

**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: ЦИТОМОРФОМЕТРИЧНІ ПОКАЗНИКИ ЛІМФОЦИТІВ ПРИ
ВИКОРИСТАННІ *HIRUDO VERBANA* ЯК НЕІНВАЗИВНОГО
ІНСТРУМЕНТУ ДЛЯ ЗАБОРУ КРОВІ ССАВЦІВ

Виконала: студентка 2 курсу, групи 8.0912-б
спеціальності 091 Біологія
освітньої програми Біологія

А.О. Гранкіна

Керівник к.б.н., доц. Р.О. Литвиненко

Рецензент к.б.н., ст. викладач Р.Ф. Амінов

**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

“ ____ ”

_____ 2022 року

З А В Д А Н Н Я
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТЦІ
Анастасії Олександрівні Гранкіній

1 Тема роботи: Цитоморфометричні показники лімфоцитів при використанні *Hirudo verbana* як неінвазивного інструменту для забору крові ссавців
керівник роботи Раїса Олександрівна Литвиненко, к.б.н.

затверджені наказом ЗНУ від «01» травня 2023 року № 644-с

2 Строк подання студентом роботи грудень 2023 року

3 Вихідні дані до роботи Курсова робота на тему «Біологічно активні речовини медичної п'явки та їх вплив під час гірудотерапії. Вплив ендоксану на імунну систему щурів концентрації 100 мг/кг»

4 Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити): 1. Проаналізувати загальну кількість лейкоцитів, лейкоцитарну формулу та цитоморфометричні показники лімфоцитів крові донорів. 2. Проаналізувати загальну кількість лейкоцитів, лейкоцитарну формулу та цитоморфометричні показники лімфоцитів крові донорів при використанні *Hirudo verbana* для забору крові (приставка до тіла). 3. Проаналізувати загальну кількість лейкоцитів, лейкоцитарну формулу та цитоморфометричні показники лімфоцитів крові (з хвоста) лабораторних щурів. 4. Проаналізувати загальну кількість лейкоцитів, лейкоцитарну формулу та цитоморфометричні показники лімфоцитів крові лабораторних щурів при використанні *Hirudo verbana* для забору крові (приставка до тіла).

5 Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень): Табл. 3.1-3.4: Загальна кількість лейкоцитів та лейкоцитарна формула; цитоморфометричні класи лімфоцитів крові добровольців / лабораторних щурів, отриманої звичайним методом та із використанням *Hirudo verbana*.

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Консультант	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
4	к.б.н., доцент Гороховський Є.Ю.		

7 Дата видачі завдання _____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Підбір та аналіз літературних джерел за темою кваліфікаційної роботи. Підбір методів дослідження	Жовтень – грудень 2022	Виконано
2	Оформлення розділу «Огляд наукової літератури».	Грудень 2022 – січень 2023	Виконано
3	Оформлення розділу «Матеріали та методи дослідження»	Січень – лютий 2023	Виконано
4	Формування розділу «Охорона праці»	Березень – квітень 2023	Виконано
5	Формування та поповнення бази даних експериментального дослідження	Квітень - травень 2023	Виконано
6	Статистичний аналіз та інтерпретація експериментальних даних	Вересень – жовтень 2023	Виконано
7	Формування розділу «Експериментальна частина»	Листопад 2023	Виконано
8	Оформлення та попередній захист кваліфікаційної роботи	Грудень 2023	Виконано

Студент _____

А.О. Гранкіна

Керівник роботи _____

Р.О. Литвиненко

Нормоконтроль пройдено

Нормоконтролер _____

Є.Ю. Гороховський

РЕФЕРАТ

Робота викладена на 66 сторінках друкованого тексту, містить 13 таблиць, 9 рисунків. Список літератури включає 72 джерела, в тому числі 31 іноземною мовою.

Матеріалом дослідження була кров 9 умовно здорових донорів та 10 лабораторних щурів, отримана звичайним методом і з використанням *Hirudo verbana*. Метою роботи було визначити цитоморфометричні показники лімфоцитів при використанні *H. verbana* як неінвазивного інструменту для забору крові ссавців (людини, лабораторних щурів). Методи дослідження: імунологічні (загальна кількість лейкоцитів, лейкоцитарна формула крові, цитоморфометричні показники лімфоцитів), статистичні.

В крові донорів, отриманої із використанням *H. verbana*, порівняно зі звичайним методом забору крові, виявлено підвищення загальної кількості лейкоцитів, зменшення відносного вмісту еозинофілів і збільшення абсолютної кількості лімфоцитів, а також тенденцію до зменшення відносного вмісту паличко- і сегментоядерних нейтрофілів та збільшення відносного вмісту моноцитів і лімфоцитів. Виявлені зміни співвідношення цитоморфометричних класів лімфоцитів, зокрема в крові донорів зі шлункової кишки п'явки зменшена відносна кількість середніх та збільшена – великих лімфоцитів. У лабораторних щурів тенденція змін показників крові була подібною.

Новизна роботи полягає у визначенні цитоморфометричних показників лімфоцитів крові людини і лабораторних щурів при використанні *H. verbana* як інструменту для забору крові.

Теоретичне значення: доповнено відомості щодо особливостей лейкоцитарних показників крові ссавців при використанні *H. verbana* як інструменту для забору крові.

МЕДИЧНА П'ЯВКА, ЗАБІР КРОВІ, ГРУДОВПЛИВ, ЛАБОРАТОРНІ ЩУРИ, БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ РЕЧОВИНИ, ЦИТОМОРФОМЕТРИЧНІ ПОКАЗНИКИ ЛІМФОЦИТІВ

ABSTRACT

The work is presented on 66 pages of printed text, contains 13 tables, 9 figures. The list of references includes 72 sources, including 31 in foreign languages.

The research material was the blood of 9 conditionally healthy donors and 10 laboratory rats, obtained by the usual method and using *Hirudo verbana*. The aim of the work was to determine the cytomorphometric parameters of lymphocytes when using *Hirudo verbana* as a non-invasive tool for blood sampling of mammals (humans, laboratory rats). Research methods: immunological (the total number of leukocytes, leukocyte blood formula, cytomorphometric indicators of lymphocytes), statistical.

In the blood of donors obtained with the use of *H. verbana*, compared to the usual method of blood collection, an increase in the total number of leukocytes, a decrease in the relative content of eosinophils and an increase in the absolute number of lymphocytes, as well as a tendency to a decrease in the relative content of rod- and segmented neutrophils and an increase in the relative content of monocytes and lymphocytes were obtained. Changes in the ratio of cytomorphometric classes of lymphocytes were revealed, in particular, in the blood of donors from the stomach of a leech, the relative number of medium and large lymphocytes decreased. In laboratory rats, the trend of changes in blood parameters was similar.

The novelty of the work consists in the determination of cytomorphometric parameters of blood lymphocytes of humans and laboratory rats when using *H. verbana* as a tool for blood sampling.

Theoretical significance: information on the peculiarities of the leukocyte indicators of the blood of mammals when using *H. verbana* as a tool for blood sampling has been added.

MEDICINAL LEECH, BLOOD SAMPLING, HIRUDOLOGICAL INFLUENCE, LABORATORY RATS, BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES, CYTOMORPHOMETRIC PARAMETERS OF LYMPHOCYTES.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	8
ВСТУП.....	9
1 ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	12
1.1. Загальна характеристика <i>Hirudo verbana</i>	12
1.1.1. Зовнішній вигляд, систематичне положення та біологічні властивості слини п'явок виду <i>Hirudo verbana</i>	12
1.1.2. Особливості застосування п'явок виду <i>Hirudo verbana</i>	17
1.1.2.1. Косметичні та медичні цілі.....	17
1.1.2.2. Забір крові для клінічних досліджень.....	20
1.2. Загальна характеристика цитологічних показників крові у нормі та при різних патологіях.....	23
1.2.1. Загальна кількість лейкоцитів.....	24
1.2.2. Лейкоцитарна формула.....	25
1.2.3. Цитоморфометричні показники лімфоцитів.....	31
1.3. Відомості щодо впливу <i>Hirudo verbana</i> на цитологічні показники крові.....	33
2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	37
2.1. Матеріали для дослідження та характеристика біологічних об'єктів.....	37
2.2. Методи досліджень.....	38
2.2.1. Методика отримання різних зразків крові з біологічних об'єктів.....	38
2.2.2. Методика визначення загальної кількості лейкоцитів.....	39
2.2.3. Методика визначення лейкоцитарної формули крові.....	41
2.2.4. Визначення цитоморфометричних показників лімфоцитів крові.....	42
2.2.5. Методи статистичної обробки даних.....	43
3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	45

3.1. Загальна кількість лейкоцитів, лейкоцитарна формула та цитоморфометричні показники лімфоцитів людини при використанні <i>Hirudo verbana</i> як неінвазивного інструменту для забору крові	45
3.2. Загальна кількість лейкоцитів, лейкоцитарна формула та цитоморфометричні показники лімфоцитів лабораторних щурів при використанні <i>Hirudo verbana</i> як неінвазивного інструменту для забору крові	47
4 ОХОРОНА ПРАЦІ.....	50
ВИСНОВКИ.....	55
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	57
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ.....	58

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ
І ТЕРМІНІВ

ГТ – гірудотерапія

БАР – біологічно активні речовини

Me – медіана

Q1 – перший кuartиль

Q3 – третій кuartиль

ВСТУП

П'явки виду *Hirudo verbana* так само, як і п'явки виду *H. medicinalis*, активно використовуються у косметології, дерматології і навіть власне медицині через те, що в їхній слині міститься ряд фармакологічних сполук із антикоагулянтною, антимікробною, знеболювальною та протизапальною властивостями. Завдяки цьому слина подібних п'явок «лікує» широке коло навіть тих хвороб, які досить важко піддаються лікуванню звичайними методами [1-13].

Також п'явки виду *H. verbana*, як і інші п'явки, є гематофагами, тобто вони живляться кров'ю, а також здатні її запасати на деякий час у своєму тілі у кількості, що до 10 разів більша за їхню масу, завдяки чому вони стали корисним інструментом для забору крові у різних галузях клінічних досліджень. Метод забору крові із використанням п'явок є досить ефективним через, по-перше, комерційну доступність п'явок, їхню універсальність відносно температурного режиму та високу ємність по відношенню до збирання крові, і, по-друге, неінвазивність та безболісність самої процедури, що буде спричиняти набагато менше стресу та психологічних травм порівняно зі звичайними методами забору крові [1, 14-20].

Актуальність теми полягає у застосуванні п'явок виду *H. verbana* для забору крові ссавців, а також визначенні різних цитологічних показників крові ссавців, отриманої із застосуванням цих п'явок, і порівнянні цих результатів із результатами, отриманими із застосуванням звичайного методу забору крові. Відомо, що більш-менш тривале зберігання крові в організмі будь-якої п'явки змінює цитологічний склад крові, що може дати хибні результати при цитологічному дослідженні, незважаючи на ефективність методу забору крові із використанням п'явок [17]. Поряд із визначенням кількості лейкоцитів та лейкоцитарної формули у крові ссавців, отриманій із застосуванням п'явок, актуальним є визначення цитоморфометричних показників таких клітин із

групи лейкоцитів, як лімфоцити, а також визначення співвідношення кількості малих, середніх та великих лімфоцитів у крові ссавців, отриманій із застосуванням п'явок, і порівняння цього співвідношення із тим, що визначається при заборі крові звичайним методом [18, 19].

Мета роботи – визначити цитоморфометричні показники лімфоцитів при використанні *Hirudo verbana* як неінвазивного інструменту для забору крові ссавців (людини, лабораторних щурів).

Відповідно до мети роботи було сформульовано наступні завдання:

- 1) проаналізувати загальну кількість лейкоцитів, лейкоцитарну формулу та цитоморфометричні показники лімфоцитів венозної крові донорів;
- 2) проаналізувати загальну кількість лейкоцитів, лейкоцитарну формулу та цитоморфометричні показники лімфоцитів при використанні *Hirudo verbana* для забору крові (приставка до тіла) у донорів;
- 3) проаналізувати загальну кількість лейкоцитів, лейкоцитарну формулу та цитоморфометричні показники лімфоцитів крові (з хвоста) лабораторних щурів;
- 4) проаналізувати загальну кількість лейкоцитів, лейкоцитарну формулу та цитоморфометричні показники лімфоцитів при використанні *Hirudo verbana* для забору крові (приставка до тіла) у лабораторних щурів;
- 5) порівняти результати дослідження, отримані при заборі крові звичайним способом та з використанням *Hirudo verbana*.

Об'єкт дослідження – кров ссавців (людини, лабораторних щурів).

Предмет дослідження – цитоморфометричні показники лімфоцитів крові ссавців (людини, лабораторних щурів) при використанні *Hirudo verbana* як неінвазивного інструменту для забору біоматеріалу.

Методи дослідження: імунологічні (загальна кількість лейкоцитів, лейкоцитарна формула крові, цитоморфометричні показники лімфоцитів), статистичні.

Новизна роботи полягає у визначенні цитоморфометричних показників лімфоцитів крові людини і лабораторних щурів при використанні *Hirudo verbana* як інструменту для забору крові.

Теоретичне значення: доповнено відомості щодо особливостей лейкоцитарних показників (кількість лейкоцитів, лейкоцитарна формула та цитоморфометричні показники лімфоцитів) крові ссавців при використанні *Hirudo verbana* як інструменту для забору крові.

Практичне значення. Результати роботи можуть бути впроваджені у навчальний процес при підготовці бакалаврів та магістрів за спеціальністю 091 Біологія та біохімія. Незважаючи на деякі спотворення результатів гематологічного аналізу крові, взятої з використанням медичних п'явок виду *H. verbana*, цей метод забору крові може бути використаним для попередньої оцінки результатів аналізу крові, порівняно зі звичайними способами забору крові, адже медичні п'явки при цьому використовуються у якості неінвазивного інструменту для взяття крові, що буде мінімізувати дискомфортні відчуття.

Апробацію результатів дослідження було проведено на Міжнародній науковій інтернет-конференції «Тенденції та перспективи розвитку науки і освіти в умовах глобалізації» (Вип. 99, Переяслав, листопад 2023) з публікацією статті та Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні проблеми науки, освіти і суспільства» (Київ, грудень 2023) з публікацією тез.

