

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

БІОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра фізіології, імунології і біохімії з курсом цивільного захисту та
медицини
(повна назва кафедри)

Кваліфікаційна робота

магістра
(рівень вищої освіти)

на тему ЛЕЙКОЦИТАРНІ ПОКАЗНИКИ КРОВІ НЕЛІНІЙНИХ
ЛАБОРАТОРНИХ ЩУРІВ В УМОВАХ ГРУДОВПЛИВУ *IN VITRO* ТА
IN VIVO

Виконала: студентка 2 курсу, групи 8.0918

Спеціальності 091 Біологія
(код і назва спеціальності)

освітньої програми Біологія
(код і назва освітньої програми)

А.М. Лозова
(ініціали та прізвище)

Керівник ст. викладач, к.б.н. Р.О. Литвиненко
(посада, вчене звання, науковий ступінь, підпис, ініціали та прізвище)

Рецензент доц., доц., к.б.н. М.М. Малько
(посада, вчене звання, науковий ступінь, підпис, ініціали та прізвище)

Запоріжжя
2020

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Біологічний факультет

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

Рівень вищої освіти магістр

Спеціальність 091 Біологія

Освітня програма Біологія

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри В. Д. Бовт

“ ___ ” _____ 20__ року

ЗАВДАННЯ
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТЦІ

Лозовій Анні Миколаївні

1. Тема роботи Лейкоцитарні показники крові нелінійних лабораторних щурів в умовах гірудовпливу *in vitro* та *in vivo*
керівник роботи Литвиненко Раїса Олександрівна, к.б.н., ст. викладач
затверджені наказом ЗНУ від « 12 » червня 2019 року № 940-с
2. Строк подання студентом роботи грудень 2019 року
3. Вихідні дані до роботи: кваліфікаційна робота на тему «Вплив біологічно активних речовин медичної п'явки на лейкоцитарні показники крові лабораторних щурів в експерименті *in vivo*»
4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити):1) проаналізувати кількість лейкоцитів, лейкоцитарну формулу, лейкоцитарні індекси та фагоцитарну активність нейтрофілів крові у інтактних лабораторних щурів молодого статевозрілого віку; 2) проаналізувати вплив БАР слини МП *in vivo* на кількість лейкоцитів, лейкоцитарну формулу, лейкоцитарні індекси та фагоцитарну активність нейтрофілів крові лабораторних щурів молодого статевозрілого віку; 3) проаналізувати вплив БАР тотальних антигенів МП *in vitro* на кількість лейкоцитів, лейкоцитарну формулу та лейкоцитарні індекси крові лабораторних щурів молодого статевозрілого віку до та після гірудовпливу.
5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень): 6 рисунків, 11 таблиць.

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Консультант	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
1-3	Фролов О.К., д.м.н., професор		
4	Клімова О.О., к.б.н., ст. викладач		

7. Дата видачі завдання _____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітки
1.	Поповнення джерел літератури за темою кваліфікаційної роботи	Грудень 2018	Виконано
2.	Оформлення розділу «Огляд літератури»	Січень 2019	Виконано
3.	Формування розділу «Матеріали та методи дослідження»	Квітень 2019	Виконано
4.	Формування експериментальної бази дослідження, аналіз мікропрепаратів	Квітень – вересень 2019	Виконано
5.	Статистична обробка та опис експериментальних даних	Вересень 2019	Виконано
6.	Формування експериментальної частини, оформлення кваліфікаційної роботи	Жовтень – грудень 2019	Виконано
7.	Оформлення матеріалів до захисту, попередній захист кваліфікаційної роботи	Грудень 2019	Виконано

Студент _____

А.М. Лозова

Керівник роботи _____

Р. О. Литвиненко

Нормоконтроль пройдено

Нормоконтролер _____

О.О. Клімова

РЕФЕРАТ

Робота викладена на 97 сторінках друкованого тексту, містить 11 таблиць і 6 рисунків. Перелік посилань включає 97 джерел.

Об'єктом дослідження була артеріовенозна кров лабораторних щурів під дією біологічно активних речовин медичної п'явки *in vivo* та *in vitro*.

Мета роботи: дослідження лейкоцитарних показники крові нелінійних лабораторних щурів в умовах гірудовпливу *in vitro* та *in vivo*.

Методи дослідження: 1) імунологічні: визначення загальної кількості лейкоцитів, лейкоцитарної формули крові, лейкоцитарних індексів, фагоцитарної активності нейтрофілів; 2) статистичні.

Доповнено дані стосовно впливу біологічно активних речовин (БАР) *H. verbana in vivo* та *in vitro* на лабораторних щурів молодого статевозрілого віку. *In vivo* гірудовплив виражався у збільшенні відносної кількості еозинофілів на 30% ($p \leq 0,05$). При аналізі лейкоцитарних індексів після гірудовпливу виявили найбільше зрушення співвідношення лімфоцитів до еозинофілів на 18% ($p > 0,05$). Додавання антигенів *H. verbana* в короткочасну культуру крові інтактних щурів призводить до зниження моноцити на 25%, ($p \leq 0,05$) і збільшення лімфоцити на 28,5%, ($p \leq 0,05$), що зумовлює збільшення співвідношення лімфоцитів до моноцитів на 19%, ($p \leq 0,05$). Антигени *H. verbana in vitro* після гірудовпливу виявляють стабілізуючий вплив на еозинофіли, тим самим підвищуючи показник співвідношення лімфоцитів до еозинофілів, що вказує на зсув імунної відповіді в бік гіперчутливості уповільненого типу.

Новизна роботи – результати дослідження поширюють уявлення про вплив біологічно активних речовин медичної п'явки на лейкоцити крові молодих статевозрілих лабораторних щурів.

Практичне значення: результати, отримані в ході дослідження можуть бути використані науковими лабораторіями для подальшого вивчення імуотропний вплив у біологічно активних речовин медичної п'явки.

БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ РЕЧОВИНИ, ГІРУДОТЕРАПІЯ, МЕДИЧНА П'ЯВКА, ЛЕЙКОЦИТИ, ЛЕЙКОЦИТАРНА ФОРМУЛА, ФАГОЦИТОЗ.

ABSTRACT

The work presented on 97 pages of printed text, contains 11 tables, 6 pictures. The list of references includes 97 sources.

The object of the study was the arteriovenous blood of laboratory rats under the action of biologically active substances of medical leech *in vivo* and *in vitro*.

The aim of the study was leukocyte blood counts of nonlinear laboratory rats under conditions of hirudoinfluence *in vivo* and *in vitro*.

Methods of research: 1) immunological: determination the total number of leukocytes, leukocyte formula of blood, leukocyte indices, neutrophil phagocytic activity; 2) statistics.

Complemented by data on the effect of biologically active substances (BAS) *H. verbana in vivo* and *in vitro* in laboratory rats mature young age. *In vivo* the hirudoinfluence is expressed in an increase the relative number of eosinophils by 30% ($p \leq 0.05$). In the analysis of leukocyte indices after the hirudoinfluence revealed the largest shift in the lymphocytes/eosinophils ratio by 18% ($p > 0.05$). Addition of *H. verbana* antigens to short-term blood culture of intact rats results in a 25% decrease in monocytes ($p \leq 0.05$) and a 28.5% increase in lymphocytes ($p \leq 0.05$), which causes an increase in lymphocyte/monocyte ratio by 19% ($p \leq 0.05$). Antigens of *H. verbana* have a stabilizing effect on eosinophils after hirudoinfluence, thereby increasing of lymphocytes/eosinophils ratio, indicating a shift of the immune response toward a delayed-type hypersensitivity.

The novelty of the work – the results of the study are spreading the idea of the influence of BAS of medical leech on the blood leukocytes of young sexually mature laboratory rats.

Practical significance: the results obtained in experiment can be used by scientific laboratories to further explore the immune response to medical leech biologically active substances.

BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES, HIRUDOTHERAPY, MEDICINAL LEECH, LEUKOCYTES, LEUKOCYTE FORMULA, PHAGOCYTOSIS.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ ТА УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	8
ВСТУП	9
1 ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	12
1.1 Біологічні особливості медичної п'явки виду <i>Hirudo verbana</i>	12
1.2 Елементарний склад тіла видів роду <i>Hirudo</i>	18
1.3 Біологічно активні речовини слинних залоз медичних п'явок.....	21
1.4 Особливості біології лабораторних щурів	28
1.5 Напрямки застосування та біологічні ефекти гірудотерапії	33
2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	39
2.1 Матеріали та схема дослідження.....	39
2.2 Методи дослідження.....	41
2.2.1 Імунологічні методи дослідження.....	41
2.2.1.1 Підрахунок кількості лейкоцитів у камері Горяєва.....	41
2.2.1.2 Приготування та фарбування мазка крові.....	42
2.2.1.3 Визначення лейкоцитарної формули крові.....	43
2.2.1.4 Дослідження лейкоцитарних індексів периферичної крові.....	48
2.2.1.5 Дослідження фагоцитарної активності нейтрофілів.....	50
2.3. Статистичні методи дослідження.....	51
3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	54
3.1 Лейкоцитарні показники крові та фагоцитарна активність нейтрофілів інтактних молодих статевозрілих лабораторних щурів	54
3.2 Лейкоцитарні показники крові та фагоцитарна активність нейтрофілів молодих статевозрілих лабораторних щурів при гірудовпливі <i>in vivo</i>	58
3.3 Лейкоцитарні показники спонтанних та антиген-стимульованих зразків крові молодих статевозрілих лабораторних щурів до та після гірудовпливу в експерименті <i>in vitro</i>	60

3.4 Порівняльна характеристика лейкоцитарних показників крові молодих статевозрілих лабораторних щурів при гірудовпливі <i>in vivo</i> та <i>in vitro</i>	66
4 ОХОРОНА ПРАЦІ.....	74
ВИСНОВКИ.....	85
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	88
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ.....	89

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ ТА УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АГ – антиген

АМП – антимікробні пептиди

БАР – біологічно активні речовини

ГВ – гірудовплив

Г/л – $\times 10^9$

ГТ – гірудотерапія

ЛІГ – лімфоцитарно-гранулоцитарний індекс

ІСЛЕ – індекс співвідношення лімфоцитів та еозинофілів

ІСЛМ – індекс співвідношення лімфоцитів та моноцитів

ІСНМ – індекс співвідношення нейтрофілів та моноцитів

МП – медична п'явка

СП – спонтанний зразок

ССЗ – секрет слинних залоз

ФАН – фагоцитарна активність нейтрофілів

ВСТУП

Лише в 1884 році, J. В. Haucraft перший отримав із п'явки речовину, що перешкоджає тромбоутворенню, названу гірудином [1], в 1955 році, F. Markwardt здійснив екстракцію цієї речовину і отримав її в чистому вигляді. Секрет слинних залоз (ССЗ) медичної п'явки (МП) – складний комплекс біологічно активних речовин (БАР). Добре відомо приблизно 20, всього відомо понад 100 компонентів БАР ССЗ МП, проте біологічні ефекти цих речовин недостатньо вивчені, деякі з них не досліджені [1]. Через свою багатогранність і неповну дослідженість, питання вивчення проблем цієї галузі є досить актуальними.

Через велику кількість БАР, що виділяється п'явкою під час гірудотерапії (ГТ), які обумовлюють виражений терапевтичний ефект, інтерес до МП зростає в останні роки [1]. Проводяться багато досліджень, присвячених з'ясуванню механізмів впливу БАР на організми людини та тварин [1-3]. До кінця механізми дії все ще не визначені, для оцінки терапевтичного ефекту

Останнім часом потреба в препаратах з імунотропною дією (імуномодуляторів), дуже зростає, внаслідок швидкого темпу життя людей, а також нестачі корисних мікроелементів, вітамінів у раціоні сучасної людини. Всі ці фактори порушують гомеостатичні процеси в організмі людини, таким чином організм стає вразливішим до стресів, імунний захист слабшає [4, 5].

В якості імуномодуляторів використовують різні препарати тваринного, рослинного та синтетичного походження [4-6]. Переважна більшість з яких синтетичної природи, які не завжди відповідають всім поставленим вимогам та мають недоліки. Найпоширеніші з них побічні цитотоксичні ефекти, недостатньо вибірковий модулюючий вплив тощо. А при частому використанні можуть викликати хронізацію патології, а також алергії та аутоалергії [5].

Отже, важливим завданням медицини сьогодні є пошук безпечних імуномодуючих засобів. Тому все більше значення в профілактиці та лікуванні різноманітних захворювань набуває натуротерапевтичний підхід, тобто використання природних засобів впливу на організм. До такого підходу відноситься ГТ, яка з давніх часів зарекомендувала свій позитивний вплив на живі організми [7].

Використання МП як джерела корисних БАР є вкрай перспективним напрямком досліджень. Крім того, БАР МП містять речовини, що володіють імунотропною дією. До найбільш вивчених БАР ССЗ МП відносяться – гірудин, егліні, бделіні, ферменти: гіалуронідаза, дестабілаза, колагеназа, апіраза, еластаза та ін. [1, 8], антибіотик (хлороміцетин) [8], анальгезуючі речовини [8, 9].

Мета роботи: дослідження лейкоцитарних показників крові нелінійних лабораторних щурів в умовах гірудовпливу *in vitro* та *in vivo*.

Завдання дослідження:

1) проаналізувати кількість лейкоцитів, лейкоцитарну формулу, лейкоцитарні індекси та фагоцитарну активність нейтрофілів крові у інтактних лабораторних щурів молодого статевозрілого віку;

2) проаналізувати вплив БАР слини МП *in vivo* на кількість лейкоцитів, лейкоцитарну формулу, лейкоцитарні індекси та фагоцитарну активність нейтрофілів крові лабораторних щурів молодого статевозрілого віку;

3) проаналізувати вплив БАР тотальних антигенів МП *in vitro* на кількість лейкоцитів, лейкоцитарну формулу та деякі лейкоцитарні індекси крові лабораторних щурів молодого статевозрілого віку до та після гірудовпливу;

4) порівняти лейкоцитарні показники крові молодих статевозрілих лабораторних щурів при гірудовпливі *in vivo* та *in vitro*.

Об'єктом дослідження була артеріовенозна кров лабораторних щурів під дією БАР МП *in vivo* та *in vitro*.

Предмет дослідження – імунотропні ефекти БАР МП *in vivo* та *in vitro* у молодих статевозрілих лабораторних щурів.

Методи дослідження: 1) імунологічні: визначення загальної кількості лейкоцитів, лейкоцитарної формули крові, лейкоцитарних індексів, фагоцитарної активності нейтрофілів; 2) статистичні.

Новизна роботи – результати дослідження поширюють уявлення про вплив біологічно активних речовин медичної п'явки на лейкоцити крові молодих статевозрілих лабораторних щурів.

Практичне значення: результати, отримані в ході експерименту можуть бути використані різними науковими лабораторіями для подальшого вивчення впливу БАР медичної п'явки на імунітет людини та тварин.

Результати дослідження були апробовані на міжнародній науково-практичній конференції з публікацією тез доповіді:

- Лозова А.М., Литвиненко Р.О. Вплив біологічно активних речовин медичної п'явки на лейкоцитарні показники крові лабораторних щурів в експерименті *in vivo*. *Осінні наукові читання: XXIII Міжнародна науково-практична інтернет конференція: тези доповідей, Тернопіль, 27 листопада 2019 р.* Ч. 1. Дніпро: ГО «НОК», 2019. С. 45-48.

1 ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Біологічні особливості медичної п'явки виду *Hirudo verbana*

Рід *Hirudo* відносяться до типу кільчастих червів *Annelidia*, клас – *Hirudinea*, підклас – справжні п'явки *Archihirudinea*, ряд – *Archinobdella*, сімейство *Hirudinidea* [1]. Він включає в себе щонайменше чотири види лікарських п'явок (Siddall et al., 2007; Utevsky, Trontelj, 2005; Utevsky S. et al., 2010; Trontelj, Utevsky, 2005, 2012) [10]. П'явки мають сегментоване тіло, що складається з 33 сегментів, кожен з яких містить різні органи. Передні 4 сегменти утворюють передню присоску, 7 останніх – задню, і 22 сегмента складають тіло [1, 11]. Зовні тіло п'явки покрите тонкою плівкою (кутиктуюлою), яку вона періодично скидає. Інтенсивність «линьки» дозволяє зробити висновки про стан тварини: чим частіше воно линяє, тим більш інтенсивні у неї обмінні процеси [1]. Дві присоски працюють для забезпечення переміщення і фіксації на субстраті або тілі жертви. Передня має три щелепи: верхня і дві нижньобокові – розташовані під кутом 120⁰ один до одного. Кожна з яких несе по 70-100 твердих хітинових зубчиків [1].

Найвідоміші троє з них, *Hirudo medicinalis* (Linnaeus, 1758), *H. verbana* (Carena, 1820) та *H. orientalis* (S. Utevsky et Trontelj, 2005). Але найбільший практичний інтерес мають аптечні МП виду *Hirudo verbana*, яких найчастіше використовують для гідудотерапії та вирощують у лабораторних умовах. Вважається, що всі три форми можуть використовуватися з лікувальною метою, вони здатні спарюватись одне з одним і давати потомство (Кузнецов С. В., 1975) [1]. Проте було з'ясовано, що таке спарювання вкрай не ефективно. У видів різняться хромосомні числа, це було виявлено в результаті каріологічних досліджень [10]. Таким чином, *H. medicinalis*, *H. verbana* і *H. orientalis* є ізотропними видами, відрізняються морфологічно, також як і їх географічний розподіл, мають певні фізіологічні відмінності [1, 12, 13]. Це свідчить про певні труднощі в галузі міжвидової гібридизації.

У природних умовах п'явки обирають прісні водоймища для життєдіяльності, мають визначені ареали проживання, рідко обирають місця зайняті іншим видом п'явок. Ймовірно це пов'язано з різними екологічними вимогами, репродуктивними стратегіями, та, виходячи з цього, взаємодіями з навколишнім середовищем.

Особини чутливі до вібрацій на воді, дотику, освітленості, тепла, звуку і різних хімікатів. Тому при розведенні даного виду необхідно враховувати ці особливості, для забезпечення всіх необхідних умов для їх ефективної життєдіяльності [14, 15].

Лікарська п'явка – абсолютний гематофаг, пристосована до короткострокових контактів із «годувальниками» і до швидкого поглинання великого об'єму крові, що перевищує її початкову вагу в 3-7 разів і тривалого її зберігання в рідкому стані. Так, годування займає майже 40 хвилин, а особина споживає 10-15 мл крові протягом одного акту харчування [1]. В якості «годувальника» виступає крупна рогата худоба, що випасається на березу, а також всі тварини, що там проживають або споживають воду у заселеному п'явками ставку. Харчуючись, п'явка не призводить до загибелі організму [1]. Зазвичай вони полюють на теплі частини тіла жертви і смокчуть її кров із ритмічними скороченням [1, 11, 12]. Травлення досягається багатьма ферментами і мікроорганізмами-симбіонтами [1, 11, 15, 16].

Кров як джерело їжі є високореактивним компонентом, насиченим рядом клітинних і гуморальних факторів, які в свою чергу мають вплив на організм п'явки, а саме на тканини системи травлення МП у посттрофічний період. При патологічному його перебігу особина з великою ймовірністю загине. До таких реакцій відносять пригнічені скоротливі і присмоктувальні рефлекси, низька рухова активність, різної форми перетяжки (зазвичай супроводжуються безперервним відригуванням з'їденої крові) (рис. 1.1) [16].

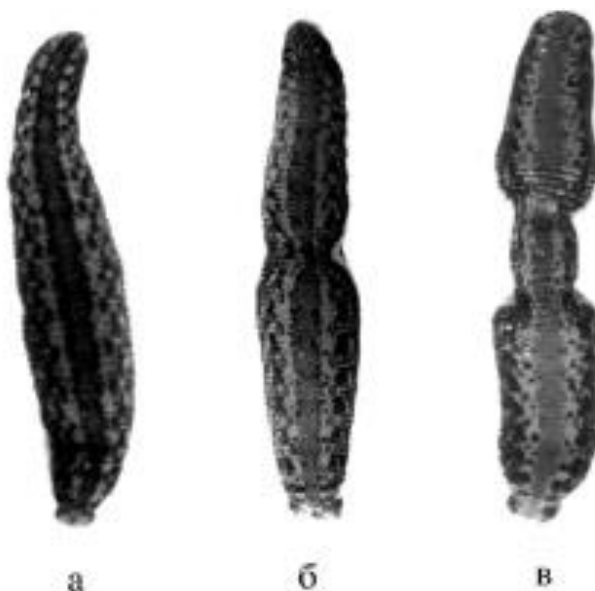


Рисунок 1.1 – Формування перетяжок на тілі *H. verbana* в посттрофічний період (дорсальний вид): а - сита здорова *H. verbana*; б - сита *H. verbana* з одиначною перетяжкою на тілі; в - сита загибла *H. verbana* з декількома перетяжками на тілі [16].

Травлення поглиненої крові відбувається у короткій середній і задній кишці, а передня, представлена циліндричним розширенням, що займає майже все тіло, зберігає пластичний матеріал, піддає його імунному контролю [16, 17].

В процесі травлення приймають участь кишковий епітелій, сполучна і ботріюдна тканини. Кишковий епітелій шлункової кишки здорової п'явки представлений одношаровим циліндричним/кубічним облямистим епітелієм [1, 16, 18].

Ботріюдна тканина (БТ) п'явок роду *Hirudo* представлена оксифільною порожнистою структурою з округлих клітин двох типів – зернистих (гранулоцитарних) ботріюдних і плоских ендотеліоподібних [19]. Гранулоцити БТ активуються у посттрофічному періоді, забезпечують адсорбцію поживних речовин, які надходять до сполучної тканини з кишечника, беруть участь у видільній функції. Цитоплазма їх накопичує різні включення, серед яких жовто-коричневі зерна екскреторної природи, що містять продукти розпаду гема, виконують захисну імунну функцію [16, 20].

Разом із плоскими ендотеліоподібними клітинами ботріоїодні гранулоцити формують додаткові проміжні лакуни і капіляри [16].

Більшість клітин БТ щільно прилягає навколо каналів капілярної сітки лакунарної (кровоносної) системи, яка з'єднує дорсальний, вентральний і бічний лакунарний канали [16].

У МП існує конкуренція за харчові ресурси. Голодні особини стають більш активними і починають реагувати на будь-які подразники, пов'язані з їжею. Як результат, накидаються на перше, що потрапило у воду, сподіваючись хоча б на щось, що може принести для них харчову цінність. У голодних *Hirudo verbana* виявляється канібалізм по відношенню до ситих п'явок свого ж виду. Годовані особини зазнають нападів від своїх родичів, на їх тілі утворюються рани, шириною до 6 мм, через які голодні намагаються дістати поглинуту кров.

Канібалізм виявляється у чверті всіх голодних п'явок. Годовані п'явки після перших нападів голодних намагалися триматися зверху, захиститись хвилеподібними рухами, в момент приближення небезпеки, вивільнити невелику кількість крові з ротового апарату, для того щоб відволікти [21, 22].

П'явки – гермафродити, не здатні до самоzapлiднення, статева зрілість настає при досягненні твариною певного віку [1]. У природних водоймах молоді особини п'явок, в силу ряду причин (обмеженість кормових ресурсів, кліматичні умови, зимовий анабіоз), ростуть досить повільно і досягають статевої зрілості тільки на третій рік життя. У лабораторних умовах, при дотриманні розробленої методики, період зростання і розвитку МП становить, за різними даними, від 6 до 12 місяців [23]. Відразу після запліднення особина вишукує місце для відкладання коконів. Матки в штучних умовах відкладають 4-5 коконів, які мають овальну форму і зовні покриті губчастою оболонкою, всередині білкова маса, що слугує живленням для ембріонів. Кокон містить 20-30 зародків, може бути порожнім [1, 11].

