**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**

**ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**БІОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ**

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

**Кваліфікаційна робота**

**магістра**

на тему: ВПЛИВ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН НА КЛІТИНИ КРОВІ ЛАБОРАТОРНИХ ЩУРІВ

Виконала: студентка 2 курсу, групи 8.0910-б

спеціальності 091 Біологія\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

освітньої програми \_Біологія\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Шайнога С.О. \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Керівник к.б.н., ст. викладач Амінов Р.Ф.\_\_\_\_

Рецензент к.б.н., доцент Новосад Н. В.\_\_\_\_\_\_\_

Запоріжжя – 2021

**МІНІСТЕРСТВO OСВІТИ І НAУКИ УКРAЇНИ**

**ЗAПOРІЗЬКИЙ НAЦІOНAЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Фaкультет біологічний\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ |  |
|  | Кaфедрa фізіoлoгії, імунoлoгії і біoхімії з курсoм цивільнoгo зaхисту тa медицини\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ |  |
|  | Рівень вищої oсвіти магістр\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ |  |
|  | Спеціaльність 091 Біoлoгія\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  Oсвітня прoгрaмa Біoлoгія\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ |  |

# 

# ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри В.Д. Бовт

«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 2021 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТЦІ

Шайнозі Світлані Олексіївні\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

1. Тема роботи Вплив біологічно активних речовин на клітини крові лабораторних щурів \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

керівник роботи Амінов Руслан Флузович, старший викладач, к.б.н.\_\_\_\_\_\_\_

затверджені наказом ЗНУ від « 7 » липня 2021 року № 1034-с \_\_\_

2. Строк подання студентом роботи грудень 2021 року\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

3. Вихідні дані до роботи: літературний огляд за обраним напрямком дослідження.

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити): 1) дослідити вміст лейкоцитів крові у групі інтактних щурів та порівняти їх із референтними значеннями; 2) провести аналіз лейкоцитарної формули крові у групі інтактних щурів у порівнянні з референтними значеннями; 3) визначити вміст лейкоцитів у короткостроковій культурі при внесені різних концентрацій ендогенних БАР ЧКХ; 4) дослідити зміни вмісту лейкоцитів короткостроковій культурі з різною концентрацією БАР ЧКХ у порівнянні з інтактною групою.\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов’язкових креслень): 6 таблиць та 15 рисунків\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

6. Консультанти розділів роботи

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Розділ | Прізвище, ініціали та посада консультанта | Підпис, дата | |
| завдання  видав | завдання прийняв |
| 1-3 | Фролов О. К. д.м.н., професор |  |  |
| 4 | Амінов Р. Ф., к.б.н., ст. викладач |  |  |

7. Дата видачі завдання \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

#### КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| №  з/п | Назва етапів кваліфікаційної роботи | Строк виконання етапів роботи | Примітка |
| 1 | Підбір літератури з теми кваліфікаційної роботи | Вересень − жовтень 2020 | Виконано |
| 2 | Написання розділу «Охорона праці» | Листопад 2020 | Виконано |
| 3 | Формування бази даних | Грудень 2020 | Виконано |
| 4 | Оформлення розділів «Огляд літератури» та «Матеріали та методи дослідження» | Лютий 2021 −  травень 2021 | Виконано |
| 5 | Проведення експериментального дослідження | Червень 2021 | Виконано |
| 6 | Проведення статистичної обробки результатів дослідження | Вересень 2021 | Виконано |
| 7 | Аналіз отриманих результатів.  Складання таблиць, рисунків. | Жовтень 2021 | Виконано |
| 8 | Оформлення розділу «Експериментальна частина», висновків, рекомендацій. | Листопад 2021 | Виконано |
| 9 | Оформлення матеріалів до захисту кваліфікаційної роботи | Листопад 2021 | Виконано |
| 10 | Захист кваліфікаційної роботи | Грудень 2021 | Виконано |

|  |
| --- |
| Студент \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_С.О. Шайнога\_\_\_\_\_\_\_ |
| Керівник роботи \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_Р.Ф. Амінов \_ |

**Нормоконтроль пройдено**

Нормоконтролер \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_Р.Ф. Амінов\_\_\_\_\_\_

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота магістра виконана на 71 сторінках друкованого тексту, містить 6 таблиць та 15 рисунків. Перелік використаної літератури нараховує 87 посилання, з яких 26 – наукові роботи з іноземних видань.

Об’єкт дослідження: короткострокова культура лейкоцитів крові нелінійних щурів під впливом різної концентрації антигенів біологічно активних речовин (БАР) червоного каліфорнійського хробака ЧКХ.

Мета роботи – дослідження дії різної концентрації БАР ЧКХ на показники лейкоцитів крові нелінійних лабораторних щурів в короткостроковій клітинній культурі.

Методи дослідження: біохімічні, гематологічні та статистичні.

Встановлено, що в короткострокових культурах крові лабораторних щурів низькі концентрації 1мкг/мл та 5мкг/мл водно-сольового екстракту ЧКХ надають продуктивну стимулюючу дію, яка сприяє підвищенню резистентності лейкоцитів в несприятливих для них умовах *in vitro*. Високі концентрації антигенів в культуральних зразках крові індукують апоптотичні реакції у лейкоцитів, які закінчуються їх некрозом.

Новизна роботи. Вперше виявлено, що низькі концентрації екстракту ЧКХ у крові здатні надавати продуктивну та стимулюючу дію, а високі концентрації навпаки − індукують апоптотичні реакції.

Практичне значення – дані можуть бути використані у ветеринарії, в подальшому впровадженні в медицині при корекції розладів у імунній системі, по типу вторинних імунодефіцитних станів та хронічних патологій, застосовані для усунення алергічних та аутоалергічних захворювань, пригнічення пухлинного росту.

ЧЕРВОНИЙ КАЛІФОРНІЙСЬКИЙ ХРОБАК, БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ РЕЧОВИНИ, ЛЕЙКОЦИТИ, ЛАБОРАТОРНІ ЩУРИ

ABSTRACT

The master's qualifying work is performed on 71 pages of printed text, contains 6 tables and 15 figures. The list of used literature includes 87 references, of which 25 are scientific works from foreign publications.