1 ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика *Hirudo verbana*

Вид *Hirudo verbana*, або п'явка аптечна, належить до гематофагів, які завдяки цілющим властивостям своєї слини досить широко використовуються у різних галузях від косметології до медицини, а також цей вид п'явок так само, як і п'явки виду *H. medicinalis* (або п'явка медична), використовується у клінічних дослідженнях для забору капілярної крові [1, 2, 14, 19-32].

1.1.1. Зовнішній вигляд, систематичне положення та біологічні властивості слини п'явок виду *Hirudo verbana*

П'явки виду *H. verbana* характеризуються довгим (до 100-140 мм у довжину) і дещо широким у середній частині (до 20 мм в ширину) блискучим та ребристим тілом, яке поступово звужується у напрямку до передньої частини і є сплющеним у дорзально-вентральному напрямку. Стосовно кольорового забарвлення *H. verbana*, п'явки цього виду мають зеленувато-коричнєве черево, а також смугасту спинну частину, що характеризується чергуванням чорних товстих поздовжніх смуг із помаранчевими тонкими поздовжніми смужками із нерівними краями (рис. 1.1) [24, 33, 34].



Рисунок 1.1 – Зовнішній вигляд п'явки виду *Hirudo verbana* [34].

Систематичне положення п'явок виду *H. verbana* представлено у табл. 1.1 [35, 36, 37].

Таблиця 1.1 – Систематичне положення *Hirudo verbana* [35, 36, 37]

Домен	Еукаріоти (Eukaryota)
Царство	Тварини (Animalia)
Тип	Кільчасті черви або Кільчаки (Annelida)
Надклас	Пояскові черви (Clitellata)
Клас	П'явки (Hirudinida)
Підклас	П'явки (Hirudinea)
Ряд	Безхоботні п'явки (Arhynchobdellida)
Підряд	Щелепні п'явки (Hirudiniformes)
Родина	Hirudinidae
Рід	П'явка (<i>Hirudo</i>)
Вид	П'явка аптечна (<i>Hirudo verbana</i> Carena 1820)

Згідно з табл. 1.1, *H. verbana* відноситься до домену Еукаріоти (Eukaryota), царства Тварини (Animalia), типу Кільчасті черви (Annelida), надкласу Пояскові черви (Clitellata), класу П'явки (Hirudinida), підкласу П'явки (Hirudinea), ряду Безхоботні п'явки (Arhynchobdellida), підряду Щелепні п'явки (Hirudiniformes), родини Hirudinidae, а також роду П'явка (*Hirudo*) [35, 36, 37].

Біологічно активні властивості слини п'явок виду *H. verbana* полягають у тому, що слинні залози цих п'явок виробляють таку речовину із фармакологічним ефектом, як гірудин, що представляє собою поліпептид, який складається із 64-66 амінокислотних залишків і має молекулярну масу близько 7000 Да. Хімічна структура гірудину представлена на рис. 1.2 [14, 15, 38, 39].

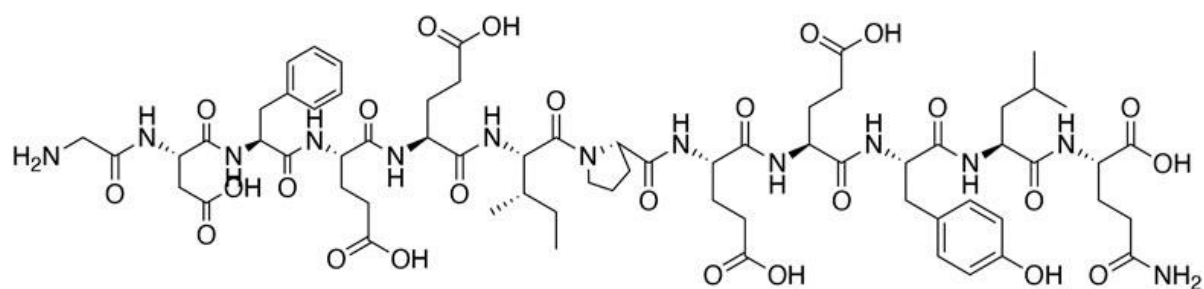


Рисунок 1.2 – Хімічна структура гірудину [39]

Фармакологічні властивості гірудину характеризуються його антикоагулянтним ефектом за рахунок того, що цей поліпептид інгібує активність такого ферменту, який бере участь у процесі згортання крові, як тромбін. На рис. 1.3 продемонстровано механізм інгібування тромбіну за участю гірудину [40, 41].

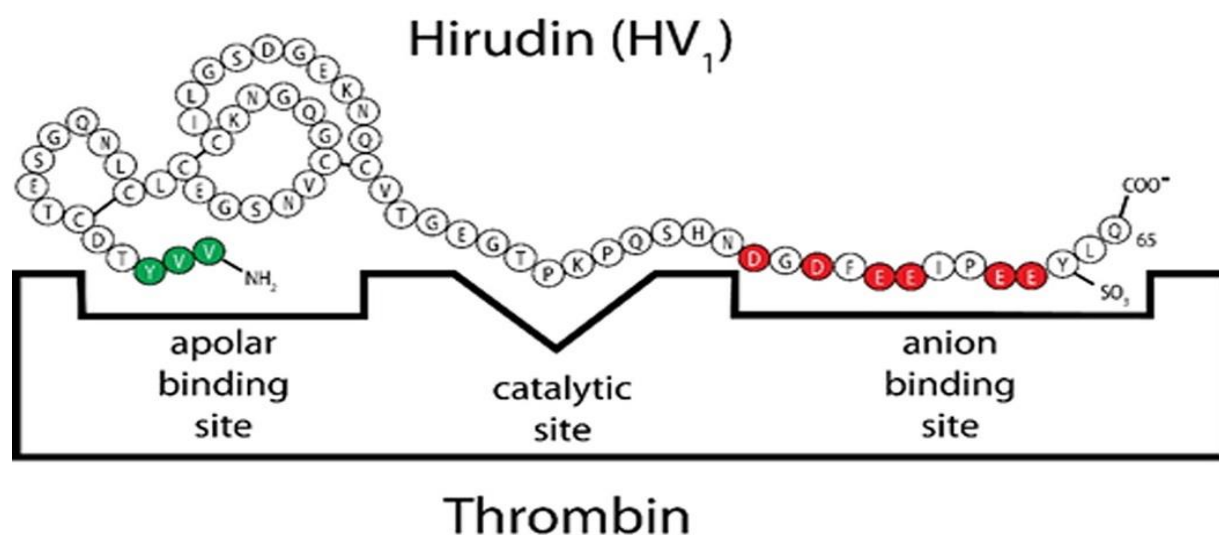


Рисунок 1.3 – Механізм інгібування тромбіну за участю гірудину [41].

Згідно з рис. 1.3, гірудин, що у своїй структурі має три дисульфідні зв'язки, своїм N-термінальним доменом, до складу якого входять такі амінокислотні залишки, як валін-1, валін-2 і тирозин-3, прикріплюється до неполярного сайту тромбіну, а C-термінальним доменом, до складу якого входять аспартат-53, аспартат-55, глутамат-57, глутамат-58, глутамат-61 і глутамат-62, прикріплюється до аніонного сайту тромбіну. Тим самим гірудин

перекриває доступ до каталітичного сайту тромбіну, і через це активність подібного ферменту інгібується [41, 42].

Також у слині п'явок виду *H. verbana* окрім гірудину містяться інші речовини (близько 100 компонентів) з терапевтичним ефектом, характеристика яких зазначена у табл. 1.2 [2, 3, 4].

Таблиця 1.2 – Речовини з терапевтичним ефектом, що знаходяться у слині п'явок виду *Hirudo verbana* (окрім гірудину) [2, 3, 4]

Компонент	Властивість
1	2
Дестабілаза	Антикоагуляційна (розчинення фібрину), антимікробна (проти <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> і <i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
Інгібітор фактору згортання крові Ха	Антикоагуляційна (інгібування перетворення протромбіну в тромбін)
Гементин, гементерин	Антикоагуляційна (розчинення фібриногену)
Гіалуронідаза	Деградація позаклітинного матриксу, антимікробна
Колагеназа	Деградація позаклітинного матриксу
Ацетилхолін, гістаміноподібні речовини, інгібітор карбоксипептидази А	Покращення кровотоку (судинорозширювальний ефект)
Апіраза	Антиагрегаційна по відношенню до тромбоцитів (гідроліз АТФ і АДФ)
Декорсин	Антиагрегаційна по відношенню до тромбоцитів (антагоніст глікопротеїну)
Калін	Антиагрегаційна по відношенню до тромбоцитів (інгібітор активації фактора Віллебранда)

Продовження таблиці 1.2

1	2
Саратин	Антиагрегаційна по відношенню до тромбоцитів (інгібітор рецептору тромбоцитів vWf)
Бделіни А і В	Знеболювальна і протизапальна дія (пригнічення активності трипсину)
Егліни В і С	Знеболювальна і протизапальна дія (пригнічення активності α -хімотрипсину, хімази тучних клітин, субтилізину і таких нейтральних протеїназ нейтрофілів, як еластаза і катепсин G)
Інгібітор триптази	Знеболювальна і протизапальна дія (пригнічення активності ферменту триптази, що деградує білки позаклітинного матриксу і тим самим спричиняє алергічні та запальні реакції)
Гірустазин	Знеболювальна і протизапальна дія (пригнічення активності тканинного калікреїну, трипсину, хімотрипсину і нейтрофільного катепсину G)
Інгібітор комплементу C1	Знеболювальна і протизапальна дія (пригнічення калікреїн-кінінової системи згортання крові)
Пігуамерин	Знеболювальна і протизапальна дія (пригнічення активності калікреїну плазми крові)

Отже, слина п'явок виду *H. verban* містить таку речовину із фармакологічним ефектом, як гірудин, що володіє антикоагулянтним ефектом, який проявляється в інгібуванні тромбіну – ферменту, що бере участь у процесі згортання крові. Також у слині цієї п'явки міститься багато інших біологічно активних сполук із антикоагулянтним, антимікробним, знеболювальним і протизапальним ефектами.

1.1.2. Особливості застосування п'явок виду *Hirudo verbana*

Так як слина п'явок виду *H. verbana* містить у своєму складі гірудин із антикоагулянтними властивостями, а також ряд інших сполук, що володіють антимікробною, знеболювальною та протизапальною властивостями, то, звичайно, п'явки широко використовуються у галузях, які полягають в оздоровленні людини, зокрема в косметології та медицині. Також завдяки тому, що п'явки виду *H. verbana* є гематофагами і володіють можливістю зберігати кров у своєму організмі, їх використовують у клінічних дослідженнях для забору крові [1, 14, 15, 19, 20, 23, 25, 38, 42].

1.1.2.1. Косметичні та медичні цілі

У роботі [2] стверджується, що п'явки виду *H. verbana* використовуються у косметології, дерматології та естетичній медицині, оскільки завдяки фармакологічному ефекту своєї слини володіють лікувальними властивостями по відношенню до різного кола хвороб. При цьому п'явки прикладаються до того чи іншого місця на 10-30 хвилин, і за цей час кожна п'явка вбирає в себе від 2 до 20 мл крові, спонтанно відпадаючи з місця прикріплення по мірі насичення.

Особливо п'явки виду *H. verbana* застосовуються у лікуванні псоріазу та варикозного розширення вен. У першому випадку гірудотерапія складається із шести сеансів протягом двох тижнів із приставкою п'явок 1 раз на тиждень, і на першому тижні ставляться п'ять п'явок на ділянці біля печінки, а на другому тижні – шість п'явок на ділянках біля нирок (по три п'явки на ділянці біля кожної нирки) [2]. На рис. 1.4 продемонстровано результат лікування псоріазу біля лівого ліктя із застосуванням п'явок виду *H. verbana* [2].



Рисунок 1.4 – Ділянка біля лівого ліктя із псоріазом до гірудотерапії (зліва) і після гірудотерапії із застосуванням *Hirudo verbana* упродовж 6 сеансів (справа) [2].

Стосовно лікування варикозного розширення вен, гірудотерапія триває 5 місяців, і при цьому кожні 4-6 днів ставляться до 3-4 п'явки на ділянці біля пупка, а також навколо зон із варикозним розширенням вен. На рис. 1.5 продемонстровано результат лікування варикозного розширення вен на внутрішній стороні лівої ноги із застосуванням п'явок виду *H. verbana* [2].



Рисунок 1.5 – Ділянка на внутрішній стороні лівої ноги із варикозним розширенням вен до гірудотерапії (зліва), після першого дня гірудотерапії із застосуванням *Hirudo verbana* (посередині) і після гірудотерапії протягом 5 місяців (справа) [2].

Крім того, гірудотерапія із використанням п'явок виду *H. verbana* застосовується також для лікування таких дерматологічних хвороб, як розацеа, короста, хронічні виразки, акне, atopічний дерматит, синці, гематоми, екземи, ліпоми, рубці на шкірі, шрами, флебіт, фурункули, абсцеси, рани, які

важко загоюються, целюліт і навіть зморшки, так як слина цих п'явок окрім оздоровлюючого ефекту володіє також омолоджуючим ефектом. Крім того, гірудотерапію застосовують при лікуванні інших хвороб, не пов'язаних з дерматологією, зокрема геморою, цервікогенного головного болю, дисциркуляторної енцефалопатії, ішемічного мозкового інсульту, інфаркту міокарда, стенокардії, глаукоми, діабетичної виразки стопи, обструкції верхніх дихальних шляхів і навіть COVID-19 [2, 5-12].

До того ж 4-сеансна гірудотерапія із тижневими перервами з використанням п'явок різних видів також застосовується для лікування різних алопецій на шкірі голови. На рис. 1.6 показано результат лікування алопецій на шкірі голови 4-місячної дівчинки, у якої попереднє фармакологічне лікування алопеції впродовж 6 місяців не дало ефекту, але після проходження 4-сеансної гірудотерапії із тижневими перервами, відмічено відростання волосся в зонах облісіння [2, 13].



Рисунок 1.6 – Ділянки на шкірі голови з алопеціями до гірудотерапії (зліва) і через 6 місяців від початку гірудотерапії (справа) [13].

Отже, п'явки виду *H. verbana* широко використовуються в косметології, дерматології та естетичній медицині завдяки цілющим властивостям своєї слини, які полягають в антикоагулянтному ефекті гірудину, що розріджує кров, а також антимікробному, знеболювальному і протизапальному ефектах інших сполук, які справляють лікувальний ефект по відношенню до широкого кола дерматологічних хвороб і не тільки.

