після фіксації етиловим спиртом, мазок висушують та фарбують. Фарбують розчином Романовським – Гімзе (1 мл готової рідкої фарби Романовського— Гімза + 2 мл основного буферного розчину + 47 мл дистильованої води) протягом 40 хвилин. Тривалість фарбування підбирають емпірично. Використовують фосфатний буфер рН 6,4-6,5 [30]. Промивають дистильованою водою та досліджують під імерсією. Огляд мазка починали з малого збільшення, при якому оцінювали якість мазка, але аналіз його проводили під імерсією. Слід мати на увазі, що не зважаючи на достатньо правильне технічне виконання мазка, клітини крові розподіляються не

рівномірно по всьому препарату. Тому для отримання достовірних даних при підрахунку лейкоцитарної формули прийнято рахувати лейкоцити в різних ділянках мазка крові. Щоб уникнути повторного підрахунку одних і тих же лейкоцитів рекомендується рухатись по мазку крові зигзагами – лінією Меандра [31]. Прийнято рахувати 200 лейкоцитів, відступаючи 0,3-0,5 см від основи «вусиків», рухаючись зигзагами на всю ширину мазка через 2-3 поля зору. Необхідно прагнути набрати дану кількість клітин на 2/3 мазка, де клітини розподілені найбільш оптимально без накладень. Після закінчення перегляду 200 лейкоцитів, визначали процентний вміст кожного з видів лейкоцитів. Це і є відносна лейкоцитарна формула крові [32].

Референтні значення для лабораторних щурів на початку статевого дозрівання становлять в середньому: паличкоядерні нейтрофіли 1-4%, сегментоядерні нейтрофіли 6-17%, лімфоцити 75-94%, моноцити 0-3%, еозинофіли 0-3% [1].

2.2.5 Визначення мітотичного індексу кісткового мозку

Мітотичний індекс кісткового мозку тварин оцінювали згідно модифікації Амінова Р.Ф. [33]. Для дослідження відбирали кістковий мозок безпосередньо у тварин з вилучених кісток, які розрізали вздовж і вимивали кістковий мозок. Додавали теплий гіпотонічний 0,9% розчин цитрату натрію у стерильну пробірку. Отриману клітинну суспензію інкубували у гіпотонічному середовищі протягом 10 хв. за температури тіла досліджуваного об'єкта. Центрифугували отриману суспензію протягом 5 хв. при 1000 об/хв і збирали осад у пробірку. Клітини кісткового мозку фіксували протягом 60 хв. при температурі $+6\pm 2$ °C у суміші метилового спирту з крижаною оцтовою кислотою (3:1). За 60 хв. фіксації при

температурі $+6\pm 2$ °С тричі змінювали фіксатор із проміжним ресуспензуванням осаду та наступним центрифугуванням. В останньому фіксаторі осад ресуспензували та наносили на стерильне прохолодне $+6$ °С предметне скло. Скло швидко проводили через полум'я пальника, щоб фіксатор запалав, але не допускаючи перегрівання. Аналізували 3000 клітин, серед яких визначали такі, що перебували у мітозі.

Мітотичний індекс виражають у проміле ‰. Щоб розрахувати мітотичний індекс роблять підрахунки клітин: кількість клітин на стадії профазі (у відсотках); кількість клітин на стадії метафазі (у відсотках); кількість клітин на стадії анафазі (у відсотках); кількість клітин на стадії телофазі (у відсотках) [1] та розраховують за формулою:

$$MI = (P+M+A+T)/N \quad (2.3)$$

де P — кількість клітин на стадії профазі (у відсотках),

M — кількість клітин на стадії метафазі (у відсотках),

A — клітин на стадії анафазі (у відсотках);

T — кількість клітин на стадії телофазі (у відсотках).

N — загальна кількість клітин. (див. вище)

Референтні значення для лабораторних щурів становлять у межах 7,5 – 17,0‰ [1, 28].

2.3 Статистичні методи дослідження

Обробку даних та розрахунки виконувались за допомогою програми Microsoft XP «Excel».