Вроджений імунітет п'явки представлений антимікробними пептидами, а також фагоцитарними імунними клітинами (рис. 1.2) [24].

Антимікробні пептиди (АМП) є важливою частиною вродженої імунної відповіді хребетних, безхребетних і рослин. Вони являють собою різноманітну групу сполук, які здатні вбивати широкий спектр бактерій. Більшість АМП є катіонними і амфіфільними, і їх найбільш поширеним способом є руйнування мембрани бактеріальних клітин. Як можна було б припустити, що вони найбільш часто зустрічаються на межі між організмом і навколишнім середовищем (наприклад, між шкірою і травним трактом), щоб запобігти мікробному вторгненню.

АМП були знайдені в шлунково-кишковому тракті п'явки. Лектинс – типу, який може мати антимікробну активність. Нм-люмбрицин і нейромацин були виділені в центральній нервовій системі *H. Medicinalis* і теромацин, тероміцин і пептид В із гемолімфи. Теромацин і тероміцин також були виявлені в епітеліальних клітинах кишечника п'явки [24].

Фагоцитарні імунні клітини є ще одним важливим компонентом вродженої імунної відповіді проти патогенів. Імунні клітини, звані амебоцитами, були вперше ідентифіковані в целомній рідині і сполучній тканині *H. medicinalis*. Саме вони відіграють важливу роль у фагоцитозі [24]. Адаптивний імунітет МП представлений популяціями бактерій, таких як *Aeromonas veronii* *Rikenella*-подібної бактерії (рис. 1.2). Як і всі тварини, п'явка живе в тісному зв'язку з мікроорганізмами, які, як вважається, забезпечують важливу функцію п'явки. У МП травний тракт колонізований відносно простим мікробним співтовариством, що може мати вирішальне значення для запобігання передчасної деградації кров'яної маси. Ранні дослідження повідомили про наявність єдиного бактеріального симбіонту *Aeromonas veronii*. Згодом дослідження показало наявність другого числового домінантного бактеріального симбіонту – *Rikenella*-подібної бактерії. У кишечнику ці два види дуже численні, але існує більша різноманітність видів, наприклад, *Magnetos pirillum* і *Roseospira* [26]. Діагностика ембріонів показала, що бактерії передаються від батьків до потомства. Дуже цікаво, що мікрофлора кишечника – незвичайно проста [25, 26].

Фактори, що викликаються мікроорганізмами (рис. 1.2). Симбіонти в кишечнику п'явки, *A. veronii* і *Rikenella*-подібні бактерії, можуть перешкоджати колонізації патогенних бактерій, займаючи певну нішу (таким чином створюється конкуренція за поживні речовини).

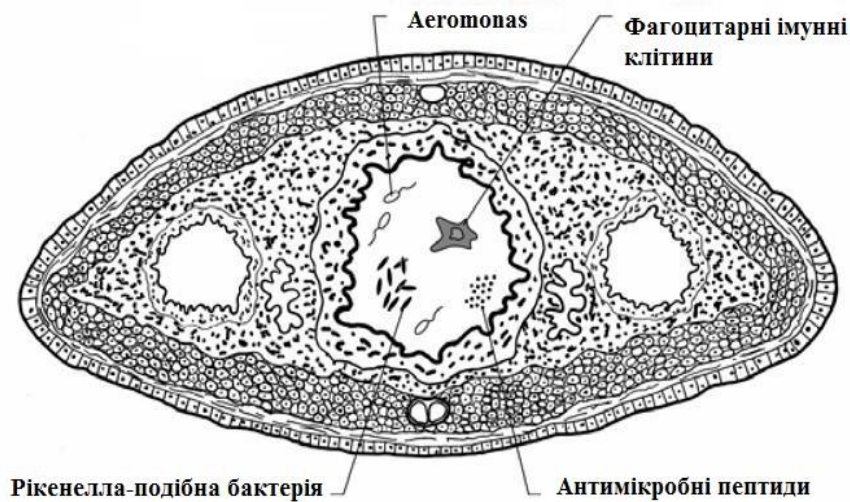


Рисунок 1.2 – Поперечний розріз лікарської п'явки (зображує набутий (комплементарний) і вроджений (імунні клітини і АМП) імунітет) [24]

Наявність більш різноманітної мікробної популяції, яка включає як *A. veronii*, так і *Rikenella*-подібні бактерії, можуть нести відповідальність за стимуляцію епітелію кишечника, щоб той у свою чергу виділяв АМП. Травний тракт п'явки має цікаву еволюційну адаптацію, при якій імунна система доповнюється компонентами імунної системи від хребетних, на яких вона харчується [24, 26].

1.2 Елементарний склад тіла видів роду *Hirudo*

У процесах росту і розвитку тварин істотна роль належить біологічно активним макро- і мікроелементам (ММЕ). Рівень есенціальних і екзогенних МЕ в організмі визначається фізіологічними процесами, в яких вони беруть участь. Стабільність хімічного складу є одним з найважливіших і обов'язкових умов нормального функціонування організму, оскільки ММЕ беруть участь у водному, білковому, вуглеводному і ліпідному обміні, утворюють з гормонами, вітамінами, амінокислотами та ферментами внутрішньокмплесні з'єднання, сприяючи їх біохімічній активності, знешкоджують токсини і т. п. [23].

Зростання і розвиток медичних п'явок супроводжується спрямованим підвищенням сумарного змісту макро- і мікроелементів в їх тканинах. В організмі *Hirudo medicinalis* було виявлено присутність понад 60 хімічних елементів. Вміст елементів коливається в широкому інтервалі концентрацій. Ранжування макроелементів (масова частка $\omega > 10^{-2}\%$) відповідає ряді: $\text{Na} > \text{P} > \text{K} > \text{Mg} > \text{Fe}$. Вміст мікроелементів ($10^{-5}\% < \omega < 10^{-2}\%$) зменшується в ряду: $\text{Zn} > \text{Cu} > \text{Cr} > \text{Ag} > \text{Ni} > \text{Ca} > \text{Al} > \text{Sr} > \text{Mn} > \text{Se} > \text{V} > \text{Pb} > \text{Rb} > \text{Mo} > \text{V} > \text{As} > \text{Li} > \text{Zr} > \text{Sn} > \text{Co}$ (від $4,7 \cdot 10^{-2}\%$ для цинку до $1,6 \cdot 10^{-4}\%$ для кобальту). Серед ультрамікроелементів ($\omega < 10^{-5}\%$): $\text{Sb} > \text{Be} > \text{Ce} > \text{La}$ [27].

Значне перевищення біологічно значущих есенціальних s- і d-елементів в організмі п'явки порівняно з плазмою крові людини (таблиця 1.1) дозволяє припускати можливість надходження цих елементів в кров при терапевтичних процедурах [27].

При цьому відзначені істотні відмінності в характері змісту і динаміки окремих елементів (таблиця 1.2).

Таблиця 1.1 – Порівняння вмісту есенціальних елементів в організмі *Hirudo medicinalis* і плазмі крові людини [27].

Назва елемента	Медична п'явка ω, мкг/г	Плазма крові людини ω, мкг/г
K	$6,7 \cdot 10^2$	2 – $1,95 \cdot 10^2$
Mg	$5,3 \cdot 10^2$	15,6 – 26,4
Fe	$2,4 \cdot 10^2$	0,6- 1,68
Zn	47,1	0,70-1,10
Cu	27,9	0,7 – 1,6

Таблиця 1.2 – Вікова динаміка вмісту макро- і мікроелементів (мкг / г) в тканинах *Hirudo verbanana* біофабриці [23].

ММЕ, мкг/г	5 діб	1 місяць	3 місяці	5 місяців	7 місяців	9 місяців
Cu	1,25±0,011	1,29±0,014	2,13±0,021	2,08±0,032	2,03±0,027	2,06±0,031
Zn	24,4±2,69	8,29±0,51	8,01±0,18	20,7±1,66	21,2±1,25	22,4±2,09
Mn	1,45±0,047	0,57±0,012	1,01±0,014	0,94±0,035	0,93±0,011	0,92±0,017
Fe	85,2±4,39	190,5±8,76	214,3±12,7	278,9±13,9	346,8±18,2	342,6±14,2
Ca	66,4±3,85	42,4±2,39	52,7±3,08	50,4±3,11	50,6±2,97	47,5±2,76
Mg	137,6±11,6	56,4±2,41	66,1±1,79	64,4±3,63	67,1±2,37	68,9±2,22
Co	0,75±0,071	0,71±0,032	0,76±0,025	0,81±0,030	0,79±0,041	0,78±0,022
Sr	1,75±0,021	0,43±0,066	0,23±0,014	0,35±0,016	0,31±0,014	0,32±0,017
Ni	2,53±0,016	2,28±0,019	2,75±0,034	2,76±0,027	2,78±0,031	2,82±0,022
Cd	0,51±0,011	0,57±0,023	0,52±0,014	0,44±0,021	0,34±0,016	0,31±0,018
Pb	1,25±0,014	2,01±0,023	1,88±0,018	1,54±0,035	1,27±0,017	1,26±0,021
Сума	323,1±22,7	305,5±14,3	350,4±17,9	423,3±22,5	494,2±25,1	489,9±21,4

Так, у п'явок, які вийшли з коконів, відзначені мінімальні концентрації біофільної міді, які підвищуються на 70% до тримісячного віку і далі, в процесі росту, зазнають незначних коливання. Для новонароджених п'явок характерний високий, максимальний вміст цинку, який різко знижується (більш ніж на 60%) протягом першого місяця життя і починає істотно підвищуватися тільки з п'ятимісячного віці. Перше годування молодих п'явок відбувається в двотижневому віці, друге - ще через два тижні, далі - один раз на місяць. Таким чином, перші прийоми їжі не супроводжуються накопиченням цинку у тканинах зростаючих п'явок, і потреба в цьому біогенному елементі зростає у цих черв'яків на більш пізніх етапах росту і розвитку. Максимальні концентрації марганцю також виявлені в тканинах дитинчат, а вже через місяць їх значення зменшуються на 40% і далі спостерігаються незначні фазові зміни в вмісті цього металу на рівнях, що не досягають вихідних значень. Ріст і розвиток п'явок супроводжується багаторазовим (до 400%) підвищенням концентрації заліза, що характеризується дуже високою позитивною кореляцією. Мінімальний вміст цього мікроелементу відзначено в тканинах «нитчаток», максимальні - у семимісячних особин.

Для лужноземельних елементів (кальцій, магній і стронцій) характерна зворотня картина: їх максимальні концентрації присутні в тканинах п'явок, які вийшли з кокона, тоді як після перших прийомів їжі вони знижуються, і на подальших етапах росту не схильні до значних коливань.

Для концентрацій кобальту і нікелю характерно відсутність істотних відмінностей в тканинах різних вікових груп п'явок. Максимальні концентрації ксенобіотиків кадмію і свинцю виявлені в тканинах одномісячних п'явок. При подальшому розвитку і зростанні п'явок в їх тканинах не відбувається накопичення цих важких металів, навпаки, спостерігається рівномірне зниження їх концентрацій. Дане позитивне явище обумовлено декількома факторами: інтенсивним нарощуванням м'язової маси п'явок на всіх етапах росту і розвитку, наявністю ефективних механізмів

детоксикації та елімінації в їх організмі, якість води, в якій знаходяться п'явки і крові, якою вони харчуються.

У міру зростання у медичних п'явок значно підвищується фізіологічна потреба в таких ММЕ, як мідь, цинк і залізо. Що стосується марганцю, кальцію, магнію, кобальту, стронцію та нікелю, то їх стабільне утримання в тканинах підтримується на всіх етапах розвитку і зростання п'явок. Виявлено, що концентрації в тканинах зростаючих п'явок таких небезпечних ксенобіотиків, як кадмій і свинець, які не беруть участі в нормальних фізіологічних процесах п'явок, знижуються. Ймовірно вміст макро- і мікроелементів в п'явці має деякий терапевтичний вплив на організм жертви [23].

1.3 Біологічно активні речовини слинних залоз медичних п'явок

Секрет слинних залоз (ССЗ) медичної п'явки є гуморальним агентом гірудотерапії, широко використовуваного методу лікування багатьох захворювань шляхом приставлення п'явок [28]. Відомі дослідження з порівняння ССЗ МП, в результаті яких було виявлено, що *H. medicinalis* та *H. orientalis* найближчі один до одного за складом секрету [29].

Механізми комплексного впливу на організм жертви умовно можна поділити на:

- 1) деградацію позаклітинного матриксу (при укусі, порушуючи цілісність шкірних покривів);
- 2) інгібуючий ефект (пригнічення адгезії тромбоцитів);
- 3) антикоагулюючий ефект (пригнічення агрегації і коагуляції);
- 4) антимікробну дію (захист свого власного організму);
- 5) знеболюючі ефекти (має адаптивний характер – запобігання виявлення);

б) протизапальний вплив [30].

Деградація позаклітинного матриксу досягається завдяки літичним сполукам, ферментам: гіалуронідаза та колагеназа. Інгібування функцій тромбоцитів відбувається внаслідок дії антигемостатиків: калін, апіраза. Антикоагулюючий ефект зумовлюється присутністю в ССЗ п'явки гірудину, ацетилхоліну, гістаміноподібних речовин, дестабілази, інгібітору Ха фактору. Антимікробна активність виражається у присутності дестабілази, хлороміцетину, теромацину, тероміцину. Анальгезуючий та протизапальний ефекти забезпечується такими компонентами БАР медичної п'явки: еглін С, гірустазін інгібітор комплементу С1, бделастазін, бделіни [1, 30, 31].

1. Літичні сполуки (забезпечують проникнення речовин слини), до них відносяться ізопептидаза (дестабілаза), гіалуронідаза, колагеназа. Вони забезпечують руйнування тканин жертви, впливають на проникність міжклітинного матриксу дерми організму жертви. Ці речовини містяться в перших і середніх порціях секрету, в останніх – їх не виявлено [1, 31]

Дестабілаза (ізопептидаза) — це фермент проявляє активність мурамідази (лізоциму), руйнує зв'язки в плазмових, мембранних, структурних білках. Цей тип зв'язків утворюється при стабілізації фібрину [1, 2]. Молекулярну масу дестабілази визначають за допомогою електрофорезу і становить 12,3 кДа. Білок складається з 115 залишків амінокислот, з яких 14 – висококонсервативні залишки цистеїну, що утворюють сім містків S – S [32].

Біфункціональний фермент дестабілаза-лізоцим, забезпечує антимікробну і бактерицидну функції секрету п'явки, сполука поєднує ізопептидазну і лізоцимну або пептидоглікан-лізуючу (ПГЛ) функції. Лізоцими гідролізують $\beta(1-4)$ -зв'язок між залишками N-ацетилмурамової кислоти і N-ацетилглюкозамін в молекулі пептидоглікану клітинної стінки бактерій. Але лізоцимна або ПГЛ активність, як механізм руйнування пептидогліканів клітинних стінок бактерій, може включати, крім

глікозидазної, амідазну і пептидазну активності, спрямовані на гідроліз зв'язку між N-ацетилмурамовою кислотою і L-аланін і пептидних зв'язків між амінокислотами пептидного "хвоста", приєднаного до залишків ацетилмурамової кислоти пептидоглікана. Це також призводить до руйнування клітинної стінки бактерій [33].

ССЗ МП трьох видів відрізняються за рівнем їх лізоцимної (ПГЛ) активності. Глікозидазна активність секрету *H. verbana* майже в 2 рази перевищує активність двох інших видів МП. Глікозидазно-лізоцимна активність секретів *H. medicinalis* і *H. orientalis* практично однакова. Сумарна ПГЛ активність більшою мірою виражена в ССЗ найбільше у *H. medicinalis*, менше у *H. verbana*, в той час як в *H. orientalis* ця активність значно нижча [34].

Ізопептидаза здатна впливати на функціональну активність різних клітин: ендотеліоцитів, лімфоцитів, тромбоцитів, макрофагів тощо [1]. Виявляє виражену тромболітичну дію. Молекули фібрину у тромбах зшиті ізопептидними зв'язками, опосередкованими фактором XIIIa, які дестабілаза ефективно розщеплює. Так препарат дестабілази після введення внутрішньовенно лабораторним щурам з попередньо сформованими тромбамив яремній вені, викликає його розщеплення на 85% одразу після введення, і на 98% через 6 днів [32]. Інші джерела вказують на те, що дестабілаза викликає зменшення венозних і артеріальних тромбів на 47,6% і 74,6% відповідно. Фермент виявився більш ефективним в розчиненні тромбів в порівнянні зі стрептокіназою. Комбіноване введення обох ензимів має більший ефект, ніж їх ін'єкція окремо. Дестабілаза зменшує стабілізацію фібрину в тромбах [35].

Гіалуронідаза – фермент, що каталізує реакції гідролітичного розщеплення глюкоунідних зв'язків гіалуронової кислоти, таким чином діючи як фактор проникнення.

Гіалуронова кислота (ГК) – лінійний, нерозгалужений високомолекулярний полісахарид, що складається з повторюваних ланок

дисахариду D-глюкуронової кислоти і N-ацетил-D-глюкозаміну, пов'язаних через зв'язки β -1,4. Глікозоаміноглікани гіалуронової кислоти входять до складу міжклітинного матриксу та мембран клітин [1, 31]. Гіалуронідази поділяють на 3 класи глікозидаз, які розкладають гіалуронові кислоти, виходячи з особливостей субстрату та продуктів гідролізу:

- 1) гіалуронат-ліази (ЕС 4.2.2.1,гіалуронідаза *Streptococcus*);
- 2) гіалуронат-4-гліканогідролази (ЕС 3.2.1.35, бичача тестикулярная гіалуронідаза);
- 3) гіалуронат-3-гліканогідролази (ЕС 3.2.1.36, гіалуронідаза п'явки).

Гіалуронова кислота з високою молекулярною масою широко розподіляється серед різних тканин господаря і бере участь в численних фізіологічних процесах, а біологічні функції і застосування ГА залежать від його молекулярної маси. Низькомолекулярні олігосахариди ГК мають унікальну біологічну активність. Менші олігосахариди ГК можуть стимулювати проліферацію фібробластів і синтез колагену і навіть вибірково вбивати багато типів ракових клітин шляхом порушення взаємодії рецептор-гіалуронан.

Октасахариди ГК (ГК8) і декасахариди (ГК10) виявляють значну інгібуючу дію на ракові клітини, а тетрасахариди ГК (ГК4) і гексахариди (ГК6) можуть викликати дозрівання дендритних клітин через Toll-подібний рецептор (TLR) -4, пов'язаний з антигенпрезентуючими клітини вродженої імунної системи. Крім того, низькомолекулярні олігосахариди ГА легко засвоюються організмом і служать попередниками для синтезу високомолекулярних молекул [36].

Колагеназа – це фермент, що каталізує реакцію гідролізу волокон колагену, також виступає фактором проникнення.

Гіалуронідаза та колагеназа – ферменти, що також мають додаткову бактерицидну та бактеріостатичну дію [17].

2. Антигемостатики – перешкоджають розвитку механізмів згортання крові, забезпечують постійний кровотік протягом усього акту харчування.

Локалізуються в середній фракції слини. До них відносять: калін, апіраза, антагоніст PAF, інгібітор Ха-фактора, гірудин.

Калін – потужний інгібітор, пригнічує агрегацію тромбоцитів, викликану колагеном, а також адгезію тромбоцитів до мікроелементам покритим колагеном. Взаємодія каліну з колагеном – є причиною явища тривалої кровотечі, що спостерігається після укусу п'явки [37].

Апіраза – інгібітор агрегації тромбоцитів ініційований АДФ [1, 31], викликає гідроліз аденозинових нуклеотидів (АТФ і АДФ), причому майже з однаковою початковою швидкістю [1]. Апіраза визначає антисклеротичний ефект БАР п'явки, підвищує активність ліпопротеїдліпази, і як наслідок — знижує рівень загального холестерину і β -ліпопротеїдів низької щільності [38].

Антагоніст PAF (фактору активації тромбоцитів) – перешкоджає адгезії та активації тромбоцитів, міграції тромбоцитів і нейтрофілів до вогнища ураження [1, 31], а також скороченню гладенько-м'язових клітин. PAF – фосфогліцерид, що виділяється в процесі імунологічних реакцій нейтрофілами, базофілами та макрофагами, а також у процесі специфічної активації тромбоцитів. PAF є потужним медіатором запалення і, виділяючись у ділянці нанесення ранки, ініціює гемостаз та запальну реакцію [1].

Інгібітор Ха-фактора (FXaI – factor Xa inhibitor) – у каскаді білків плазменного гемостазу фактор Ха є ферментом, що каталізує перетворення протромбіну в тромбін у присутності іонів Ca^{2+} , фактора згортання крові V на поверхні мембран активованих тромбоцитів [1].

Гірудин – високоспецифічний інгібітор ферменту тромбіну, він блокує всі відомі реакції, активатором яких виступає тромбін [1, 31, 38, 39]: активацію фібриногену і перетворення його в нерозчинний фібриновий згусток; регуляцію V, VIII, XIII факторів згортання; регуляцію компонентів системи комплементу; зміни функціонального стану клітин крові (моноцитів, нейтрофілів), у тому числі і агрегацію тромбоцитів.

3. Блокатори захисних реакцій організму — це ряд ферментів поліпептидної природи, що виступають інгібіторами ферментів, які продукуються різними клітинами організму в ході реакції-відповіді на пошкодження шкіри [1]. Відіграють важливу функцію для організму п'явки, бо таким чином забезпечують захист організму від пошкодження ферментами крові жертви, знешкоджуючи їх. Дані речовини були виявлені в середніх та особливо останніх фракціях слини.

Бделіни – група поліпептидів із невеликою молекулярною масою, серед яких виділяють бделіни А з молекулярною масою 7 кДа і бделіни В із молекулярною масою 5 кДа. Методом рівновагової хроматографії виділені численні форми бделінів А і В; які позначені від А1 до А6 і від В1 до В6 [1]. Вони є сильними інгібіторами трипсину, плазміну [1, 38]. Вони не блокують активність хімотрипсину, тканинного та плазменного калікреїнів, субтилізину [1].

Гірустазин – належить до тієї ж інгібіторів сери нових протеаз [1, 31], молекулярна маса становить 5,9 кДа, він інгібує тканинний калікреїн, трипсин, хімотрипсин, катепсин G нейтрофілів [39].

LDTI (leech derived tryptase inhibitor) – білок з 46 амінокислот, інгібітор триптази, також трипсину і хімотрипсину. Не пригнічує жодну з серинових протеїназ в каскаді згортання крові, певно що його біологічна функція полягає у блокуванні захисних механізмів, ініційованих триптазою тучних клітин «годувальника».

Триптаза – трипсиноподібна серинова протеїназа, розщеплює пептидні субстрати на карбоксильному боці залишків лізину і аргініну. Зберігається в цитоплазматичних гранулах тучних клітин і приводить до руйнування білків екстраклітинного матриксу, при дегрануляції тучних клітин триптаза вивільняється разом з іншими медіаторами (гістамін, хімаза, протеоглікани) в позаклітинний простір. Відіграє важливу роль при алергічних та запальних реакціях [1, 40].

Триптаза бере участь у патогенезі різних захворювань людини, які характеризуються рекрутуванням великої кількості тучних клітин і їх дегрануляції. Також бере участь в онкогенезі через свою здатність активувати ферменти деградації матриксу (проурокинази і матриксні металлопротеїнази, простромелізін). Здатна до активації патогенних вірусів (вірус грипу, вірус Сендай і вірус імунодефіциту людини (ВІЛ). LDTI пригнічує опосередковану триптазою проліферацію кератиноцитів і фібробластів людини, а також може блокувати реплікацію вірусу ВІЛ-1. Відомі лише синтетичні інгібітори триптази, такі як диізопропілфторфосфат, фенілметилсульфонілфторид та тозил-L-лізинхлорметан. Проте вони непридатні для використання *in vivo*, через свою токсичність і низьку стабільність.