1.1.2.2. Забір крові для клінічних досліджень

Так як п'явки виду *H. verbana* є гематофагами і здатні накопичувати кров у своєму організмі в тій кількості, що до 10 разів перевищує їх власну масу, ці п'явки цілком можна застосовувати для забору крові [14-17].

У роботі [17] стверджується, що метод забору крові із використанням п'явок різних видів є не тільки неінвазивним та безболісним, але й у той час досить ефективним для кількісного визначення різних гематологічних та біохімічних параметрів крові у ссавців, які утримуються в зоопарках, адже цей метод на відміну від звичайного методу забору крові не спричиняє сильного стресу та психологічних травм. До того ж п'явки є комерційно доступними, можуть годуватися при широкому діапазоні температур, а також здатні збирати великі об'єми крові.

Щодо звичайного методу забору крові, у людини із проколюванням подушечки безіменного пальця отримують капілярну кров, а шляхом черезшкірної пункції ліктвової та яремної вен, а також вен стопи – відповідно, венозну кров [44-48].

По відношенню до тварин існують різні методи забору крові. Наприклад, у щурів кров отримують шляхом відсікання невеликої частини хвоста або ж власне пункції латеральної хвостової вени, а також напряду з серця [28, 43, 49, 50].

У кроликів кров збирають з серця і вушної раковини, а у мишей – зі стегнової вени шляхом її проколювання на шкірі без наступного введення голки у вену. У коней чи дрібної та великої рогатої худоби кров збирають з яремної вени, а у свиней – із зовнішнього краю вуха та шляхом відсікання кінчика хвоста [48, 51].

Метод забору крові із використанням п'явок дещо нагадує власне гірудотерапію, і при цьому на протертій холодною кип'яченою водопровідною водою безволосі чи вкриті слабким шаром хутра ділянки тіла ссавців ставиться

по 1-3 п'явки у залежності від ваги (1 – на ссавця вагою до 1 кг, 2 – на ссавця вагою до 10 кг і 3 – на ссавця вагою понад 10 кг) приблизно на 20 хвилин. Упродовж цього часу п'явки після того, як спожили кров, мимовільно відпадають від тіла хазяїна, і потім кров з ротової частини п'явок відбирають голкою діаметром 21G, що приєднується до шприця об'ємом 5 чи 10 мл, або ж тим самим шприцем із голкою проводять пункцію шлунка медичної п'явки з вилученням поглинутої нею крові [17].

У ссавців із контрольної групи збирають венозну кров звичайним методом (тобто шляхом пункції) із різних частин тіла. По відношенню до таких тварин, як альпака (*Vicugna pacos*), вівця свійська (*Ovis aries*), кінь свійський (*Equus caballus*), козел альпійський (*Capra ibex*), козел свійський (*Capra aegagrus hircus*) та червоношийй валлабі (*Macropus rufogriseus*), у цих тварин збирають кров з яремної вени протягом 20 хвилин [17].

У той час у бурого щура (*Rattus norvegicus*), кабана дикого (*Sus scrofa*), кроля європейського (*Oryctolagus cuniculus*) і мари патагонської (*Dolichotis patagonum*) кров збирають з краніальної порожнистої вени одразу після підпадиння п'явки. Натомість у щурів (*Rattus norvegicus*) кров можна збирати також шляхом пункції латеральної хвостової вени або ж відсікання невеликої частини хвоста, а також пункції серця [17, 28, 43, 50, 51].

Стосовно кролів, у них кров збирають також напряму з серця і з вушної раковини. У мишей кров збирають шляхом одноразового проколвання стегнової вени на шкірі без подальшої її пункції [48].

Стосовно гематологічного аналізу зразків крові, отриманих з різних ссавців із використанням п'явок різних видів, а також звичайним методом, у дослідженні [17] подібні зразки крові аналізувалися автоматично у гематологічному аналізаторі HM5 (Abaxis, США). Крім того, у роботі [44] стверджується, що здійснення гематологічного аналізу крові можливе також «вручну» із використанням камери Горяєва для кількісного підрахунку окремих формених елементів крові, а також із опануванням методу визначення

лейкоцитарної формули у підфарбованих за Романовським-Гімзою мазках крові під мікроскопом.

Метод статистичної обробки даних зазвичай включає здійснення кореляційного аналізу за Пірсоном, що є досить простим і дозволяє виявити відмінності між результатами гематологічного аналізу крові, отриманої з використанням п'явок різних видів і звичайним способом. При цьому створюють графік, на якому результати щодо кількості певних формених елементів крові, отримані із використанням п'явок (вертикальна вісь абсцис), «накладають» на подібні результати, отримані після взяття крові звичайним методом (горизонтальна вісь ординат), а потім зі здійсненням кореляційного аналізу за Пірсоном визначають ступінь взаємозв'язку між цими результатами [17].

На рис. 1.7 продемонстровано приклад здійснення кореляційного аналізу за Пірсоном по відношенню до результатів з визначення кількості лімфоцитів у крові різних тварин, отримані з використанням п'явок і звичайним методом [17]. Згідно з рис. 1.7, коефіцієнт кореляції Пірсона r , значення якого дорівнює 0,62, демонструє середній додатній взаємозв'язок між результатами, отриманими після забору крові з використанням п'явок, і результатами, отриманими після забору крові звичайним методом. Це означає, що результати гематологічного аналізу з використанням п'явок помітно відрізняються від подібних результатів, отриманих після забору крові звичайним способом, причому у більшу сторону, тобто відносна кількість лімфоцитів у крові, спожитою п'явкою, є більшою за відносну кількість подібних формених елементів у крові, взятій звичайним способом. Із застосуванням цього коефіцієнту можна легко «підігнати» змінені результати гематологічного аналізу крові [17].

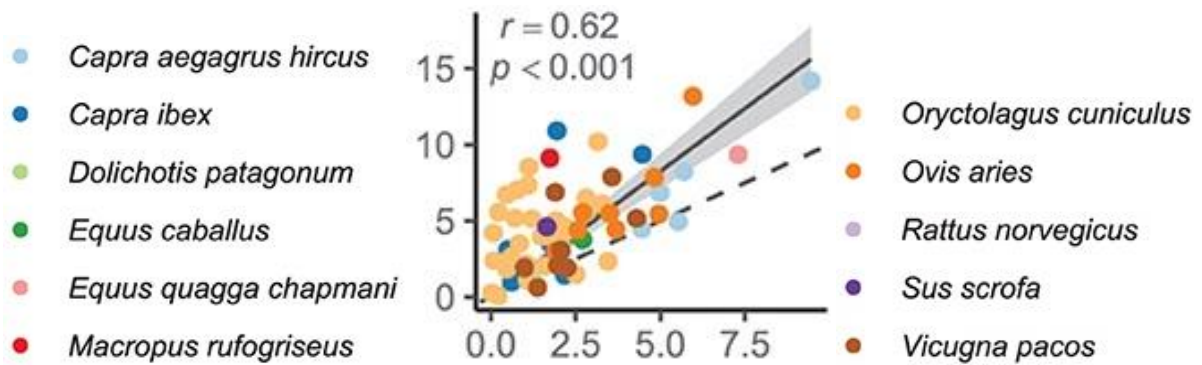


Рисунок 1.7 – Порівняння результатів з визначення кількості лімфоцитів у крові різних тварин ($\times 10^9/\text{л}$), отриманій з використанням п'явок (суцільна лінія із сірою тінню) і звичайним методом (штрихова лінія), шляхом здійснення кореляційного аналізу за Пірсоном. Вертикальна вісь абсцис демонструє результати, отримані при заборі крові з використанням п'явок, а горизонтальна вісь ординат – результати, отримані при заборі крові звичайним способом [17].

Отже, медичні п'явки будь-якого виду можна застосовувати для забору крові з метою гематологічного аналізу. Незважаючи на те, що використання п'явок для забору крові змінює цитологічний склад крові, результати дослідження можна підкоригувати під ті, що отримуються при звичайному методі забору крові, зі здійсненням кореляційного аналізу за Пірсоном.

1.2. Загальна характеристика цитологічних показників крові у нормі та при різних патологіях

Стосовно різних цитологічних показників крові, які визначаються при здійсненні гематологічного аналізу, до них відносяться концентрації таких формених елементів у певній об'ємній одиниці крові, як еритроцити, лейкоцити і тромбоцити. Також при гематологічному аналізі крові визначають так звану лейкоцитарну формулу, тобто з-поміж усіх наявних лейкоцитів

диференціюють нейтрофіли, еозинофіли, лімфоцити, моноцити і базофіли, а також визначають цитоморфометричні показники лімфоцитів [17, 25, 44].

1.2.1. Загальна кількість лейкоцитів

Щодо загальної кількості лейкоцитів у певній об'ємній одиниці людської крові, цей показник є досить варіабельним, і для 1 мкл крові референтні значення складають 4000-8800 клітин, а для 1 л крові – відповідно, $4-8,8 \times 10^9$ клітин. Під час мікроскопічного дослідження лейкоцити у пофарбованих за Романовським-Гімзою мазках крові легко ідентифікуються за їхнім бузково-фіолетовим забарвленням [44]. Знижені показники кількості лейкоцитів у людини (менше, ніж $4 \times 10^9/\text{л}$) вказують на розвиток вірусних інфекцій, сепсису, цирозу печінки й активного гепатиту, а також на прийом людиною різних цитотоксичних препаратів. Подібний патологічний стан називають лейкопенією [44, 45].

У той час підвищені показники кількості лейкоцитів у людини (більше, ніж $8,8 \times 10^9/\text{л}$) вказують на розвиток різних запальних процесів, гострих бактеріальних інфекцій, інтоксикацій, шоку, коматозних станів, гемолітичного кризу, алергічних реакцій, а також різних пухлин. Подібний патологічний стан називають лейкоцитозом [44]. Крім того, підвищення кількості лейкоцитів у крові людини відбувається також при гострих крововтратах через активну проліферацію кістковомозкових елементів [44, 45]. Натомість збільшення кількості лейкоцитів у людській крові до значень, близьких до $50-100 \times 10^9/\text{л}$, або так званий високий лейкоцитоз, охарактеризовує розгорнуту стадію хронічного мієлолейкозу, а також розвиток хронічного лімфолейкозу [44, 45]. Стосовно кількості лейкоцитів у певному об'ємі крові лабораторного щура, вона не відрізняється від такої у людини і входить в межі референтних значень $4-8,8 \times 10^9/\text{л}$ [18, 44].

Отже, референтні значення загальної кількості лейкоцитів у крові ссавців складають $4-8,8 \times 10^9$ клітин, і кількість лейкоцитів, менша за $4 \times 10^9/\text{л}$, охарактеризовує лейкопенію, а кількість лейкоцитів, більша за $8,8 \times 10^9/\text{л}$, відповідно, охарактеризовує лейкоцитоз. У той час кількість лейкоцитів у крові ссавців, що наближається до $50-100 \times 10^9/\text{л}$, охарактеризовує високий лейкоцитоз.

1.2.2. Лейкоцитарна формула

У гематологічному аналізі крові при визначенні лейкоцитарної формули у пофарбованих за Романовським-Гімзою мазках крові ідентифікують різні типи лейкоцитів за формою їхнього ядра, яке через кислий характер нуклеїнових кислот добре забарвлюється у синьо-фіолетовий колір таким лужним гістологічним барвником, як азур II. До таких клітин належать сегментоядерні і паличкоядерні нейтрофіли, еозинофіли, базофіли, лімфоцити і моноцити [17, 44]. Характеристику форми ядра лейкоцитів, що ідентифікуються при визначенні лейкоцитарної формули, представлено у табл. 1.3 [44, 45].

Таблиця 1.3 – Характеристика форми ядра лейкоцитів, що ідентифікуються при визначенні лейкоцитарної формули [44, 45]

Типи лейкоцитів	Форма ядра
Нейтрофіли (сегментоядерні)	3-5-сегментна (у вигляді окремих перетяжок)
Нейтрофіли (паличкоядерні)	Вузька, витягнута у вигляді палички або зігнута у вигляді літери «С»

Продовження таблиці 1.3

1	2
Еозинофіли	2-3-сегментна (у вигляді широких фрагментів)
Базофіли	Невизначена (часто займає усю цитоплазму)
Лімфоцити	Округла чи бобоподібна
Моноцити	Поліморфна (округла чи бобоподібна із вдавленнями)

Стосовно цитоплазми вищезазначених клітин, вона при фарбуванні за Романовським-Гімзою набуває усіх відтінків рожевого кольору. На рис. 1.8 продемонстровано зовнішній вигляд різних типів лейкоцитів у пофарбованому за Романовським-Гімзою мазку крові людини у полі зору мікроскопа [44, 45].

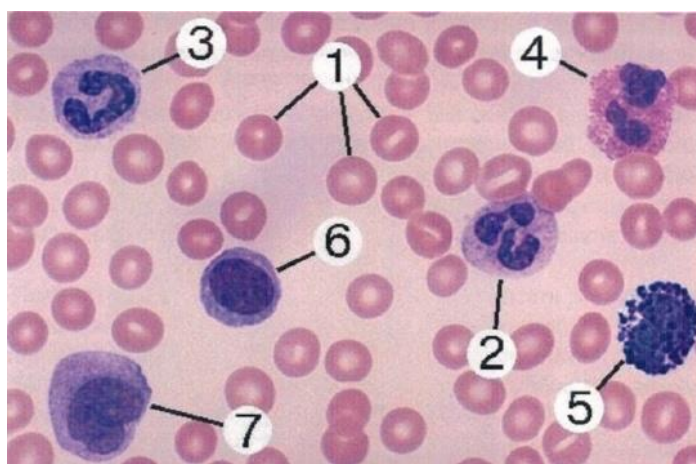


Рисунок 1.8 – Зовнішній вигляд різних типів лейкоцитів (2-7) у пофарбованому за Романовським-Гімзою мазку крові людини у полі зору мікроскопа: 1) еритроцити; 2) нейтрофіл (сегментоядерний); 3) нейтрофіл (паличкоядерний); 4) еозинофіл; 5) базофіл; 6) лімфоцит; 7) моноцит [44].

Стосовно кількості лейкоцитів різного типу або їхнього відсоткового співвідношення у людській крові, у табл. 1.4 відображено лейкоцитарну формулу крові людини у нормі [45].