Оцінку отриманих результатів здійснювали за допомогою статистичного опису. Для кожного гематологічного показника, як контролю,

так і дослідю обчислювали: медіану – величина, яка показує середину ранжованого ряду, перший (25%) і третій (75%) кватилі [34, 35, 36, 38].

Для оцінки достовірності результатів використовували ранговий критерій Манна-Уїтні [37] U-критерій Манна-Уїтні – показник, що використовується для порівняння вираженості показників в двох незв'язних вибірках. Також даний показник має обмеження: вибірка від 3 до 60 особин в групах, групи можуть мати різну кількість представників, тому, як ми мали невелику вибірку, було актуально застосувати самий цей метод.

Середні дані в таблицях представлені у вигляді $Me (Q1; Q3)$, де Me – медіана, Q – кватиль. Відмінності вважали достовірними при рівні значимості $p < 0,05$ [37, 38].

3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1 Загальна кількість еритроцитів та лейкоцитів крові у лабораторних щурів на початку статевого дозрівання після гірудовпливу

Результати дослідження загальної кількості еритроцитів та лейкоцитів крові у лабораторних щурів на початку статевого дозрівання (35 доба) без та на фоні гірудовпливу їх батькам, який проводився в період злучки, представлені в таблиці 3.1. Згідно зі схемою дослідження, в експерименті було задіяно по 3 самки та 3 самця в контролі (інтактні тварини) та дослідній групі (гірудовплив: приставки МП самицям 1 раз до злучки і 4 рази під час злучки з самцями). У кожній групі тварин відбирали потомство (по 9 тварин, які склали контрольну та дослідну групи відповідно) на початку статевого дозрівання. Терміни початку статевого дозрівання лабораторних щурів для проведення досліду були обрані з урахуванням загальноновизнаної класифікації вікових періодів у щурів. Так, 1-5 доба життя відповідає періоду новонародженості, 6-21 доба - підсисному періоду, 22-50 доба - періоду становлення статевої зрілості, і нарешті, з 60 доби - період статевої зрілості [1].

У контрольній групі тварин показники загальної кількості еритроцитів та лейкоцитів відповідали референтним значенням, характерним для нелінійних лабораторних щурів даного віку, медіана у контрольній групі тварин при цьому становила для еритроцитів $3,9 \times 10^{12}/\text{л}$, для лейкоцитів – $3,2 \times 10^9/\text{л}$, що свідчить про відсутність патологічних станів та адекватно підібрану групу.

У тварин експериментальної групи показник еритроцитів був вищим за контроль на 25,6%, а лейкоцити на 59,3%, при $p < 0,05$. Це за даними літератури може свідчити про стимулюючий вплив БАР на гематологічні показники [1].

Таблиця 3.1 - Загальна кількість еритроцитів та лейкоцитів крові у лабораторних щурів на початку статевого дозрівання (35 доба) після гірудовпливу, Me (Q1, Q3)

№	Досліджувані групи	Лейкоцити, ×10 ⁹ /л	Еритроцити, ×10 ¹² /л
1	Контрольна група, n=9	3,2 (3 ; 3,4)	3,9 (3,6 ; 4,1)
2	Дослідна група, n=9	5,1 (4,9 ; 5,4)*	4,9 (4,8 ; 5)*

Примітка. * - показники достовірно відрізняються від контролю за критерієм Манна-Уїтні при $p < 0,05$.

Зважаючи на отримані результати, можна зробити висновок, що БАР МП мають стимулюючий вплив на показники кількості еритроцитів та лейкоцитів артеріовенозної крові, але вони не виходять за межі фізіологічної норми.

3.2 Оцінка лейкоцитарної формули крові у нелінійних лабораторних щурів на початку статевого дозрівання після гірудовпливу

При дослідженні лейкоцитарної формули крові у нелінійних лабораторних щурів на початку статевого дозрівання після гірудовпливу, показники відповідали референтним значенням, характерним для тварин даного віку у контрольній групі, і медіана становила для еозинофілів 1%, паличкоядерних нейтрофілів – 5%, сегментоядерних – 13%, моноцитів – 1%, лімфоцитів – 78%, що свідчить про відсутність патологічних станів та адекватно підібрану групу.