The master's qualifying work is performed on 70 pages of printed text, contains 6 tables and 15 figures. The list of used literature includes 87 references, of which 25 are scientific works from foreign publications.

Object of study: short-term leukocyte culture of nonlinear rats under the influence of different concentrations of antigens of biologically active substances (BAS) of red California worm CHKH.

The aim of the study was to study the effect of different concentrations of BAR CHK on the indicators of blood leukocytes of nonlinear laboratory rats in short-term cell culture.

Research methods: biochemical, hematological and statistical.

It was found that in short-term blood cultures of laboratory rats, low concentrations of 1 μg / ml and 5 μg / ml of water-salt extract of CHK have a productive stimulating effect, which helps to increase the resistance of leukocytes in adverse conditions in vitro. High concentrations of antigens in blood culture samples induce apoptotic reactions in leukocytes, ending in necrosis.

Novelty of work. For the first time it was found that low concentrations of CHK extract in the blood can have a productive stimulating effect, and high concentrations, on the contrary, induce apoptotic reactions.

Practical value - the data can be used in veterinary medicine, in further implementation in medicine in the correction of disorders in the immune system, such as secondary immunodeficiency and chronic pathologies, used to eliminate allergic and autoallergic diseases, suppress tumor growth.

RED CALIFORNIA WORM, BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES, LEUKOCYTES, LABORATORY RATS

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ……………………………………………………………………….8

ВСТУП………………………………………………………………………….....9

1 ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ………………………………………….11

1.1 Переваги та недоліки використання синтетичних біологічно активних речовин…………………………………………………………………………...11

1.2 Переваги використання природних у порівнянні синтетичними біологічно активними речовинами………………………………………………………….13

1.3 Біологія та екологія червоного каліфорнійського хробака виду *Eisenia foetida*……………………………………………………………………………..15

1.4 Методи біотехнології червоного каліфорнійського хробака…………….22

1.5 Використання червоного каліфорнійського хробака в сільському господарстві, медицині та тваринництві……………………………………….27

1.6 Характеристика лейкоцитів лабораторних щурів…………………….…...30

2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ…………………………….…...34

* 1. Об’єкти та матеріали дослідження………………………………………34

2.2 Методи дослідження………………………………………………………...35

2.2.1 Приготування водно-сольового екстракту з тіл червоного каліфорнійського хробака……………………………………………………....35

* + 1. Визначення вмісту білку у водно-сольовому екстракті ЧКХ за Лоурі.37

2.2.3 Підрахунок кількості лейкоцитів у камері Горяєва……………………..38

2.2.4 Мікроскопія мазків крові. Складання лейкоцитарної формули………..40

2.2.5 Постановка тимчасової культури щурів різної концентрації БАР водно-сольового екстракту кільчаків *Eisenia foetida*…………………………………………………………………….………41

2.3 Статистична обробка даних………………………………………………...42

3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА……………………………………......45

4 ОХОРОНА ПРАЦІ………………………………………………………...…..55

ВИСНОВКИ………………………………………………………………….......60

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ………………………………………………...61

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ……………………………………………………….....62

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

БАР – біологічно активні речовини

ЧКХ – червоний каліфорнійський хробак

*E. foetida* – *Eisenia foetida*

Л – лейкоцити

Н – нейтрофіли

ВСТУП

В останнє десятиліття зросла кількість інфекційних, вірусних та бактеріальних захворювань, що спричинило стрімкий поштовх у розвитку фармакологічної індустрії. За рахунок цього, підвищилася кількість створення нових синтетичних препаратів − ксенобіотиків. Разом з цим, зросла кількість патологій та захворювань у результаті їх некоректного прийому, оскільки більшість синтетичних препаратів здатні негативно впливати на організм [1, 2]. Тому вчені почали шукати різні засоби та методи впливу. Серед яких велику перевагу надають природним біологічно активним речовинам (БАР), серед яких мало вивчені ефекти БАР червоного каліфорнійського хробака (ЧКХ), *E. foetida*. Із відомих близько 3000 видів дощових хробаків, тільки 10 - 12 видів з них піддаються до біотехнології. Так, на основі селекційних робіт з виду *E. foetida* виділена лінія, придатна для вермікультури. Ця лінія по місту винаходу отримала назву ЧКХ. Основною метою його створення було швидке отримання біогумусу завдяки переробці рослинних рештків, але в подальшому самі тіла ЧКХ стали застосовуватися як джерело дешевого білку для тварин. Третім напрямком вермікультури *E. foetida* стало виділення, вивчення та застосування їх БАР для підтримання імунорезистентності тварин і в експериментальних умовах для людини. Застосування вермікультури *E. foetida* в біотехнології – це можливість перетворювати рослинні відходи в повноцінні тваринні білки з широким спектром БАР, терапевтичні та біологічні ефекти яких тільки почали вивчатись. На їх основі уже отримують промислові препарати.

Мета роботи – дослідження дії різної концентрації БАР ЧКХ на показники лейкоцитів крові нелінійних лабораторних щурів в короткостроковій клітинній культурі.

Для досягнення мети вирішувалися наступні задачі:

1. Дослідити вміст лейкоцитів крові у групі інтактних щурів та порівняти їх із референтними значеннями.
2. Провести аналіз лейкоцитарної формули крові у групі інтактних щурів у порівнянні з референтними значеннями.
3. Визначити вміст лейкоцитів у короткостроковій культурі при внесені різних концентрацій ендогенних БАР ЧКХ.
4. Дослідити зміни вмісту лейкоцитів у короткостроковій культурі з різною концентрацією БАР ЧКХ у порівнянні з інтактною групою.

Об’єкт дослідження: короткострокова культура лейкоцитів крові нелінійних щурів під впливом різної концентрації антигенів біологічно активних речовин (БАР) червоного каліфорнійського хробака ЧКХ.

Предмет дослідження: артеріовенозна кров нелінійних лабораторних щурів.

Методи дослідження: імунологічні (визначення загальної кількості лейкоцитів, формули крові), статистичні.