LDTI може бути корисним засобом для оцінки патофізіологічних функцій триптази людини і може проявляти терапевтичний потенціал [40].

LCI (leech carboxypeptidase inhibitor) – стабільний інгібітор карбоксипептидази типу А і В, містить 67 залишків, складається в компактний домен з п'яти ланцюгів антипаралельних β -листів і коротких α -спіралей, які жорстко стабілізовані чотирма дисульфідними зв'язками. Існує 2 ізоформи з молекулярною масою 7,3 та 7,2 кДа, припускають, що вони здатні блокувати гідроліз кінинів металлопротеїназами у місці укусу, посилюючи індуковане кінінами збільшення кровотоку [1, 41]. При рН 7,5. LCI - це швидкий жорстко зв'язуючий, конкурентний інгібітор карбоксипептидаз підшлункової залози з різними специфічними ознаками, тобто А1, А2 та В форм підшлункової залози ссавців та карбоксипептидази В плазми людини [42]. Тромбін-активованій інгібітор фібринолізу (ТАFI). Доведено його можливе використання в якості підсилювача тканинного плазміногену для лікування тромбозу [41].

Егліни – низькомолекулярні білки, що інгібують активність α -хімотрипсину, хімазимастоцитів, субтилізину та нейтральних протеїназ нейтрофілів: еластази і катепсину G [1, 31, 38].

4. Допоміжні речовини — сприяють транспортуванню, посиленню дії інших компонентів секрету МП [1]. Наявність у ССЗ великої кількості ліпідів дозволяє зробити припущення про можливість формування ліпідно-ферментних комплексів, в яких молекули білка чи їх активні ділянки можуть «екрануватися» ліпідами [1, 38]. В результаті клітини-макрофаги організму не розпізнають чужих білків і не реагують на них. Введені речовини тривало зберігаються в тканинах і, не дивлячись на надзвичайно малу кількість, виявляють значний і тривалий біологічний ефект [1].

1.4 Особливості біології лабораторних щурів

Щури відносяться до роду – *Ratus*, сімейства Мишеподібні – *Muridae*. Для експериментальних досліджень використовують альбіносні форми чорної (*Ratus ratus*) та сірої (*Ratus norvegicus*) порід. Вперше альбіноси були виведені в Англії (18 століття) як екзотичні експанати для зоопарку з сірої породи. Вважається, що лінії Вістар, Левіс, Спрагью – Девлей походять саме від норвезьких щурів. Для виведення інших ліній використовувалась чорна порода.

Вікові періоди лабораторних тварин практично не розглядаються в літературі. Разом з тим продовжують збільшуватися обсяги досліджень на тваринах, зростають вимоги до таких досліджень, що вимагає більш досконалих підходів до виконання експериментів. Часто одні і ті ж дії (фізіологічні, фармакологічні, патологічні) у тварин різних вікових груп викликають різні кількісні і якісні реакції [43].

Вікова періодизація лабораторних щурів (на основі анатомо-фізіологічних особливостей, інтенсивності росту, поведінкових реакцій, змін в статевій сфері) наступна.

1. Період молочного годування – тварини вигодовуються молоком матері, у гнізді. Дистантні рецептори не функціонують або функціонують недостатньо. В цей період з'являється шерсть і прорізаються молочні зуби. Період характеризується інтенсивним зростанням, середній щоденний приріст : маси тіла –5–15%; довжини тіла –2–8% [43]:

1) новонароджені тварини – шерстяний покрив і зуби відсутні, харчуються молозивом;

2) сосуни – шерстяний покрив і пігментація шкіри наявні, відкриваються очі. починають функціонувати дистантні рецептори. Реалізується поза стояння, щурята пересуваються по гнізду. У самок з'являються грудні соски [43].

2. Період статевого дозрівання – тварини здатні до самостійного годування, і готові залишити гніздо, їх необхідно відділити від матері. Добре розвинені рухові акти. Добре виражені вторинні статеві ознаки. Молочні зуби змінюються постійними. Інтенсивний лінійний ріст. Шерсть густа, очі блищать. Середній щоденний приріст : маси тіла –1-10%, довжини тіла –0,5-2%:

1) інфантильні тварини (статевонезрілий вік) – тварини не вимагають догляду матері. Удосконалюються рухові акти. Намічається диференціація вторинних статевих ознак (самці більші за самок). У частини самок відкривається піхва, а у самців відбувається опускання сім'яників в мошонку;

2) ювенільні тварини (предслучний вік) – добре виражені вторинні статеві ознаки: у самок відкрита піхва, у самців завершено опускання сім'яників в мошонку. З'являється статеве полювання [43].

3. Репродуктивний період – характеризується завершеністю розвитку статевих органів (диференційовані вторинні статеві ознаки). У самок встановилися статеві цикли. Інтенсивне розмноження. Значно знижений рівень лінійного зростання. Тварини фізично міцні. Шерсть густа. Середній щоденний приріст: маси тіла 0,15 – 1,5%, довжини тіла – 0,01 – 0,15%:

1) молоді тварини (молодість) – тварини допускаються в злучку. Розмноження інтенсивне. Приплід численний. Зуби білі без ознак стирання;

2) дорослі тварини (зрілий вік) – інтенсивність розмноження знижується. Зуби білі без нальоту, на них відзначаються перші ознаки стирання.

4. Період виражених старечих змін – спостерігається різке зниження або припинення статевого полювання і репродуктивної функції. Настання менопаузи. Зростання тіла значно уповільнено або припинено. Рухова активність знижена. Поверхня зубів стерта. Шерсть рідка, без блиску, нещільно прилягає до тіла. Виражена атрофія м'язів і шкіри. Виникають спонтанні пухлини. Відзначаються значна гіпофункція внутрішніх органів, ослаблення адаптації і процесів метаболізму. Середній щоденний приріст : маси тіла 0,01 – 0,2%, довжини тіла 0,001 – 0,005%.

1) предстарі тварини (передстаречий вік) – значно знижується розмноження. Приплід малий і часто нежиттєздатний. У самок порушується регулярність тічки. Кігті великі, викривлені;

2) старі тварини (старечий вік) – розмноження різко знижено або повністю припиняється. У більшості самок настає менопауза. Шерсть рідка, облісїла. На зубах коричневий наліт, їх ріжучі поверхні стерті. Кігті довгі, викривлені;

3) Гранично старі тварини (гранично старечий вік) – статєва функція припинена. Значне облісіння. Вага тіла знижується. Відзначається загальне постаріння організму.

Норма лейкоцитарних показників крові лабораторних щурів. Загальна кількість периферичної крові складає $7,47 \pm 0,15\%$ від загальної маси тіла (тобто, при масі 200 г 14,6 – 15,3 г припадає на периферичну кров). Морфологічний склад крові лабораторних щурів:

1) еритроцити складають $5,31 - 11 \times 10^{12}/л$ (середнє значення $8 \times 10^{12}/л$), з них приблизно 0,6 – 4,9% складають ретикулоцити, тривалість циркуляції еритроцитів 8 діб [43];

- 2) лейкоцити складають 5 – 25,6 Г/л (середнє значення 12,5 Г/л) [34];
- 3) абсолютна кількість тромбоцитів 430 – 1000 Г/л (середнє значення 500 Г/л) [43].

Відносні показники лейкоцитарної формули білих щурів в нормі: нейтрофіли – 18 – 36% (середнє значення 20%); еозинофіли – 1 – 4%; базофіли – 0 – 0,1%; лімфоцити – 62 – 75%; моноцити – 1 – 6% [43].

Морфологічний склад крові лабораторних щурів варіюється в залежності від різних факторів (вікові особливості, сезонні коливання). Таким чином, згідно сезонним коливанням загальна кількість лейкоцитів влітку має найменше значення (не значно нижче від нормального середнього значення), різко підвищується в період від осені до зими і нормалізується весною (має нормальне фізіологічне значення) [43].

Відносний вміст еозинофілів влітку має найнижче значення, восени і взимку підвищується у 2,5 рази, і весною нормалізується (знижується у 2 рази). Відносний вміст паличкоядерних нейтрофілів у периферичній крові щурів має найнижче значення влітку, восени спостерігається підвищення у 2,5 рази, взимку – зниження у 1,5 рази, весною – підвищення у 1,2 рази. Відносний вміст сегментоядерних нейтрофілів змінюється таким чином: найнижче значення простежується весною, на період всіх інших сезонів встановлюється на більш високому рівні (підвищення відносно весни у 1,3 – 1,4 рази). Відносна кількість лімфоцитів не значно змінюється протягом сезонів (найнижче значення зимою, найвище – весною). Відносна кількість моноцитів має найнижче значення в період від осені і до зими, весною підвищується у 2,5 рази, а влітку знов знижується [43].

Головною біологічною ланкою в експерименті є лабораторні тварини. Результати досліджень і висновки експериментальної роботи в повній мірі залежать від вибору біологічного об'єкту. Це пов'язано з їх морфофізіологічними і якісними особливостями, а саме – здоров'я, генетична однорідність, відсутність латентних патологій [44].

Лабораторних щурів часто використовують в дослідженнях спрямованих на визначення токсичності, для цього беруть здорових молодих статевозрілих особин. Такі експерименти можна проводити як на лінійних так і на нелінійних тваринах. При використанні перших обов'язково потрібно вказувати лінію, адже чутливість до токсичної дії може бути генетично детермінованою. Бажано подібні дослідження проводити на тваринах обох статей [44].

При проведенні досліджень необхідно враховувати труднощі екстраполяції даних, отриманих на тваринах, на організм людини:

1) вік щура складає 2,5 – 3 роки, в той час як у людини – 70 – 80 років. Співвідношення довготи життя щура до людини 1:30 [44];

2) для підтримки життя щурам необхідно, щоб відносна кількість білків у раціоні складала 20 – 27% від загальної кількості калорій, людині потребується менше половини цього значення [44];

3) шкіра лабораторних щурів не має ороговілого шару, який наявний у людини; шкіра тварин тонша [44];

4) головний мозок щурів не має звивин [45], в той час як у людини наявні численні звивини, які є показником ступеня розвитку кори;

5) різці у щурів зростають постійно [47], і при нормальному годуванні у них, на відміну від людини, не утворюється зубний камінь; не буває у них і спонтанної періодонтальної хвороби;

6) матка щурів має два роги і не одну, а дві шийки, тому в нормі у щурів в посліді міститься від 8 до 14 дитинчат [45, 46];

7) в печінці і щурів і людини функціонує фермент дельта-5-десатураза (фермент, що каталізує перетворення одинарного зв'язку між атомами вуглецю в ацільних ланцюгах (C-C) в подвійні зв'язку (C = C); однак у щурів цей фермент володіє значно більшою активністю, ніж у людини [47];

8) у людини жовчні кислоти формуються з холестерину в печінці, потім вони потрапляють в жовчний міхур, а звідти в кишечник; у щурів жовчного міхура немає [45, 46], тому жовчні кислоти в їх організмі

виділяються безпосередньо в кишечник; у цих тварин виробляється особлива жовчна кислота, яка у людей відсутня – муріхолева [48]; це вказує на більшу стійкість щурів до змін рівня сироваткового холестерину, ніж у людей;

9) метаболізм каротиноїдів у щурів відбувається в ентероцитах, де весь β -каротин йде на утворення вітаміну А; у людини ж, навпаки, значна кількість каротиноїдів поглинається в незмінному вигляді і приблизно 15% залишається в організмі у вигляді запасу в печінці і адипоцитах [48, 50];

10) щури здатні синтезувати вітамін С в печінці із глюкози з допомогою L-гулонооксидази, що забезпечує постійний рівень цього вітаміну в організмі щура. У людини, приматів і морської свинки через відсутність цього ферменту, вітамін С не синтезується взагалі. Ця обставина не дозволяє використовувати щурів для досліджень пов'язаних з метаболізмом вітаміну С [44].

Наведені відмінності в анатомії, фізіології і біохімії лише деякі із загальної маси відмінностей, а, отже, результати досліджень, проведених на щурах, можуть сильно відрізнятись від результатів, які будуть спостерігатися у людей. Тому необхідно уважно планувати дослідження, з урахуванням особливостей, обраного виду тварин, і їх збігу з параметрами людини.

1.5 Напрямки застосування і біологічні ефекти гірудотерапії

Слина п'явки, потрапляючи до організму, активує механізми блокування утворення гемостатичного тромбу. В пошкоджених шкіряних судинах вона викликає тимчасове незгортання крові.

Дослід, проведений Г.С. Ісаханьяном із співавторами [51], дозволив виявити неоднорідність зміни властивостей крові, яка коагулюється: у одних хворих, і розріжується в інших. Більш того, деякі показники коагуляції у того самого хворого змінюються різноспрямовано. Це вказує на комплексний

вплив ССЗ медичної п'явки і на те, що біологічно активні речовини МП сприяють нормалізації показників коагуляції в кінцевому результаті. Таким чином, виявлена відповідна закономірність : при вихідному стані гіперкоагуляції використання п'явок сприяє активації системи протизгортання, а вихідна гіпокоагуляція супроводжувалася підвищенням згортання крові [1, 52]. Це вказує на те, що за допомогою БАР медичної п'явки можна впливати і корегувати показники згортання крові.

Достовірне зниження в крові рівня холестерину і тригліцеридів, є доказом наявності в слині тварини речовин антисклеротичної дії, головним чином такий ефект досягається ферментом апіразою.

О. І. Глазова, Є. М. Тарєєв, А. А. Герне та інші вперше встановили позитивний вплив ССЗ п'явки на інфарктних та предінфарктних хворих. Були досягнуті позитивні результати в корекції системи згортання і фібринолізу при гірудотерапії інфекційного міокардиту [1].

Терапевтичний ефект полягає в акті «кровопускання», тобто кількості втраченої жертвою крові, яку поглинає п'явка та вплив БАР секрету слинних залоз на внутрішнє середовище організму [53, 54]. П'явка виробляє ряд речовин; антикоагулянтів, як гірудин, калін, інгібітори каллікреїна, гіалуронідази, гістамінподібні вазодилататори, колагеназа і слабо охарактеризовані анестетичні сполуки [55].

Медичне застосування медичних п'явок. Реконструктивна та мікрохірургія. У медицині використовуються щелепно-лицевими та іншими мікрохірургами для сприяння усуненню скомпонованої венозної тканини [53]. Мікрохірургія – це тип хірургічних операцій, що виконуються з використанням мікроінструментів під мікроскопом з метою анастомозу невеликих кровоносних судин, вен та артерій під час реплантації тканин або ампутованих частин тіла. Тромбоз артерій не є поширеним випадком, але венозна оклюзія є серйозною загрозою для нових трансплантованих тканинах і може призвести до утворення тромбу, некрозу тканин. Звільнення венозних застоїв є життєво важливим кроком для пом'якшення цього ризику та

спасіння цих пересаджених тканин [56]. Активний дренаж крові, що виникає внаслідок акту смоктання п'явки, також пасивне протікання після відділення п'явки стимулюють розвантаження венозного клапана.

Знижуючий ефект – це акумулятивний результат протікання крові, викликаний прикусом п'явки, що є наслідком багатьох факторів, включаючи крововтрату, секретовані біоактивні ферменти, антикоагулянти та вазодилататори [56].

Лікувальна терапія корисна у випадках травми авалюзії на обличчі, де присутнє артеріальне кровопостачання, але бракує венозного відтоку. М'які тканини піддаються щадному ефекту [53].

Така терапія також використовується в косметології, лікування обморожень, есенціальної гіпертонії та різних типів артритів [58]. Німецьке дослідження з 51 пацієнтом колінного остеоартриту показало більше спадіння болю (через сім днів після лікування п'явки) порівняно з контролем, хто отримував місцеве застосування диклофенаку [56].

Гірудин може зменшити синовіальне запалення у пацієнтів з артритом, інгібуючи білок DING, похідну синовіального стимулюючого протеїну, який діє як ауто антиген у пацієнтів з ревматоїдним артритом [57].

Лікування раку і метастазів. Мова йдеться про використання секрету слинних залоз п'явки як антиметастатичний засіб, а не використовувати його для лікування самої пухлини. Застосування ліків як антиметастатичного засобу було раніше зареєстрованою метастатичною інгібіторною активністю деякого антикоагулянту, такого як варфарин та гепарин. Передбачається, що надзвичайне поєднання багатьох антикоагулянтів, інгібіторів протеаз та інших компонентів у слині п'явки може бути більш потужним, як антиметастатичний препарат [58].

Виявлено, що екстракт слинної залози з *H. ghilianii* та *Haementeria officinalis* пригнічує метастатичну колонізацію клітин пухлини легенів, які вводять внутрішньовенно до організму лабораторних тварин [59].

В іншому дослідженні описано синтетичний гірудин препарат як ефективний інгібітор метастазування широкого спектру злоякісних пухлинних клітин, таких як карцинома легенів, карцинома молочної залози, карцинома сечового міхура, колоректального раку, саркома м'яких тканин, лейкемії та лімфоми [60].

Було доведено, що екстракт слини з тропічного п'явки *H. manillensis* демонстрував антипроліферативну активність *in vitro* проти дрібноклітинного раку легень (SW1271) [61].

Цукровий діабет – група порушень метаболізму, що призводить до підвищеного рівня глюкози в крові, що в кінцевому підсумку призводить до клінічних симптомів та ускладнень. Немає документованих наукових доповідей про гірудотерапію як антигіперглікемічний препарат. З іншого боку, застосування п'явки традиційно використовувалось для лікування ускладнень цукрового діабету [58].

Одним з найбільш важких ускладнень цукрового діабету є серцево-судинні захворювання, пов'язані з коронарним атеросклерозом, гіперглікемією, підвищеним рівнем ліпідів крові, порушенням адгезії тромбоцитів, факторами згортання крові, високим кров'яним тиском, окисним стресом та запаленням. Діабетичні пацієнти знаходяться під високим ризиком інфаркту міокарда, що є головною причиною, що викликає смерть у людей з цукровим діабетом 2 типу [58].

З іншого боку, наявність пептидів та білків, що впливають на кров у слину п'явки, може бути важливою перевагою для зняття цих умов. Перш за все, гірудин відіграє важливу роль у запобіганні процесів згортання крові через його здатність зв'язувати тромбін і, отже, пригнічувати перетворення фібриногену в фібрин, опосередковану тромбіном, що дозволяє ефективно лікувати ішемічні явища. Калін, виділений із *H. medicinalis*, перешкоджає формуванню тромбінів [58, 62].

До 2002 року був відкритий офіційний центр гірудотерапії, який протягом короткого періоду часу став міжнародним центром лікування

цукрового діабету за допомогою п'явок. Засновник цього центру заявив, що за один сеанс він буде використовувати чотири п'явки, і в багатьох важких випадках більше п'явок можуть запобігти ампутації [58].

Інфекційні захворювання. Постійно зростаючі темпи інфекційних захворювань призвели до більш високого використання комерційно доступних антибіотиків, що призвело до появи нового складного явища, яке називається стійкістю до антимікробних агентів. Тому вчені створюють нові стратегії розвитку протимікробних препаратів з новими механізмами дії та зниженням частоти бактеріальної резистентності.

Дестабілаза – протеїн з лізоцимподібною активністю, володіє антибактеріальною дією проти деяких бактеріальних штамів, оскільки він може знищити їх клітинні компоненти. Теромацін та тероміцін були виділені з тілесної рідини п'явки *T. tessulatum*. Встановлено, що обидва мають антибактеріальну активність проти грампозитивних бактеріальних штамів *Micrococcus luteus* [58].

Секреція слинної залоз медичних п'явок як багатокомпонентна система білків і низькомолекулярних речовин активує підшкірні тучні клітини щура *in vitro*, викликаючи зниження індексу насичення гепарином і збільшуючи деякі характерні морфометричні параметри стовбурових клітин. Ті ж самі зміни в тучних клітинах були виявлені при аналізі деяких зразків підшкірної клітинної тканини в області шкіри, пошкодженої укусом п'явки. Ці зміни зберігаються протягом 3 днів. Активація тучних клітин за допомогою ССЗ поширюється на віддалені підшкірні тучні клітини. Це виражається в різкому зниженні показника насичення гепарином. Вторинне вилугування в цих віддалених точках провокує зниження активації тучних клітин і деяке зниження вмісту гепарину в крові після п'явки. Таким чином передбачається участь гепарину, що секретується активованими тучними клітинами, в підтримці кровотечі після укусу п'явки, феномен, який забезпечує розвантаження капілярного пулу шляхом застосування лікарських п'явок для лікування багатьох захворювань [63].

Гіалуронідази, зокрема п'явки, привертає до себе увагу через її широкий спектр застосування в медицині і має великий потенціал для ферментативного виробництва гіалуронових олігосахаридів [36].

Таким чином, аналіз доступної літератури виявив, що гірудотерапія має чітко виражений позитивний терапевтичний вплив і фізіологічний ефект на живі організми, головним чином на організм людини. Проте даних про механізми імунотропний ефект БАР МП в літературі не достатньо.

2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Матеріали та схема дослідження

Експериментальні дослідження проводились на 24 безпорідних молодих статевозрілих лабораторних щурах (самці, вік 7-8 місяців, маса 180-220 г). До дослідження були допущені лише фізіологічно здорові тварини, які пройшли карантинний режим і не мали ніяких захворювань. Тварин утримували в стандартних умовах спеціалізованого віварію біологічного факультету Запорізького національного університету в пластмасових клітках при природному й додатковому штучному освітленні (з 8:00 до 17:00) при температурі 22-24 °С. Тварин годували збалансованим комбікормом з 9:00 до 17:00 години, доступ до питної води був без обмежень.

Схема дослідження включала дослідження дії БАР МП *in vitro* та *in vivo*. Лабораторні щури були поділені з використанням принципу рандомізації на 2 підгрупи:

- 1) контрольна група – інтактні щури (n=12);
- 2) дослідна група щурів (n=12), яким здійснювали гірудовплив (триразову приставку по 1 голодній МП з інтервалом 2 доби) і досліджували показники імунної системи через 2 тижні після останньої приставки МП.

Для дослідів використовували голодних медичних п'явок виду *Hirudo verbana* (вік 7-8 місяців, термін голодування не менше 4 місяців), вирощених на базі навчально-науково-дослідної лабораторії клітинної та організменної біотехнології Запорізького національного університету (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.) [64].

Маніпуляцію приставки МП проводили швидко, шляхом короткочасного фіксування тварини (4-5 хв.), гоління хутра взагрівовій ділянці і приставки МП. Для певності результату в шприц вносили 2 МП,

після присмокування однієї з них, іншу знімали, таким чином повний акт годування проходила 1 МП (25-30 хв.). По закінченню приставки ранку тварин присипали стерильною крейдою. Кожен із дослідних щурів після приставки МП перебував в індивідуальній клітці до повного загоєння ранки.

Дослідження здійснювали в один і той же час доби. Всі маніпуляції проводили з дотриманням регламентованих норм і правил поводження з лабораторними тваринами[65].

Тварин виводили з експерименту під ефірним наркозом методом декапітації. Кров лабораторних щурів стабілізували антикоагулянтом та одразу аналізували.

Ефект гірудовпливу *in vivo* у лабораторних щурів оцінювали через 2 тижні після останньої приставки МП. Визначали кількість лейкоцитів, лейкоцитарну формулу крові у мазку, лейкоцитарні показники (ІЛГ, ІСЛЕ, ІСЛМ), фагоцитарну активність нейтрофілів.