Таблиця 3.2 — Лейкоцитарна формула крові приплоду лабораторних щурів на 35 добу, Me (Q1, Q3)

№	Досліджувані групи	Еозинофіли, %	Нейтрофіли, %		Моноцити,%	Лімфоцити,%
			Паличко- ядерні	Сегменто- ядерні		
1	Контрольна група, n=9	1 (1 ; 1)	5 (4 ; 6)	13 (12 ; 13)	1 (1 ; 1)	78 (78 ; 80)
2	Дослідна група, n=9	1 (1 ; 1)	4 (4 ; 5)	15 (15 ; 16)	1 (1 ; 1)	82 (81 ; 82,4)

У лабораторних щурів на фоні гірудовпливу лейкоцитарна формула артеріовенозної крові не зазнала статистичних змін ($p > 0,05$), порівняно з контролем, табл 3.2.

3.3 Мітотичний індекс кісткового мозку у нелінійних лабораторних щурів на початку статевого дозрівання після гірудологічного впливу

На представлених рисунках 3.1, 3.2, слід зазначити, що мітотичні клітини кісткового мозку не мали деструктивних морфологічних змін при стимуляції БАР МП, порівняно з контролем, що є важливим. В контрольній групі показники відповідали референтним значенням і становили 9,1 (8,9 ; 9,2) %.

При дослідженні мітотичного індексу кісткового мозку дослідної групи тварин у порівнянні з контрольною виявлено статистично значиме його збільшення на 67% при $p < 0,05$ (за критерієм Манна-Уїтні), табл. 3.3.

Таблиця 3.3 — Мітотичний індекс кісткового мозку у нелінійних лабораторних щурів на початку статевого дозрівання (35 доба) після гірудологічного впливу, Ме (Q1, Q3)

№	Досліджувані групи	Мітотичний індекс , %
1	Контрольна група, n=9	9,1 (8,9 ; 9,2)
2	Дослідна група, n=9	15,2 (14,9 ; 15,8)*

Примітка. * - показники достовірно відрізняються від контролю за критерієм Манна-Уїтні при $p < 0,05$.

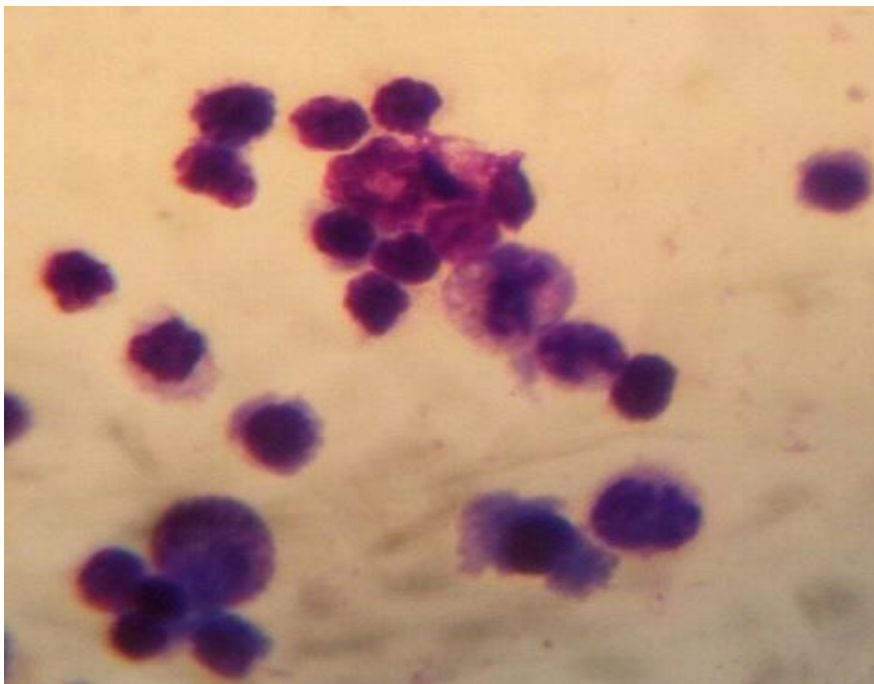


Рис. 3.1 — Проліферативна активність кісткового мозку інтактної групи лабораторних щурів віку 35 діб (контроль)