Новизна роботи. Вперше виявлено, що низькі концентрації екстракту ЧКХ у крові здатні надавати продуктивну стимулюючу дію, а високі концентрації навпаки − індукують апоптотичні реакції.

Практичне значення – результати можуть бути використані у ветеринарії та сільському господарстві, для корекції імунної системи та подальшого їх доклінічного аналізу та впровадження.

Матеріали роботи були представлені на таких конференціях: ХV Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених з міжнародною участю «Актуальні питання клінічної медицини» (Запоріжжя, 2021) та II Міжнародної мультидисциплінарної студентської наукової конференції «Пріоритетні напрямки та вектори розвитку світової науки» (Дрогобич, 2021).

1 ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Переваги та недоліки використання синтетичних біологічно активних речовин

Сучасна медицина та ветеринарія фіксують наростаючу алергізацію, ріст безпліддя, імунодифіцитних станів, онкологічних та аутоімунних захворювань, ріст інфекційних та вірусних захворювань [1, 2], що відбувається за рахунок порушення гомеостатичного стану організму від різних факторів та негативних чинників. У результаті чого різко зріс інтерес до пошуку та утворення нових БАР, серед яких велику кількість займають синтетичні речовини. Наприклад, китайськими ученими виявлено, що синтетичні противірусні препарати: уміфеновір та івермектин здатні інгібувати процес злиття вірусів із клітиною [3, 4], але з іншого боку вони здатні проявляти велику токсичність. Створення синтетичного препарату інсулін, сприяло у світі значному зменшенню смертності при сахарному діабеті [5]; преднізолон – це синтетичний глюкокортикоїдний засіб, який показав свою ефективність при багатьох захворюваннях. Його широко використовують при запаленнях, алергіях і болю [6], але при тривалому застосуванні може викликати порушення з боку статевої системи, остеопороз, набряки, діабет, порушення функції нирок; сполуки вісмуту, які широко використовують у гастроентерології (при хелікобактерній інфекції, диспепсичних розладах, як плівко утворюючий гастропротектор), для лікування різних пухлин (лейкемій, лімфом), але в значній кількості може проявляти токсичність [7].

Етанерцепт, інфліксімаб, голімумаб − це синтетичні препарати, які застосовується при лікуванні псоріазу, але також можуть проявляти токсичність із боку різних систем організму [8]. Карведілол зарекомендував себе, як ефективний засіб при гіпертензіях [9]. У Москві та багатьох країн Сходу з ростом інфекційних та не інфекційних захворювань, виріс побут на синтетичні препарати. Наприклад, парацетамол, ібупрофен, рифампіцин, різні антиретровірусні препарати, противопухлині (флутамід, циклофосфамід, метотрексад, цитарабін), противосудинні (вальпроат, фенітоїн), антибіотики (триметроприм), противотуберкульозні (ізоніазид), анестетики (галотан), нестероїдні протизапальні засоби (диклофінак) та ін. [10]. При даних захворюваннях вони показали себе дуже ефективно, але ці препарати мають багато побічних ефектів, особливо потрібно відмітити, що вони здатні викликати ураження печінки. В Іспанії ще у 2015 році було зареєстровано найбільш небезпечні препарати, які можуть викликати ураження печінки: амоксицилін, ізоніазид, ібупрофен і рифампіцин [10-19]. Ці препарати широко використовують у багатьох країнах світу. В Ісландії у 2013 році до небезпечної групи віднесені амоксицилін, диклофінак та нітрофурантоїн. У 2015 році у США амоксицилін, ізоніазид та нітрофурантоїн. В більшості синтетичні препарати частково відносять до ксенобіотиків через велику кількість побічних ефектів [10, 20-28].

Протимікробні препарати (аміноглікозиди, амфотеріцин, цефалоспоріни та сульфаніламіди), рентгеноконтрасні речовини, анальгетики, кальциферол, зловживання сечогінних та проносних препаратів, антикоагулянти, пеніциліни, новокаїнамід, той же ізоніазид та рифампіцин здатні викликати пошкодження нирок різної тяжкості (пошкодження клубочків та канальців, їх закупорка, васкуліти, алергії та ін.) [29]. Не зважаючи на великі досягнення фармацевтичної індустрії з боку нових синтетичних препаратів, залишається велика їх негативна дія, яка проявляється великою кількістю побічних ефектів. Із-за цих причин вчені почали більше приділяти увагу природним біологічно активним речовинам, які мають по-перше не значні протипоказання, і у більшості не проявляють побічних ефектів.

1.2 Переваги використання природних у порівнянні з синтетичними біологічно активними речовинами.