Ефект гірудовпливу *in vitro* оцінювали на ізольованих зразках крові лабораторних щурів контрольної (інтактною) та дослідної (після гірудовпливу шляхом триразової приставки МП) групи. Зі стабілізованих гепарином зразків крові лабораторних щурів, отриманих після декапітації тварин, відбирали по 200 мкл в 2 хімічно чисті епіндорфи: 1 - спонтанний зразок, 2 - стимульований додаванням тотальних антигенів (АГ) сольового екстракту з тіл *H. verbana* у дозі 60 мкг/мл [66], після чого їх закривали та інкубували протягом 2 годин в термостаті при +37 °С. У спонтанних та АГ-стимульованих зразках крові 24 щурів до та після курсу ГВ аналізували кількість лейкоцитів, лейкоцитарну формулу крові, визначали лейкоцитарні індекси.

Сольовий екстракт із тіл МП виду *H. verbana*, який використовували для тестування гірудовпливу *in vitro*, отримували за запатентованою методикою [66]. Брали 40 МП віком 7-8 місяців, які голодували понад 4 місяці, їх тіла фрагментували ножицями та промивали забуференим (рН=7,2) фізрозчином (ЗФР) від залишків крові в органах системи травлення. Далі

частки кільчеців фрагментували у фарфоровій ступці з кварцевим піском. В тканинний гомогенат додавали ЗФР у співвідношенні 1:10 і екстрагували в холодильнику протягом 12 годин при +4°C із періодичним струшуванням. Надосад центрифугували в рефрижераторній центрифугі при 1500 об./хв. протягом 30 хв. Далі супернатант стерилізували шляхом пропускання через бактеріальний фільтр із діаметром пор 0,23 мкм, ампулювали в мікропробірках для зберігання при температурі -20 °С до використання. Концентрацію білка (мкг/мкл) в екстракті визначали за загальноприйнятим методом Лоурі [67]. Отримані показники використовували для розрахунку доз АГ кільчеців при тестуванні отриманої крові.

2.2 Методи дослідження

2.2.1 Імунологічні методи дослідження

2.2.1.1 Підрахунок кількості лейкоцитів у камері Горяєва

Кількість лейкоцитів аналізували за методом П'ятницького [68]. Досліджувану стабілізовану антикоагулянтом венозну кров розводили в 20 разів. Для цього в лунку серологічного планшету вносили 0,38 мл 3% розчину оцтової кислоти, що містила додатково кілька крапель метиленового синього (для фарбування ядер лейкоцитів), і додавали 0,02 мл досліджуваної крові. Суміш ретельно перемішували піпеткою та залишали на 1-2 хв. до повного лізису еритроцитів, після чого знов ретельно перемішували і заповнювали нею камеру Горяєва, залишали її в горизонтальному положенні на 1 хв. для осідання лейкоцитів.

Лейкоцити підраховували під мікроскопом у 100 великих квадратах камери Горяєва при малому збільшенні (окуляр К7×, об'єктив 20×).

Для того, щоб повторно не підрахувати один і той же лейкоцит, підрахунок проводили зліва направо, зверху вниз, при цьому в кожному

квадраті рахували елементи, що лежать всередині, на лівій та верхній сторонах квадрата.

Розрахунок кількості лейкоцитів ($10^9/\text{л}$ або $\text{Г}/\text{л}$) проводили, виходячи з розведення крові (20), числа підрахованих квадратів (100) та об'єму одного великого квадрата ($1/250$ мкл), за формулою [2.1]:

$$X = a \times 250 \times 20 / 100, \text{ тобто } X = a \times 50, \quad (2.1)$$

де X – число лейкоцитів у 1 мкл крові;

a – число лейкоцитів у 100 великих квадратах [69].

2.2.1.2 Приготування та фарбування мазка крові

Мазки крові для морфологічного дослідження готували за стандартним способом та фарбували за Унна – Папенгеймом. Висушені на повітрі мазки фіксували етиловим спиртом протягом 5 хв., потім проводили експозицію 4 хв. у фосфатному буфері Соренсена з рН 6,8. Спочатку мазки крові фарбували 1 хвилину насиченим розчином фарби Май-Грюнвальда, промивали у дистильованій воді, а потім дофарбовували протягом 15 хв. 10-15% розчином фарби Романовського-Гімза, приготованої на буфері Соренсена з рН 6,8, після чого ще раз промивали у дистильованій воді, диференціювали у 0,01% розчині соляної кислоти промивали у кількох порціях дистильованої води, висушували на повітрі [70].

2.2.1.3 Визначення лейкоцитарної формули крові

Лейкоцитарна формула – це процентне співвідношення різних видів лейкоцитів. Використовували уніфікований метод морфологічного дослідження формених елементів крові з диференційним підрахунком лейкоцитарної формули. Аналіз пофарбованого мазка крові здійснювали під імерсійним об'єктивом (100×) мікроскопа [68].

Реактиви та обладнання: діетиловий ефір, мікроскоп, імерсійне масло.

Хід дослідження. За допомогою об'єктива знаходили край мазка крові. Наносили каплю імерсійного масла та не змінюючи положення скла, переводили імерсійний об'єктив (90) таким чином, щоб він занурився в каплю масла. За допомогою мікрогвинта відповідну фокусну відстань, встановлювали чітке бачення клітин. При дослідженні лейкоцитарної формули необхідно диференціювати не пошкодженні лейкоцити. Для отримання достовірних результатів лейкоцити рахували в різних ділянках мазка. Для уникнення повторного підрахунку одних і тих же клітин рухались по мазку крові зигзагами. Після завершення аналізу 200 лейкоцитів визначали лейкоцитарну формулу – абсолютне та відносне співвідношення різних видів лейкоцитів [68].

При диференціюванні лейкоцитів враховували наступні їх морфологічні ознаки (рис. 2.1-2.4).

Лейкоцити периферичної крові діляться на гранулоцити (нейтрофіли, еозинофіли, базофіли, рис. 2.1-2.3) і агранулоцити (лімфоцити, моноцити, рис. 2.1, 2.4).

Нейтрофіли в залежності від стадії розвитку мають різне ядро, в нормі у крові містяться паличкоядерні та сегментоядерні нейтрофіли, назва вказує на форму ядра. Ядро паличкоядерних нейтрофілів має чітко форму «кільця», перетяжки відсутні, в той час як сегментоядерні нейтрофіли (зрілі) мають перетяжки, ядро має вигляд «намиста». Кількість сегментів варіюється в

межах 2 – 5, якщо сегментів більше, це вказує на патологію. Більшу частину клітини займає блідо-рожева цитоплазма з рясною нерівномірною дрібною зернистістю, забарвленою в рожево-фіолетовий колір (рис. 2.2).

Еозинофіли також морфологічно розрізняються на паличкоядерні, сегментоядерні, юні, в крові циркулюють частіше сегментоядерні, рідше паличкоядерні. Паличкоядерні мають кільцеподібне ядро без перетяжок, сегментоядерні – з перетяжками, вони зазвичай мають 2 сегменти. Ядро у еозинофілів менш щільне в порівнянні з нейтрофілами. Цитоплазма містить яскраво червону зернистість, цитоплазма блідо-рожева (рис. 2.3).

Базофіли дещо менші за сегментоядерні нейтрофіли. Цитоплазма забарвлюється в блідий синювато-фіолетовий колір. У ній є зерна різної величини, забарвлені в інтенсивно фіолетовий колір. Ядра в паличкоядерних і сегментоядерних базофілах мають рихлу структуру і забарвлюються у фіолетовий колір (рис. 2.3).

Лімфоцити мають округле ядро, деколи бобовидне, структура груба, частіше складається з грубих грудок. Ядро забарвлюється в темно- або світло- фіолетові кольори Обідок цитоплазми буває вузький, іноді ледве помітний, або широкий. Цитоплазма лімфоцита щура світло-синя з проясненням навколо ядра. Деяка частина лімфоцитів має в цитоплазмі азурофільну зернистість, що забарвлюється в червоний колір (рис. 2.4).

Моноцити подібно до лімфоцитів мають велике ядро, що займає більшу частину клітини. Воно може бути бобовидним або мати форму гриба і т.п. Ядро забарвлюється в червонувато-фіолетовий колір – світліший, ніж у нейтрофільних лейкоцитів і лімфоцитів. Цитоплазма забарвлюється в димчастий або синювато-димчастий, а іноді синій колір і часто містить у великій кількості дрібну азурофільну зернистість (рис. 2.4).

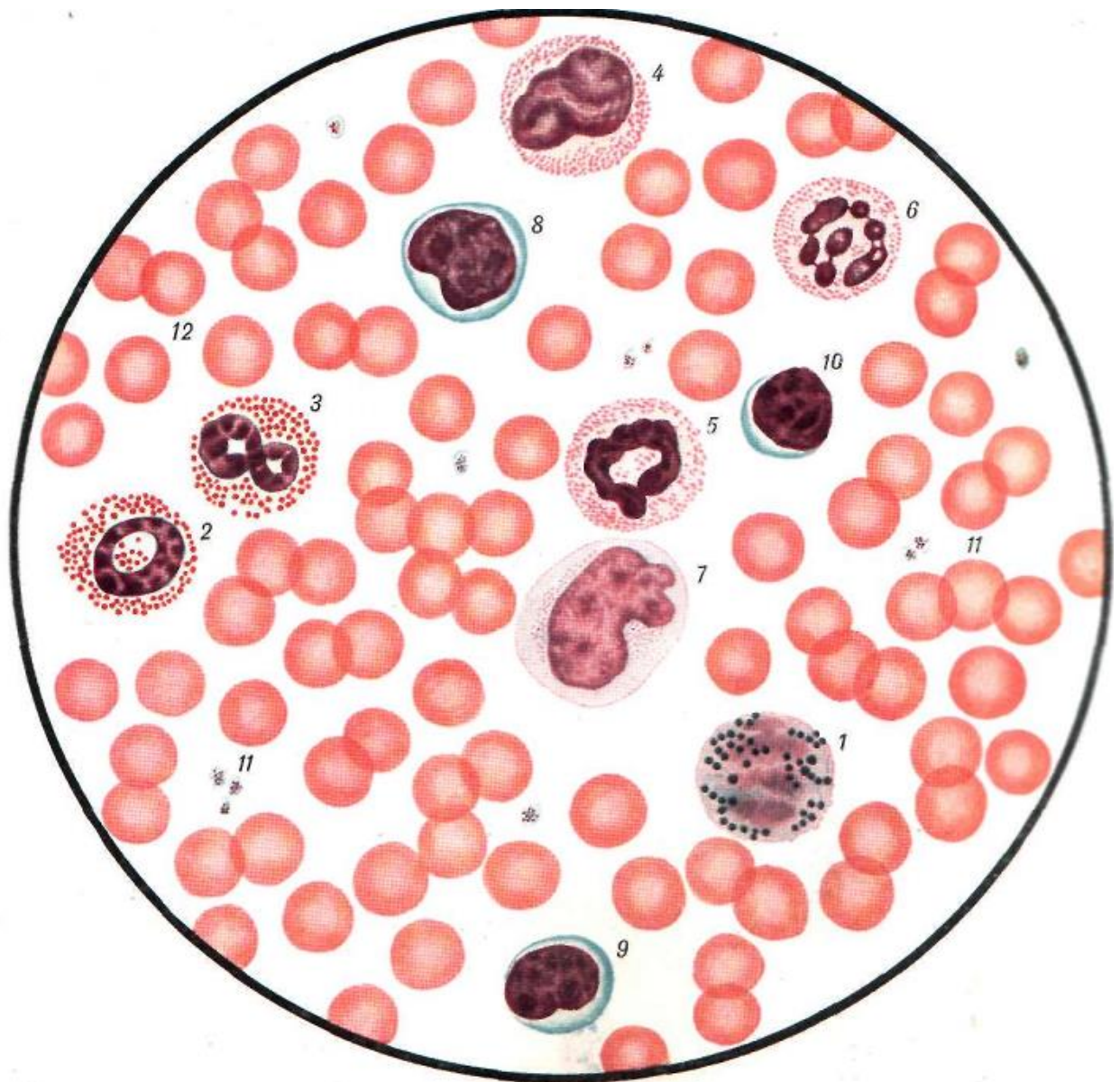


Рисунок 2.1 – Загальна мікроскопічна картина крові щура: 1 – сегментоядерний базофіл, 2-3 – паличкоядерні еозинофіли, 4-6 – спеціальні гранулоцити (нейтрофіли), 4 – міелоцит (розвивається в юний), 5 – паличкоядерний (кільчасте ядро) 6 – сегментоядерний, 7 – моноцит, 8 – великий лімфоцит, 9 – середній лімфоцит, 10 – невеликий лімфоцит, 11 – кров'яні пластинки, 12 – еритроцит [71]

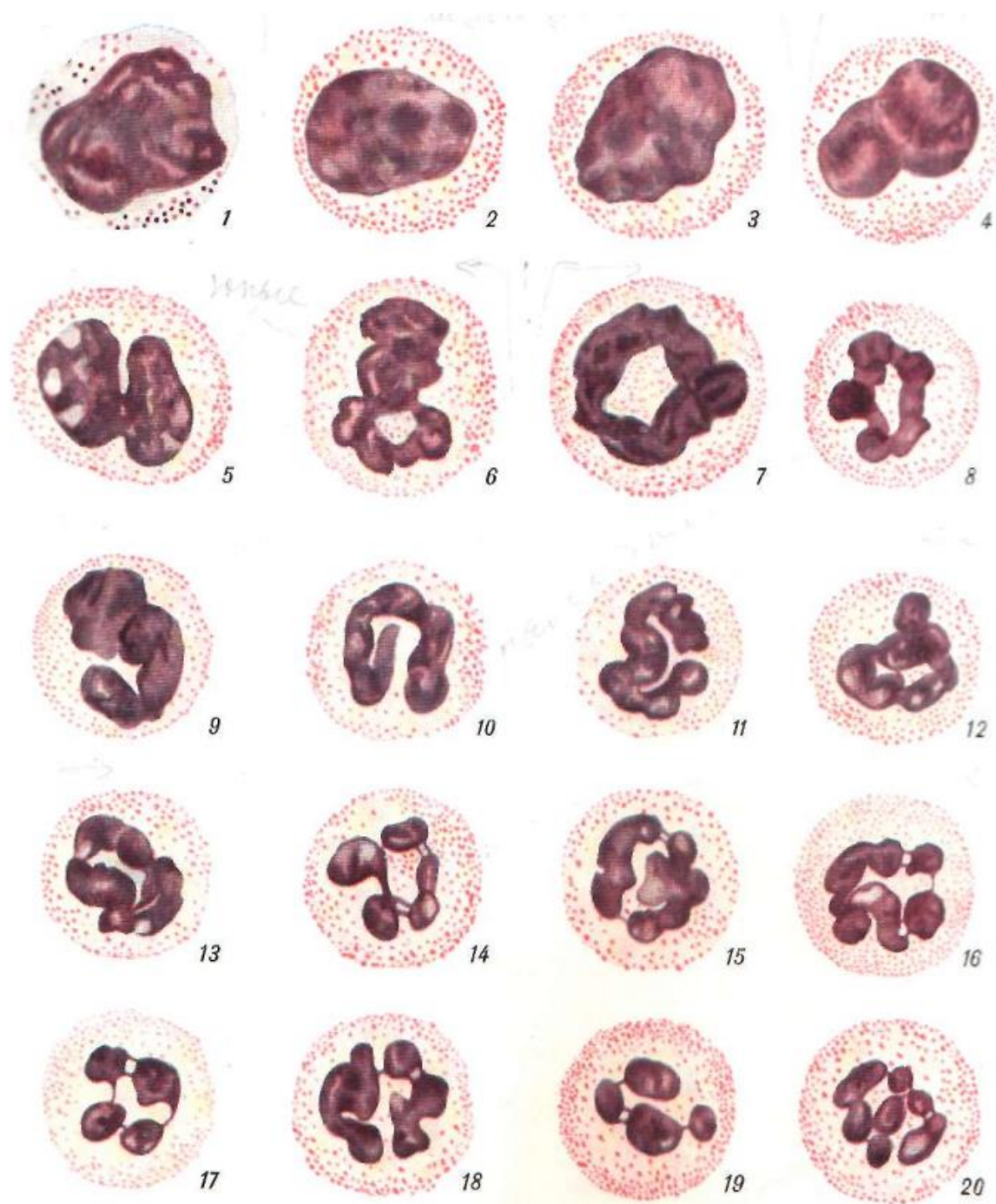


Рисунок 2.2 – Спеціальні гранулоцити (нейтрофіли) крові щурів: 1 – промієліт, 2,3 – мієлоцит, 4,5,6 – юні, 7-12 – паличкоядерні, 13-20 – сегментоядерні спеціальні гранулоцити. В 6,7,8,12,13,14,15,16,17,18,20 – добре помітний кільцевий тип дозрівання ядра [71]

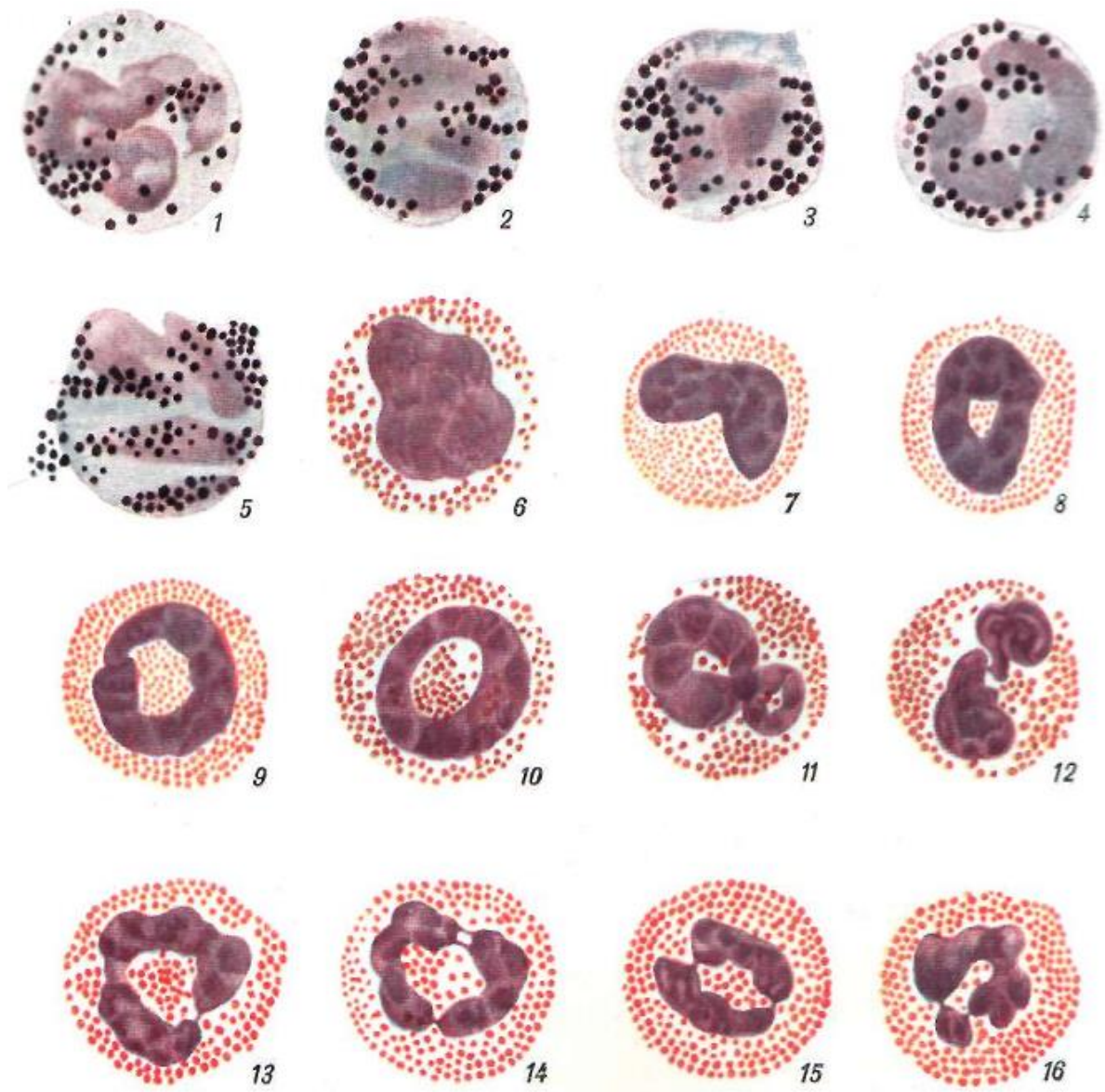


Рисунок 2.3 – Базофіли і еозинофіли крові щура: 1-5 – базофіли: 3 - міелоцит, 1 – паличкоядерні, 2,4,5 – сегментоядерні базофіли, 5 – деяка деформація клітини, 6-16 – еозинофіли: 6 – міелоцит: 7 – юний, 8-11 – паличкоядерний, 12-16 – сегментоядерний. Для щурів типова кільцева форма ядра гранулоцитів [71]

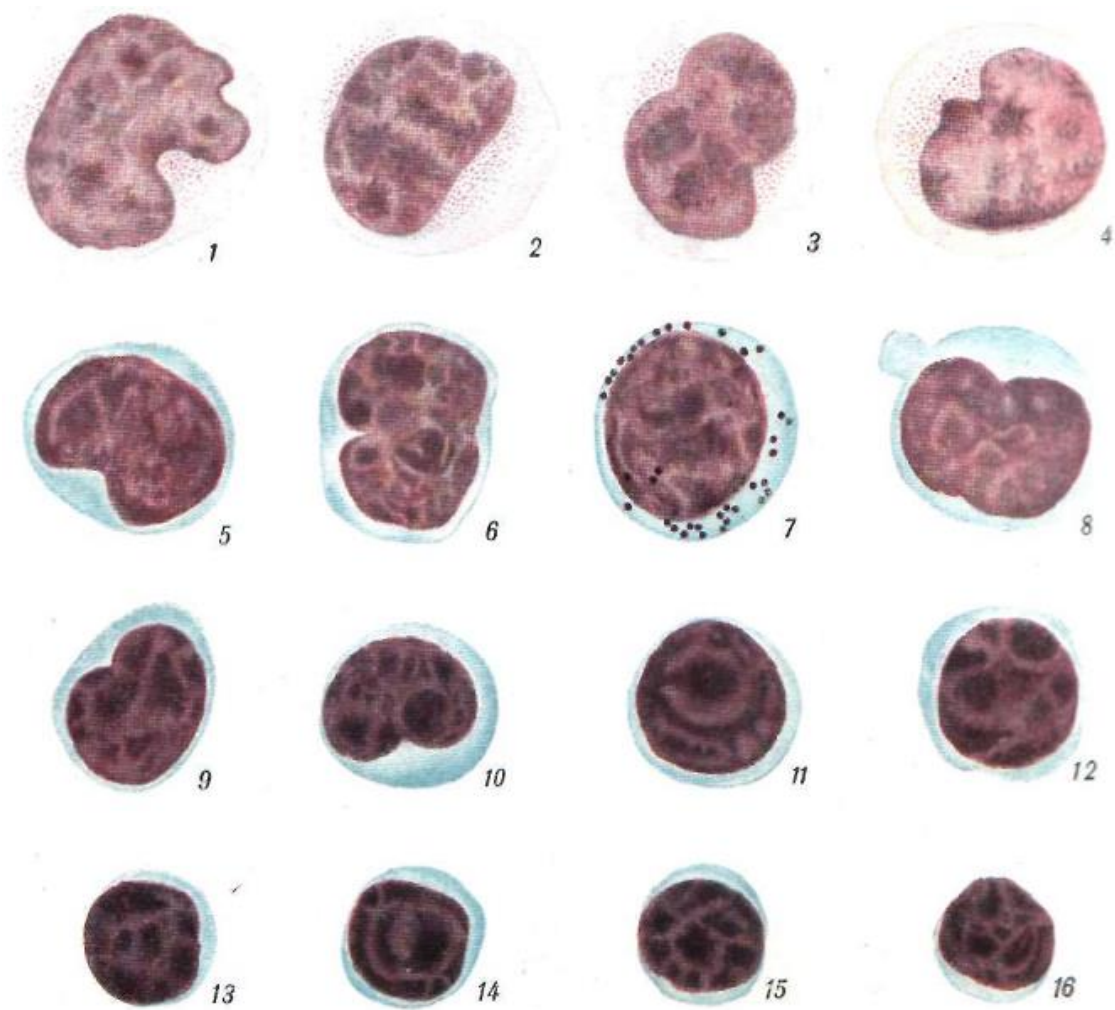


Рисунок 2.4 – Агранулоцити крові щура: 1-4 – моноцити, 5-8 – великі лімфоцити, 7 – чітко виражена азурофільна зернистість, 9-12 – середні лімфоцити, 13-16 – малі лімфоцити [71]

2.2.1.4 Дослідження лейкоцитарних індексів периферичної крові

Індекс співвідношення лімфоцитів і моноцитів (ІСЛМ) – вказує на взаємовідношення афекторних і ефекторних ланок імунологічного процесу. Розраховується за формулою [72]:

$$\text{ІСЛМ} = \frac{\text{Лім}}{\text{Мон}} \quad (2.2)$$

де Лім – лімфоцити (Г/л);

Мон – моноцити (Г/л).