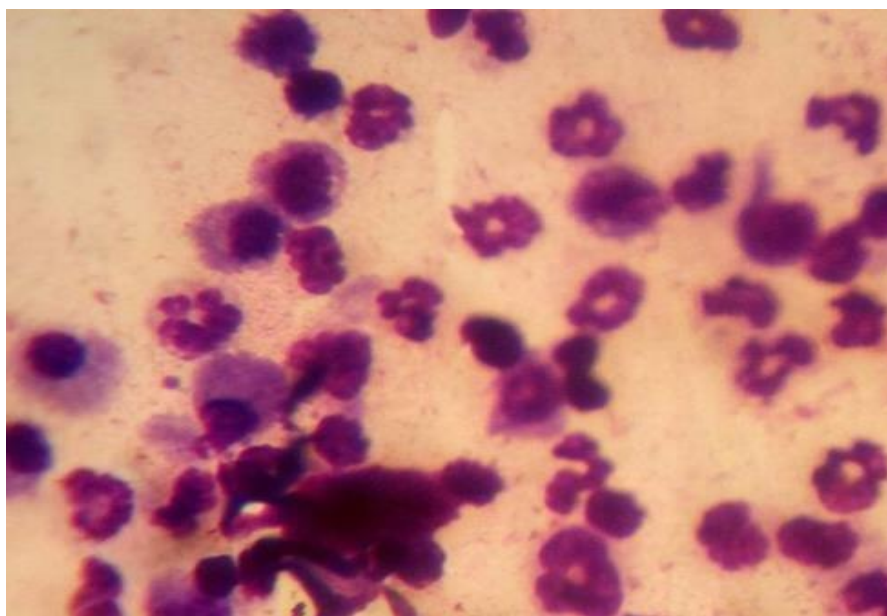


Рис. 3.2 — Проліферативна активність кісткового мозку лабораторних щурів віку 35 діб після гірудологічного впливу їхнім батькам у період злучки

Стимуляція проліферативної активності клітин кісткового мозку у лабораторних щурів під дією БАР МП (локальні приставки) була виявлена раніше й іншими ученими, але не в такому прояві, як при комбінованій приставці МП [1] Було виявлено на 30 добу, що мітотична активність була збільшена лише на 42%, що в рази менше від комбінованої приставки [1].

Темою моєї роботи є «Мітотична активність клітин кісткового мозку на початку статевого дозрівання після гірудологічного впливу». Метою цього розділу було набуття навичок та теоритичних знань з охорони праці.

Перед початком роботи, я була проінструктована. Прослухала та закріпила отримані знання підбіркою літератури з охорони праці. Ознайомилась з: правилами по роботі з біологічними об'єктами, які несуть безпосередню загрозу для здоров'я, ознайомилась з інструктажем Охорони праці № 61 При роботі у віварії та з мікроорганізмами та з інструктажем № 2 з Пожежної безпеки університету [39].

При виконанні експериментальної частини, я мала справу з тваринами, біологічними рідинами, різними хімічними речовинами, електроприладами та скляним посудом. Основними небезпечними виробничими травмами при виконанні роботи могли стати хімічні, термічні опіки, потрапляння біологічних рідин на відкриті частини тіла, слизові оболонки та спецодяг, електротравми, укуси, подряпини на шкірі від лабораторних тварин [40].

Мої дослідження проводилися в навчально-науково-дослідній лабораторії клітинної та організменної біотехнології. Тому задля уникнення травм різного характеру, я ознайомилась з правилами лабораторії, пройшла інструктаж з охорони праці, ознайомилась з інструкціями до приладів.

У робочій зоні, де я виконувала свою роботу, було дотримано температурний режим, освітлення та вологість, параметри температури, вологості, освітлення, швидкості переміщення повітря згідно з вимогами ДСН 3.3.6.042 99.