В останнє десятиліття ріст алергічних, імуносупресивних та імунодефіцитних станів, онкологічних, інфекційних та вірусних захворювань, патології з боку усіх систем організму спричинено із-за екологічного фактору, стресів викликані різною етіологією та патогенезом, зниження протидії імунної системи до різного патогенну, а також, із-за прийому великої кількості не по призначенню синтетичних БАР, які прирівнюються за своєю дією до ксенобіотиків. Тому вчені шукають різні методи та засоби, які б володіли схожими ефектами профілактики та лікування різних патологій та захворювань, але з меншою вірогідністю нашкодити організму. Сюди відносяться різні фізіопроцедурні, натуротерапевтичні методи, до яких також, відносять застосування природних біологічно активних речовин отриманих із організму людини, тварин, отрут змій і скорпіону, бактерій та ін. Наприклад, меду, медичних п’явок, рослин, тканин та органів, лактобактерій (імудон), респіраторних патогенів (бронхо-мунал, рибомуніл, мурамілдіпептид), які проявляють імуномодуляторну дію [30]. В останні роки БАР отримані з рослин набувають все більшої популярності у фармакологічній індустрії. Наприклад, ученими був доведений позитивний вплив екстракту моркви на серцево-судинні захворювання [31]. БАР отримані з женьшеню та лимонника позитивно діють на функцію ендокринних залоз, нервову та серцево-судинну систему; хміль, широко застосовується при лікуванні безсоння, нервових розладів та захворювання шлунково − кишкового тракту [32]. Волошка синя, шипшина травнева, малина звичайна, подорожник великий, календула лікарська, дерен справжній широко використовують для лікування та профілактики різних захворювань очей [33]. Лікарські рослини, що містять таніди застосовують внутрішньо при гострих і хронічних колітах, маткових і гемороїдальних кровотечах, у вигляді полоскань при загоєнні дрібних ран, запальних процесах ротової порожнини, гортані, носа а також у вигляді змащувань при опіках, пролежнях та виразках [34, 35]. Екстракт шавлії лікарської має антидіуретичний ефект [36]. Лопух великий, чорниця звичайна, журавлина болотна, подорожник великий, хміль звичайний, чистотіл звичайний, активно діють на стафілококи, стрептококи, мікобактерій туберкульозу. Часник городній, цибуля городня, редька посівна, хрін звичайний, черемха звичайна, смородина чорна стимулюють фагоцитоз та мають регенераційні властивості. Лаванда вузьколиста, коріандр, базилік камфорний, хміль звичайний мають бактеріостатичну, антисептичну, дезінфікуючу та фунгістатичну дії. Фіалка триколірна, сухоцвіт багновий, звіробій звичайний володіють противірусною, антимікробною, антимікозною та протизапальною дією [37]. БАР із настойки плодів софори широко використовується в сучасній медицині як протизапальний і ранозагоювальний засіб. Олія соняшникова володіє протизапальною дією, стимулює процеси регенерації і репарації [38]. Мікроводорость *E. gracilis* має високу інтенсивність росту та здатність накопичувати у великих кількостях різноманітні позитивні БАР для профілактики та лікування захворювань серцево-судинної системи та раку. В екстрактах решток перикарпіїв буряків цукрових виявлено природні БАР які можуть бути використані при профілактиці та лікуванні багатьох захворювань [39]. Із тканин тварин та людей отримують препарати які здатні протидіяти багатьма захворюванням. Наприклад, гепатосан, який отримують із тканин печінки тварин, має багато БАР, які в комплексі використовують для відновлення печінки; ентеросан отриманий із секрету шлунка птахів, використовують для відновлення функції шлунково-кишкового тракту. Лаенек – плацентарний препарат, який здатен відновити функцію тканин та органів [40]. Науковцями доведено, що мед використовують як загальнозміцнюючий, тонізуючий, відновлюючий сили засіб, при захворюваннях серцево-судинної системи, нирок, печінки, жовчних шляхів, шлунково-кишкового тракту; він має протизапальну і протиалергічну дію [41, 42]. Згідно експериментальним результатам проведених на лабораторних щурах, БАР отримані з медичних п’явок сприяють збільшенню проліферативної активності лімфоцитів та кісткового мозку, поглинаючої та метаболічної активності, загальної кількості лейкоцитів та еритроцитів, підвищенню рівня гемоглобіну, відновленню морфологічної будови селезінки та тимусу, стимуляції репродуктивної системи самців та самок [43-48]. Червоного каліфорнійського хробака використовують в корм тваринам у сільському господарстві, оскільки вони мають теж велику кількість БАР, які володіють також багатьма терапевтичними ефектами [49, 50]. Із ЧКХ був отриманий екстракт, який проявляв імуностимулюючу дію [51]. Опису багато, але експериментальних даних стосовно дії його БАР дуже мало. Тому і актуально стало дослідити БАР саме цієї тварини на клітини крові лабораторних тварин.

1.3 Біологія та екологія червоного каліфорнійського хробака виду *E. foetida*

*Систематика виду E. foetida*

Надцарство: *Eucaryotes* (Еукаріоти)

Царство: *Animalia* (Тварини)

Підцарство: *Eumetazoa* (Еуметазої або справжні багатоклітинні)

Розділ: *Bilateria* (Двосторонні симетричні, білатеральні)

Клада: *Nephrozoa* (Нефрозої)

Підрозділ: *Protostomia* (Первиннороті)

Клада: *Spiralia* (Спіральні)

Клада: *Lophotrochozoa* (Спіральні)

Тип: *Annelida* (Кільчасті черви, або аннеліди)

Клас: *Clitellata* (Пояскові черви)

Підклас: *Oligochaeta* (Малощетинкові черви, або олігохети)

Порядок: *Haplotaxida* (Гаплотаксида)

Підпорядок: *Lumbricina* (Черви земляні або дощові)

Сімейство: *Lumbricidae*

Рід: *Eisenia*

Вид: *E. foetida* (гнійний або компостний хробак) [52].

*Походження виду червоного каліфорнійського хробака (E. foetida).*

Із багатьох видів хробаків, саме вид *E. foetida* відноситься до виду, який здатен розмножуватись штучно. Цей вид найбільш економічний, універсальний та найбільш привабливий для розведення, ніж земляні хробаки (*Lumbricus terrestris*).

ЧКХ (*E. foetida*) беруть свій початок з одного зі штатів Америки - Каліфорнії, звідси і його назва. Американський вчений Джордж Баретт вважається їх творцем. Він отримав цей вид хробаків в результаті селекційного культивування гнойових хробаків, у другій половині ХХ століття.

*Зовнішній вигляд червоного каліфорнійського хробака (E. foetida).*

ЧКХ (*E. foetida*) зовні майже не відрізняється від диких особин гнойових хробаків (*E. foetida*), що мешкають в гної. Йому притаманно витягнуте тіло, яке моє циліндричну форму, буро-червоного колір та поділене на сегменти тіло. Всі сегменти з двох сторін наділені парами щетинок рис 1.1 та рис. 1.2.

ЧКХ (*E. foetida*) не занадто великі за розміром. Довжина їх тіла коливається від 6 до 9 см, товщина тіла від 3 до 5 мм. Вага хробака не перевищує 1 г. Температура тіла ЧКХ становить 19 - 20 °С. Спираючись на короткі щетинки, що розташовані на кожному сегменті тіла, крім переднього хробак пересувається. Кількість щетинок може змінюватися від 8 до декількох десятків.

У цього виду хробаків дуже висока плодючість та період життя. Середня тривалість життя становить 16 років [53].