Індекс співвідношення лімфоцитів і еозинофілів (ІСЛЕ) – вказує на орієнтоване взаємовідношення процесів гіперчутливості негайного і уповільненого типу. Розраховується за такою формулою [73]:

$$\text{ІСЛЕ} = \frac{\text{Лім}}{\text{ЕозФ}} \quad (2.3)$$

де Лім – лімфоцити (Г/л);

ЕозФ – еозинофіли (Г/л).

Підвищення значення цього показника вказує на переважання гіперчутливості уповільненого типу [74].

Лімфоцитарно – гранулоцитарний індекс (ЛІГ) – індекс активності процесу запалення, дозволяє диференціювати аутоінтоксикацію і інфекційну інтоксикацію [73, 74]. Розраховується за формулою:

$$\text{ЛІГ} = \frac{\text{Лім} \times 10}{\text{ЕозФ} + \text{БазоФ} + \text{Міелоц} + \text{МетаМіелоц} + \text{НейФ}} \quad (2.4)$$

де Лім – лімфоцити (Г/л);

ЕозФ - еозинофіли (Г/л);

БазоФ – базофіли (Г/л);

Міелоц – міелоцити (Г/л);

МетаМіелоц – метаміелоцити (Г/л);

НейФ – нейтрофіли (Г/л).

Відносне зниження цього показника вказує на збільшення частки нейтрофілів у порівнянні з іншими субпопуляціями лейкоцитів, тобто на активацію гранулоцитарного гемопоезу. Якщо значення ІЛГ встановлюється нижче норми, це свідчить про пригнічений стан імунітету. Зниження пов'язано з напругою неспецифічної ланки імунної системи і розвитком аутоімунних порушень. Зростання лейкоцитарного показника свідчить інтоксикацію, що виникла внаслідок інфекційного генезу в організмі.

Індекс співвідношення нейтрофілів до моноцитів (ІСНМ) – відбиває системну відповідь організму на запалення.

$$\text{ІСНМ} = \frac{\text{НейФ}}{\text{Мон}} \quad (2.5)$$

де НейФ – нейтрофіли (Г/л);

Мон – моноцити (Г/л).

Підвищення характеризує вираженість синдрому ендогенної інтоксикації [74].

2.2.1.5 Дослідження фагоцитарної активності нейтрофілів

Фагоцитарну (поглинальну) активність нейтрофілів (ФАН) оцінювали в тесті з дріжджами (*Saccharomyces cerevisiae*). Для цього у лунку планшета для серологічних досліджень дозатором вносили 0,05 мл цільної крові, стабілізованої гепарином та 0,05 мл 1% суспензії дріжджів; старанно перемішували піпетуванням. Інкубували в термостаті протягом 30 хв. при температурі +37 °С, із періодичним струшуванням кожні 10 хв., після чого готували мазки, які фіксували та фарбували за Папенгеймом. У різних місцях препарату підраховували не менше 200 нейтрофілів за допомогою

мікроскопу з використанням імерсійного об'єктиву. Враховували кількість фагоцитів із дріжджами та без них, також кількість поглинених дріжджів на 1 нейтрофіл [68]. На основі отриманих даних визначали наступні показники ФАН:

1) фагоцитарний показник (ФП) — відсоток нейтрофілів, які беруть участь у фагоцитозі, від їх загальної кількості;

2) фагоцитарне число (ФЧ) — середня кількість мікроорганізмів, поглинених одним нейтрофілом, характеризує поглинальну здатність нейтрофілів [69].

2.3. Статистичні методи дослідження

Систематизацію матеріалів дослідження виконано з використанням пакету прикладних програм Microsoft XP «Exel», статистичні розрахунки проводились за допомогою IBSM SPSS 20,0 (USA) з використанням методів параметричної статистики.

Оцінку отриманих даних здійснювали з використанням методів статистичного опису та перевірки статистичних гіпотез. Для кожної вибірки обчислювали середньовибіркові характеристики: середнє арифметичне, похибку середнього, медіану, стандартне відхилення, дисперсія вибірки, мінімум та максимум.

Середнє арифметичне (x_{cp}) – число, яке дорівнює сумі всіх варіантів множини, поділене на їх кількість [75].

$$x_{cp} = \sum X_n / n \quad (2.6)$$

де x_{cp} – середнє арифметичне;

$\sum X_n$ – сума всіх варіантів множини;

n – кількість варіантів.

Знаходження середньої арифметичної – це по суті заміна індивідуальних варіюючих значень ознак окремих членів сукупності деякою однаковою величиною при збереженні основних властивостей усіх членів сукупності. Є одною з мір центральної тенденції [75].

Досконалішим показником, який характеризує варіацію, є середній квадрат відхилень варіант від середньої арифметичної величини, інакше званий варіансою і середнім квадратичним відхиленням (стандартне відхилення).

Середнє квадратичне відхилення визначається наступним чином:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2.7)$$

де \bar{x} - середнє арифметичне;

x_i - значення i -варіанти;

n – загальне число варіант, або обсяг даної сукупності [76].

Стандартне відхилення виражається в тих же одиницях, що й досліджувана ознака. Оскільки різноманітність не може бути негативною, використовується тільки позитивне значення кореня. Для розрахунку статистичної помилки використовується наступна формула:

$$m = \pm \frac{\sigma}{\sqrt{n-1}} \quad (2.8)$$

де m – помилка середньої величини;

σ - середнє квадратичне відхилення;

n – загальне число варіант, або обсяг даної сукупності [76].

Медіана – це значення варіанти, що знаходиться точно в середині ряду. Щоб знайти таку варіанту, треба спочатку розташувати всі варіанти по порядку від мінімальних до максимальних їх значень. Таке розташування

варіант називають ранжуванням. Медіана дає загальне уявлення про сукупність в цілому, характеризує типове в даній сукупності [75].

Перевірку кількісних показників на нормальність розподілу здійснювали з використанням одновибіркового тесту Колмогорова-Смірнова. Для оцінки достовірності відмінностей вибірок використовували критерій Ст'юдента [76].

Перевірка достовірності і відмінності проводилась за критерієм Ст'юдента. Нормоване відхилення різниці визначали за формулою:

$$td = \frac{d}{md} \quad (2.9)$$

Значення критерію Ст'юдента для трьох рівнів довірчої (статистичної) значущості (p) наводять у довідниках із математичної статистики. Кількість ступенів свободи визначають за формулою:

$$f=d=v= n_1 + n_2 - 2, \quad (2.10)$$

де n_1 і n_2 – обсяги порівнюваних вибірок.

Із зменшенням обсягів вибірок ($n < 10$) критерій Ст'юдента стає чутливим до форми розподілу досліджуваної ознаки в генеральній сукупності. Тому в сумнівних випадках рекомендують використовувати непараметричні методи або порівнювати отримані значення з критичними для вищого рівня значущості.

Рішення про достовірність відмінностей приймають у тому разі, якщо обчислена величина t перевищує табличне значення для певної кількості ступенів свободи (f або $d(v)$).

Дані в таблицях представлені у вигляді $x_{cp} \pm m$, де x_{cp} – середнє арифметичне, m – похибка середнього. Відмінності вважали достовірними при рівні значимості $p \leq 0,05$ [76].

3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Завданням дослідження було оцінити вплив біологічно активних речовин медичної п'явки на лейкоцитарні показники крові молодих статевозрілих щурів в експерименті *in vivo* та *in vitro*. Дослідження виконано на 24 лабораторних щурах: 1 група – інтактні/контроль (n=12); 2 група – дослід/гірудовплив (n=12).

Ефект гірудовпливу *in vivo* у лабораторних щурів оцінювали шляхом визначення кількості лейкоцитів, лейкоцитарної формули крові, лейкоцитарних показників (ІЛГ, ІСЛЕ, ІСЛМ, ІСНМ), фагоцитарної активності нейтрофілів до та після приставок МП.

Ефект гірудовпливу *in vitro* оцінювали на ізольованих зразках крові контрольної (інтактної) та дослідної (гірудовплив) груп тварин. Зі зразків артеріовенозної крові, стабілізованої гепарином, відбирали по 200 мкл в 2 хімічно чисті епіндорфи: 1 – спонтанний (СП) зразок, 2 – стимульований додаванням тотальних антигенів (АГ) сольового екстракту з тіл *H. verbanus* у дозі 60 мкг/мл [66], після чого їх закривали та інкубували протягом 2 годин в термостаті при +37 °С. Після інкубації визначали кількість лейкоцитів, лейкоцитарну формулу крові та лейкоцитарні індекси.

3.1 Лейкоцитарні показники крові та фагоцитарна активність нейтрофілів інтактних молодих статевозрілих лабораторних щурів

Описова статистика загальної кількості лейкоцитів, лейкоцитарної формули крові, лейкоцитарних індексів (ІЛГ, ІСЛЕ, ІСЛМ, ІСНМ) та фагоцитарної активності нейтрофілів інтактної групи тварин представлена в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1 — Описова статистика лейкоцитарних показників крові та фагоцитарної активності нейтрофілів інтактних молодих статевозрілих лабораторних щурів (n=12)

Показник, одиниці вимірювання		Середнє	Стандартна похибка	Медіана	Стандартне відхилення	Дисперсія вибірки	Мінімум	Максимум	
Лейкоцити, Г/л		6,59	0,302	6,55	1,046	1,094	4,95	8,2	
Лейкоцитарна формула крові	Еозинофіли	%	3,04	0,264	3	1,01	1,021	2,0	5,0
		Г/л	0,20	0,021	0,17	0,072	0,005	0,12	0,33
	Нейтрофіли	%	24,20	0,745	24	2,58	6,657	20,0	29,0
		Г/л	1,58	0,066	1,55	0,228	0,052	1,16	2,014
	Моноцити	%	3,25	0,242	3,5	0,839	0,704	2,0	5,0
		Г/л	0,22	0,021	0,22	0,073	0,005	0,099	0,345
	Лімфоцити	%	69,51	0,913	70	3,162	10	62,0	74,5
		Г/л	4,59	0,235	4,514	0,815	0,665	3,56	5,74
Лейкоцитарні індекси	ІЛГ, у.о.		25,86	1,080	25,65	3,742	14	18,23	33,86
	ІСЛМ, у.о.		22,96	2,016	20,64	6,98	48,78	13,6	36,0
	ІСЛЕ, у.о.		25,28	2,360	23,58	8,18	66,88	12,40	37,25
	ІСНМ, у.о.		7,92	0,657	7,268	2,276	5,18	5,0	12,5
ФАН	ФП, %		70,25	1,353	70,25	4,688	21,97	62,0	78,0
	ФЧ, у.о.		4,27	0,131	4,21	0,450	0,206	3,30	4,81

У безпородних лабораторних щурів показники кількості лейкоцитів за даними літератури варіюють у широких межах (5-25,6 Г/л, у середньому 12,5), що залежить від різних умов: віку, статі, сезону, часу обстеження, раціону тощо. Для здорових лабораторних щурів лінії Wistar (самці, 6 – 8 місяців) характерні показники $5,9 \pm 0,30$ Г/л, а для лінії SHR (самці, 5 – 7

місяців) – $6,1 \pm 0,50$ Г/л [45]. Але, референтні значення лейкоцитарних показників та лейкоцитарних індексів для даної вікової групи нелінійних тварин серед доступної літератури відсутні.

Так, у інтактних молодих статевозрілих щурів при дослідженні загальної кількості лейкоцитів крові виявлено середнє значення $6,59 \pm 0,302$ Г/л індивідуальні коливання в межах 4,95 – 8,2 Г/л (таблиця 3.1).

При дослідженні відносних показників лейкоцитарної формули крові виявлено наступні особливості: середнє значення еозинофілів у групі становило $3,04 \pm 0,264$ % та коливалось у межах 2,0 – 5,0 %; середнє значення нейтрофілів становило $24,20 \pm 0,745$ % та коливалось в межах 20,0 – 29,0 %; середнє значення моноцитів становило $3,25 \pm 0,242$ % та коливалось в межах 2,0 – 5,0 %; середнє значення лімфоцитів становило $69,51 \pm 0,913$ % та коливалось в межах 62,0 – 74,5 %.

Досліджуючи абсолютні значення показників лейкоцитарної формули, було виявлено середнє значення еозинофілів $0,20 \pm 0,021$ Г/л, яке коливалось в межах 0,12 – 0,33 Г/л; середнє значення нейтрофілів – $1,58 \pm 0,066$ Г/л та коливалось в межах 1,16 – 2,014 Г/л; середнє значення моноцитів – $0,22 \pm 0,021$ Г/л та коливалось в межах 0,099 – 0,345 Г/л; середнє значення лімфоцитів – $4,59 \pm 0,235$ Г/л та коливалось в межах 3,56 – 5,74 Г/л.

З даних літератури відомо, що у лабораторних щурів при статевому дозріванні (причому з 6-місячного віку більш виражено), вміст лімфоцитів у крові знаходиться на більш низькому, а нейтрофілів – навпаки, на більш високому рівні [77]. Ці особливості узгоджуються з отриманими нами показниками (таблиця 3.1), що вказує на нормальний розвиток обраних для дослідження тварин і відсутність патологій та захворювань на момент проведення експерименту.

Для оцінки неспецифічної резистентності організму розраховували інтегральні лейкоцитарні індекси, які дозволяють оцінити в динаміці стан різних ланок імунної системи, без використання спеціальних методів дослідження. Перевагу надали оцінці ІЛГ, ІСЛМ, ІСЛЕ, ІСНМ.

Середнє значення ІЛГ становило $25,86 \pm 1,080$ та коливалось у межах 18,23 – 33,86. Цей індекс показує активність запалення, його зростання вказує на наявність в організмі інтоксикації.

Середнє значення ІСЛМ становило $22,96 \pm 2,016$ та коливалось в межах 13,6 – 36,0. Як відомо з літературних джерел, цей індекс відображає співвідношення клітин неспецифічного і специфічного захисту.

Середнє значення ІСЛЕ становило $25,28 \pm 2,360$ та коливалось у межах 12,40 – 37,25. ІСЛЕ вказує на співвідношення процесів гіперчутливості негайного і уповільненого типів [72-74].

Середнє значення ІСНМ становило $7,92 \pm 0,657$ та коливалось у межах 5,0 – 12,5. ІСНМ виражає системну відповідь організму на запалення.

В доступній літературі референтні значення досліджених показників для безпородних лабораторних щурів даного віку тварин нами не виявлено.

При дослідженні фагоцитарної активності нейтрофілів периферичної крові перевагу надали оцінці їх поглинальної здатності, яку характеризує фагоцитарний показник (ФП) та фагоцитарне число (ФЧ). Так, відносне значення активних, тобто здатних до фагоцитозу нейтрофілів (ФП) становило $70,25 \pm 1,353$ %, при індивідуальних коливаннях у межах 62,0 – 78,0%. Середня кількість фагоцитованих мікроорганізмів (ФЧ) становила $4,27 \pm 0,131$ у.о. і коливалась в межах 3,30 – 4,81 у.о.

Як відомо, ФП та ФЧ показує готовність імунітету боротись із патогенами і активно захищати організм [78].

Отже, результати дослідження є цілком задовільними для даної онтогенетичної групи [43], що свідчить про вдало підібрану контрольну групу тварин.

3.2 Лейкоцитарні показники крові та фагоцитарна активність нейтрофілів молодих статевозрілих лабораторних щурів при гірудовпливі *in vivo*

У молодих статевозрілих щурів при дослідженні лейкоцитарних показників артеріовенозної крові у віддалені терміни після гірудовпливу (через 2 тижні після останньої приставки) виявлено наступні особливості, таблиця 3.2.

Загальна кількість лейкоцитів була в межах референтних значень для лабораторних щурів становила в середньому $7,35 \pm 0,419$ Г/л, індивідуальні показники коливались в межах 4,9 – 9,3 Г/л.

При аналізі відносних показників лейкоцитарної формули крові виявлено наступні особливості: середнє значення еозинофілів становило $3,58 \pm 0,230\%$ та коливалось в межах 2,5 – 4,5%; середнє значення нейтрофілів – $22,58 \pm 0,780\%$ та коливалося в межах 18,0 – 27,5%; середнє значення моноцитів – $3,20 \pm 0,208\%$ та коливалося в межах 2,5 – 4,5%; середнє значення лімфоцитів – $70,62 \pm 0,879\%$ та коливалося в межах 65,5 – 76,5%.

Досліджуючи абсолютні значення показників лейкоцитарної формули, нами було виявлено: середнє значення еозинофілів на рівні $0,26 \pm 0,017$ Г/л індивідуальні показники коливалися в межах 0,15 – 0,35 Г/л; середнє значення нейтрофілів – $1,67 \pm 0,128$ Г/л та коливалося в межах 1,08 – 2,38 Г/л; середнє значення моноцитів – $0,24 \pm 0,027$ Г/л та коливалося в межах 0,134 – 0,42 Г/л; середнє значення лімфоцитів – $5,17 \pm 0,277$ Г/л та коливалося в межах 3,48 – 6,74 Г/л.

У молодих статевозрілих щурів через 2 тижні після останньої приставки МП середнє значення ІЛГ становило $27,45 \pm 1,289$ та коливалось в межах 20,47 – 37,32; ІСЛМ – $23,01 \pm 1,434$ та коливалось у межах 16,11 – 29,0; ІСЛЕ – $20,73 \pm 1,524$ та коливалось в межах 14,55 – 30,6; ІСНМ – $7,33 \pm 0,494$ та коливалось у межах 4,55 – 11,0.

Таблиця 3.2 – Описова статистика лейкоцитарних показників крові молодих статевозрілих лабораторних щурів після гірудовпливу (n=12)

Показник, одиницівимірювання		Середнє	Стандартна похибка	Медіана	Стандарьневі дхилення	Дисперсія бірки	Мінімум	Максимум	
Лейкоцити, Г/л		7,35	0,419	7,325	1,45	2,105	4,9	9,3	
Лейкоцитарна формула крові	Еозинофіли	%	3,58	0,230	3,5	0,79	0,629	2,5	4,5
		Г/л	0,26	0,017	0,26	0,059	0,0035	0,15	0,35
	Нейтрофіли	%	22,58	0,780	22,25	2,704	7,31	18,0	27,5
		Г/л	1,67	0,128	1,70	0,444	0,197	1,08	2,38
	Моноцити	%	3,20	0,208	3,0	0,722	0,52	2,5	4,5
		Г/л	0,24	0,027	0,20	0,094	0,0089	0,134	0,42
Лімфоцити	%	70,62	0,879	70,75	3,046	9,278	65,5	76,5	
	Г/л	5,17	0,277	4,95	0,960	0,922	3,48	6,74	
Лейкоцитарні індекси	ІЛГ, у.о.		27,45	1,289	26,71	4,3	19,94	20,47	37,32
	ІСЛМ, у.о.		23,01	1,434	24,08	4,968	24,68	16,11	29,0
	ІСЛЕ, у.о.		20,73	1,524	19,64	5,28	27,87	14,55	30,6
	ІСНМ, у.о.		7,33	0,494	7,08	1,71	2,93	4,55	11,0
ФАН	ФП, %		72,0	0,90	72	3,0	8,7	68,0	78,0
	ФЧ, у.о.		4,30	0,069	4,25	0,24	0,057	3,9	4,7

Аналіз ФАН дав наступні результати: ФП у щурів після гірудовпливу становив $72,0 \pm 0,90$ %, при індивідуальних коливаннях у межах 68,0 – 78,0 %, а ФЧ становило $4,30 \pm 0,069$ у.о. і коливалось в межах 3,9 – 4,7 у.о.

Отже більшість досліджених лейкоцитарних показників периферичної крові згідно літературних джерел знаходиться в межах референтних значень для безпородних лабораторних щурів та значно не виходять за межі таких у

інтактних (контроль) молодих статевозрілих щурів (таблиця 3.1), що вказує на відсутність негативних проявів гірудовпливу.

3.3 Лейкоцитарні показники спонтанних та антиген-стимульованих зразків крові молодих статевозрілих лабораторних щурів до та після гірудовпливу в експерименті *in vitro*

Описова статистика загальної кількості лейкоцитів, лейкоформули крові, лейкоцитарних індексів (ІЛГ, ІСЛЕ, ІСЛМ, ІСНМ) у спонтанних (СП) та антиген-стимульованих (АГ) зразках цільної крові до та після гірудовпливу представлені в таблицях 3.3-3.6.

У інтактних лабораторних щурів (контроль) після інкубації спонтанного зразку спостерігається низьке відносно контролю (артеріовенозновенозна кров) середнє значення кількості лейкоцитів, що становило $3,69 \pm 0,20$ та коливалось у межах 2,75 – 5,0 (таблиця 3.3). При аналізі відносного вмісту лейкоцитарної формули спонтанних зразків крові контрольної групи тварин виявлено наступні особливості: середнє значення еозинофілів становило $6,13 \pm 0,625\%$ та коливалось у межах 3,5 – 9,0%, нейтрофілів – $33,5 \pm 0,59\%$ та коливалось в межах 31,0 – 36,0%; моноцитів – $4,62 \pm 0,440\%$ та коливалося в межах 3,0 – 7,0%; лімфоцитів – $55,75 \pm 0,530\%$ та коливалося в межах 53,0 – 57,5%. Абсолютні значення показників лейкоцитарної формули становили: середнє значення еозинофілів на рівні $0,22 \pm 0,016$ Г/л та коливалось в межах 0,13 – 0,290 Г/л, нейтрофілів – $1,24 \pm 0,008$ Г/л та коливалося в межах 0,85 – 1,72 Г/л, моноцитів – $0,16 \pm 0,010$ Г/л та коливалося в межах 0,096 – 0,224 Г/л, лімфоцитів – $2,07 \pm 0,120$ Г/л та коливалося в межах 1,46 – 2,87 Г/л. Середнє значення ІЛГ становило $14,07 \pm 0,184$ та коливалось у межах 13,25 – 14,93; ІСЛМ – $13,32 \pm 1,238$ та коливалось у межах 7,57– 19; ІСЛЕ становило $10,35 \pm 1,132$ та

коливалось у межах 5,88 – 15,85; ІСНМ становило $7,98 \pm 0,705$ та коливалось у межах 4,43 – 11,0. Зниження загальної кількості лейкоцитів, імовірно, пов'язане з вилученням крові з організму та, як наслідок, відсутністю стабілізуючого впливу зі сторони організму.