Повітря робочої зони лабораторії повинно суворо дотримуватися ДСТУ 12.1.005-88. Це забезпечувалось за допомогою провітрювання приміщення,

працюючих витяжних шаф, це було особливо актуально при роботі з їдкими та отруйними речовинами СНП 2.04.05-91 та ДСТУ 12.1.005-88 [41].

У лабораторії де виконувались роботи, повинно бути нормальне освітлення для збереження зору, це забезпечувалось за рахунок ламп накаливання та природного світла. Природне та штучне освітлення лабораторії повинне суворо відповідати вимогам ДБН В.2.5–28–2006, тому задля дотримання вимог були використанні лампи штучного освітлення та денне світло ДБН В.2.5–28–2006 [42].

Також в лабораторії повинна бути оптимальна вологість, яка становила в межах 60-70% та температура в діапазоні від 18 до 20 °С.

Важливо, щоб на всі роботи, які можуть нести нещасні випадки та пожежі чітко виконувались правила з техніки безпеки. Всі експериментальні роботи повинні проводитися після підготовлених відповідних документів та дозволу наукового керівника. Перед початком роботи, всі дії були узгоджені з науковим керівником. Допуск до роботи був здійснений тільки при наявності спецодягу. Також перед виконанням роботи науковий керівник проводив бесіди задля уникнення нещасних випадків.

При проведенні дослідів доводилося працювати із різними електроприладами (центрифуги, термостат, мікроскоп, комп'ютер та ін.), тому для уникнення нещасних випадків я притримувалася вимог ДНАОП 0.00-1.21-98 «Правила безпечної експлуатації електроустановок споживачів». Після закінчення роботи прилади вимикалися із електромереж.

При роботі з хімічними реактивами обов'язково одягався спецодяг, рукавички. Реактиви заздалегідь проходили перевірки згідно ст. 163 кодексу законів про працю України і ДНАОП 0.00-4.26-96. Після дослідів реактиви зберігалися відповідно до умов [43].

В лабораторії завжди були у вільному доступі усі справні прилади для гасіння пожежі: відро з піском та совком; вогнегасник, покривало.

Обробка даних проводилась за допомогою комп'ютера. Перед використанням я була ознайомена з інструкцією. Також дотримувалась всіх

рекомендацій щодо експлуатації комп'ютерів. Вмикання проводилось через спеціально встановлені розетки, заздалегідь перевірені. Для запобігання перевантаження організму я обмежувала час використання комп'ютера та відпочивала через кожні 2 години по 15 хвилин [43].

Під час проведення експериментальної роботи можуть виникнути різні нещасні випадки. При термічних опіках слід швидко позбутися джерела. Перша допомога – це при горінні одягу і т.д., швидко загасити полум'я за допомогою ковдри, дати знеболювальне постраждалому та доставити в опіковий центр.

Хімічні опіки можуть виникнути при потраплянні на шкіру розчинів лугів, сильних кислот, солей деяких важких металів. Тому одяг, який промочений якоюсь хімічною речовиною, негайно потрібно видалити [44].

При роботі з біологічними рідинами слід вважати їх умовно зараженими та працювати особливо уважно. При потраплянні різних рідин на одяг, слід його негайно замочити у дезінфектанті приблизно на годину [40].

При потраплянні біологічного матеріалу на слизову оболонку очей потрібно промити великою кількістю води і закапати 30% розчином альбуциду, якщо рідина потрапила на слизові оболонки ротової порожнини, потрібно прополоскати 70% розчином спирту. Обов'язково при виникненні якоїсь небезпеки чи для уникнення її повідомляти керівництво лабораторії, наукового керівника та лаборанта.

Об'єктом дослідження моєї наукової роботи була кров та кістковий мозок щурів на початку статевого дозрівання під гірудовпливом, тому обов'язково потрібно знати умови утримання та догляд за тваринами (МП, лабораторними щурами).

Тварини для проведення експериментальних дослідів утримуються у віварію. Категорично забороняється приводити тварин, які не перевірені ветеринарним лікарем і тих, що не пройшли карантинний термін .