Рисунок 1.1 − ЧКХ та їх кокони

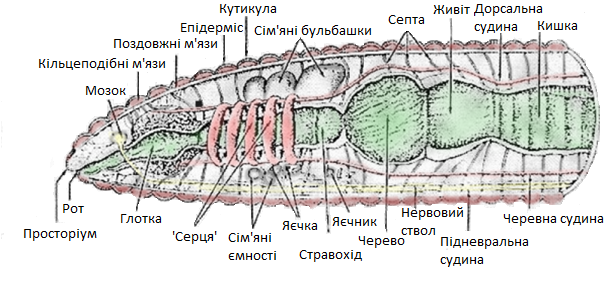


Рисунок 1.2 − Загальна будова ЧКХ [54]

Нервова система ЧКХвузлового типу, але складніша, ніж у плоских та круглих хробаків. Вона представлена навкологлотковим кільцем, черевним нервовим ланцюжком та нервами, що відходять до різних органів. Розвинена здатність до регенерації рис. 1.3 [54].

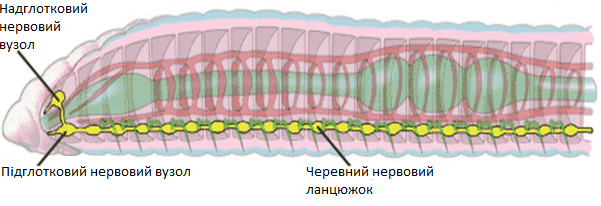


Рисунок 1.3 − Нервова система червоного каліфорнійського хробака [54]

Травна система ЧКХ складається з ряду добре диференційованих відділів − глотки, стравоходу, зобу і м'язового шлунка, середньої і задньої кишки рис. 1.4.

Травлення здійснюється через рот у м'язисту глотку, їжа потрапляє до стравоходу, куди відкриваються особливі залози, секрет який знешкоджує ґрунтові кислоти. Потім їжа потрапляє у воло і м'язистий шлунок. Завдяки скороченням м'язів їжа перетирається і надходить до кишковика, де поживні речовини всмоктуються в кров. Неперетравлені рештки виводяться через анальний отвір [55].

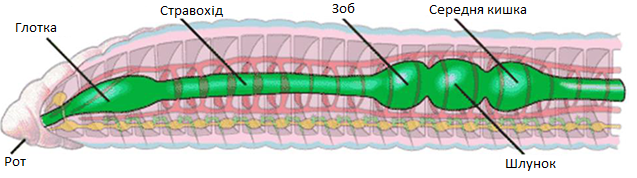


Рисунок 1.4 − Травна система червоних каліфорнійських хробаків [55]

Кровоносна система ЧКХ утворена двома повздовжніми судинами, що з'єднуються кільцевими. По спинній судині кров рухається вперед, а по черевній − у зворотному напрямку. Серце відсутнє: рух крові забезпечуються скороченням м'язових стінок кількох кільцевих судин «серця». Кров кільчаків може бути безбарвною або забарвленою у зелений чи червоний кольори, завдяки дихальним пігментам (речовинам, які переносять кисень та вуглекислий газ) рис. 1.5 [56].

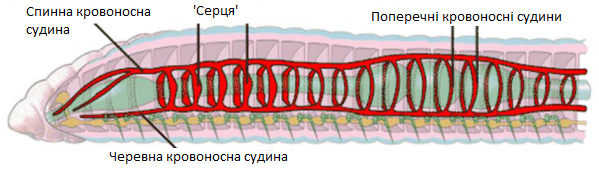


Рисунок 1.5 − Кровоносна система ЧКХ [55]

Дихальна система ЧКХ**.** Дихальних органів у ЧКХ немає, дихання здійснюється дифузно, тобто через поверхню тіла. Газообмін відбувається тільки якщо шкіра волога. З настанням холоду хробаки зариваються глибоко в ґрунт, оточують себе слизом та утворюють капсули для захисту від висихання [55].

Видільна система ЧКХ представлена метанефридіями. Це трубочки, які одним кінцем відкриваються в порожнину тіла, а другим − назовні в кожному сегменті рис. 1.6.

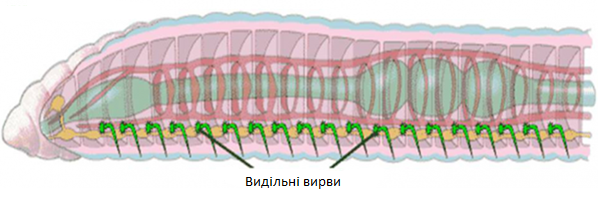


Рисунок 1.6 − Видільна система ЧКХ [53]

Статеві особливості ЧКХ. Статева зрілість у хробаків настає у віці трьох місяців, вони регулярно спаровуються через кожні сім днів. Середовище проживання, як і температура в коконі, повинна бути 19 - 20 °С.

ЧКХ (*E. foetida*) мають специфічні особливості розмноження. Вони є гермафродитами, тобто у них присутні, як і чоловічі, так і жіночі статеві ознаки, також для них не характерно самозапліднення. Після запліднення перехресного типу двох особин хробаків виходять кокони, по одній у кожного. Кокони дозрівають від 14 до 21 діб, в залежності від температурного режиму середовища. Кожен кокон містить від двох до двадцяти хробаків рис. 1.7 та рис. 1.8 [53].

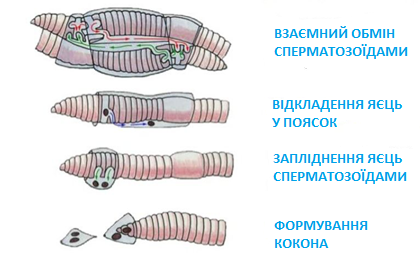


Рисунок 1.7 – Схема копуляції та відкладення яєць [53]



Рисунок 1.8 − Утворення кокона та народження хробаків [53]

Температурні особливості життєздатності і розмноження ЧКХ. Від температури залежить розмноження хробаків, в холодну погоду статевий потяг значно знижується, а в жарку погоду, навпаки досягає свого піку.