Таблиця 1.4 – Лейкоцитарна формула крові людини у нормі [45]

Типи лейкоцитів	Референтні значення	
	Кількість в 1 мкл крові	Кількість у %
Нейтрофіли (сегментоядерні)	2000-5500	47-72
Нейтрофіли (паличкоядерні)	40-300	1-6
Еозинофіли	20-300	0,5-5
Базофіли	0-65	0-1
Лімфоцити	1200-3000	19-37
Моноцити	90-600	3-11

Зважаючи на те, що базофіли у більшості випадків не виявляються у пофарбованих за Романовським-Гімзою мазках крові здорових людей, при визначенні лейкоцитарної формули подібний тип лейкоцитів зазвичай пропускають [45].

Знижені чи підвищені показники певних складників лейкоцитарної формули порівняно з референтними значеннями, зазначеними у табл. 1.4, вказують на розвиток певних патологій. Наприклад, зменшення чи збільшення кількості сегментоядерних нейтрофілів (менше, ніж 47%, при так званій нейтропенії або більше, ніж 72%, при так званому нейтрофільозі), зазвичай вказує на розвиток різних гострих респіраторних інфекцій [52, 53, 54]. Щодо абсолютних показників кількості сегментоядерних нейтрофілів при нейтропенії, це менше за $1,8 \times 10^9/\text{л}$ при загальній кількості лейкоцитів $4 \times 10^9/\text{л}$ або ж менше за $4,1 \times 10^9/\text{л}$ при загальній кількості лейкоцитів $8,8 \times 10^9/\text{л}$. Натомість абсолютні показники кількості сегментоядерних нейтрофілів при нейтрофільозі є наступними: це більше за $2,9 \times 10^9/\text{л}$ при загальній кількості лейкоцитів $4 \times 10^9/\text{л}$ або ж більше за $6,3 \times 10^9/\text{л}$ при загальній кількості лейкоцитів $8,8 \times 10^9/\text{л}$ [52, 53, 54].

Стосовно паличкоядерних нейтрофілів, дані щодо зменшення їхньої кількості (менше, ніж 1%) відсутні. Натомість збільшення кількості подібних нейтрофілів (більше, ніж 6%), або так званий регенеративний зсув ядра

нейтрофілів вліво, вказує на розвиток різних інфекцій бактеріальної чи вірусної етіології, а також грибкових інфекцій на прикладі мікроспорії [55, 56, 57]. Щодо абсолютних показників кількості паличкоядерних нейтрофілів при нейтрофільозі, це більше за $0,2 \times 10^9/\text{л}$ при загальній кількості лейкоцитів $4 \times 10^9/\text{л}$ або ж більше за $0,5 \times 10^9/\text{л}$ при загальній кількості лейкоцитів $8,8 \times 10^9/\text{л}$ [55, 56, 57].

Зменшення кількості еозинофілів (менше, ніж 0,5%), або так звана еозинопенія, вказує на розвиток різних запальних процесів, гнійних інфекцій, шоку, стресу та еклампсії, а також спостерігається при інтоксикації різноманітними хімічними сполуками чи важкими металами та зумовлюється активацією адренокортикоїдної системи, при якій еозинофіли затримуються у кістковому мозку. У той час збільшення кількості еозинофілів (більше, ніж 5%), або так звана еозинофілія, вказує на розвиток atopічної алергії та різних паразитарних захворювань, а також спостерігається при таких патологічних станах, як фібропластичний парієтальний ендокардит, вузликівий періартеріт та лімфома Ходжкіна, коли відбувається еозинофільна гіперплазія кісткового мозку і внаслідок цього – інфільтрація різних тканин еозинофілами [54]. Щодо абсолютних показників кількості еозинофілів при еозинопенії, це менше за $0,02 \times 10^9/\text{л}$ при загальній кількості лейкоцитів $4 \times 10^9/\text{л}$ або ж менше за $0,04 \times 10^9/\text{л}$ при загальній кількості лейкоцитів $8,8 \times 10^9/\text{л}$. Натомість абсолютні показники кількості еозинофілів при еозинофілії є наступними: це більше за $0,2 \times 10^9/\text{л}$ при загальній кількості лейкоцитів $4 \times 10^9/\text{л}$ або ж більше за $0,4 \times 10^9/\text{л}$ при загальній кількості лейкоцитів $8,8 \times 10^9/\text{л}$ [54].

Натомість зменшення кількості базофілів, або так звана базопенія, зазвичай ніяк не може діагностуватися через те, що нижньою межею референтних значень кількості подібних типів лейкоцитів є 0%. Але збільшення кількості базофілів (більше, ніж 1%), або так звана базофілія, вказує на розвиток різних алергічних реакцій, хронічного виразкового коліту, лімфоми Ходжкіна, гіпофункціонального стану щитоподібної залози, таких захворювань, як хронічна мієлоцитарна лейкемія, еритремія та

остеомієлофіброз, а також спостерігається при лікуванні синтетичними аналогами естрогену [54]. Щодо абсолютних показників кількості базофілів при базофілії, це більше за $0,04 \times 10^9/\text{л}$ при загальній кількості лейкоцитів $4 \times 10^9/\text{л}$ або ж більше за $0,09 \times 10^9/\text{л}$ при загальній кількості лейкоцитів $8,8 \times 10^9/\text{л}$ [54].

У той час зменшення кількості лімфоцитів (менше, ніж 19%), або так звана лімфопенія, вказує на розвиток тяжких вірусних захворювань, злоякісних пухлин і ниркової недостатності, а також спостерігається при прийомі кортикостероїдів. Збільшення кількості лімфоцитів (більше, ніж 37%), або так званий лімфоцитоз, вказує на розвиток вірусної та цитомегаловірусної інфекції, інфекційного мононуклеозу, хронічної лімфоцитарної лейкемії, гострого вірусного гепатиту, а також макроглобулінемії Вальденстрема [54]. Щодо абсолютних показників кількості лімфоцитів при лімфопенії, це менше за $0,7 \times 10^9/\text{л}$ при загальній кількості лейкоцитів $4 \times 10^9/\text{л}$ або ж менше за $1,6 \times 10^9/\text{л}$ при загальній кількості лейкоцитів $8,8 \times 10^9/\text{л}$. Натомість абсолютні показники кількості лімфоцитів при лімфоцитозі є наступними: це більше за $1,5 \times 10^9/\text{л}$ при загальній кількості лейкоцитів $4 \times 10^9/\text{л}$ або ж більше за $3,3 \times 10^9/\text{л}$ при загальній кількості лейкоцитів $8,8 \times 10^9/\text{л}$ [54].

Нарешті, зменшення кількості моноцитів (менше, ніж 3%), або так звана моноцитопенія, найчастіше спостерігається при гіпоплазії кровотворення, а збільшення кількості моноцитів (більше, ніж 11%), або так званий моноцитоз, вказує на розвиток туберкульозу, септичного ендокардиту, сепсису, а також системного васкуліту [54]. Щодо абсолютних показників кількості моноцитів при монопенії, це менше за $0,1 \times 10^9/\text{л}$ при загальній кількості лейкоцитів $4 \times 10^9/\text{л}$ або ж менше за $0,2 \times 10^9/\text{л}$ при загальній кількості лейкоцитів $8,8 \times 10^9/\text{л}$. Натомість абсолютні показники кількості моноцитів при моноцитозі є наступними: це більше за $0,4 \times 10^9/\text{л}$ при загальній кількості лейкоцитів $4 \times 10^9/\text{л}$ або ж більше за $0,97 \times 10^9/\text{л}$ при загальній кількості лейкоцитів $8,8 \times 10^9/\text{л}$ [54].

Стосовно лейкоцитарної формули лабораторного щура, вона дещо відрізняється від такої у людини. У табл. 1.5 зазначено порівняння лейкоцитарної формули крові 220-денного щура та людини у нормі [18, 45].

Таблиця 1.5 – Лейкоцитарна формула крові 220-денного щура та людини у нормі [18, 45].

Типи лейкоцитів	Референтні значення, %	
	Лабораторні щури	Людина
Нейтрофіли (сегментоядерні)	13,7–30,3	47-72
Нейтрофіли (паличкоядерні)	0,1–0,7	1-6
Еозинофіли	0,8–5,0	0,5-5
Базофіли	–	0-1
Лімфоцити	44,0–97,9	19-37
Моноцити	1,6–5,2	3-11

Згідно з табл. 1.5, відсоткові співвідношення паличкоядерних нейтрофілів, еозинофілів та моноцитів у крові щура та людини є майже ідентичними. У той час кількість сегментоядерних нейтрофілів у крові щурів є значно заниженою порівняно з людиною, кількість лімфоцитів у крові щурів – навпаки, є значно завищеною у порівнянні з людиною, а базофіли у крові щурів переважно відсутні [18, 45].

Отже, лейкоцитарна формула характеризує кількість різних типів лейкоцитів та їхнє відсоткове співвідношення між собою у певній об'ємній одиниці крові. Існують певні референтні значення щодо кількості та відсоткового співвідношення різних типів лейкоцитів у крові, що характерні для здорових ссавців, натомість відхилення від цих референтних значень у меншу чи більшу сторону практично завжди вказує на розвиток певних патологій.

1.2.3. Цитоморфометричні показники лімфоцитів

При визначенні цитоморфометричних показників лімфоцитів під час проведення гематологічного аналізу крові спираються на такі показники, як діаметр клітини. Ще одним цитоморфометричним показником є об'єм клітини, який розраховують виходячи з її діаметру [25].

Відповідно до діаметру лімфоцити розподіляються на такі три морфофункціональні класи [25]:

- малі – активні мігруючі постпроліферативні лімфоцити, а також преапоптотичні лімфоцити;
- середні – тривало циркулюючі лімфоцити, або клітини пам'яті;
- великі – імунобласти, натуральні кілери й активовані Т-лімфоцити.

Стосовно числових показників діаметру лімфоцитів, що входять до різних морфофункціональних класів, у роботі [25] стверджується, що градація діаметрів лімфоцитів, що входять до складу того чи іншого морфофункціонального класу, дещо відрізняється у людини і лабораторного щура. У табл. 1.6 представлено характеристику морфофункціональних класів лімфоцитів людини та щура стосовно їхнього діаметру.

Таблиця 1.6 – Характеристика морфофункціональних класів лімфоцитів людини та щура стосовно їхнього діаметру [25]

Морфофункціональний клас лімфоцитів	Діаметр лімфоцитів, мкм	
	Людина	Щур
Малі	4,5–7	≤ 8
Середні	7–10	8,5-11
Великі	10–18	≥ 11,5

Згідно з табл. 1.6, розмірні характеристики лімфоцитів того чи іншого морфофункціонального класу у людини та щура відрізняються на 1 мкм, що

слід враховувати при визначенні цитоморфометричних показників лімфоцитів у зразках крові, отриманих від людини та щура [25].

У полі зору мікроскопа лімфоцити різного діаметру у пофарбованих за Романовським-Гімзою мазках крові легко детектуються із використанням об'єктива зі збільшенням $100\times$, об'єкта-мікрометра та окуляра-мікрометра $K7\times$ з сіточкою Автандилова, при цих умовах 1 умовна одиниця сіточки становить 6 мкм. Діаметр досліджуваних клітин із використанням цифрової камери співвідносять із розмірною сіткою, і за множенням ціни поділки на ймовірну кількість поділок, яку «займає» той чи інший лімфоцит, визначають числове значення діаметру цих клітин [25].

Мікрофотографію лімфоцитів у пофарбованому за Папенгеймом мазку крові щура зображено на рис. 1.9 [18].

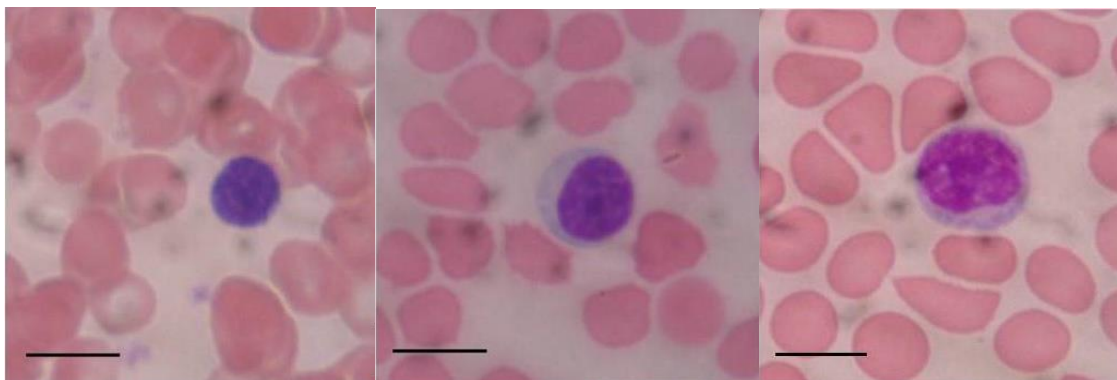


Рисунок 1.9 – Мікрофотографія лімфоцитів у пофарбованому за Папенгеймом мазку крові щура. Збільшення – $100\times$, шкала – 10 мкм: малий лімфоцит (зліва); середній лімфоцит (посередині) та великий лімфоцит (справа) [18].

Стосовно відсоткового співвідношення лімфоцитів того чи іншого діаметру у крові людей та щурів, у табл. 1.7 зазначено так звану лімфоцитарну формулу крові людини і щура у нормі [18, 19].

Таблиця 1.7 – Лімфоцитарна формула крові людини і щура у нормі [18, 19, 25]

Морфофункціональний клас лімфоцитів	Кількість лімфоцитів, %	
	Людина, n = 10, $\bar{x}_{cp} \pm m$	Лабораторні щури, n = 10, Me(Q1;Q3)
Малі	21,7 ± 1,30	43,0 (31,5; 59,8)
Середні	62,3 ± 1,53	45,0 (31,8; 57,0)
Великі	16,0 ± 1,16	10,0 (7,5; 12,3)

Згідно з табл. 1.7, у крові щура кількість малих лімфоцитів є значно завищеною порівняно з людиною, тоді як кількість середніх та великих лімфоцитів у крові щура є дещо нижчою, ніж у людини [18, 19].

Отже, до цитоморфометричних показників лімфоцитів відносяться в основному показники діаметру цих клітин, який при мікроскопічному дослідженні визначається із застосуванням окуляра-мікрометра. Відповідно до цього лімфоцити бувають малі, середні та великі, і градація числових значень діаметру різних лімфоцитів так само, як і відсоткове співвідношення цих лімфоцитів у крові, є різною у людини та щура.