Вентиляція віварію повинна працювати цілодобово. Для знезараження повітря встановлюють бактерицидні опромінювачі.

Стіни приміщень, в яких містяться тварини від підлоги до стелі викладені плиткою. Прибирання віварію проводять щодня.

Після закінчення прибирання все зібране у віварію сміття спалюють або утилізують [44].

Основну небезпеку для здоров'я несе можливість заразитися інфекційними захворювання, особливо через укуси. Для попередження цієї небезпеки перед маніпуляцією з тваринами слід одягати рукавички та після кожного огляду тварин дезинфікувати руки.

При укусі щуром рану слід промити великою кількістю проточної води, обробити спиртом та розчином йоду. Обов'язково попередити наукового керівника та лаборанта.

Таким чином, отримавши необхідні знання, я унеможливила нещасні випадки на своєму робочому місці. Отримала багато корисних теоретичних знань, які буду використовувати і в подальшому.

ВИСНОВКИ

1. У нащадків інтактних лабораторних щурів (контрольна група, $n=9$) та щурів, яким проводили гірудовплив в період злучки (дослідна група, $n=9$), на початку статевого дозрівання (35доба) загальна кількість лейкоцитів та еритроцитів відповідала референтним значенням. У дослідної групи тварин виявлено статистично значиме збільшення кількості еритроцитів на 25,6% та лейкоцитів на 59,3% порівняно з контролем при $p<0,05$.

2. Лейкоцитарна формула артеріовенозної крові знаходиться в межах норми у контрольній та дослідній групі лабораторних щурів та статистично не відрізняється між групами.

3. Мітотичний індекс кісткового мозку у дослідної групи нащадків лабораторних щурів на початку статевого дозрівання у порівнянні з контролем статистично збільшився на 67% при $p<0,05$, що імовірно, свідчить про стимулюючу дію БАР МП при комбінованій приставці п'явок (чергування ділянки холки та куприка) їхнім батькам у період злучки.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Результати експериментальної роботи можуть широко використовуватися в ветеринарії та сільському господарстві. Результати показують стимулюючу дію гірудовпливу на гематологічні показники та мітотичний індекс.

Отримані в роботі результати можуть бути впроваджені в навчальний процес закладів вищої освіти, зокрема при викладанні окремих тем наступних дисципліни: «Імунологія», «Фізіологія крові», «Великий практикум з імунології».

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Амінов Р. Ф. Природний імуномодулятор із тіл медичних п'явок: отримання та застосування: монографія. Запоріжжя : Запорізький національний університет, 2022. 164 с.
2. Литвиненко Р. О. Імуномодуляторні властивості біологічно активних речовин медичної п'явки в умовах гірудовпливу : дис. ... канд. біол. наук: 03.00.09. Київ, 2016. 169 с.
3. Куплевська Л. А. Натуропатична медицина. Гірудотерапія і фізіологія здоров'я. Львів, 2019. 231 с.
4. Килівник В. С., Цвень П.В., Кузьмін І.В. Історія гірудотерапії з найдавніших часів до початку 18-го століття н.е. *Вісник соціальної гігієни та організації охорони здоров'я України*. 2012. № 4. С. 84-90.
5. Nyson J. M. Leech therapy: a history. *Journal of the History of Dentistry*. 2005. Vol. 53, № 1. P. 25–27.
6. Kashuba E., Bailey J., Allsup D. The kinin-kallikrein system: physiological roles, pathophysiology and its relationship to cancer biomarkers. *Biomarkers*. 2013. Vol. 18, № 2. P. 279–296.
7. Historical Article: *Hirudo medicinalis*: ancient origins of, and trends in the use of medicinal leeches throughout history / I. S. Whitaker et al. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2004. Vol. 42. P. 133-137.
8. Mumcuoglu K. Y. Recommendations for the use of leeches in reconstructive plastic surgery. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014. P. 205929.
9. *Hirudo medicinalis* - historical and biological background and their role in microsurgery: Review article / A. K. Yapıcı et al. *Hand Microsurg*. 2017. № 6, Is. 1. P. 34-38
10. Шкопинський Є. О., Ковальова А. А. Гірудотерапія як засіб фізичної реабілітації. *Вісник Запорізького національного університету. Фізичне виховання та спорт*. 2013. № 1. С. 146-155.