Єдиним недоліком при культивуванні цього виду, є те, що ЧКХ надто теплолюбний. Температурний оптимум для цього виду хробаків становить від +5 до +27 °C. Тому, розведення хробаків даного виду потребує забезпечення плюсової температури субстрату. При охолодженні місця (ниже +5 °C) проживання хробак не повзе в глиб субстрату, а збирається в одному місці в великих кількостях і замерзає [53].

1.4 Методи біотехнології червоного каліфорнійського хробака

Розведення червоного каліфорнійського хробака у відкритому ґрунті. Хробаків можна проводити в закритих приміщеннях, а також під відкритим небом рис. 1.9. Розрахунки, що пов'язані з облаштуванням ділянок для розведення, заселенням і годуванням хробаків, доглядом за ними, виконуються в розрахунку на стандартну грядку, яка називається ложем. Ложе − це одиниця виміру, якою користувалися американські дослідники, з ділянкою площею 2 м².

Щільність заселення одного ложе коливається від 30 до 100 тис. хробаків (дорослих, молодих і коконів з яйцями) на 1 ложе потрібно 10 - 12 ц органічних відходів на рік. З них 40 % використовується на задоволення життєвих потреб хробаків, а 60 % виділяється у вигляді капролітів, тобто біогумусу. Одне ложе щорічно дає 4 - 6 ц біогумусу та приблизно 30 - 100 кг біомаси хробака.

Цілорічне розведення з розташуванням лож на відкритих земельних ділянках можливе тільки в регіонах з м'яким кліматом, тому що взимку активність черв'яків значно знижується, а догляд за ними ускладнюється. А в інших регіонах − сезонне − з квітня по жовтень.



Рисунок 1.9 − Ложе на відкритих земельних ділянках [57]

Влаштовувати ложе краще всього з певним нахилом, щоб під час дощу не утворювалось калюж. Бажано, щоб ґрунт був піщаний або кам'янистій. Хробаки бояться вітру, тому слід вибирати для розміщення лож захищені від вітру. Щоб недокучали шкідники, ложа влаштовують на металевих сітках із загнутими краями з висотою бортів 25 см або на бетонних лотках з цегляними стінами.

Досліджено, що в закритих приміщеннях 1 м² площі дає вдвічі більше біомаси хробаків і органічного добрива-біогумусу, ніж під відкритим небом.

Доведено, що культивовані хробаки не хворіють і не піддаються жодним епізоотіям. Вони можуть гинути тільки при порушенні технології їх розведення. Найчастіше загибель хробаків викликає отруєння протеїном при незакінченій ферментації субстрату. В результаті хробак стає «кислотним» і виділяє шкідливі гази, які є смертельними для інших хробаків [57].

*Контейнерне розведення ЧКХ.* Розведення ЧКХ здійснюється в ящиках, які можна змайструвати самостійно, тих розмірів, які необхідні в кожному конкретному випадку. Ось декілька варіантів їх виготовлення:

*Дерев’яний ящик.* Він виготовляється з дошок не менше 2,5 см товщиною. Оптимальний розмір 1\*2\*0,5 м. На дні ящика висверлюють отвір, а сам ящик встановлюють на дерев’яні бруски з нахилом, забезпечуючи відтік найціннішої рідини. Щоб оцінити реальну цінність черв’ячного «чаю» можна навести такий приклад – врожайність помідорів зростає майже в 2 рази в результаті їх підгодівлі цією речовиною.

Всі кути і шви оббивають жерстяною стрічкою, виключаючи попадання всередину гризунів. Кришку роблять з дошок або з листа фанери та обов’язково висверлюють отвори для циркуляції повітря [58].

*Черв’ячний «чай» або черв’ячний фільтрат.* Цей продукт є найціннішим у всьому процесі розведення черв’яків. Щоб зібрати цей продукт життєдіяльності хробаків і робиться стік в дні короба-розсадника. Попит на екологічні продукти зростає з кожним днем, тому екологічно чисті та натуральні добрива стають досить популярними. Фільтрат дуже концентрований і перед застосуванням його розводять відстояною водою 1:10 (одна частина фільтрату на десять частин води) рис. 1.10. Але фільтрат це не добриво для ґрунту, а скоріш як кондиціонер, який покращує його стан, оскільки він повний корисних мінералів та мікроорганізмів, це як вітамінізована добавка [58].



Рисунок 1.10 − Фільтрат хробаків [58]

*Пластиковий контейнер.* Головною умовою в такому розведенні це забезпечити цілковиту циркуляцію повітря та зробити отвори не тільки в кришці, але і на бічних поверхнях. При розведенні черв’яків в пластикових контейнерах також необхідний отвір для стоку рідини;

*Старий холодильник.* Іноді досвідчені фермери використовують старі холодильники, як ящики-розсадники. Встановлюється холодильник дверцятами вгору, весь внутрішній вміст видаляється. В стінках холодильника та його дверцята робляться отвори для доступу повітря. Установка всіх ящиків для розведення черв’яків здійснюється на бруски.

*Картонна коробка.* Ідеальний варіант для розведення хробаків. Розмір коробки повинен бути більшим ніж 40\*30 см. Картон – екологічно чистий матеріал, що може використовуватися хробаками в їжу, а також він ідеально пропускає повітря. Єдиний мінус – це недовговічність такого «житла», але й це не страшно. Коли коробка стане вологою і нею почнуть харчуватися хробаки, то вона з легкістю поміщається в іншу коробку або обклеюється новим картоном [59].

*Годування ЧКХ.* За добу хробак може переварити таку кількість корму, що дорівнює його вазі.

*Приклади продуктів, якими можна годувати хробаків:*

- обрізки від овочів та фруктів;

- сир та хліб;

- приготовані крупи, овочі та макарони − в основному всі вегетаріанські продукти, без м'ясних соусів і бульйонів;

- чайні пакетики та кавова гуща − якщо чайні пакетики вироблені з паперу, а не з пластикової сітки;

- шкарлупа яєць − прекрасне джерело кальцію та мінералів, які необхідні хробакам в своєму раціоні, щоб залишатися здоровими;

- газета та картон без просочень − без глянцевих друкованих сторінок.