1.3. Відомості щодо впливу *Hirudo verbana* на цитологічні показники крові

Автори Р. Kvapil, О. Tomášek, Е. Bártová та ін. при проведенні досліджень [17] встановили, що у крові, взятої із використанням медичних п'явок будь-якого виду (до них може зокрема відноситися й *H. verbana*), значно змінюється цитологічний склад порівняно із кров'ю, отриманою звичайним методом. Це може пояснюватися фізіологічними особливостями травної системи п'явок, при якій із крові, яку п'явка спожила, видаляється

рідка частина, тобто відбувається так звана дегідратація крові із подальшим зменшенням її об'єму, внаслідок чого відповідно до зменшеного об'єму самої крові змінюється концентрація її формених елементів.

При дегідратації крові в тілі п'явки концентрація формених елементів у цій крові зазвичай збільшується (це зокрема стосується еритроцитів, лейкоцитів загалом, лімфоцитів і тромбоцитів). Стосовно тромбоцитів, незважаючи на антикоагулянтні властивості слини п'явок, концентрація подібних елементів у спожитій п'явкою крові є вищою за контроль, адже такі сполуки, що діють на тромбоцити, як апіраза, калін, саратин і декорсин, володіють антиагрегаційними властивостями шляхом пригнічення функції цих клітин без їх апоптозу, тож їхня концентрація загалом залишається сталою у крові, натомість є підвищеною через дегідратацію [2, 17].

У той час концентрація інших формених елементів спожитої п'явкою крові (наприклад, нейтрофілів), навпаки, знижується через те, що ці клітини, знаходячись в тілі п'явки, тобто в чужорідному середовищі, піддаються реакції за типом «трансплантант проти хазяїна» і характеризуються підвищеною імунологічною дією, причому однократною, після чого вони гинуть шляхом апоптозу. Але концентрація таких елементів, як моноцити, залишається незмінною порівняно з контролем, що може вказувати на те, що ці клітини порівняно з нейтрофілами не дуже сильно реагують на реакцію за типом «трансплантант проти хазяїна», тож поряд зі збільшенням концентрації цих клітин у дегідратованій крові ця ж концентрація одночасно зменшується із тією самою швидкістю, що зовні спостерігається як збереження сталої концентрації моноцитів [25, 58].

Натомість автори Р. Ф. Амінов та О. К. Фролов при проведенні досліджень із визначення гематологічних показників крові, взятої від тварин після гірудовпливу видом *Hirudo verbana*, у 220-денних самок щурів (*Rattus norvegicus*) [59] встановили, що екстракт слини, виділений від цих п'явок, дещо підвищує кількість лейкоцитів, еритроцитів, паличкоядерних нейтрофілів (і нейтрофілів загалом), лімфоцитів та еозинофілів і дещо знижує

кількість сегментоядерних нейтрофілів та моноцитів у зразках крові порівняно з контролем. У табл. 1.8 представлені гематологічні показники крові 220-денних самок щурів, взятої звичайним методом (контрольна група) і після гірудовпливу *H. verbana*.

Таблиця 1.8 – Гематологічні показники крові 220-денних самок щурів, взятої звичайним методом (контроль) і після гірудовпливу *Hirudo verbana* [59, 60, 61]

Показник	Контроль, n = 20	Вплив слини <i>H. verbana</i> , n = 20
Лейкоцити ($\times 10^9/\text{л}$)	$5,02 \pm 0,25$	$8,16 \pm 0,66$
Еритроцити ($\times 10^{12}/\text{л}$)	$7,08 \pm 0,40$	$8,78 \pm 0,29$
Лейкоцитарна формула		
Паличкоядерні нейтрофіли (%)	$8,01 \pm 0,29$	$9,61 \pm 0,22$
Сегментоядерні нейтрофіли (%)	$14,20 \pm 1,42$	$13,96 \pm 1,02$
Нейтрофіли загалом (%)	$22,41 \pm 1,02$	$23,57 \pm 1,31$
Лімфоцити (%)	$70,09 \pm 1,48$	$70,51 \pm 1,64$
Моноцити (%)	$7,40 \pm 0,88$	$5,46 \pm 0,22$
Еозинофіли (%)	$0,30 \pm 0,02$	$0,46 \pm 0,06$

До того ж Р. О. Литвиненко при визначенні співвідношення лімфоцитів різного діаметру у крові молодих статевозрілих лабораторних щурів (*Rattus norvegicus*), взятої після гірудовпливу [25] встановила, що слина п'явок після курсу гірудовпливу значно підвищує рівень малих і знижує рівень середніх лімфоцитів, а також незначно знижує рівень великих лімфоцитів.

У табл. 1.9 зазначено так звану лімфоцитарну формулу крові щура у нормі та через 24 год. після останнього сеансу гірудовпливу.

Таблиця 1.9 – Лімфоцитарна формула крові щура у нормі (контроль) та після гірудовпливу (через 24 год після останнього сеансу), Me(Q1;Q3) [25]

Морфофункціональний клас лімфоцитів	Норма (контроль), n = 10	Після гірудовпливу (через 24 год), n = 10
Малі, %	43,0 (31,5; 59,8)	75,0 (59,8; 77,3)
Середні, %	45,0 (31,8; 57,0)	18,0 (15,5; 28,3)
Великі, %	10,0 (7,5; 12,3)	9,0 (5,5; 11,5)

Але незважаючи на помітні зміни у цитологічному складі крові, яка отримується із використанням п'явок будь-якого виду, автори Р. Kvapil, О. Tomášek, Е. Bártoová та ін. [17] вважають, що подібний неінвазивний метод забору крові все ж є досить надійним та ефективним для дослідження гематологічних та біохімічних параметрів крові. При цьому отримані результати дослідження можна легко «підігнати» під ті результати, які отримуються при дослідженні крові, взятої звичайним методом, шляхом множення чи ділення отриманих результатів на коефіцієнти кореляції, які можна отримати при здійсненні кореляційного аналізу за Пірсоном.

Отже, п'явки виду *H. verbana* значно змінюють цитологічний склад крові, який можна легко «скоригувати» зі здійсненням кореляційного аналізу за Пірсоном. Зважаючи на це, неінвазивний метод забору крові із використанням п'явок виду *H. verbana* можна вважати надійним та ефективним для визначення гематологічних та біохімічних параметрів крові.

2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали для дослідження та характеристика біологічних об'єктів

Для проведення дослідження було відібрано 9 умовно здорових донорів віком 27-46 років, які дали згоду на проведення досліджень, 10 статевозрілих лабораторних щурів віком 7-8 місяців та медичні п'явки виду *H. verbana*.

В експеримент взято товарних медичних п'явок виду *H. verbana* (Carena, 1820) віком 6-8 місяців, яких востаннє годували кров'ю великої рогатої худоби 4 місяці тому. Медичних п'явок вирощували на базі навчально-науково-дослідної лабораторії клітинної та організменної біотехнології Запорізького національного університету згідно з ТУ У 05.0-02125243-002:2009 «П'явка медична» (санітарно-епідеміологічний висновок МОЗ України № 05.03.02-06/49982, від 12.08.2009 р.) [62].

Перед приставкою п'явок в обстежуваних брали кров із ліктвової вени (контроль) та стабілізували гепарином. Забір крові у людини здійснювали також з шлункової кишки медичної п'явки одразу після її годування до повного насичення на тілі людини [25, 63]. Медичних п'явок приставляли на ділянку пупка, лона та печінки добровольців.

У лабораторних щурів отримували кров із хвоста [49] та після приставки медичної п'явки на область тазу та стегна [49].

Час гірудотерапії становив близько 35-60 хвилин, після чого з п'явки механічним шляхом відбирали необхідну кількість крові обстеженого.

У зразках крові аналізували загальноприйнятими методами загальну кількість лейкоцитів, лейкоцитарну формулу та цитоморфометричні показники лімфоцитів.

2.2. Методи досліджень

2.2.1. Методика отримання різних зразків крові з біологічних об'єктів

Спочатку у всіх піддослідних біологічних об'єктів отримували контрольні зразки крові звичайним методом, а також збирали кров із застосуванням п'явок виду *H. verbana*.

У людей-донорів контрольні зразки крові отримували вранці натщесерце з вени, кров стабілізували гепарином [44].

Стосовно щурів, у них контрольні зразки крові отримували шляхом відсікання кінчика хвоста [49]. Для цього фіксували наркотизованого, розігрівали хвіст шляхом занурення його в теплу воду (35 °C). Приготували меланжер і ножиці. Виймали хвіст з води, обсушували його чистою ганчіркою і оброблювали спиртом. Гострою бритвою робили надріз кінчика хвоста навскіс, по спіралі. Стиснули частину хвоста двома пальцями і таким чином проводили по шкірі хвоста до його кінчика. Краплю, яка з'явилася швидко набирали у меланжер до потрібної позначки [49].

Далі отримували зразки крові від щурів та людей-донорів із застосуванням п'явок виду *H. verbana*.

У донорів ділянку біля печінки, в області лона та пупка протирали стерильним ватним диском, змоченим у холодній кип'яченій водопровідній воді, а потім витирали насухо. Далі до місця інвазії прикладали по одній п'явці, і чекали допоки п'явка після харчування не відпаде з місця прикріплення, а до самих місць інвазії з метою зупинки кровотечі прикладали стерильні ватні диски.

У лабораторних щурів отримували кров із хвоста та після приставки медичної п'явки на область тазу та стегна. Маніпуляцію приставки медичної п'явки проводили при короткочасній фіксації тварини, голили хутро в ділянці тазу та стегна і виконували приставку медичної п'явки. Для певності результату вносили в шприц 2 п'явки, після присмокування однієї, іншу

знімали, тому годування проходила лише одна п'явка (20-45 хв.). Після насичення та відпадання медичної п'явки від тіла лабораторного щура ранку присипали стерильним порошком крейди [25].

У самих п'явок механічним шляхом отримували кров зі шлункової кишки згідно методу [25].

Кожного разу після збирання того чи іншого зразка крові у пробірки, аби при проведенні подальших досліджень точно знати, який саме зразок аналізується, на пробірках окремими літерами за допомогою маркеру помічали наступну інформацію:

- біологічний об'єкт, з якого взятий зразок крові (наприклад, Щ – щур, Л – людина), а також порядковий номер цього об'єкту;
- тип крові (наприклад, В – венозна, Х – кров із хвоста, П – кров, що отримана із використанням п'явок).

2.2.2. Методика визначення загальної кількості лейкоцитів

Загальну кількість лейкоцитів у різних зразках крові підраховували із використанням камери Горяєва. Перед цим із кожної пробірки з тим чи іншим зразком крові за допомогою дозатора відбирали по 20 мкл крові, які потім розводили у 20 разів 3% розчином оцтової кислоти, підфарбованим краплею метиленового синього, наступним чином.

До 20 мкл кожного зразка крові із використанням дозатора додавали 380 мкл приготовленого власноруч 3% розчину оцтової кислоти, який одразу після приготування підфарбували однією краплею метиленового синього (20 мкл). Потім камеру Горяєва та покривне скло насухо протирали марлею.

Далі саме покривне скло акуратно притирали до камери Горяєва, злегка надавлюючи на нього до появи кольорових кілець Ньютонa. Після цього

камеру Горяєва заповнювали розведеною у 20 разів краплею крові і витримували її протягом 1 хвилини для зупинки руху клітин крові.

При малому збільшенні мікроскопа (окуляр К7×, об'єктив ×20) підраховували лейкоцити у 100 великих квадратах камери Горяєва. При цьому враховували лише ті клітини, які знаходилися усередині квадрату, а також доторкалися до лівої та верхньої межі кожного квадрату.

Після роботи камеру Горяєва дезінфікували у 70% розчині етилового спирту протягом 30 хвилин, а потім її промивали дистильованою водою і протирали м'якою серветкою [3, 19, 44].

Розрахунок числа лейкоцитів в 1 мкл крові здійснювали, виходячи зі ступеня розведення крові (20) та числа великих квадратів камери Горяєва (100), за наступною формулою:

$$X = \frac{a \times 250 \times 20}{100} \quad (2.1)$$

де:

- а – число лейкоцитів, підрахованих у 100 великих квадратах камери Горяєва;
- 250 – множник, який приводить результат підрахунку до об'єму в 1 мкл (об'єм великого квадрату 1/250 мкл);
- 20 – ступінь розведення крові;
- 100 – кількість великих квадратів у камері Горяєва.

Для простоти, зробивши ряд скорочень у наведеній формулі, для представлення результату щодо кількості лейкоцитів у 1 мкл крові кількість підрахованих лейкоцитів множили на 50. Для представлення результату щодо кількості лейкоцитів у 1 л крові кількість підрахованих лейкоцитів, відповідно, множили на 50×10^6 [3, 19, 44].

2.2.3. Методика визначення лейкоцитарної формули крові

Перед визначенням лейкоцитарної формули готували мазки крові за наступним методом. Спочатку чисте предметне скло за два краї брали великим та вказівним пальцями лівої руки і на відстані близько 1 см від того краю скла, який прилягав до вказівного пальця лівої руки, за допомогою дозатора наносили краплю крові об'ємом 20 мкл. Потім пальцями правої руки біля краплі крові встановлювали шліфувальне скло під кутом 30-45° і обережно просували його до моменту зіткнення його краю із краплею крові. Після цього шліфувальне скло плавно просували у напрямку до того краю предметного скла, який прилягав до великого пальця лівої руки, роблячи рівномірний мазок, який закінчувався на відстані 1-3 см від зазначеного краю предметного скла. Далі мазки сушили на відкритому повітрі доти, поки вони не ставали сухими, і на кожному предметному склі із висušеним мазком за допомогою маркера на вільній від мазка частині позначали літерами біологічний об'єкт і тип крові, а також порядковий номер того чи іншого біологічного об'єкту. Після цього мазки крові фіксували шляхом їхнього занурення у 95% етиловий спирт на 10-15 хвилин [3, 44].