11. Коритнюк Р., Борисенко Т. Пиявочка–козявочка. *Фармацевт–практик*. 2009. № 1. С. 34–37.
12. Karadag A.S., Calka O., Akdeniz N. A. case of irritant contact dermatitis with leech. *Cecen I Cutan Ocul Toxicol*. 2011. Vol. 30. P. 234-235.
13. Effectiveness of leech therapy in osteoarthritis of the knee: A randomized, controlled trial / A. Michalsen et al. *Ann. Intern. Med.* 2003. Vol. 139. P. 724-725.
14. Surendranth D. Role of Leeches in Peri-orbital lacerations healed by primary intention. *International Journal of Ayurvedic Medicine*. 2016. № 7 (1). P. 88-93.
15. Antimicrobial Role of RNASET2 Protein During Innate Immune Response in the Medicinal Leech *Hirudo verban* / N. Baranzini et al. *Front. Immunol.* 2020. № 11. P. 1-18
16. Hirudo (Leech) for proliferative vitreous retinopathy. A protocol for systemic review and meta-analysis / H. Huang et al. *Medicine*. 2021. Vol.100. P. 1-5.
17. Rehman S. Management of Diabetic Foot Ulcer by *Hirudo medicinalis*, the “Healing Leech”. *Diabetic Foot Ulcer*. 2020. Vol.6, №3. P. 315-330.
18. Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus / W. L. Li et al. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004. № 1. P.1– 21.
19. Baranzini N., Weiss-Gayet M., Chazaud B. Recombinant *HvRNASET2* protein induces marked connective tissue remodelling in the invertebrate model *Hirudo verbana*. *Cell and Tissue Research*. 2020. Vol. 380. P. 565–579.
20. A peptide inhibitor of macrophage migration in atherosclerosis purified from the leech *Whitmania pigra* / B. Hu et al. *J Ethnopharmacol*. 2020. Vol. 254.P. 112723.
21. Jha K., Garg A., Narang R., Das S. Hirudotherapy in Medicine and Dentistry. *J. Clin. Diagn. Res.* 2015. Vol. 9(12). P. ZE05-7. DOI: 10.7860/JCDR/2015/16670.6918.
22. Rado C. Beyond bloodletting: FDA gives leeches a medical makeover. *FDA Consumer Updates*. 2004. Vol. 38, № 9. P. 65-70.

23. Syed I. H. Leech Therapy in Traditional Medicine: Hirudotherapy. *Md Tanwir Alam*. 2015. Vol. 22, № 1. P. 3-50.
24. Амінов Р. Ф. Вплив гірудопунктури та екстракту з тканин медичної п'явки на імунну реактивність самиць та приплоду щурів у постембріональному онтогенезі : дис. ... канд. біол. наук: 03.00.09. Київ, 2018.149 с.
25. Harris C.A. Philadelphia: Lindsay and Blackston; 1845. The principles and practice of dental surgery. Seattle, 2016. 466 p.
26. Вплив екзогенних біологічно активних реовин медичної п'явки на біологічні властивості *Echerichia coli* 3921/41 / О. К. Фролов та ін. *Microbiology&Biotechnology*. 2014. № 2(26). С. 94–100. URL: [https://doi.org/10.18524/2307-4663.2014.2\(26\).48281](https://doi.org/10.18524/2307-4663.2014.2(26).48281)
27. Амінов Р. Ф., Фролов О. К., Федотов Є. Р. Пристрій для фіксації дрібних лабораторних тварин. Патент №107289 України. 2016. Заявл. 22.12.2015. Опубл. 25.05.2016. Бюл. №10.
28. Задорожна Г. О., Хоменко О. М. Методичний посібник для виконання експериментальних робіт із використанням щурів. Дніпро : Дніпровська політехніка, 2019. 40 с.
29. Bradley E.L. 3rd. A clinically based classification system for acute pancreatitis. *Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis, Atlanta, Ga, September 11-13, 1992. Arch. Surg.* 1993. № 128(5). P. 586-590.
30. Фролов О. К., Федотов Є. Р.,Копійка В. В., Фролова Л. О. Спосіб фарбування мазків венозної крові. Патент №62690 України 2003. Заявл. 30.04.2003. Опубл. 15.12.2003. Бюл. №12.
31. Кайдашева І. П. Методи клінічних та експериментальних дослідженьв медицині. Полтава : Полімет, 2003. 320 с.
32. Boyum A. Separation of blood leukocytes, granulocytes and lymphocytes. 4th ed. *Tissue antigens*, 1974. P. 269-274.