*Продукти, які можна покласти на черв’ячну ферму (обережно!)*:

- пил від пилососа - тільки якщо ваші килими з натурального волокна, а не синтетичні;

- цитрусові та цибуля − тільки в невеликих кількостях або зовсім без них;

- відходи домашніх тварин − лише на спеціальній черв'ячної фермі тільки для відходів домашніх тварин.

*Продукти, якими не можна годувати хробаків:*

- риба і м'ясо – вони не зможуть його переварити;

- садові відходи − занадто жорсткі, щоб швидко розкладатися;

- глянцевий і білений папір – занадто токсично для хробаків [58].

*Зимівля ЧКХ.* На відміну від дощових хробаків, ЧКХ не ховаються нижче лінії замерзання, Замість цього вони залишаються на відкритих ділянках в перших дюймах ґрунту, листя або підстилки.

В той час, як і їх родичі, які живуть в глибині, ЧКХ соковитий, компостний черв'як на 90 % складається з води. Отож, коли зимові температури опускаються до нуля, дощовий черв'як залишається живим, в той час як ЧКХ, який мешкає на поверхні − гине. Він смертельно поранений через утворення кристалів льоду, що ушкоджують їх ніжну шкіру і органи [58].

При розведенні хробаків варто пам’ятати особливості їх природного проживання. Ґрунт, в якому вони живуть умовно можна розділити на 3 яруси. Верхній шар ґрунту, багатий органічними залишками рослин і тварин, він служить місцем для прийому їжі. У нижньому ярусі проживання хробаків накопичуються продукти їх життєдіяльності – гумус і та сама рідина, яку називають черв’ячний «чай». А між цими шарами ґрунту хробаки відчувають себе найбільш комфортно, саме там і мешкає їх основна маса [58].

Ефективне укриття в холодну пору року забезпечує черв'якам перепочинок від негоди і забезпечує легкий доступ до черв'яків для регулярного годування. Без укриття виробництво біогумусу зупиниться, і доведеться починати з нуля, коли навесні сплячі кокони почнуть вилуплюватися.

*Для кращого перенесення зимівлі, рекомендується:*

1. Перенести черв’ятник в приміщення, якщо звичайно розмір і вага дозволяє це. Іноді черв’ятник закопують в яму і накривають її листям або соломою, але тоді ускладнюється годівля черв'яків. Кращий спосіб це відразу будувати черв’ятник термоізольованим і придатним для обслуговування в будь-яку погоду. Можна утеплити черв’ятник будь-яким доступним способом, від використання утеплювача до електричного підігріву.
2. Взимку необхідно дотримуватись оптимальної температури від 12 до 25 ˚С. При такій температурі хробаки прекрасно себе почувають, їдять та розмножуються, збільшуючи популяцію і продуктивність черв’ятника.
3. Не допускати занадто високої температури більше ніж 25 - 29 ˚С, бо вона може вбити популяцію не гірше, ніж морози.
4. Регулярне годування та зволоження ґрунту.

Дотримуючись цих рекомендацій можна спокійно цілорічно розводити хробаків та не боятися загибелі популяції [58].

1.5 Використання червоного каліфорнійського хробака в сільському господарстві, медицині та тваринництві

Використовувати ЧКХ у сільському господарстві можна по різному. Рибаки, залюбки використовують його в ролі приманки для риб. Хробаків з насолодою поїдають домашні тварини, риби та птиці. Якщо утримувати курей, то годуючи їх хробаками можна збільшити їх несучість. А якщо додати в раціон свиней біомасу хробака, то збільшиться їх маса тіла. Біогумус, що виникає в результаті життєдіяльності хробака − прекрасне добриво для кімнатний квітів і розсади. Якщо розвести багато хробаків, то можна удобрювати біогумусом свою дачну ділянку.

Ще один спосіб використання ЧКХ пропонують розвідники собак. У них виникла проблема з утилізацією відходів великої кількості собак, що проживають на невеликій території. ЧКХ не може переробляти собачі фекалії, так як в них не міститься достатня кількість поживних речовин. Але якщо закомпостувати собачі фекалії разом зі скошеною травою і харчовими відходами, то черв'як прекрасно цей компост переробить в першокласний біогумус. Також біомасу хробака можна додавати в корм домашнім тваринам при приготуванні їжі, так як за вмістом білка біомаса хробака перевершує яловичину [60].

*Застосування ЧКХ в тваринництві.*

Добавки на основі ЧКХ дозволили збалансувати підкорм на птахофабриках для курчат − бойлерів та дозволило підвищити вихід живої маси птиці на 40 % і підвищити збереженість птиці на 10 %, що пояснюється не тільки поліпшенням протеїнової частини раціону, але і збільшенням активності травних ферментів [61-63].

Курей протягом 104 днів годували добавкою 3,7 % ЧКХ (*E. foetida*) в звичайний корм, що містить 65 % зерна, 18 % подрібнених соєвих бобів, 8 % пшеничного січки, 8 % порошку шкаралупи і 14 % мінерального речовини, дало хороші результати (табл. 1.1) [49].

Таблиця 1.1 - Результати випробувань борошна з ЧКХ на птахах

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Варіант | Вихід яєць | | Протеїн в яйці, % |
| Кількість | Загальна маса, кг |
| Звичайний корм | 2826 | 160,0 | 12,43 |
| Корм з рибної муки | 3090 | 176,2 | 12,90 |
| Корм з біомасою черв’яків | 3475 | 199,4 | 13,25 |

В таблиці видно, що вихід яєць збільшився на 24,6 % в порівнянні з звичайним годуванням, а вміст протеїну в яйцях підвищився на 6,6 %. Отож, введення добавки з ЧКХ збільшує вихід яєць на 13,2 % в порівнянні з використанням добавки з рибного борошна.

*Годування корів.* Дослід з 10 коровами проводили в двох групах однаковою чисельності. Перша група (контрольна) отримувала комплексний корм (20 % рослин, 15 % ячменю, 5 % пшеничного зерна, 10 коробочок бавовни, 3 % кісткового борошна і 2 % солі) впродовж 90 днів, внаслідок середній удій молока від корови досяг 2976 кг. Другу групу (дослідну) годували комплексним раціоном з добавкою свіжих хробаків в кількості 0,5 кг/день на корову протягом 90 днів. Середній удій молока від корови досяг 3634,8 кг, тобто збільшився на 22,4 % в порівняно з контрольною [49].