Потім фіксовані мазки висušували на повітрі і фарбували за Романовським-Гімзою наступним чином. Спочатку перед фарбуванням кожного мазка готували робочий розчин із розрахунку ~3 мл на мазок, змішуючи розчин барвника Азур-еозин по Романовському (що містив також метиленовий синій) із дистильованою водою у співвідношенні 1:9. Отриманий робочий розчин за допомогою дозатора у кількості 3 мл наносили на кожний висušений і фіксований мазок крові, витримуючи 25-40 хвилин. Потім пофарбовані мазки промивали дистильованою водою, диференціювали в підкисленій дистильованій воді та промивали кількома порціями дистильованої води і висušували на відкритому повітрі.

Далі проводили мікроскопічне дослідження пофарбованих мазків крові з метою визначення лейкоцитарної формули. Для цього спочатку предметне скло із мазком крові поміщали на столик мікроскопа і при малому збільшенні знаходили будь-який край мазка та аналізували якість препарату.

Потім, в області «щіточки» препарату на ділянку дослідження під об'єктивом за допомогою дозатора наносили краплю імерсійної олії об'ємом 20 мкл. Після цього проводили власне мікроскопічне дослідження мазка, переводячи імерсійний об'єктив у вертикальне положення і тим самим занурюючи його кінець в імерсійну олію. Далі злегка рухали макрогвинт для отримання в полі зору мікроскопа певного зображення. Потім за допомогою мікрогвинта встановлювали більш чітку видимість зображення [3, 44].

Після цього у полі зору мікроскопа рахували не менше 200 лейкоцитів. Серед прорахованих клітин визначали відсоткове співвідношення тих чи інших типів лейкоцитів на основі їх морфологічних ознак та відмічали їх кількість за допомогою 11-клавійного лічильника [3, 44].

2.2.4. Визначення цитоморфометричних показників лімфоцитів крові

Цитоморфометричне дослідження лімфоцитів периферичної крові здійснювали в мазку крові відповідно до методики [25]. Паралельно з визначенням лейкоцитарної формули крові аналізували середні лінійні розміри (діаметр) не менше 100 лімфоцитів у мазку з використанням окуляр-мікрометра на площі половини мазка крові. Вимірювання проводили за допомогою окуляр-мікрометра (об'єктив 100×, окуляр К7×), ціну поділки потім виставляли за об'єкт-мікрометром [25]. Вимірювали максимальний та мінімальний діаметр клітини, після чого визначали середнє значення. Далі знаходили діаметр клітини в мкм, для чого середній діаметр множили на ціну поділки. Після цього склали варіаційний ряд розмірних класів лімфоцитів з

інтервалом 1 мкм і об'єднували їх у групи: у людини малі (середній діаметр 7,0 мкм), середні (діаметр 7,5-10 мкм), великі (діаметр $\geq 10,5$ мкм), у лабораторних щурів малі (середній діаметр $\leq 8,5$ мкм), середні (діаметр $> 8,5 - < 11,0$ мкм), великі (діаметр $\geq 11,0$ мкм). Визначали кількість кожного класу у відсотках [18, 25].

По завершенні дослідження кожне предметне скло із тим чи іншим пофарбованим мазком крові прибирали зі столика мікроскопа, видаляли з нього імерсійну олію і клали у картонну коробку для довготривалого зберігання, а також здійснювали догляд за самим мікроскопом щоразу після закінчення роботи з ним.

2.2.5. Методи статистичної обробки даних

Результати дослідження статистично обробляли із використанням пакету прикладних програм Microsoft XP «Excel» та IBM SPSS Statistics 20,0 (USA). Статистичну обробку проводили параметричним методом (t-критерій Стьюдента) [64].

Середнє арифметичне значення визначається за формулою [2.2]:

$$\bar{X} = \sum \frac{Xi}{n} \quad (2.2)$$

де n – кількість випадків;

Σ – сума варіантів.

Середнє квадратичне відхилення розраховується за формулою [2.3]:

$$\sigma = \pm \sqrt{\sum \frac{(x-x)^2}{(n-1)}} \quad (2.3)$$

Похибка середнього арифметичного значення обчислюється за формулою [2.4]:

$$m_x = \frac{\sigma}{\sqrt{(n-1)}} \quad (2.4)$$

Достовірність різниці визначається за формулою [2.5]:

$$t_d = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{m_{\bar{X}_1}^2 + m_{\bar{X}_2}^2}} \quad (2.5)$$

Показник вірогідності (P) відшукується по таблиці Ст'юдента на підставі даних (t_d) [64, 65].

3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1. Загальна кількість лейкоцитів, лейкоцитарна формула та цитоморфометричні показники лімфоцитів людини при використанні *Hirudo verbana* як неінвазивного інструменту для забору крові

Загальна кількість лейкоцитів та лейкоцитарна формула венозної крові донорів, отриманих із застосуванням звичайного способу (забір крові з вени) та з використанням *H. verbana* (таблиця 3.1) згідно табл. 1.4 (див. пункт 1.2.2) знаходяться в межах референтних значень.

Таблиця 3.1 – Загальна кількість лейкоцитів та лейкоцитарна формула крові добровольців, отриманої звичайним методом та із використанням *Hirudo verbana*, $\bar{x} \pm m$

Показник, од. вимірювання	Венозна кров, взята звичайним способом (контроль), n=9	Кров із використанням <i>H. verbana</i> , n= 9
Загальна кількість лейкоцитів, Г/л	5,79 ± 0,421	7,02 ± 0,405*
Еозинофіли, %	2,67 ± 0,464	2,06±0,306*
Нейтрофіли паличкоядерні, %	4,44 ±0,664	4,06 ±0,412
Нейтрофіли сегментоядерні, %	59,4 ± 2,27	56,3 ± 2,12
Моноцити, %	3,95 ± 0,475	5,06 ±0,460
Лімфоцити, %	29,56 ±2,19	32,56 ± 1,959
Лімфоцити, Г/л	1,67 ± 0,120	2,32 ±0,226*

Примітка. * - показники достовірно відрізняються від контролю при $p \leq 0,05$.

Загальна кількість лейкоцитів крові донорів, отриманої із використанням *H. verbana*, була вищою на 21,2% ($p \leq 0,05$) порівняно зі звичайним методом забору крові і становила $7,02 \pm 0,405$ Г/л, при $5,79 \pm 0,421$ Г/л в контролі, що імовірно обумовлено дегідратацією спожитої крові через те, що медична п'явка «пітніє» при годуванні, тобто виділяє назовні воду з плазми крові годувальника [17, 25]. При аналізі відмінностей в лейкоцитарній формулі крові донорів, отриманої із використанням *H. verbana*, виявлено статистично значиме зменшення відносного вмісту еозинофілів на 22,8% ($p \leq 0,05$) з $2,67 \pm 0,464\%$ у контролі, до $2,06 \pm 0,306\%$ у досліді і збільшення абсолютної кількості лімфоцитів на 38,9% ($p \leq 0,05$) з $1,67 \pm 0,120$ Г/л в контролі до $2,32 \pm 0,226$ Г/л в досліді, тенденцію ($p \geq 0,05$) до зменшення відносного вмісту паличко- та сегментоядерних нейтрофілів на 8,6 та 5,2% відповідно, тенденцію ($p \geq 0,05$) до збільшення відносного вмісту моноцитів та лімфоцитів на 28,1 та 10,1% відповідно.

Співвідношення малих, середніх та великих цитоморфометричних класів лімфоцитів крові донорів, отриманої звичайним способом та з використанням *H. verbana* представлено в таблиці 3.2.

Аналізуючи кількість лімфоцитів донорів кожного окремого цитоморфометричного класу, то згідно табл. 3.2 виявлено, що показники крові зі шлункової кишки п'явки *H. verbana* та венозної крові статистично відрізняються ($p \leq 0,05$), зокрема в крові зі шлункової кишки п'явки зменшується відносна кількість середніх лімфоцитів на 40% від $68,11 \pm 2,245\%$ в контролі до $40,89 \pm 2,508\%$ в досліді та збільшується відносна кількість великих лімфоцитів на 202,6% від $12,78 \pm 1,60\%$ в контролі до $38,67 \pm 2,134\%$ в досліді.

Таблиця 3.2 – Цитоморфометричні класи лімфоцитів крові добровольців, отриманої звичайним методом та із використанням *Hirudo verbana*, $\bar{x} \pm m$

Цитоморфометричні класи лімфоцитів, %	Венозна кров, взята звичайним способом (контроль), n=9	Кров із використанням <i>H. verbana</i> , n= 9
Малі лімфоцити ($\leq 7,0$ мкм), %	19,11 \pm 2,245	20,44 \pm 2,000
Середні лімфоцити (7,5-10 мкм), %	68,11 \pm 2,245	40,89 \pm 2,508*
Великі лімфоцити ($\geq 10,5$ мкм), %	12,78 \pm 1,60	38,67 \pm 2,134*

Примітка. * - показники достовірно відрізняються від контролю при $p \leq 0,05$.

3.2 Загальна кількість лейкоцитів, лейкоцитарна формула та цитоморфометричні показники лімфоцитів лабораторних щурів при використанні *Hirudo verbana* як неінвазивного інструменту для забору крові

У табл. 3.3 продемонстровано результати визначення загальної кількості лейкоцитів та лейкоцитарної формули крові щурів, отриманої із використанням *Hirudo verbana*. Загальна кількість лейкоцитів була вищою у зразках «п'явочної» крові щурів на 31,4% і становила $8,66 \pm 0,479$ Г/л в контролі та $11,38 \pm 0,407$ Г/л в досліді ($p \leq 0,05$). Стосовно визначення лейкоцитарної формули у зразках «п'явочної» крові щурів, було виявлено, що лейкоцитарна формула крові щурів, отриманої від п'явки, відрізняється від тієї, що отримана із застосуванням звичайного способу забору крові, причому

в бік збільшення абсолютної кількості лімфоцитів, зменшення еозинофілів та збільшення паличкоядерних нейтрофілів ($p \leq 0,05$), виявлена тенденція до збільшення відносної кількості лімфоцитів, моноцитів, зменшення сегментоядерних нейтрофілів при $p > 0,05$. При порівнянні визначених показників із даними в табл. 1.5 (див. пункт 1.2.2) щодо референтних показників лейкоцитарної формули крові щурів, всі визначені показники опинилися в межах референтних значень.

Таблиця 3.3 – Результати визначення лейкоцитарної формули крові лабораторних щурів, отриманої звичайним методом та із використанням *Hirudo verbana*, $\bar{x} \pm m$

Показник, од. вимірювання	Кров із хвоста, взята звичайним способом (контроль), n=5	Кров із використанням <i>H. verbana</i> , n= 5
Загальна кількість лейкоцитів, Г/л	8,66 ± 0,479	11,38 ± 0,407*
Еозинофіли, %	3,7 ± 0,20	2,5 ± 0,224*
Нейтрофіли паличкоядерні, %	1,4 ± 0,187	2,6 ± 0,400*
Нейтрофіли сегментоядерні, %	23,8 ± 2,06	19,1 ± 1,43
Моноцити, %	3,5 ± 0,32	4,1 ± 0,33
Лімфоцити, %	67,6 ± 1,93	71,7 ± 1,81
Лімфоцити, Г/л	5,85 ± 0,352	8,18 ± 0,472*

Примітка. * - показники достовірно відрізняються від контролю при $p \leq 0,05$.

У табл. 3.4 зазначено результати визначення цитоморфометричних показників крові щурів, отриманої звичайним методом та із використанням *Hirudo verbana*. Щодо цитоморфометричних показників лімфоцитів, у

«п'явочній» крові щурів на відміну від тієї, що була взята звичайним методом, відмічена тенденція до збільшення відносної кількості малих та великих лімфоцитів і зменшення відносної кількості середніх лімфоцитів. При цьому серед усіх лімфоцитів переважну більшість складають лімфоцити малого діаметру, далі за ними слідує лімфоцити середнього діаметру, а найменшу кількість складають лімфоцити великого діаметру.

Таблиця 3.4 – Цитоморфометричні класи лімфоцитів крові лабораторних щурів, отриманої звичайним методом та із використанням *Hirudo verbana*, $\bar{x} \pm m$

Цитоморфометричні класи лімфоцитів, %	Кров із хвоста, взята звичайним способом (контроль), n=5	Кров із використанням <i>H. verbana</i> , n= 5
Малі лімфоцити ($\leq 8,5$ мкм), %	48,8 \pm 8,24	58,8 \pm 7,00
Середні лімфоцити ($> 8,5 - < 11,0$ мкм), %	43,8 \pm 8,47	30,8 \pm 4,32
Великі лімфоцити ($\geq 11,0$ мкм), %	7,4 \pm 0,87	10,4 \pm 3,34

Але незважаючи на помітні зміни у цитологічному складі крові, яка отримується із використанням п'явок будь-якого виду, автори Р. Kvapil, О. Tomášek, Е. Bártoová та ін. [17] вважають, що подібний неінвазивний метод забору крові все ж є досить надійним та ефективним для дослідження гематологічних та біохімічних параметрів крові. При цьому отримані результати дослідження можна легко «підігнати» під ті результати, які отримуються при дослідженні крові, взятої звичайним методом, шляхом множення чи ділення отриманих результатів на коефіцієнти кореляції, які можна отримати при здійсненні кореляційного аналізу за Пірсоном.

4 ОХОРОНА ПРАЦІ

Охорона праці при виконанні досліджень – це важливий етап, перед початком експерименту, так як це запобігає виникненню травм та розвитку професійних захворювань внаслідок нещасних випадків. Експериментальна частина моєї кваліфікаційної роботи полягає у вивченні цитоморфометричних показників лімфоцитів при використанні п'явки аптечної як неінвазивного інструменту для забору крові ссавців, а саме людини та лабораторних щурів. З даної теми можна зрозуміти, що в першу чергу потрібно працювати із кров'ю ссавців (людини, лабораторних щурів) та медичною п'явкою, що може нести небезпеку, тому потрібен захист від різних біологічних рідин організму, які ми досліджуємо. Також ми працюємо з різними хімічними речовинами, скляним посудом та електроприладами, що також можуть нести загрозу для здоров'я.

Дослідження проводилися в навчально-науково-дослідній лабораторії клітинної та організменної біотехнології Запорізького національного університету.

Перед початком роботи зі мною був проведений інструктаж за інструкцією № 60 з охорони праці «При роботі з хімічними реактивами та скляним посудом» та за інструкцією № 62 «При роботі з електричними приладами» з реєстрацією у спеціальному журналі інструктажів при роботі в лабораторії. Інструктаж з охорони праці завершився усною перевіркою набутих знань, а також умінь і навичок безпечних прийомів роботи.