Таблиця 3.3 — Описова статистика лейкоцитарних показників крові інтактної (контроль) групи молодих статевозрілих лабораторних щурів у спонтанних зразках в експерименті *in vitro* (n=12)

Показник, одиницівимірювання		Середнє	Стандартна похибка	Медіана	Стандарне відхилення	Дисперсія вбірки	Мінімум	Максимум	
Лейкоцити, Г/л		3,69	0,200	3,7	0,69	0,48	2,75	5,0	
Лейкоцитарна формула крові	Еозинофіли	%	6,13	0,625	6,0	2,16	4,69	3,5	9,0
		Г/л	0,22	0,016	0,236	0,054	0,0029	0,13	0,29
	Нейтрофіли	%	33,5	0,59	33,25	2,06	4,23	31,0	36,0
		Г/л	1,24	0,080	1,22	0,29	0,08	0,85	1,72
	Моноцити	%	4,62	0,440	4,25	1,54	2,37	3,0	7,0
		Г/л	0,16	0,010	0,18	0,045	0,002	0,096	0,224
Лімфоцити	%	55,75	0,530	56,25	1,83	3,34	53,0	57,5	
	Г/л	2,07	0,120	2,11	0,42	0,17	1,46	2,87	
Лейкоцитарні індекси	ЛЛГ, у.о.		14,07	0,184	14,06	0,638	0,407	13,25	14,93
	ІСЛМ, у.о.		13,32	1,238	13,35	4,287	18,380	7,57	19,0
	ІСЛЕ, у.о.		10,35	1,132	9,82	3,923	15,388	5,88	15,85
	ІСНМ, у.о.		7,98	0,705	8,24	2,444	5,974	4,43	11,0

В антиген-стимульованих зразках крові контрольної групи тварин (таблиця 3.4) середня кількість лейкоцитів становила в середньому $4,23 \pm 0,266$ Г/л, індивідуальні показники коливались у межах 3,2 – 5,9 Г/л.

При аналізі відносних показників лейкоцитарної формули середнє значення еозинофілів становило $4,66 \pm 0,640\%$ та коливалось у межах 1,5 – 7,0%, нейтрофілів – $29,92 \pm 1,740\%$ та коливалось у межах 20,5 – 40,0%; моноцитів – $2,66 \pm 0,256\%$ та коливалося в межах 1,0 – 3,5%; лімфоцитів – $62,75 \pm 1,925\%$ та коливалося в межах 53,0 – 74,5%.

Таблиця 3.4 – Описова статистика лейкоцитарних показників крові інтактної групи молодих статевозрілих лабораторних щурів у стимульованих антигенами медичної п'явки зразках в експерименті *in vitro* (n=12)

Показник, одиницівимірювання		Середнє	Стандартна похибка	Медіана	Стандарне відхилення	Дисперсія вибірки	Мінімум	Максимум	
Лейкоцити, Г/л		4,23	0,266	4,0	0,92	0,85	3,2	5,9	
Лейкоцитарна формула крові	Еозинофіли	%	4,66	0,64	6,0	2,22	4,92	1,5	7,0
		Г/л	0,206	0,035	0,207	0,123	0,015	0,05	0,39
	Нейтрофіли	%	29,92	1,74	30,0	6,04	36,5	20,5	40,0
		Г/л	1,25	0,092	1,19	0,32	0,102	0,82	1,86
	Моноцити	%	2,66	0,256	2,75	0,89	0,79	1,0	3,5
		Г/л	0,12	0,015	0,125	0,051	0,003	0,032	0,206
Лімфоцити	%	62,75	1,925	62,25	6,67	44,48	53,0	74,5	
	Г/л	2,66	0,175	2,75	0,6	0,37	1,7	3,48	
Лейкоцитарні індекси	ІЛГ, у.о.		19,42	2,007	17,94	6,95	48,35	11,52	33,11
	ІСЛМ, у.о.		27,30	3,68	24,72	12,77	163,14	16,86	54,0
	ІСЛЕ, у.о.		19,92	4,38	10,50	15,17	230,18	8,786	43,33
	ІСНМ, у.о.		14,6	3,47	10,3	12,03	144,75	6,8	40,0

Абсолютні значення показників лейкоцитарної формули становили: середнє значення еозинофілів на рівні $0,206 \pm 0,035$ Г/л та коливалось у межах 0,05 – 0,39 Г/л, нейтрофілів – $1,25 \pm 0,092$ Г/л та коливалося у межах 0,82 –

1,86 Г/л, моноцитів – $0,12 \pm 0,015$ Г/л та коливалось у межах 0,032 – 0,206 Г/л, лімфоцитів – $2,66 \pm 0,175$ Г/л та коливалось у межах 1,7 – 3,48 Г/л. Лейкоцитарні індекси становили: ІЛГ – $19,42 \pm 2,007$ та коливалось у межах 11,52 – 33,11; ІСЛМ – $27,30 \pm 3,680$ та коливалось у межах 16,86– 54,0; ІСЛЕ – $19,92 \pm 4,380$, та коливалось в межах 8,786 – 43,33; ІСНМ – $14,6 \pm 3,470$ та коливалось у межах 6,8 – 40,0. Динаміка змін лейкоцитарних показників в АГ-стимульованій культурі та спонтанній, відносно контролю (артеріовенозновенозна кров, таблиця 3.1) була схожою. Варто зазначити, що попередньо інтактні лабораторні щури не мали контактів із медичною п'явкою.

Після інкубації спонтанного зразку дослідної групи тварин (після гірудовпливу, таблиця 3.5) спостерігаємо середню кількість лейкоцитів, що становила $5,56 \pm 0,285$ Г/л, індивідуальні показники коливались у межах 3,85– 7,5 Г/л. Середнє значення загальної кількості лейкоцитів, не дивлячись на відсутність природної організменної гомеостатичної дії, відповідає референтним значенням. Можливо це пов'язано з позитивним проявом гірудовпливу, тому клітини крові в дослідній групі виявляють вищу стійкість. При аналізі відносного вмісту лейкоцитарної формули крові виявлено середнє значення еозинофілів на рівні $7,92 \pm 0,654$ % та індивідуальні значення у межах 3,5 – 10,0 %, нейтрофілів – $21,0 \pm 1,18$ % та індивідуальні значення у межах 15,0 – 26,5%, моноцитів – $3,75 \pm 0,242$ % та індивідуальні значення в межах 3,0 – 5,0%; лімфоцитів – $67,33 \pm 0,976$ % та індивідуальні значення в межах 63,5 – 73,0 %. Варто відмітити підвищений відносний вміст еозинофілів порівняно з контролем. Абсолютні значення показників лейкоцитарної формули становили: еозинофіли – $0,44 \pm 0,043$ Г/л та коливались у межах 0,18 – 0,68 Г/л, нейтрофіли – $1,18 \pm 0,099$ Г/л та коливались у межах 0,75 – 1,802 Г/л, моноцити – $0,21 \pm 0,021$ Г/л та коливались у межах 0,144 – 0,375 Г/л, лімфоцити – $3,73 \pm 0,179$ Г/л та коливались у межах 2,5 – 4,88 Г/л. При аналізі лейкоцитарних індексів середнє значення ІЛГ становило $23,62 \pm 1,079$ та коливалось у межах 19,54 –

30,42; ІСЛМ – $18,90 \pm 1,369$ та коливалось у межах 13,0 – 24,3; ІСЛЕ – $9,61 \pm 1,256$ та коливалось у межах 7,0 – 18,71; ІСНМ – $5,72 \pm 0,318$ та коливалось в межах 4,2 – 7,66.

Таблиця 3.5 – Описова статистика лейкоцитарних показників крові молодих статевозрілих лабораторних щурів після гірудовпливу у спонтанних зразках в експерименті *in vitro* (n=12)

Показник, одиницівимірювання		Середнє	Стандартна похибка	Медіана	Стандарне відхилення	Дисперсія вибірki	Мінімум	Максимум	
Лейкоцити, Г/л		5,56	0,285	5,35	0,987	0,974	3,85	7,5	
Лейкоцитарна формула крові	Еозинофіли	%	7,92	0,654	9,0	2,265	5,129	3,5	10,0
		Г/л	0,44	0,043	0,464	0,148	0,022	0,18	0,68
	Нейтрофіли	%	21,0	1,184	22,0	4,101	16,820	15,0	26,5
		Г/л	1,18	0,099	1,185	0,346	0,120	0,75	1,802
	Моноцити	%	3,75	0,242	3,5	0,839	0,705	3,0	5,0
		Г/л	0,21	0,021	0,19	0,072	0,005	0,144	0,375
Лімфоцити	%	67,33	0,976	66,25	3,380	11,424	63,5	73,0	
	Г/л	3,73	0,179	3,635	0,621	0,386	2,5	4,88	
Лейкоцитарні індекси	ІЛГ, у.о.		23,62	1,079	22,08	3,738	13,97	19,54	30,42
	ІСЛМ, у.о.		18,90	1,369	19,10	4,744	22,51	13,0	24,3
	ІСЛЕ, у.о.		9,61	1,256	7,66	4,352	18,94	7,0	18,71
	ІСНМ, у.о.		5,72	0,318	5,77	1,102	1,21	4,2	7,66

Після інкубації антиген-стимульованих зразків крові дослідної групи тварин (після гірудовпливу, таблиця 3.6) спостерігаємо середнє значення кількості лейкоцитів на рівні $5,28 \pm 0,245$ Г/л, яке коливалось у межах 4,0 – 6,8 Г/л. Значення лейкоцитів знаходяться в межах референтних показників

для лабораторних щурів. При аналізі відносних показників лейкоцитарної формули крові виявлено середнє значення еозинофілів – $6,33 \pm 0,527\%$ та коливання у межах 4,0 – 9,0%; нейтрофілів – $22,75 \pm 0,922\%$ та коливання у межах 19,0 – 29,0%; моноцитів – $4,04 \pm 0,428\%$ та коливання у межах 2,0 – 7,0%; лімфоцитів – $66,88 \pm 1,090\%$ та коливання у межах 60,0 – 73,0%.

Таблиця 3.6 – Описова статистика лейкоцитарних показників крові молодих статевозрілих щурів після гірудовпливу у стимульованих антигенами медичної п'явки зразках в експерименті *in vitro* (n=12)

Показник, одиницівимірювання		Середнє	Стандартна похибка	Медіана	Стандарне відхилення	Дисперсія вбірки	Мінімум	Максимум	
Лейкоцити, Г/л		5,28	0,245	5,3	0,85	0,72	4,0	6,8	
Лейкоцитарна формула крові	Еозинофіли	%	6,33	0,527	6,0	1,826	3,33	4,0	9,0
		Г/л	0,33	0,020	0,325	0,07	0,005	0,19	0,42
	Нейтрофіли	%	22,75	0,922	22	3,19	10,2	19,0	29,0
		Г/л	1,18	0,039	1,26	0,138	0,019	0,95	1,36
	Моноцити	%	4,04	0,428	4,0	1,48	2,203	2,0	7,0
		Г/л	0,22	0,029	0,19	0,102	0,01	0,112	0,408
	Лімфоцити	%	66,88	1,090	66,5	3,78	14,28	60,0	73,0
		Г/л	3,55	0,209	3,55	0,72	0,52	2,56	4,7
Лейкоцитарні індекси	ІЛГ, у.о.		23,49	1,200	24,10	4,15	17,21	16,66	29,2
	ІСЛМ, у.о.		19,07	2,45	16,25	8,50	72,35	9,29	36,5
	ІСЛЕ, у.о.		11,51	1,070	11,17	3,70	13,72	7,11	17,63
	ІСНМ, у.о.		6,47	0,780	6,13	2,70	7,31	3,14	11,5

Абсолютні значення показників лейкоцитарної формули становили: середнє значення еозинофілів на рівні $0,33 \pm 0,020$ Г/л та коливалось у межах

0,19 – 0,420 Г/л, нейтрофілів – $1,18 \pm 0,039$ Г/л та коливалось у межах 0,95 – 1,36 Г/л, моноцитів – $0,22 \pm 0,029$ Г/л та коливалось у межах 0,112 – 0,408 Г/л, лімфоцитів – $3,55 \pm 0,209$ Г/л та коливалось у межах 2,56 – 4,7 Г/л. Лейкоцитарні індекси становили: ІЛГ – $23,49 \pm 1,200$ та коливалось у межах 16,66 – 29,2; ІСЛМ – $19,07 \pm 2,450$ та коливалось у межах 9,29 – 36,5; ІСЛЕ – $11,51 \pm 1,070$ та коливалось у межах 7,11 – 17,63; ІСНМ – $6,47 \pm 0,780$ та коливалось у межах 3,14 – 11,5.

Отже, враховуючи індивідуальні показники в групах можна помітити, що гірудовплив виявляє підтримуючу дію лімфоцитарного фону в порівнянні з контрольною групою, в якій остання – відсутня (оскільки тварини раніше не мали контакту з БАР МП). Варто зазначити, що у спонтанних та антиген-стимульованих зразках крові при підрахунку лейкоформули на основі аналізу морфології окремих лейкоцитів було виявлено клітини, в основному нейтрофіли, з морфологічними ознаками апоптозу.

3.4 Порівняльна характеристика лейкоцитарних показників крові молодих статевозрілих лабораторних щурів при гірудовпливі *in vivo* та *in vitro*

Згруповані дані експериментальних досліджень *in vivo* та *in vitro* контрольної та дослідної групи тварин представлені у таблицях 3.7 – 3.9.

При дослідженні ефекту гірудовпливу *in vivo* у віддалені терміни (через 2 тижні) у молодих статевозрілих щурів (таблиця 3.7) виявлена тенденція ($p > 0,05$) до збільшення на 13% загальної кількості лейкоцитів відносно інтактної групи тварин, але індивідуальні показники у лабораторних щурів (таблиця 3.2) знаходилися в межах референтних значень для безпородних щурів. Середні відносні показники лейкоцитарної формули дослідної групи тварин, порівняно з контролем, статистично значимо не змінилися ($p > 0,05$).

Спостерігалась тенденція до збільшення вмісту еозинофілів (на 18%) та лімфоцитів (на 2%), зменшення – нейтрофілів (на 7%) і моноцитів (на 1,5%), відносно контролю. Абсолютні лейкоцитарні показники збільшилися: еозинофілів – на 30% ($p \leq 0,05$), нейтрофілів – на 6% ($p > 0,05$), моноцитів – на 9% ($p > 0,05$), лімфоцитів – на 13% ($p > 0,05$). Але лейкоцитарні показники були в межах норми для обраної вікової групи тварин (таблиця 3.1).

Фагоцитарна активність нейтрофілів після гірудовпливу *in vivo* (таблиця 3.8) статистично значимо не змінювалась: фагоцитарний показник збільшився на 2,5% ($p > 0,05$), а фагоцитарне число – на 1% ($p > 0,05$). Оцінюючи лейкоцитарні індекси (таблиця 3.9), визначили, що ІЛГ статистично незначимо знижений (на 6%, $p > 0,05$), проте всі лейкоцитарні показники в обох групах у межах референтних значень (таблиця 3.1), тож пригнічення імунітету не виявлено. Статистично не значиме зниження ІСЛЕ на 18% ($p > 0,05$), обумовлене збільшенням кількості еозинофілів. Статистично не значиме зниження ІСНМ на 7,5% ($p > 0,05$) свідчить про відсутність ендогенної інтоксикації у групі гірудовпливу. Отже, гірудовплив *in vivo* при дослідженні через 2 тижні після приставок МП у молодих статевозрілих лабораторних щурів не призводить до значних змін лейкоцитарних показників, лейкоцитарних індексів та поглинальної здатності нейтрофілів, що вказує на відсутність негативних проявів гірудовпливу та свідчить про резистентність молодих статевозрілих лабораторних щурів до зовнішніх впливів.

Таблиця 3.7 – Порівняльна характеристика кількості лейкоцитів та лейкоцитарної формули крові молодих статевозрілих лабораторних щурів при гірудовпливі *in vivo* та *in vitro* ($x_{cp} \pm m$)

Група тварин/ дослідний зразок	Лейко- цити, Г/л	Еозинофіли		Нейтрофіли		Моноцити		Лімфоцити	
		%	Г/л	%	Г/л	%	Г/л	%	Г/л
Інтактні, n=12	6,59±	3,04±	0,20±	24,20±	1,58±	3,25±	0,22±	69,51±	4,59±
	0,302	0,264	0,021	0,745	0,066	0,242	0,021	0,913	0,235
Інтактні, СП, n=12	3,69±	6,13±	0,22±	33,5±	1,24±	4,62±	0,16±	55,75±	2,07±
	0,200 ¹	0,625 ¹	0,016	0,59 ¹	0,080 ¹	0,440 ¹	0,010 ¹	0,530 ¹	0,120 ¹
Інтактні, АГ, n=12	4,23±	4,66±	0,206±	29,92±	1,25±	2,66±	0,12±	62,75±	2,66±
	0,266 ²	0,640 ²	0,0350	1,740 ²	0,092 ²	0,256 ³	0,015 ^{2 3}	1,925 ^{2 3}	0,175 ^{2 3}
Гірудовплив, n=12	7,35±	3,58±	0,26±	22,58±	1,67±	3,20±	0,24±	70,62±	5,17±
	0,419	0,230	0,017*	0,780	0,128	0,208	0,027	0,879	0,277
Гірудовплив, СП, n=12	5,56±	7,92±	0,44±	21,0±	1,18±	3,75±	0,21±	67,33±	3,73±
	0,285 ¹	0,654 ¹	0,043 ¹	1,184	0,099 ¹	0,242	0,021	0,976 ¹	0,179 ¹
Гірудовплив, АГ, n=12	5,28±	6,33±	0,33±	22,75±	1,18±	4,04±	0,22±	66,88±	3,55±
	0,245 ²	0,527 ²	0,020 ^{2 3}	0,922	0,039 ²	0,428	0,029	1,090 ²	0,209 ²

Примітки: тут і далі

1. Інтактні – контрольна група молодих статевозрілих лабораторних щурів.
2. Гірудовплив – дослідна група молодих статевозрілих лабораторних щурів, що піддавалась гірудовпливу, показники отримані у віддалені терміни (через 2 тижні) після гірудовпливу.

3. СП – спонтанний зразок артеріовенозної крові *in vitro*, що піддавався інкубації протягом 2 годин при +37°C.

4. АГ – антиген-стимульований зразок артеріовенозної крові *in vitro*, що піддавався інкубації протягом 2 годин при +37°C з додаванням тотальних антигенів сольового екстракту з тіл медичної п'явки в дозі 60 мкг/мл.

5. Результати відрізняються при $p \leq 0,05$ за даними критерію Ст'юдента (t_d критичне = 2,074, $v = 22$) при порівнянні наступних груп тварин або дослідних зразків крові:

* – інтактні і гірудовплив;

¹ – інтактні та інтактні, СП / гірудовплив та гірудовплив, СП;

² – інтактні та інтактні, АГ / гірудовплив та гірудовплив, АГ;

³ – інтактні, СП і інтактні, АГ / гірудовплив, СП та гірудовплив, АГ.

Таблиця 3.8 – Порівняльна характеристика фагоцитарної активності нейтрофілів крові молодих статевозрілих лабораторних щурів при гірудовпливі *in vivo* ($x_{cp} \pm m$)

Показник, од. вимір.	Контроль, n=12	Гірудовплив, n=12
ФП, %	70,25±1,353	72,0±0,9
ФЧ, у.о.	4,27±0,131	4,3±0,069

Таблиця 3.9 – Порівняльна характеристика лейкоцитарних індексів крові молодих статевозрілих лабораторних щурів при гірудовпливі *in vivo* та *in vitro* ($x_{cp} \pm m$)

Група тварин / дослідний зразок	ІЛГ, у.о.	ІСЛМ, у.о.	ІСЛЕ, у.о.	ІСНМ, у.о.
Інтактні, n=12	25,86± 1,08	22,96± 2,016	25,28± 2,36	7,92± 0,657
Інтактні, СП, n=12	14,07± 0,184 ¹	13,32± 1,238 ¹	10,35± 1,132 ¹	7,98± 0,705
Інтактні, АГ, n=12	19,42± 2,007 ^{2 3}	27,30± 3,68 ³	19,92± 4,38 ³	14,6± 3,47
Гірудовплив, n=12	27,45± 1,289	23,01± 1,434	20,73± 1,524*	7,33± 0,494
Гірудовплив, СП, n=12	23,62± 1,079 ¹	18,90± 1,369 ¹	9,61± 1,256 ¹	5,72± 0,318 ¹
Гірудовплив, АГ, n=12	23,49± 1,20 ²	19,07± 2,45	11,51± 1,07 ²	6,47± 0,78

Примітки: див. табл. 3.7.

В експерименті *in vitro* в контрольній групі тварин (таблиця 3.7) виявили зниження кількості лейкоцитів в спонтанних зразках крові на 44% ($p \leq 0,05$), а в АГ-стимульованій пробі – на 36% ($p \leq 0,05$) порівняно з інтактними тваринами. Зниження загальної кількості лейкоцитів – нормальне явище для дослідів *in vitro*, це пояснюється відсутністю стабілізуючого впливу зі сторони організму, а саме органів систем, що забезпечують гомеостаз. АГ-стимуляція у інтактному зразку (той, що раніше не контактував з МП) виявляє підтримуючу дію, таким чином, деякі клітини стають більш «витривалішими». Так, відомо що БАР МП у шлунковому мікрооточенні сприяють «консервуванню» з'їденої крові без загнивання до 18 місяців.

Порівнюючи відносні лейкоцитарні показники спонтанних і АГ-стимульованих зразків крові інтактною групи відносно до результатів контрольної групи, виявили тенденцію у спонтанній пробі до статистично значимого ($p \leq 0,05$) збільшення відносних показників для еозинофілів (у 2 рази), нейтрофілів (на 38%), моноцитів (на 42%) за рахунок значного зниження абсолютної (на 55%, $p \leq 0,05$) і, відповідно, відносної (на 20%, $p \leq 0,05$) кількості лімфоцитів. У АГ-стимульованому зразку середні відносні лейкоцитарні показники статистично значимо ($p \leq 0,05$) збільшились у еозинофілів (на 53%), нейтрофілів (на 24%) та знизились у моноцитів (на 18%). При порівнянні показників між спонтанною і антиген-стимульованою пробами було виявлено зниження відносних значень еозинофілів (на 24%, $p > 0,05$), нейтрофілів (на 10%, $p > 0,05$), моноцитів (на 42%, $p \leq 0,05$), збільшення відносного показника лімфоцитів (на 12,5%, $p \leq 0,05$).

При аналізі абсолютних значень лейкоформули у спонтанних та антиген-стимульованих зразках, порівняно з вихідними показниками артеріовенозної крові виявили тенденцію до зниження усіх показників, крім еозинофілів, їх абсолютні значення майже незмінні. Зниження моноцитів ($p \leq 0,05$) відбувається більш у АГ-стимульованому зразку (на 45% проти 27% у спонтанному зразку), а лімфоцитів – у спонтанному зразку (на 55% проти

42% у АГ- стимульованому зразку). Як відомо першими реагують клітини неспецифічного імунітету (переважно нейтрофіли), які знижуються більш виражено при додаванні чужорідних антигенів у АГ- стимульованій пробі.

При порівнянні середніх значень спонтанних і АГ- стимульованих культур інтактної групи тварин, виявили, що антигени не мають значного впливу на абсолютні значення еозинофілів, нейтрофілів, проте мають стимулюючий вплив на лімфоцити і пригнічуючий на моноцити. Так при порівнянні спонтанної і антиген-стимульованої проб між собою виявили статистично значиме зниження абсолютного показника моноцитів на 25% ($p \leq 0,05$), збільшення абсолютного значення лімфоцитів на 28,5% ($p \leq 0,05$). Що зайвий раз доводить пригнічуючий вплив АГ на моноцити і стимулюючий на лімфоцити.