33. Лаповець Л. Є., Лебедь Г. Б., Ястремська О. О. Клінічна лабораторна діагностика. Місто: Київ Вид-во Всеукраїнське спеціалізоване видавництво «Медицина», 2021. 472 с.
34. Гаркавий В. К. Статистика. Київ : Алерта, 2012. 608 с.
35. Статистика : підручник / С. С. Герасименко та ін.; за ред. С. С. Герасименка. 2-ге вид., перероб. і доп. К.: КНЕУ, 2000. 467 с.
36. Dunn O. J. Basic statistics: A primer for the biomedical sciences. 4th ed. Hoboken, N.J : John Wiley & Sons, 2009.
37. Бахрушин В. Є. Методи аналізу даних : навчальний посібник для студентів. Запоріжжя : КПУ, 2011. 268 с.
38. Василенко О. А., Сенча І. А. Математично-статистичні методи аналізу у прикладних дослідженнях: навч. посіб. Одеса : ОНАЗ ім. О. С. Попова, 2011. 166 с.
39. Протоєрейський О.С. Охорона праці в галузі: навч. посіб / О.С. Протоєрейський, О.І. Запорожець. Київ : Книжкове вид-во НАУ, 2005. 268 с.
40. Охорона праці та промислова безпека: навч. посіб. / К.Н. Ткачук, В.В. Зацарний, Р.В. Сабарно, С.Ф. Каштанов та ін.; за ред. К.Н. Ткачука і В.В. Зацарного. Київ, 2009. 454 с.
41. ДСТУ 12.1.005–88. Загальні санітарно–гігієнічні вимоги до повітря робочої зони: [Чинний від 1989–01–01]. Затв. МЗ СРСР у 1988 р. 70 с.
42. ДБН В.2.5–28–2006. Природне і штучне освітлення : [Чинний від 2006–10–01]. Вид. офіц. Київ : МінБуд України, 2006. 128 с.
43. Правила охорони праці у хімічних лабораторіях. К.: Основа, 2013. 22 с.
44. Шевченко А.М. Яворівський О.П. Гігієна праці. Вінниця : Нова книга, 2005. 84с.

Декларація
академічної доброчесності
здобувача ступеня вищої освіти ЗНУ

Я, Свириденко Аліна Петрівна, студентка 2 курсу, денної форми навчання, факультету біологічного, спеціальність 091 Біологія, освітня програма Біологія, адреса електронної пошти alinasvyrydenko39@gmail.com, підтверджую, що написана мною кваліфікаційна робота на тему «Мітотична активність клітин кісткового мозку щурів на початку статевого дозрівання після гірудологічного впливу» відповідає вимогам академічної доброчесності та не містить порушень, що визначені у ст. 42 Закону України «Про освіту», зі змістом яких ознайомена;

– заявляю, що надана мною для перевірки електронна версія роботи є ідентичною її друкованій версії;

– згодна на перевірку моєї роботи на відповідність критеріям академічної доброчесності у будь-який спосіб, у тому числі за допомогою інтернет-системи, а також на архівування моєї роботи в базі даних цієї системи.

Дата _____ Підпис _____ ПІБ (студент) Свириденко А.П.

Дата _____ Підпис _____ ПІБ (науковий керівник) Литвиненко Р.О.