Обов'язковою умовою проведення експерименту є підтримка санітарно-гігієнічного режиму лабораторії. Такі параметри, як температура, вологість, освітленість, швидкість руху повітря й атмосферний тиск протягом усього експерименту, відповідали вимогам ДСН 3.36.042 99. Важливу роль при роботі в лабораторії має провітрювання. Склад повітря: кисень – 20,93%, вуглекислий газ – 0,04%, азот – 78,08%, інертні гази – 0,94%. Провітрювання необхідне для відновлення концентрації кисню в повітрі закритого

приміщення, а також для зниження концентрації вуглекислого газу. Для запобігання переохолодженню та пов'язаних із цим захворювань надмірних протягів не влаштовувала [66-69].

При роботі з електрообладнанням чітко дотримувалася правил техніки безпеки, не працювала з електроприладами із ушкодженою ізоляцією, а також не працювала із незаземленим обладнанням [68].

Своє робоче місце тримала в чистоті, були поруч матеріали та обладнання, які потрібні були виключно для експерименту. В лабораторії категорично забороняється пити воду та вживати їжу. Заборонялося працювати без наукового керівника або лаборанта в лабораторії [70].

Хімічний посуд повинен бути абсолютно чистим, і без виконання цієї умови працювати не можна. Для відмірювання кожного реактиву потрібно мати мірний посуд (піпетки, бюретки, мензурки, циліндр або мірний стакан), при цьому не слід виливати надлишок налитого в пробірку реактиву назад в ємність, щоб не зіпсувати реактив. При проведенні дослідів у лабораторії використовується хімічний посуд загального і спеціального призначення. Дуже часто використовуються пробірки. Неприпустимо, щоб пробірка була наповнена до країв, аби уникнути вихлюпування і потрапляння рідин на шкіру експериментатора [66].

При проведенні досліджень я використовувала світловий мікроскоп. З метою уникнення перенавантаження очей, що може привести до погіршення гостроти зору, я уникала тривалого контакту з мікроскопом. Після роботи з мікроскопом були короточасні перерви для відпочинку, а також гімнастика для очей [70].

З метою запобігання нещасним випадкам у навчальній лабораторії експерименти треба проводити акуратно та уважно. Площа, що припадає на одного працюючого, повинна бути не менше 4,5 м². Під час експерименту завжди користувалася медичним халатом. При роботі з біологічними рідинами та хімічними реактивами працювала у медичних рукавичках та окулярах [70].

Перед початком роботи треба отримати дозвіл на виконання роботи, одягти спеціальний одяг, ознайомитися з правилами безпеки робіт, а також обладнанням, матеріалами та інструментами. У лабораторії не можна працювати одному, наявність другої особи необхідна для надання допомоги при нещасних випадках [70].

При проведенні дослідів у лабораторії застосовується хімічний посуд загального і спеціального призначення, зокрема мірний. При митті посуду треба стежити за тим, щоб його не вдарявся об дно і стінки посуду, що може призвести до биття скляних предметів та травмування. У раковину забороняється виливати концентровані розчини кислот і лугів, що сильно пахнуть, та отруйні речовини, і т. п. При виливанні в раковину таких речовин є можливим їхнє випаровування й отруєння повітря лабораторії та прилеглих приміщень. Концентровані кислоти і луги необхідно попередньо сильно розбавити чи нейтралізувати, щоб уникнути руйнування каналізаційної мережі.

Так як працювала з кислотами, був проведений повторний інструктаж для запобігання нещасних випадків та надання медичної допомоги. При хімічних опіках шкіри необхідно видалити відповідним розчинником речовину, яка стала їх причиною, а потім обробити уражену ділянку етанолом і змазати маззю від опіків. При опіках кислотами уражену ділянку треба промити сильним струменем проточної води, а потім обробити 3% розчином натрій гідрогенкарбонату. При опіках їдкими лугами уражену ділянку треба промити водою, обробити 3% розчином оцтової чи борної кислоти, а потім знову промити водою. При опіках очей кислотою необхідно промити їх великою кількістю води, потім обробити тампоном, змоченим у 3% розчині натрій гідрогенкарбонату, і знову промити водою. Після цього потрібно негайно звернутися до лікаря.

При порізах потрібно пінцетом, попередньо обробленим спиртом, видалити з рани видимі шматочки скла, промити рану дистильованою водою,

а потім змастити 5% спиртовим розчином йоду і забинтувати. Невеликі порізи можна заклеїти антисептичним пластиром.

При роботі на комп'ютерах йде сильне навантаження на зір за участю високочастотних електромагнітних випромінювань, а також на опорно-руховий апарат. Щоб запобігти впливу шкідливих факторів, я дотримувалась певних правил. Відстань від очей до екрану дисплея повинна становити 50-70 см, кут зору 10-20°, але не більше 40°. Враховуючи те, що тривала робота з комп'ютером призводить до іонізації приміщення позитивними та негативними іонами, а також з метою відпочинку очей, я через кожну годину робила перерви на 20 хвилин. В цей час провітрювалась кімната. Так як робота з комп'ютером є роботою з тривалим перебуванням у фіксованій позі, під час перерви я виконувала фізичні вправи та вправи для очей [71].

Дотримувалася правил протипожежної безпеки. При виникненні пожежі, в першу чергу, дії повинні бути спрямованні на забезпечення безпеки та евакуації людей. При виявленні пожежі необхідно вимкнути від енергопостачання прилади та обладнання; приступити до гасіння пожежі первинними засобами пожежогасіння, а при неможливості здійснення даних дій вийти з приміщення і щільно зачинити за собою двері та вікна, щоб запобігти приливу свіжого повітря, що сприятиме швидкому поширенню вогню. негайно викликати пожежну охорону [72].

Після закінчення роботи були вимкнуті всі прилади, прибрано з робочого столу й вимкнено світло [72].

Таким чином, дотримання правил безпеки при роботі з хімічними реактивами, скляним посудом та електричними приладами, а також власне роботи в лабораторії разом із підтримкою її правильного санітарно-гігієнічного режиму згідно вимог ДСН 3.36.042 99 дозволило уникнути наступних ризиків:

- переохолодження і пов'язаних із цим захворювань;
- отруєння через вживання їжі і пиття води в лабораторії, до яких могли би потрапити різні хімічні речовини;

- виникнення різних небезпек через роботу в лабораторії наодинці без другої особи;
- спотворення результатів експериментів через роботу у недостатньо чистому скляному посуді;
- псування реактивів внаслідок виливання в них надлишку з іншого посуду, куди зразок цього реактиву був налитий;
- вихлюпування і потрапляння хімічних речовин на шкіру через наповнення пробірок до країв;
- перенавантаження очей та виникнення разом із цим супутніх проблем – погіршення гостроти зору через невиконання короткочасних перерв для відпочинку і гімнастики для очей;
- потрапляння на очі та шкіру тіла хімічних речовин через роботу без медичного халату, медичних рукавичок та окулярів;
- поранення уламками скла через недотримання правил правильного миття скляного посуду;
- руйнування каналізаційної мережі та отруєння повітря лабораторії через виливання у раковину концентрованих розчинів кислот і лугів без їхньої попередньої нейтралізації;
- сильне навантаження на зір та опорно-руховий апарат через недотримання правил роботи за комп'ютером;
- виникнення пожеж через недотримання правил протипожежної безпеки.

ВИСНОВКИ

1. Загальна кількість лейкоцитів крові донорів, отриманої із використанням *H. verbana*, була вищою на 21,2% ($p \leq 0,05$) порівняно зі звичайним методом забору крові і становила $7,02 \pm 0,405$ Г/л, при $5,79 \pm 0,421$ Г/л в контролі. При аналізі відмінностей в лейкоцитарній формулі крові донорів, отриманої із використанням *H. verbana*, виявлено статистично значиме зменшення відносного вмісту еозинофілів на 22,8% ($p \leq 0,05$) з $2,67 \pm 0,464\%$ у контролі, до $2,06 \pm 0,306\%$ у досліді і збільшення абсолютної кількості лімфоцитів на 38,9% ($p \leq 0,05$) з $1,67 \pm 0,120$ Г/л в контролі до $2,32 \pm 0,226$ Г/л в досліді, тенденцію ($p \geq 0,05$) до зменшення відносного вмісту паличко- та сегментоядерних нейтрофілів на 8,6% та 5,2% відповідно, тенденцію ($p \geq 0,05$) до збільшення відносного вмісту моноцитів та лімфоцитів на 28,1% та 10,1% відповідно.

2. Співвідношення малих, середніх та великих цитоморфометричних класів лімфоцитів крові донорів, отриманої звичайним способом та з використанням *H. verbana* відрізняється, зокрема в крові зі шлункової кишки п'явки зменшена відносна кількість середніх лімфоцитів на 40% від $68,11 \pm 2,245\%$ в контролі до $40,89 \pm 2,508\%$ в досліді та збільшена відносна кількість великих лімфоцитів на 202,6% від $12,78 \pm 1,60\%$ в контролі до $38,67 \pm 2,134\%$ в досліді ($p \leq 0,05$).

3. Загальна кількість лейкоцитів крові лабораторних щурів, отриманої із використанням *H. verbana*, була вищою на 31,4% ($p \leq 0,05$) порівняно зі звичайним методом забору крові і становила $11,38 \pm 0,407$ Г/л при $8,66 \pm 0,479$ Г/л в контролі. Лейкоцитарна формула крові щурів, отриманої від п'явки, відрізняється від тієї, що отримана із застосуванням звичайного способу забору крові, причому в бік збільшення абсолютної кількості лімфоцитів, зменшення еозинофілів та збільшення паличкоядерних

нейтрофілів ($p \leq 0,05$), виявлена тенденція до збільшення відносної кількості лімфоцитів, моноцитів, зменшення сегментоядерних нейтрофілів при $p > 0,05$.

4. Співвідношення малих, середніх та великих цитоморфометричних класів лімфоцитів крові лабораторних щурів, отриманої звичайним способом (з хвоста) та з використанням *H. verbana* відрізняється, зокрема відмічена тенденція до збільшення відносної кількості малих та великих лімфоцитів і зменшення відносної кількості середніх лімфоцитів.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Результати роботи можуть бути впроваджені у навчальний процес при підготовці бакалаврів та магістрів за спеціальністю 091 Біологія та біохімія, зокрема при викладанні навчальних дисциплін «Імунологія», «Техніка біологічного експерименту», «Великий практикум з імунології», «Імунологічні методи лабораторної діагностики» тощо.

Незважаючи на деякі спотворення результатів гематологічного аналізу крові, взятої з використанням медичних п'явок виду *H. verbana*, цей метод забору крові може бути використаним для попередньої оцінки результатів аналізу крові, порівняно зі звичайними способами забору крові, адже медичні п'явки при цьому використовуються у якості неінвазивного інструменту для взяття крові, що буде мінімізувати дискомфортні відчуття.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Detoxification by Medicinal Leeches (*Hirudo medicinalis*), M. Habrmanova et al. *Medical Research Archives*. 2020. Vol. 8, no. 12. P. 1–12.
2. Case Reports and Experts Opinions about Current Use of Leech Therapy in Dermatology and Cosmetology., E. Ząbkowska et al. *Cosmetics*. 2022. Vol. 9, no. 6. P. 1–11.
3. Амінов Р. Ф. Природний імуномодулятор із тіл медичних п'явок: отримання та застосування : монографія. Запоріжжя : Запорізький національний університет, 2022. 164 с.
4. Приходько Я. М., Литвиненко Р. О. Морфофункціональні показники нейтрофільних гранулоцитів крові людини при гірудовпливі. *Освітні та наукові виміри природничих наук* : матеріали II Всеукр. заоч. наук. конф., м. Суми, 8 груд.2021. С. 92–96.
5. Максимчук Л. Т. Гірудотерапія у хворих із цервікогенним головним болем. *Міжнародний неврологічний журнал*. 2015. Т. 3, № 73. С. 136–139.
6. Лабінський А. Й. Комбіноване лікування дисциркуляторної енцефалопатії: гірудотерапія в поєднанні з нутриціологічними методами. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2015. Т. 2-3. С. 83–86.
7. Амінов Р. Ф. Гірудотерапія як можливий потенційний метод профілактики, допоміжного лікування та швидкого реабілітаційного відновлення в разі COVID-19: огляд. *Acta Biologica Ukrainica*. 2021. Т. 1. С. 1–17.
8. Лабінський А. Й. Ефективність немедикаментної терапії хворих із перенесеним ішемічним мозковим інсультом (гірудотерапія у поєднанні із нутриціологічною корекцією). *Acta medica Leopoliensia*. 2015. Т. 21, № 4. С. 16–19.

9. Практичні навички з загального та спеціального догляду за хірургічними хворими : навч. посіб. / Р. А. Ярошенко та ін. Полтава : Укр. мед. стоматол. акад., 2020. 273 с.
10. Rehman S. Management of Diabetic Foot Ulcer by *Hirudo medicinalis*, the “Healing Leech”. *Diabetic Foot Ulcer* : book. / ed. by M. Zubair et al. Singapore, 2021. P. 315–330.
11. Semi-Solid Product of Medicinal Leech Enhances Wound Healing in Rats / L. Amani et al. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*. 2021. Vol. 16, no. 4. P. 1–9.
12. Trenholme H. N., Masseur L., Reiner C. R. Hirudotherapy (medicinal leeches) for treatment of upper airway obstruction in a dog. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 2021. Vol. 31, no. 5. P. 661–667.
13. Ząbkowska E., Piotrowska A. Hirudoterapia w wybranych zastosowaniach dermatologicznych. *Kosmetologia Estetyczna*. 2019. Vol. 8. P. 779–786.
14. Lemke S., Müller C., Hildebrandt J.-P. Be ready at any time: postprandial synthesis of salivary proteins in salivary gland cells of the haematophagous leech *Hirudo verbana*. *J Exp Biol*. 2016. Vol. 219, no. 8. P. 1139–1145.
15. Detailed ultrastructure of the *Hirudo* (Annelida: Hirudinea) salivary gland / N. Saglam et al. *Micron*. 2020. Vol. 136. 102887.
16. Ayhan H., Koçakoğlu N. Ö., Candan S. Functional morphology of the suckers and teeth of the medicinal leech *Hirudo verbana* Carena, 1820 (Annelida; Clitellata; Hirudinida): A scanning electron microscope study. *Microscopy Research and Technique*. 2021. Vol. 84, no. 12. P. 2930–2935.
17. Validation of Medicinal Leeches (*Hirudo medicinalis*) as a Non-invasive Blood Sampling Tool for Hematology and Biochemistry Profiling in Mammals / P. Kvapil et al. *Front. Vet. Sci*. 2022. Vol. 9. P. 1–11.
18. Frolov O. K., Lytvynenko R. O., Makyeyeva L. V. Functional informativeness of lymphocytes’ cytomorphometric analysis of laboratory rats’ blood. *J Adv Biotechnol Exp Ther*. 2021. Vol. 4, no. 3. P. 365–375.