Оцінюючи лейкоцитарні індекси (таблиця 3.9), порівняно з вихідними даними виявили знижений ІЛГ (на 46% у СП зразку, на 25% у АГ-стимульованому зразку, $p \leq 0,05$) знижений ІСЛМ у СП зразку (на 42%, $p \leq 0,05$) і збільшений у АГ-стимульованому зразку, вказує на пригнічуючий вплив АГ на моноцити і стимулюючий на лімфоцити. В обох зразках знижений показник ІСЛЕ (на 59% у СП зразку, $p \leq 0,05$; на 21% у АГ-стимульованому зразку, $p > 0,05$), що вказує на стійкість еозинофілів в умовах *in vitro*. Підвищений ІСНМ в АГ-стимульованих зразках вказує на інгібуючу дію антигенів на моноцити, які ймовірно залучаються в імунну відповідь.

В експерименті *in vitro* в дослідній групі тварин (таблиця 3.7) виявили зниження кількості лейкоцитів в спонтанних зразках артеріовенозної крові на 24% ($p \leq 0,05$), а в АГ-стимульованій – на 28% ($p \leq 0,05$). При порівнянні зразків між собою, кількість лейкоцитів залишається майже незмінною (відмінність становить 6%, $p > 0,05$). Антиген п'явки у дослідній групі не вплинув на кількість лейкоцитів, порівняно з спонтанними зразками.

Порівнюючи відносні лейкоцитарні показники у дослідній групі (гірудовплив) виявили тенденцію до збільшення еозинофілів (у 2,2 рази у спонтанному зразку і на 77% у антиген-стимульованому, $p \leq 0,05$), моноцитів

(на 17% у спонтанному, на 21% у АГ- стимульованому зразках, $p > 0,05$), та зниження – лімфоцитів (на 5% у спонтанному, на 2,5% у АГ-стимульованому зразках, $p \leq 0,05$), вміст нейтрофілів залишається майже незмінним.

Порівнюючи абсолютні лейкоцитарні показники у дослідній групі (гірудовплив) тварин виявили тенденцію до зниження усіх показників, крім еозинофілів, їх абсолютні величини статистично значимо збільшені на 69% у спонтанному зразку, на 25% у антиген-стимульованому зразку. А при порівнянні зразків *in vitro* між собою виявили, що антигени не мають значного впливу на абсолютні значення у дослідній групі нейтрофілів, моноцитів, лімфоцитів. Еозинофіли – знижені (на 26%, $p \leq 0,05$). Оцінюючи лейкоцитарні індекси (таблиця 3.9). виявили зниження в обох зразках усіх індексів відносно до вихідних даних. ІСЛЕ у СП відносно вище ніж в АГ за рахунок збільшення вмісту еозинофілів.

Зниження кількості лейкоцитів крові щурів при двогодинній інкубації в спонтанних (контроль) і дослідних (навантажувальних) зразках відбувається в результаті їх апоптозу, як реакція на змінену середовище проживання без стабілізуючого впливу цитокінів. Попередній ГВ, ймовірно, сприяє зниженню апоптотичних процесів при культивуванні лейкоцитів поза організмом за рахунок активації сенсibiliзованих до антигенів МП лімфоцитів, що секретують протективного цитокіни.

4 ОХОРОНА ПРАЦІ

Важливий розділ, який має на меті виявити основні заходи щодо безпечної роботи під час виконання досліджень, пов'язаних із даною тематикою. Тема моєї роботи пов'язана з визначенням лейкоцитарних показників крові лабораторних щурів під впливом біологічно активних речовин медичної п'явки. Таким чином, гарантується повна безпека при роботі з технікою, обладнанням, які відіграють не останню роль у забезпеченні здорової атмосфери робочого приміщення (зручність робочого місця, провітрювання, зниження впливу відволікаючих і надмірних шумів, організація оптимального режиму роботи тощо) у повній відповідності до нормативно-правових актів з охорони праці.

Перед початком роботи науковим керівником був проведений інструктаж з охорони праці за інструкціями № 296 та № 199 з Охорони праці та інструкцією № 62 з Пожежної безпеки.

При виконанні досліджень довелося мати справу з живими біологічними об'єктами (лабораторні щури, медична п'явка) та біологічними рідинами (кров щурів, секрет слизових залоз МП, антигени сольового екстракту з тіл МП тощо), хімічними реактивами, задіяні лабораторний посуд, електроустаткування, мікроскоп, статистична обробка даних виконувалась за допомогою комп'ютерної техніки, експериментальна робота проходила у лабораторії.

Таким чином необхідно визначити ряд небезпечних виробничих факторів, що мали вплив під час виконання роботи:

1) фізичні фактори: порушення цілісності шкірних покривів (робота з лабораторними щурами, в разі розбитого лабораторного посуду тощо), значний рівень вібрації за рахунок використання рефрижераторної центрифуги;

2)хімічні фактори: потрапляння на одяг, шкіру і слизові оболонки речовин різної природи, реагентів, що мають подразнюючий вплив на організм тощо;

3)біологічні фактори: дослідження проводиться з живими організмами, які можуть тим чи іншим чином вплинути на життєдіяльність дослідника, попадання біологічних рідин на одяг, шкіру і слизові оболонки, робота з кров'ю.

Умови у лабораторії, в якій проводився експеримент, повністю відповідають діючим вимогам «Будівельних норм та правил» (БНтП), «Санітарних норм проектування промислових підприємств» (СН 245-85) 1985 року [79].

Вимоги до безпечного проведення робіт в умовах лабораторії.

Лабораторія є окремим приміщенням зі своїм мікрокліматом, який прямим або непрямим чином має вплив на здоров'я людини. Показники, зовнішнього середовища, які формують мікроклімат: температура повітря, відносна вологість повітря, швидкість руху повітря і атмосферний тиск. Оптимальні умови мікроклімату формуються таким чином, щоб людський організм не мав потреби зайвий раз напружувати системи гомеостазу, зокрема терморегуляційну систему. Умови мають формуватись так, щоб досліджувача нічого не відволікало від роботи, для цього необхідно як мінімум оптимальне для організму поєднання факторів зовнішнього середовища.

Робоча зона повинна мати чітко визначені параметри температури, освітленості, вологості. Значення цих показників повинно відповідати вимогам ДНАОП 0.03-3.15-86 [79]. І необхідний періодичний моніторинг значень цих параметрів, для забезпечення максимально продуктивного середовища для людини.

У лабораторії раціонально спроектована і правильно експлуатована вентиляційна система. Згідно до ДОСТ 12.1.005-88 в лабораторії наявні пристрої для видалення надлишків теплоти, вологи, пилу, шкідливих парів та

газів з приміщення, це говорить про доброякісність вентиляційної системи. Лабораторія відповідає ДОСТ 12.1.005-76 за гранично допустимими показниками концентрації пилу і мікроорганізмів у зоні дихання працюючих [80, 81].

Необхідно забезпечувати постійний рух повітря, шляхом відкриття вікон, у випадку використання отруйних та речовин неприємним запахом, приточно- витяжної вентиляції, що повинна відповідати СНП 2.04.05-91 [82] і ДНАОП 0.03-3.15-89 [83].

Освітлення у лабораторії під час активної діяльності дослідників повинно бути не менше 750 Лк, при цьому не важливо якої природи освітлення (природної/штучної) [84]. В лабораторії основним джерелом освітленості слугують лампи розжарювання і люмінесцентні лампи (штучне освітлення), це спричинено дефіцитом природного сонячного світла.

Під час роботи були повністю виконані всі правила з пожежної безпеки, електробезпеки, а також правила роботи в лабораторії. Всі необхідні для дипломної роботи дослідження проводились в халаті, чистота на робочому місці дотримувалась [85]. При виконанні експериментів, безпосередньо пов'язаних із кров'ю, використовувались одноразові гумові рукавички, задля безпеки [86].

На всі види робіт, що являють собою потенційну небезпеку повинна бути підготовлена документація, що узгоджується з керівником робіт. Для запобігання виникнення нещасних випадків, пожеж і вибухів слід чітко виконувати правила техніки безпеки. Експерименти треба проводити акуратно, уважно та після ознайомлення із приладами, інструментами, властивостями речовин і правилами безпеки [87].

Перед початком роботи треба: одягти спеціальний одяг, отримати дозвіл на виконання роботи, ознайомитись із правилами безпеки робіт, обладнанням, матеріалами та інструментами. У лабораторії не можна працювати одному – наявність другої особи необхідна для надання допомоги при нещасних випадках.

При роботі використовувати колективні і індивідуальні засоби та заходи безпеки. Працювати необхідно у зручному одязі, який не стримує рухів, мати окремий рушник для витирання рук, індивідуальні окуляри для захисту попадання різного хімічного матеріалу в очі. Необхідно перевірити на справність прилади: цілісність дротів, заземлення (занулення) приладів. Упевнитись в наявності засобів гасіння вогню і надання першої долікарської допомоги [88].

При проведенні дослідів у лабораторії застосовується хімічний посуд: загального і спеціального призначення, зокрема мірний. Дуже часто використовуються пробірки. Неприпустимо, щоб пробірка була наповнена до країв, що може призвести до проливання і попадання рідин на шкіру експериментатора. Зовсім неприпустимо закривати пробірку пальцем і струшувати її в такому виді, оскільки можна зашкодити шкіру, отримати опік. При нагріванні відкритий кінець пробірки повинен бути звернений у бік від працюючого і від сусідів по столу, щоб уникнути попадання на шкіру чи в очі випадково виплеснутої рідини. При митті посуду треба стежити за тим, щоб йорж не вдарявся об дно і стінки посуду, що може призвести биття скляних предметів та травмування. У раковину забороняється вилити і видаляти концентровані розчини кислот і лугів, що сильно пахнуть, та отруйні речовини, і т.п. При виливанні в раковину таких речовин можливе їх випаровування й отруєння повітря лабораторії та прилеглих приміщень. Концентровані кислоти і луги необхідно попередньо сильно розбавити чи нейтралізувати, щоб уникнути руйнування каналізаційної мережі (відповідно до ДСТ 12.1.007-76) [89].

Після виконання роботи реактиви та скляний посуд зберігаються відповідно вимогам. Обов'язково оглянути приміщення, перевірити чи всі реактиви на своїх місцях, вимкнути електроживлення [90].

При обробці отриманих даних довелося працювати із електроприладами. Під час написання роботи мої дії підпорядковувалися

вимогам ДНАОП 0.00-1.21-98 «Правила безпечної експлуатації електроустановок споживачів» [91].

Характерною особливістю роботи на комп'ютері являється постійна напруга зорового аналізатора, викликана необхідністю розрізнення об'єктів, що висвічуються (символів, знаків та ін.), при наявності відблисків на екрані, обумовлених рядковою структурою зображення, мерехтінням зображення, недостатньою чіткістю об'єктів розрізнення [84, 92].

Умови роботи користувача ПК, що працює з дисплеєм, визначаються умовами освітлення як екрану так і на робочого місця, параметрами мікроклімату приміщення. Необхідно створити максимально сприятливе середовище для праці за комп'ютером, аби мінімізувати пагубний вплив надмірної роботи за комп'ютером. При активній діяльності за ПК, необхідно періодично робити відпочинок, для того, щоб системи організму мали змогу відновитись, бажано змінити на деякий час положення тіла, не буде зайвим маленька розминка, для тіла і для очей. В приміщеннях з комп'ютером слід проводити вологе прибирання і регулярне провітрювання протягом робочої зміни, для справної роботи техніки [92].

Перед початком роботи в лабораторії необхідно одягти спецодяг (халат), а також при необхідності – одноразові гумові рукавички. Важливо попередньо провітрити приміщення, перевірити справність електроприладів. Упевнитись в чистоті робочого місця та наявності засобів гасіння вогню. Перед початком перевірити аптечку на наявність таких медикаментів: настойка йоду, нашатирний спирт, борна кислота, перманганат калію, бинт, вата, захисний крем для рук, вазелін.

При необхідності приготувати все необхідне для досліду (реактиви, посуд). Обов'язково перевірити цілісність і доброякісність реактивів і лабораторного посуду [85].

При виконанні дослідження необхідно дотримуватися вимог, що зарегламентовані у відповідних інструкціях, задля уникнення нещасних випадків.

Роботи проводяться у витяжній шафі, якщо для виконання досліду необхідно використовувати летючі речовини або речовини, які виділяють шкідливі гази при роботі з ними. Стулки слід відчиняти на мінімальну зручну для праці висоту, але не більше ніж на $1/3$ [85].

При роботі зі скляним посудом необхідно застосовувати мінімальні фізичні зусилля, аби не пошкодити посуд і руки, за потребою захищати руки тканиною. Відпрацьовані кислоти й луги слід зливати в спеціально призначений посуд окремо, потім утилізувати і зливати в каналізацію тільки після нейтралізації. При роботі з кров'ю необхідно працювати у гумових рукавичках, так як можливе зараження СНІДом або гепатитом у випадку поранення шкіри. При митті посуду необхідно вибирати метод чищення відповідно до забруднення і природи речовин, що там знаходились [85].

При роботі з електроприладами у разі появи диму або специфічного запаху, появи підвищеного шуму, стуку, вібрації, при раптовому припиненні роботи електроустаткування (зникнення напруги, заклинення частин приладу, що рухаються), необхідно вимкнути обладнання вимикачем [84].

Забороняється залишати без нагляду електроустаткування, яке підключене до електромережі. Якщо проводиться робота з персональним комп'ютером, то необхідно відрегулювати яскравість і контрастність монітора таким чином, щоб зображення не було занадто яскравим, для того щоб запобігти надмірній втомі очей. Відстань від ока користувача до екрана дисплея повинна становити 50-70см, найсприятливіший кут зору 10-20°, можливі відхилення, проте не більше 40°. Положення тіла в просторі під час роботи з ПК, повинно бути таким, щоб руки розташовувались на робочому столі вгоризонтальному положенні, спина не повинна перенапружуватись, стегна розташовуються паралельно підлозі. Приміщення з ПК має бути оснащено вентиляцією [92].

По закінченню роботи необхідно привести в порядок робоче місце, зняти захисний одяг та рукавички. Перед тим як піти з приміщення

лабораторії треба усе ретельно перевірити, вимкнути, для попередження нещасних випадків [86].

Вимоги пожежної безпеки та електробезпеки.

Задля попередження аварійної ситуації усі роботи, які пов'язані з використанням речовин, що виділяють вибухонебезпечні гази та пари, необхідно здійснювати в витяжних шафах з вентиляцією [93].

Приміщення лабораторії повинно бути забезпечено первинними засобами пожежогасіння: вогнегасником, покривалом (з негорючого теплоізоляційного полотна, розміром не менше 1×1 м) та ящиком із піском (укомплектованим пожежним відром, совковою лопатою).

При виникненні пожежі необхідно якомога швидше ліквідувати джерело її виникнення. Необхідно здійснити евакуацію людей, вимкнути від енергопостачання прилади та обладнання; приступити до гасіння пожежі первинними засобами пожежогасіння. При неможливості здійснення якоїсь з вище перелічених дій, вийти з приміщення, щільно зачинити за собою двері та вікна, щоб запобігти приливу свіжого повітря, яке сприятиме швидкому поширенню вогню. Обов'язково викликати пожежну охорону.

Для того аби уникнути ураження струмом необхідно завжди перевіряти справність електроприладів, цілісність дротів, безпеку розетки, а також їх заземлення. Перша допомога при ураженні електричним струмом включає ряд послідовних дій. По-перше необхідно виключити електроприлад, який вразив постраждалого, якщо немає такої можливості, необхідно вимкнути рубильник, який постачає струм до устаткування. Надаючи допомогу, не можна доторкатися голими руками до людини, яка знаходиться під дією струму [94].

Запорукою безпечної роботи є відповідність лабораторії санітарно-гігієнічного режиму, встановленого нормами. У робочій зоні лабораторії повинні підтримуватись чітко визначені параметри температури, вологості, освітлення, відповідно вимогам ДСН 3.3.6.042-99.

Гранично допустимі концентрації пилу і мікроорганізмів у лабораторії

встановлено ДОСТ 12.1.005-76. Раціональна спроектованість вентиляції повинна відповідати ДОСТ 12.1.005-88 і забезпечувати необхідний повітрообмін.

Халат, який використовується як спецодяг у лабораторії, в складі тканини не повинен містити добавок синтетичних волокон, тому що у випадку займання оплавлені частини халату важко видалити з одягу. Краще за все, якщо спецодяг буде з бавовняної тканини.

Дослідження, які ми проводили, вимагали роботи із такими електроприладами: сухожарові шафи; центрифуги MPW-340 та MPW-310; термостат, ультратермостат Т9/84; холодильник побутовий та низькотемпературний; світлові мікроскопи з імерсійними об'єктивами; освітлювальні лампи.

Для забезпечення електробезпеки перед початком робіт необхідно перевірити роботу штучного освітлення (настільну лампу, підвісні та настінні світильники); перевірити відсутність видимих пошкоджень ізоляції струмопровідних електроприводів, наявність первинних засобів пожежогасіння.

Для забезпечення безпечних умов роботи із лабораторним посудом перед початком робіт необхідно уважно перевірити його, на наявність тріщин, таким чином впевнитись в цілісності лабораторного посуду.

Перед початком робіт необхідно впевнитись в наявності в аптечці необхідних медикаментів (настойка йоду, нашатирний спирт, борна кислота, перманганат калію, бинт, вата, захисний крем для рук, вазелін).

Роботу в лабораторії необхідно виконувати з підвищеною увагою і обережністю, щоб попередити або мінімізувати вірогідність нещасних випадків [85].

Для нейтралізації розлитих ненароком на стіл чи підлогу кислот або лугів у лабораторії є склянки зі заздалегідь підготовленими нейтралізуючими розчинами (слабкий розчин оцтової або лимонної кислоти – для нейтралізації лугів, 4 % розчин соди – для кислот).

До лабораторного посуду, призначеного для нагрівання, відносять тонкостінні скляні або фарфорові посудини. Під час нагрівання рідин не можна заглядати згори в посудину для запобігання травм внаслідок розбризкування нагрітої речовини.

Під час роботи з органічними розчинниками слід бути особливо обережним. Досліди з такими речовинами проводяться у витяжній шафі, з відсутніми або погашеними пальниками і з вимкненими електричними нагрівачами.

Для попередження електротравм необхідно припинити роботу на електрообладнанні при появі диму або специфічного запаху. При появі навіть слабкої дії електроструму при доторканні до приладу; появі підвищеного шуму, стуку, вібрації тощо.

При роботі з кров'ю можливе її потрапляння на шкіру, одяг та слизові оболонки. При потраплянні крові на халат, потрібно якомога швидше видалити пляму. По-перше замочити халат у дезінфікуючому розчині на 1 годину. В якості дезінфікуючого розчину можуть бути 0,5% розчин хлорантоїну, 0,5% розчин дезактину, 0,05% розчин бактоліну. При потраплянні крові на шкіру, потрібно обробити уражену ділянку одним із дезінфікативів – 70% спирт, 3% розчин перекису водню, 5% розчин йоду. Потім необхідно двократно промити шкіру під проточною водою з милом, висушити стерильним рушником і знову обробити дезінфікатором. При потраплянні крові на слизові оболонки потрібно промити ці частини великою кількістю води і закапати 30% розчином альбуциду (для очей), полоскання 70% розчином спирту (для ротової порожнини) [95].

Надаючи допомогу, не можна доторкатися голими руками до людини, яка знаходиться під дією струму. Насамперед, потрібно відключити устаткування від електромережі прямим або непрямим (рубильник) способами. Необхідно відтягти постраждалого від струмоведучих частин, використовуючи сухі предмети, що не проводять електричний струм (дошки, одяг, стілець й ін.), в крайньому випадку –

перерубати провід сокирою із сухою рукояткою. При відокремленні потерпілого від струмоведучих частин, треба діяти однією рукою. До прибуття швидкої допомоги надати постраждалому першу невідкладну допомогу. Для надання першої допомоги постраждалому при ураженні електричним струмом необхідно: припинити доступ електричного струму до постраждалого; при раптовій зупинці серця приступити до реанімації (непрямого масажу серця і штучного дихання), якщо постраждалий у стані коми, перевернути його на живіт [96].

При виконанні досліджень проводилися роботи з небезпечними реактивами. Для попередження важких уражень слід визначити ознаки отруєння: бензол - головокружіння, головний біль, стан сп'яніння; толуол - кашель, почервоніння шкіри, слизистих оболонок; фенол викликає місцеву анестезію, при потраплянні всередину організму викликає загальний важкий стан; формалін – при дії парів – різке подразнення слизових оболонок, кашель, чхання, біль у грудині, слезотеча.

Перша допомога: у разі потрапляння в організм через шлунково-кишковий тракт отруйних органічних рідин (вище перерахованих) необхідно викликати блювоту; дати постраждалому молоко і яєчний білок.

При отруєнні кислотами та лугами: видалити речовини з шлунка – 2-3 разове промивання водою (дають випити 4-5 стаканів теплої води, і потім викликають блювання натисканням пальця на корінь язика). З метою нейтралізації виконують промивання жженої магнезії – при потраплянні кислот, або 1% розчином лимонної або оцтової кислоти - при потраплянні лугу [97].

Пожежна безпека має забезпечуватися згідно з вимогами Закону України «Про пожежну безпеку» від 17 травня 1993, ДНАОП 0.01-1.01-95 та іншими відповідними нормативними актами.

Можливими причинами пожежі підчас досліджень можуть бути необережне поводження з вогнем, незадовільний стан електротехнічних пристроїв, несправність опалювальних приладів, невиконання вимог

нормативних документів з пожежної безпеки [93].

Отже, задля ефективної та результативної роботи необхідно дотримуватись правил техніки безпеки. Безпечність проведення експерименту залежить від дій експериментатора, умов робочого середовища та стану обладнання, з яким працює дослідник.

Завдяки дисципліні «Охорона праці» нам вдалось облаштувати робоче місце таким чином, аби уникнути або мінімізувати вплив всіх небезпечних факторів та удосконалити мікроклімат, що в свою чергу забезпечило мені сприятливу атмосферу для максимально ефективного і продуктивного проведення науково-дослідної роботи.

ВИСНОВКИ

1. Референтні лейкоцитарні показники артеріовенозної крові для інтактних молодих статевозрілих нелінійних лабораторних щурів (самці, вік 7-8 місяців) становлять:

- загальна кількість лейкоцитів – $6,59 \pm 0,302$ Г/л;
- лейкоцитарна формула: еозинофіли – $3,04 \pm 0,264\%$ ($0,20 \pm 0,021$ Г/л), нейтрофіли – $24,20 \pm 0,745\%$ ($1,58 \pm 0,066$ Г/л), моноцити – $3,25 \pm 0,242\%$ ($0,22 \pm 0,021$ Г/л), лімфоцити – $69,51 \pm 0,913\%$ ($4,59 \pm 0,235$ Г/л), що вказує на лімфоїдний профіль крові;
- фагоцитарна активність нейтрофілів: ФП – $70,25 \pm 1,353\%$, ФЧ – $4,27 \pm 0,131$ у.о.;
- інтегральні лейкоцитарні індекси: ІЛГ (показує активність запалення та наявність в організмі інтоксикації) – $25,86 \pm 1,080$; ІСЛМ (вказує на взаємовідношення афекторних і ефекторних ланок імунологічного процесу) – $22,96 \pm 2,016$; ІСЛЕ (вказує на співвідношення процесів гіперчутливості негайного і уповільненого типів) – $25,28 \pm 2,360$, ІСНМ (виражає системну відповідь організму на запалення, відображає співвідношення клітин неспецифічного і специфічного захисту) – $7,92 \pm 0,657$.