19. 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.
20. *Hirudo verbana* as an alternative model to dissect the relationship between innate immunity and regeneration / N. Baranzini et al. *ISJ*. 2020. Vol. 17. P. 90–98.
21. Reproduction Efficiency of the Medicinal Leech *Hirudo verbana* Carena, 1820 / M. Ceylan et al. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2015. Vol. 15. P. 411–418.
22. Ahirrao R. A., Jadhav J. B., Pawar S. P. A review on leech therapy. *Pharma Science Monitor*. 2017. Vol. 8, no. 1. P. 228–237.
23. Альков В. А. Гірудотерапія на Харківщині у XVIII – на поч. ХХ століття. *Секція: Історичні науки*. 2017. С. 1–3.
24. Рідкісні види п'явок, молюсків і ракоподібних прісних водойм Харківської області : монографія / С. Ю. Утевський та ін. ; ред. С. Ю. Утевський. Харків : Харків. нац. ун-т ім. В.Н. Каразіна, 2015. 30 с.
25. Литвиненко Р. О. Імуномодуляторні властивості біологічно активних речовин медичної п'явки в умовах гірудовпливу : дис. ... канд. біол. наук: 03.00.09. Запоріжжя, 2016. 169 с.
26. Aminov R., Aminova A. Indirect effect of substances of the hemophagous parasite *Hirudo verbana* on the immune system of the host rats. *Annals of Parasitology*. 2021. Vol. 67, no. 4. P. 603–610.
27. Frolov A. K., Litvinenko R. A. Effect of medicinal leeches' antigens on the proliferative response of human blood mononuclear cells and cytokine production in vitro. *Annals of Parasitology*. 2015. Vol. 61, no. 2. P. 97–104.
28. Aminov R., Frolov A., Aminova A. The duration of rest and feeding greatly affects the re-breeding of ectoparasites: *Hirudo verbana*, *Hirudo medicinalis* and *Hirudo orientalis*. *Annals of Parasitology*. 2022. Vol. 68, no. 4. P. 721–726.

29. Ünal K., Erol M. E., Ayhan H. Literature review on the effectiveness of medicinal leech therapy in the wound healing. *Ankara Med J.* 2023. Vol. 1. P. 151–164.
30. Tıbbi Sülük Tükürük Ekstraktının Meme Fibroblast Hücre Hattı Üzerine Etkilerinin İn Vitro Araştırılması: Deneysel Bir Çalışma / K. Ünal et al. *J Tradit Complem Med.* 2023. Vol. 6, no. 2. P. 142–151.
31. Frolov A. K., Litvinenko R. A. Basic morphofunctional features of pharmaceutical leech (*Hirudo verbana* Carena, 1820) tissues in various forms of response after hirudotherapeutic procedures. *Annals of Parasitology.* 2015. Vol. 61, no. 1. P. 27–35.
32. Reciprocal immune benefit based on complementary production of antibiotics by the leech *Hirudo verbana* and its gut symbiont *Aeromonas veronii* / A. Tasiemski et al. *Scientific Reports.* 2015. Vol. 5. P. 1–13.
33. Rodríguez A. A. Historia y distribución de les sanixueles melecinales ibéricas *Hirudo verbana* bilineata, una nueva subespecie. *Ciencias.* 2021. Vol. 11. P. 12–31.
34. Exploring the attachment of the Mediterranean medicinal leech (*Hirudo verbana*) to porous substrates / T. Kampowski et al. *J. R. Soc. Interface.* 2020. Vol. 17. P. 1–15.
35. Effect of Water Quality on Monthly Density Variation of the Endangered Southern Medicinal Leech *Hirudo verbana* Carena, 1820 (Hirudinea: Arhynchobdellida: Hirudinidae) / N. Sağlam et al. *Acta Zoologica Bulgarica.* 2018. Vol. 70, no. 3. P. 433–441.
36. A new species of medicinal leech in the genus *Hirudo* Linnaeus, 1758 (Hirudiniformes, Hirudinidae) from Tianjin City, China / H. Wang et al. *ZooKeys.* 2022. Vol. 1095. P. 83–96.
37. Ahmed R. B., Romdhane Y., Tekaya S. Checklist and Distribution of Marine and freshwater leeches (Annelida, Clitellata, Hirudinea) in Tunisia with identification key. *Ecol. Mont.* 2015. Vol. 2, no. 1. P. 3–19.

38. Амінов Р. Ф. Медичні п'явки як спосіб ранньої діагностики запального процесу організму. *Актуальні питання клінічної медицини* : матеріали XVI Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчен., м. Запоріжжя, 24–25 листоп. 2022 р. С. 8–9.
39. Pharmacological Activities and Mechanisms of Hirudin and Its Derivatives - A Review / C. Junren et al. *Front. Pharmacol.* 2021. Vol. 12. P. 1–23.
40. Montinari M. R., Minelli S. From ancient leech to direct thrombin inhibitors and beyond: New from old. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2022. Vol. 149. P. 1–8.
41. Pennington M. W., Czerwinski A., Norton R. S. Peptide therapeutics from venom: Current status and potential. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2018. Vol. 26. P. 2738–2758.
42. Local (Malaysian) Leech as Alternative Healing Treatment and an Islamic Perspective / A. K. Zulhisyam et al. *International Journal of Islamic Thought.* 2016. Vol. 10. P. 68–77.
43. Lee G., Goosens K. A. Sampling Blood from the Lateral Tail Vein of the Rat. *JoVE.* 2015. Vol. 99. e52766. URL: <https://www.jove.com/t/52766/sampling-blood-from-the-lateral-tail-vein-of-the-rat> (date of access: 03.10.2023).
44. Горбачова С. В. Поняття про клінічний аналіз крові. URL: http://dspace.zsmu.edu.ua/bitstream/123456789/8141/1/GorbachovaSV17_Ponja_pkakr.pdf (дата звернення: 03.10.2023).
45. Горбачова С. В. Лейкоцитарна формула. Абсолютна і відносна кількість лейкоцитів. Кількісні зміни лейкоцитів. URL: http://dspace.zsmu.edu.ua/bitstream/123456789/8139/1/GorbachovaSV17_Lejk_form.pdf (дата звернення: 03.10.2023).
46. Колодій В. О., Штофель Д. Х. Особливості застосування пластикових пробірок для забору крові. *Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні проблеми інфокомунікацій, радіоелектроніки та наносистем»* (СПІРН-2021), Вінниця, 3-5 листопада 2021 р. 2021. URL : <https://conferences.vntu.edu.ua/index.php/spirn/spirn2021/paper/view/13904>.

47. Макарова Т. Д., Яковенко І. О. Автоматизована система перфорації шкіри та забору крові. *Ефективність інженерних рішень у приладобудуванні* : матеріали XIV Всеукр. наук.-практ. конф. студентів, аспірантів та молодих вчен., м. Київ, 4–5 груд. 2018 р. Київ, 2018. С. 291–294.
48. Виведення тварин з експерименту. Забір крові, приготування та зберігання біологічного матеріалу. URL: <http://surl.li/nomag> (дата звернення: 04.10.2023).
49. Задорожна Г.О., Хоменко О.М. Методичний посібник для виконання експериментальних робіт із використанням щурів. URL: <https://www.biochemistry-dnu.dp.ua/wpcontent/downloads/metodichki/eksper-roz-z-vykor-schuriv.pdf> (дата звернення: 03.10.2023).
50. Спосіб забору крові з латеральної хвостової вени у лабораторних щурів : пат. 120056 Україна : G01N 33/48. № u 2017 03057 ; заявл. 31.03.2017 ; опубл. 25.10.2017, Бюл. № 20. 1 с.
51. Взяття крові у корів з хвостової вени і яремної. *Світ тваринництва і рослинності* – sksumykhimprom.com.ua. URL: <https://sksumykhimprom.com.ua/?p=26086> (дата звернення: 04.10.2023).
52. Федотов Є. Р., Антонщук Ю. С. Стан імунологічних показників у хворих на гострі респіраторні захворювання. *Актуальні питання біології, екології та хімії*. 2015. Т. 10, № 2. С. 46–54.
53. Ложкіна І. С. Лейкограма та метаболічна активність нейтрофілів крові у дітей, хворих на гострий бронхіт. *Сьогодення біологічної науки* : матеріали II Міжнар. наук. конф., м. Суми, 9–10 листоп. 2018 р. Суми, 2018. С. 210–211.
54. Методи дослідження в гематології : навч. посіб. / І. О. Дудченко та ін. ; ред. Л. Н. Приступа. Суми : Сум. держ. ун-т, 2019. 55 с.
55. Ефективність препарату «Норнікоцин» за лікування захворювань бактеріальної етіології у собак / Д. Д. Остапів та ін. *Scientific and Technical Bulletin of State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medical*

Products and Fodder Additives and Institute of Animal Biology. 2019. Т. 20, № 2. С. 112–120.

56. Реактивна відповідь нейтрофільних гранулоцитів периферичної крові хворих на гострий бронхіт / І. Й. Сидорчук та ін. *Буковинський медичний вісник*. 2015. Т. 19, № 2. С. 172–176.
57. Мартинів Ю. В. Мікроспорія котів (обґрунтування протигрибкового засобу «Мікромар» та імуностимулятора «Біоглюк» в системі лікувальних і профілактичних заходів) : дис. ... д-ра філософії в галузі вет. медицини : 211. Львів, 2022. 180 с.
58. Фролов О. К., Литвиненко Р. О. Морфофункціональні стани п'явки виду *Hirudo verbana* в найближчі проміжки часу після сеансів гірудотерапії. *Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки*. 2013. Т. 3. С. 127–133.
59. Амінов Р. Ф., Фролов О. К. Проліферативна активність клітин кісткового мозку щурів за впливу біологічно активних речовин медичної п'явки. *Regul. Mech. Biosyst.* 2017. Т. 8, № 4. С. 501–505.
60. Амінов Р. Ф. Проліферативна активність лімфоцитів крові нелінійних самиць щурів, їх приплоду на ранніх етапах постембріонального розвитку на фоні гірудовпливу. *Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки*. 2018. Т. 1. С. 40–45.
61. Амінов Р. Ф., Фролов О. К., Федотов Є. Р. Реакція бластної трансформації лімфоцитів крові нелінійних самиць щурів, їх приплоду на ранніх етапах постембріонального розвитку на фоні впливу сольового екстракту *Hirudo verbana*. *Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки*. 2018. Т. 1. С. 46–52.
62. Фролов О. К. Методичні рекомендації до технологічного регламенту біотехнології медичної п'явки. Запоріжжя : Сору Art, 2012. 36 с.
63. Пат. 68769 Україна, (51) МПК (2012.01), А61В 5/00, G01N 33/49 (2006.01). Спосіб дослідження крові / О. К. Фролов, Є. Р. Федотов, В. В. Копійка, Р. О. Литвиненко, Ю. С. Процько; власник ДВНЗ «Запорізький національний

університет» МОНмолодьспорт України. № у 2011 11341 ; заявл. 26.09.2011 ; опубл. 10.04.2012, Бюл. № 7.

64. Приседський Ю.Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів. Донецьк : Юго-Восток, 1999. 210 с.
65. Dunn O. J., Clark V. A. Basic statistics: a primer for the biomedical sciences. 4th ed. NY : John Wiley & Sons, 2009. 272 p.
66. Інструкція з охорони праці при роботі зі скляним лабораторним посудом та іншими виробами зі скла | Інструкції для навчальних закладів України. Інструкції для навчальних закладів України | Інструкції з охорони праці, техніки безпеки і пожежної безпеки. URL: <https://osvita-docs.com/node/286> (дата звернення: 04.10.2023).
67. Інструкція з охорони праці при роботі з хімічними реактивами і спиртівками в кабінеті біології | Інструкції для навчальних закладів України. Інструкції для навчальних закладів України | Інструкції з охорони праці, техніки безпеки і пожежної безпеки. URL: <https://osvita-docs.com/node/71> (дата звернення: 04.10.2023).
68. Інструкція з охорони праці при користуванні електропобутовими приладами. Календар бухгалтера. URL: <https://services.uteka.ua/ua/publication/zrazky-34-trudovi-vidnosyny-ta-oplata-pratsi-138-instrukciya-po-oxrane-truda-pri-polzovanii-elektrobytovyuh-priborov> (дата звернення: 04.10.2023).
69. ДСН 3.3.6.042-99 Санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень. БУДСТАНДАРТ Online - нормативні документи будівельної галузі України. URL: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page?id_doc=14283 (дата звернення: 04.10.2023).
70. ДСП 9.9.5.-080-02. Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю (3108). ДНАОП - Нормативно-правова бібліотека інструкції документи. URL: https://dnaop.com/html/3108/doc-ДСП_9.9.5.-080-02 (дата звернення: 04.10.2023).

71. Голінько В.І. Основи охорони праці: підручник. 2-ге вид. Донецьк: НГУ, 2014. 271 с
- Голінько В.І. Основи охорони праці: підручник. 2-ге вид. Донецьк: НГУ, 2014. 271 с.
72. Правила пожежної безпеки в Україні. Державний реєстр нормативних актів з питань пожежної безпеки (Реєстр НАПБ). Київ: Пожежінформтехніка, 2001. 238 с.

ДЕКЛАРАЦІЯ
про дотримання академічної доброчесності
здобувача ступеня вищої освіти ЗНУ

Я, Гранкіна Анастасія Олександрівна, студентка 2 курсу, денної форми навчання, факультету біологічного, спеціальність 091 Біологія, освітня програма Біологія, адреса електронної пошти grankina.nastia@gmail.com, підтверджую, що написана мною кваліфікаційна робота на тему «Цитоморфометричні показники лімфоцитів при використанні *Hirudo verbana* як неінвазивного інструменту для забору крові ссавців» 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) Гранкіна А.О.

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