2. У щурів молодого статевозрілого віку на 14 добу після гірудовпливу загальна кількість лейкоцитів збільшувалась на 6,5% ($p > 0,05$), відносна кількість еозинофілів – на 18% ($p > 0,05$) та абсолютна – на 30% ($p \leq 0,05$); відносна кількість нейтрофілів зменшувалась на 7% ($p > 0,05$) та моноцитів – на 1,5% ($p > 0,05$), порівняно з інтактними тваринами. Виявлено статистично значиме зниження показника індексу співвідношення лімфоцитів і еозинофілів на 18% ($p \leq 0,05$) за рахунок підвищення кількості еозинофілів, порівняно з інтактними щурами. Лімфоцитарно-гранулоцитарний індекс і індекс співвідношення лімфоцитів і моноцитів при гірудовпливі статистично значимо не змінювались ($p > 0,05$), що свідчить про відсутність інтоксикації у

досліджуваних тварин і наявність балансу між афекторною та ефекторною ланками імунологічного процесу. Гірудовплив не викликав значних змін фагоцитарної активності нейтрофілів.

3. При дослідженні ефекту тотальних антигенів сольового екстракту з тіл МП *in vitro* у контрольній (інтактній) групі тварин кількість лейкоцитів знизилась у спонтанних зразках артеріовенозної крові на 44% ($p \leq 0,05$), а в АГ-стимульованих – на 36% ($p \leq 0,05$). При порівнянні спонтанної і АГ-стимульованої проб виявили статистично значиме зниження абсолютного показника моноцитів при додаванні АГ на 25% ($p \leq 0,05$), збільшення абсолютної кількості лімфоцитів на 28,5% ($p \leq 0,05$). На еозинофіли і нейтрофіли у зразках контрольної групи при додаванні АГ МП такого впливу не має. Знижений ІСЛМ у СП зразку (на 42%, $p \leq 0,05$) і збільшений у АГ-стимульованому зразку (на 19%, $p > 0,05$), порівняно з вихідними даними, вказує на зміщення балансу афекторної та ефекторної ланок імунітету. В обох зразках знижений показник ІСЛЕ (на 59% у СП зразку, $p \leq 0,05$; на 21% у АГ-стимульованому зразку, $p > 0,05$), що вказує на стійкість еозинофілів в умовах *in vitro*. При аналізі морфології лейкоцитів СП та АГ-стимульованих зразків знайдені клітини з морфологічними ознаками апоптозу.

При дослідженні ефекту тотальних антигенів МП *in vitro* у дослідній групі тварин (після гірудовпливу) виявлено, що АГ МП не вплинули на кількість лейкоцитів так виражено, як в інтактних тварин, цей показник зазнав меншого коливання (зниження на 24,4% в СП зразках та на 28,2% в АГ-стимульованих зразках), що може вказувати на загальнооздоровчий терапевтичний ефект від гірудовпливу, що здійснювався попередньо. Виявлено тенденцію до зниження усіх абсолютних лейкоцитарних показників в обох зразках (СП та АГ-стимульованих), крім еозинофілів, їх абсолютні величини статистично значимо збільшені на 69% у спонтанному зразку та на 25% у АГ-стимульованому зразку.

4. У досліді *in vivo* відсутність значних змін у переважній більшості досліджуваних показників вказує на резистентність лабораторних щурів

молодого статевозрілого віку до екзогенних впливів (наприклад, приставки МП) та відсутність побічних ефектів гірудовпливу (через 2 тижні після приставки МП). Незначні зрушення лейкоцитарних показників вказують на те, що це достатній час для відновлення і приведення показників периферичної крові до фізіологічної норми.

Додавання АГ МП до культури цільної крові в інтактній групі тварин *in vitro* сприяло зниженню абсолютної кількості лейкоцитів, за рахунок моноцитів, нейтрофілів та лімфоцитів. АГ МП зумовили збільшення ІСЛМ (на 19%, $p \leq 0,05$) відносно вихідних значень, що вказує на зрушення балансу ефекторної та афекторної ланки імунної відповіді.

АГ МП в умовах гірудовпливу *in vitro* призводять до зниження абсолютної кількості лейкоцитів, за рахунок лімфоцитів, моноцитів та нейтрофілів. АГ МП, імовірно, проявляли стабілізуючий вплив на еозинофіли, абсолютний показник яких у спонтанному зразку значно перевищує (на 69%, $p \leq 0,05$) референтні значення, в той час як у АГ-стимульованих зразках – знаходився в їх межах. На всі інші популяції лейкоцитів у зразках дослідної групи не виявлено значного впливу з боку АГ МП. Імовірно, попереднє проведення гірудовпливу *in vivo* в дослідній групі тварин сприяло зниженню рівня апоптотичних реакцій при короткочасному культивуванні лейкоцитів поза межами організму за рахунок активації сенсibiliзованих до АГ МП лімфоцитів, які секретують протективні цитокіни.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Отримані результати можуть бути корисними при підготовці студентів освітнього рівня «бакалавр» та «магістр» спеціальності 091 Біологія, зокрема при вивченні окремих розділів навчальних дисциплін: «Техніка біологічного експерименту», «Великий практикум з біохімії та імунології», «Лабораторні методи імунологічних досліджень»

Результати дослідження можуть бути використані різними науковими лабораторіями для подальшого вивчення імуотропної дії біологічно активних речовин медичної п'явки.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Каменев О. Ю., Барановский А. Ю. Лечение пиявками: теория и практика гирудотерапии : руководство для врачей. Санкт-Петербург: Весь, 2006. 304 с.
2. Cooper J. E. Veterinary surgeons and leechs. *The Veterinary Record*. 1989. Vol. 29. P. 117.
3. Sobczak N., Kantyka M. Hirudotherapy in veterinary medicine. *Annals of Parasitology*. 2014. Vol. 60, No 2. P. 89-92.
4. Фещенко Ю. И., Рекалова Е. М. Особенности современной иммуномодулирующей терапии. *Астма та алергія*. 2013. № 1. С. 6-12.
5. Чоп'як В. В. Доказова імунопрофілактика та імунотропна терапія : монографія. Львів : Апріорі, 2013. 334 с.
6. Сепиашвили Р. И. Иммунотропные препараты: классификация, проблемы и перспективы. *Аллергология и иммунология*. 2015. Т. 16, № 1. С. 64-69.
7. Савинов В. А., Павлова Т. В. Пиявка лечит все. 2-е изд. Санкт-Петербург: Диля, 2014. 176 с.
8. Abdullah S., Dar L. M., Rashid A., Tewari A. Hirudotherapy / Leech therapy: applications and indications in surgery. *Arch. Clin. Exp. Surg*. 2012. Vol. 1, No 3. P. 172-180.
9. Okka B. Hirudotherapy from past to present. *Eur. J. Basic. Med. Sci*. 2013. Vol. 3, No 3. P. 61- 65.
10. Kovalenko M. V., Utevsky S. Yu. Transitional morphology in hybrids of *hirudo verbana* and *h. Orientalis* (clitellata, hirudinida). *Vestnik zoologii*. 2013. Vol. 47, No 6. P. 32-36.
11. Medicinal leech therapy – an overall perspective/ Ali K. Sig et al. *Integr Med Res*. 2017. Vol. 6, No 4. P. 337-343.

12. Kutschera U. The *Hirudo medicinalis* species complex *The Science of Nature*. 2012. Vol. 99. P. 433-434.
13. Petrauskiene L., Utevskaja O., Utevskij S. Can different species of medicinal leeches (*Hirudo* spp.) interbreed? *Invert.Biol.* 2009. Vol. 128. P. 324-331.
14. Gileva O.S., Mumcuoglu K.Y. Biotherapy-history, principles and practice: a practical guide to the diagnosis and treatment of disease using living organisms. *Hirudotherapy* / ed. M. Grassberger et al. London : Springer Science & Business Media, 2013. P. 31-76.
15. Leech therapy in flap salvage: systematic review and practical recommendations / C. Herlin et al. *Ann. Chir. Plast. Esthet.* 2016. Vol. 62. P. 1-13.
16. Фролов А. К., Литвиненко Р. А. Клеточные и тканевые реакции *Hirudo verbana* (Carena, 1820) в посттрофическом процессе. *Вісник Запорізького національного університету*. 2014. Vol. 2. P. 176 - 189.
17. Жернов В.А., Зубаркина М.М. Восстановительная медицина. Гирудотерапия: учебно-методическое пособие. Москва: Изд-во РУДН - 2004. 53 с.
18. Савинов В. А. Гирудотерапия: руководство. Москва: Изд-во Медицина, 2004. 432 с.
19. Grimaldi A., Ferrarese R., Tettamanti G. et al. Ras Activation in *Hirudo medicinalis* angiogenic process. *Invertebrate Survival Journal*. 2013. Vol. 10. P. 7-14.
20. Ultrastructure and functional versatility of hirudinean botryoidal tissue / [deEguileor M., Grimaldi A., Tettamanti G. et al.] / *TissueCell*. 2001. Vol. 33, No. 4. P. 332-341.
21. Aminov R. Cannibalism of the medical leeches *Hirudo verbana*. *EurAsian Journal of BioSciences*. 2019. Vol. 13. P. 23-26

22. Egorova S.N., Garifullina G.K. Pharmaceutical counseling: medicinal leech (*Hirudo medicinalis*) / *Medical bulletin of Bashkortostan*. 2016. Vol. 5. P. 19-24
23. Черная Л.В., Ковальчук Л.А. Возрастная динамика макроо и микроэлементов в тканях медицинской пиявки (*Hirudo verbana* Carena). ВЕСТНИК ОГУ. 2011. №15. С. 169-171.
24. Silver A. C., Graf J. Innate and procured immunity inside the digestive tract of the medicinal leech *NIH-PA Author Manuscript*. 2011. Vol. 8, No 2. P. 173–178.
25. Whitaker IS, Maltz M, Siddall ME, Graf J. Characterization of the digestive tract microbiota of *Hirudo orientalis* (medicinal leech) and antibiotic resistance profile / *Plast Reconstr Surg*. 2014. Vol. 133. No 3. P. 408-418
26. Indergand S., Graf J. Ingested Blood Contributes to the Specificity of the Symbiosis of *Aeromonas veronii* Biovar *Sobria* and *Hirudo medicinalis*, the Medicinal Leech. *Applied and environmental microbiology*. 2000. Vol. 66, No 11. P. 4735-4741.
27. Максимова Т.В., Мокроусов А.А., Лузанова И.С., Сафрошкина В.В., Плетенева Т.В. Пробоподготовка и микроэлементный анализ пиявки медицинской (*Hirudo medicinalis*). Здоровье и образование в XXI Веке. 2010. №11. С 540-541.
28. Баскова И.П., Исаханян Г.С. Гирудотерапия. Наука и практика Москва: гуманитарный центр «Монолит», 2004. 507 с.
29. Baskova I. P., Kostrjukova E. S., Vlasova M. A. Proteins and Peptides of the Salivary Gland Secretion of Medicinal Leeches *Hirudo verbana*, *H. medicinalis*, and *H. orientalis*. *BIOCHEMISTRY* . 2008. Vol. 73, No 3. P. 315-316.
30. Das B.K. An overview on hirudotherapy/leech therapy. *Ind. Res. J. Pharm. Sci.* 2014. Vol.1. P. 33–45.
31. Abbas S. M. A systematic overview of the medicinal importance of sanguivorous leeches. *Altern. Med. Rev.* 2011. Vol. 16, No 1. P. 59-65.

32. Baskova I. P., Zavalova L. L. Polyfunctionality of Lysozyme Destabilase from the Medicinal Leech. *RUSSIAN JOURNAL OF BIOORGANIC CHEMISTRY*. 2008. Vol. 34. No 3, P. 304-305.

33 Мирошников К.А., Чертков О.В., Назаров П.А., Месянжинов В.В. Успехи биол. химии, 2006. №46, с 65-98.

34. Баскова И.П., Харитоновна О.В., Завалова Л.Л. Лизоцимная активность секрета слюнных желез медицинской пиявки видов: *H. verbana*, *H. medicinalis* и *H. orientalis*. *Биомедицинская химия*. 2011. № 5, с. 511- 518.

35. Kalabushev S.N., Akhaev D.N., Bobrovsky P.A., Manuvera V.A. Role of isopeptidolysis in the process of thrombolysis. *Role of isopeptidolysis in the process of thrombolysis*. 2018. Vol. 165, P. 18-23.

36 Peng Jin, Zhen Kang, Na Zhang High-yield novel leech hyaluronidase to expedite the preparation of specific hyaluronan oligomers. *SCIENTIFIC REPORT*. Vol. 2. No. 4471. P. 18-23.

37. Munro R., Jones CP., Sawyer RT. Calin--a platelet adhesion inhibitor from the saliva of the medicinal leech. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1991. Vol. 2. No. 1, P. 18-23.

38. Коритнюк Р., Борисенко Т. Пиявочка–козявочка *Фармацевт–практик*. 2009. № 1. С. 34-37.

39. Eldor A., Orevi M., Rigbi M. The role of the leech in medical therapeutics. *Blood Reviews*. 1996. Vol. 10. P. 201–209.

40. Marco S., Priestle J. Structure of the complex of leech-derived tryptase inhibitor (LDTI) with trypsin and modeling of the LDTI-tryptase system. *Science Direct*. 1997. Vol. 5. P. 1465-1474.

41. Joan L. Arolas, Loyola D'Silva NMR Structural Characterization and Computational Predictions of the Major Intermediate in Oxidative Folding of Leech Carboxypeptidase Inhibitor. *Structure*. 2005. Vol. 13. P. 1193-1202.

42. Reverter D., Vendrell J., Canals F. et al A Carboxypeptidase Inhibitor from the Medical Leech *Hirudo medicinalis*. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998. Vol. 273. No 49, P. 32927-32933.

43. Западнюк И. П., Западнюк В. И., Захария Е. А., Западнюк Б. В. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. 3-е изд., Киев: Вища школа, 1983. 383 с.
44. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных : справочник / Т. В. Абрашова и др. Санкт - Петербург : ЛЕМА, 2013. 116с.
- 45 . Kohn D.F., Barthold S.W. Biology and diseases of rats. *Laboratory Animal Medicine* / ed.J.G. Fox,B.J. Cohen, F.M. Loew Orlando.Florida: Academic. Press, Inc., 1984. P. 91-122.
46. Hofstetter J., Suckow M.A., Hickman D.L. Morphophysiology. *The laboratory rat*.USA :Elsevier Academic Press,. 2006. 929p.
47. The metabolism of dihomogamma-linolenic acid in man / K.J. Stone et. al. *J. Lipids*. 1979. Vol. 14, No 2. P. 174-180.
48. Thomas J.N., Kelley M.J., Story J.A. Alteration of regression of cholesterol accumulation in rats by dietary pectin. *Br. J. Nutrition*. 1984. Vol. 51. P. 339-345.
49. The comparative pathobiology of alpha-2u-globulin nephropathy/ J. A. Swenberg et. al. *Tox. and Appl. Pharm*. 1989. Vol. 97. P. 35-46.
50. The metabolism of [14C]beta-carotene and the presence of other carotenoids in rats and monkeys / N.I. Krinsky et. al. *Br. J. Nutrition*. 1990. Vol. 120. P. 81-87.
51. Исаханян Г. С., Арутюнян В.М. Медицинские пиявки: их лечебное применение в терапевтической клинике *Терапевт. архив*. 1991. Т. 63, № 8. С. 110-112.
52. Никонов Г. И. Медицинская пиявка. Основы гирудотерапии. Санкт-Петербург : СДС, 1998. 294 с.
- 53 Jha Kunal, Garg Aarti, Narang Ridhi, Das Sunanda. Hirudotherapy in Medicine and Dentistry. *J. Clin.Diagn.Res*. 2015. Vol. 9, No 12. DOI: 10.7860/JCDR/2015/16670.6918.

54. Ahmed T., Anwar M. Clinical importance of leech therapy. *Indian Journal of Traditional knowledge*. 2009. Vol. 8, No 3. P. 443-445.
55. Srivastava A., Sharma R. A brief review on applications of leech therapy. *Arch Appl Sci Res*. 2010. Vol. 2, No 2. P. 271-274.
56. Scott K. Is hirudin a potential therapeutic agent for arthritis? *Ann. Rheum. Dis*. 2002. Vol. 61. P. 561-562.
57. Effectiveness of leech therapy in osteoarthritis of knee: a randomized controlled clinical trial / A. Michalsen et al. *Ann. Int. Med*. 2003. Vol. 139. P. 724–730.
58. Leech Therapeutic Applications/ A. M. Abdulkader et al. *Indian. J. Pharm. Sci*. 2013. Vol. 75, No 2. P. 127–137.
59. Method of treatment to inhibit metastasis :Patent No. 4,588,587. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office, declared 01.03.1983, issued 13.05.1986.
60. Hirudin for the inhibition of cancer metastasis. European Patent No. EP 0503829. European Patent Office, declared 08.03.1991, issued 16.09. 1992.
61. Anticancer effects of medical Malaysian leech saliva extract (LSE)/ A. Merzouk et al. *Pharm. Anal. Acta. S*. 2012. Vol. 15. P. 2-6.
62. Corral-Rodríguez M.A., Macedo-Ribeiro S., Pereira P.J., Fuentes-Prior P. Leech-derived thrombin inhibitors: From structures to mechanisms to clinical applications. *J. Med. Chem*. 2010. Vol. 53. P. 3847-3861.
63. Baskova I.P., Goltsova K.V ., Zavalova L.L ., Klimovich L.G . Effect of the medicinal leech salivary gland secretion on the state of rat subcutaneous mast cells. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*. 2005. Vol. 91. No 2. P. 195-207.
64. Фролов О. К. Методичні рекомендації до технологічного регламенту біотехнології медичної п'явки. Запоріжжя. СоруArt, 2012. 36с.
65. Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження». URL: <http://zakon4.rada.gov.ua/laws/show/3447-15> (дата звернення: 19.05.2019).
66. Пат. 80665 Україна, (51) МПК (2013.01), А61К 38/00 А61К 39/00. Спосіб отримання антигенів із медичної п'явки / О. К. Фролов,

Р. О. Литвиненко, В. В. Копійка, Є. Р. Федотов ; власник ДВНЗ «Запорізький національний університет» МОНмолодьспорт України. — № 11/2012/13751 ; заявл. 03.12.2012 ; опубл. 10.06.2013, Бюл. № 11.

67. Меньшиков В. В. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / [В. В. Меньшиков, Л. Н. Делекторская, Р. П. Золотницкая и др.]; под ред. В. В. Меньшикова. Москва. Медицина. 1987. 368 с.

68. Фролов О. К., Копійка В. В., Федотов Є. Р. Великий практикум по імунології «Методологія імунної системи ссавців»: навчально-методичний посібник. Запоріжжя: Запорізький національний університет, 2012. 152 с.

69. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник / В. В. Меньшиков и др.; под ред. В. В. Меньшикова. Москва : Медицина, 1987. 368 с.

70. Спосіб фарбування мазків венозної крові: пат. 62690 Україна: МПК G01N1/28, G01N1/30. № 2003044023 ; заявл. 30.04.2003 ; опубл. 15.12.2003, Бюл. №12. 3 с.

71. Никитин В.Н. Атлас клеток крови сельскохозяйственных и лабораторных животных. Москва: Изд-во Медицина, 1949. 118 с.

72. Мустафина Ж.Г., Крамаренко Ю.С., Кобцева В.Ю. Интегральные гематологические показатели в оценке иммунологической реактивности организма у больных с офтальмопатологией. *Клин.лаб. диагностика*. 1999. № 5. С. 47–48.

73. Жухоров Л.С., Вороная Ю. Л. Интегральные показатели лейкограммы периферической крови в оценке неспецифической реактивности у больных с ишемической болезнью сердца. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2002. № 12. С. 39-41

74. Разнатовская Е. Н. Интегральные индексы эндогенной интоксикации у больных химиорезистентным туберкулезом легких. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2012. Т. 9, № 2. С. 119-120.

75. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика: учебное пособие для биологических факультетов университетов по одноименному курсу. Минск: Высшая школа, 1973. 320 с.

76. Лакин Г. Ф. Биометрия : учебное пособие для биол. спец. вузов. Москва : Высшая школа, 1992. 293 с.

77. Назаренко Г. И., Кишкун А. А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. Москва : Медицина, 2000. 544 с.

78. Возрастные изменения лейкоцитарной формулы и морфометрических параметров больших гранулярных лимфоцитов крови крыс при различных режимах освещения / Л. Б. Узенбаеваи др. *Успехи геронтологии*. 2006. № 19. С. 79-84.

79. ДСН 3.3.6.042-99. Санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень. [Чинний від 1999-01-12]. Київ : МОЗ України, 2008. 94 с.

80. Охрана труда. Лабораторный практикум: учебное пособие / Н. Г. Луцкович и др. Минск: Республиканский институт профессионального образования, 2016. 107 с.

81. ГОСТ 12.1.005-88. Загальні санітарно-гігієнічні вимоги до повітря робочої зони :Затверджено МЗ СРСР у 1988. 70 с.

82. Опалення, вентиляція і кондиціонування : СНП 2.04.05.ЗНІП. Київ 1996. 89 с.

83. Трахтенберг І. М. Гігієна праці та виробнича санітарія. Київ: Вища школа, 1997. 462 с.

84. Зеркалов Д. В. Охорона праці в галузі: загальні вимоги: навч. посібник. Київ: Основа, 2011. 551 с.

85. ДНАОП 9.2.30-1.06-98. Правила безпеки при проведенні навчально-виховного процесу в кабінетах (лабораторіях) хімії загальноосвітніх навчальних закладів.[Чинний від 1998-11-16]. Київ:Держнаглядохоронпраці України, 1998. № 222.

86. ДНАОП 0.00-4.26-96. Положення про порядок забезпечення працівників спеціальним одягом, спеціальним взуттям та іншими засобами

індивідуального захисту. [Чинний від 1996-29-10]. Київ : Держнагляд охорони праці України, 2007. 79 с.

87. ДСТУ 2293-99. Охорона праці. Терміни і визначення [Чинний від 2000-01-01]. Держспоживстандарт України. Київ. 1999. 21 с. (Національні стандарти України).

88. Кодекс законів про працю України. Стаття 163. Зі змінами, внесеними відповідно до закону № 3694-12 від 15.12.1993. Видача спеціального одягу й інших засобів індивідуального захисту. 62 с.

89. ДНАОП 0.00-1.21-98. Правила безпеки експлуатації електроустановок споживачів. [Чинний від 1998-01-09]. Міністерство юстиції України. Київ. 1998. 394 с.

90. Александрова М.М. Первая помощь при ожогах: учебн. пособие для студентов пед. институтов по химии. Москва: Здоровье, 1990. 150 с.

91. Савчук О.М. Основи охорони праці: конспект лекцій 2-х ч. Запоріжжя: Просвіта, 2000. 124 с.

92. Баловсяк Н.В. Компьютер и здоровье. Санкт-Петербург: Питер, 2008. 208 с.

93. ДНАОП 0.01-1.01-95. Правила пожежної безпеки в Україні. [Чинний від 1995-14-06]. Київ: МВД України, 2005. 103 с.

94. Сибикин Ю.Д. Охрана труда и электробезопасность. Москва: РадиоСофт, 2014. 445 с.

95. Валецька Р.О. Основи медичних знань. Луцьк: Волинська книга, 2007. 380 с.

96. Межотраслевая инструкция по оказанию первой помощи при несчастных случаях на производстве; НЦ ЭНАС Москва, 2015. 182 с.

97. Бубнов В. Г., Бубнова Н. В. Инструкция по оказанию первой помощи при несчастных случаях на производстве. Москва: ГАЛО Бубнов, 2016. 112 с.