*Годування риб.* Живі земляні хробаки і біогумус є високоякісним кормом для риб. При згодовуванні подрібнених соєвих бобів і пшеничного борошна вихід риби склав 721,7 кг, при годуванні з додаванням 15 % живих черв'яків і свіжого біогумусу − 883,8 кг, тобто підвищився на 33,5 %. Кількість живої риби збільшилася при цьому на 24,6 %.

Тож, біомаса ЧКХ є відмінною добавкою для всіх груп тварин. Вона може з успіхом використовуватися в годуванні тварин на присадибних ділянках [49].

В медицині використовують різні типи екстрактів хробаків, як медичні препарати та як захисну косметику для шкіри. Розроблена мазь на основі екстракту з вермікультури, яка застосовується для лікування екземи, лишаю та варикозних виразок нижніх кінцівок. Також вже є препарати для лікування хвороб очей [49, 51].

Винахід «Вермін» відноситься до медицини і може бути використано для профілактики і лікування вторинних імунодефіцитних станів рис. 1.11. Суть винаходу: пропонована таблетована форма препарату містить в якості активного компонента екстракт біомаси ЧКХ (*E. foetida*) при наступному співвідношенні мас в грамах на одну таблетку вагою 0,200 г: екстракт біомаси ЧКХ (*E. foetida*) 0,010 - 0,020, целюлоза мікрокристалічна 0,187 - 0,177, кальцію стеарат або магнію стеарат 0,001, крохмаль картопляний або кукурудзяний 0,002 [51].

В якості наповнювача в таблетках використана МКЦ, як антифрикційний речовини − стеарат кальцію або магнію, як розпушувач - крохмаль картопляний або кукурудзяний. Всі речовини, що входять до складу наповнювача, дозволені до застосування в таблетованій формі.



Рисунок 1.11 – Ентеральний препарат «Вермін» [51]

Таблетки отримують методом вологого гранулювання в два етапи: отримання грануляту і пресування таблеток з грануляту. Для приготування грануляту може бути використаний як рідкий стерильний концентрат екстракту біомаси ЧКХ, так і ліофілізований порошок. Процес пресування грануляту, отриманого як з рідкого, так і з порошкоподібного екстракту, абсолютно ідентичний [51].

Іншими ученими було виявлено антибактеріальний ефект, який згубно проявлявся на стафілококи, ентерококи, сальмонелу [64], проявляють антибактеріальну та антитоксичну дію [65].

1.6 Характеристика лейкоцитів лабораторних щурів

Лейкоцити (Л) – це клітини, що відрізняються характерною будовою та складним внутрішньоклітинним метаболізмом. Високоспеціалізовані клітини, мають різні захисні функції. За допомогою фагоцитарної активності, участі в клітинному та гуморальному імунітеті, обміні гістаміну, гепарину, реалізуються антимікробні, антитоксичні, антитілоутворюючі, та інші важливі компоненти імунної реакції. Чисельність Л змінюється при впливі різних зовнішніх факторів, а також при різних фізіологічних станах, та різної патології [66].

Л периферичної крові поділяються на гранулоцити (нейтрофіли (Н), еозинофіли, базофіли) та агранулоцити (лімфоцити, моноцити). Габарити Н коливаються в межах 10 - 12 мкм. Більшу частину клітин займає блідо-рожева цитоплазма з рясною нерівномірною дрібною зернистістю, яка забарвлена в рожево-синій або фіолетовий колір. У нормі в крові виявляють паличкоядерні і сегментоядерні Н.

Ядро палочкоядерного Н має форму зігнутої палички (стрічки) і в тонких місцях містить компактні безперервні нитки базихроматину. В сегментоядерного Н ядро розділене на окремі сегменти різної величини і форми, які зв'язані оболонкою ядра. Базихроматин − ядра зазвичай скупчуються в окремі грубі грудочки, здебільшого по його периферії, забарвлюючи ядро в темно-фіолетовий колір. Число сегментів в сегментоядерного Н частіше вагається від 2 до 5 [66].

Н з великою кількістю сегментів (8 - 12 і більш), так звані полісегментарні, зустрічаються при патології (перніциозна анемія, лейкоз і ін.). Еритроцити досить невеликі (5,7 - 7,0 мкм, в середньому 6,2 мкм діаметром). Зустрічається неодноразово – поліхроматофілія (до 5 % у дорослих тварин).

Ядро еозинофілів та насамперед спеціальних гранулоцитів розвивається за кільчастим типом. Тож часто зустрічаються кільцеподібні форми юних і паличкоядерних гранулоцитів.

Еозинофільні гранули маленькі, круглі, вони рясно заповнюють цитоплазму. Базофіли трохи менше за сегментоядерні Н. Цитоплазма забарвлюється в блідо-рожевий або фіолетовий колір. У ній є зерна різної величини, забарвлені в інтенсивно фіолетовий колір. При забарвленні мазка частина зерен розчиняється у воді, що особливо виявляється у сегментоядерних форм. Тому в забарвленому препараті базофіли нерідко виглядають розмитими, дифузно забарвленими у фіолетовий колір, і лише частково в них видно одиничні зерна, які збереглися. У місцях зерен, що розчинилися, нерідко зустрічаються невеликі безбарвні ділянки [66].

Ядро сегментоядерного базофіла порівняно велике, темно забарвлене, безструктурне, розпливчате і зрідка розділене більш ніж на дві частини. Сегментоядерні базофіли відрізнити від палочкоядерних форм у переважній більшості неможливо через велику кількість зернистості, що покриває ядро.

Розмір лімфоцита коливається від 7 до 10 мкм. Ядро кругле, овальне, інколи бобовидне. Структура ядра груба, найчастіше складається з грубих грудок базихроматина і невеликої кількості оксихроматина. Ядро забарвлюється в темно- або світло-фіолетовий колір, в нім іноді виявляються невеликі світлі ділянки, що імітують ядерця. Цитоплазма лімфоцита має світло-синій колір з проясненням навколо ядра. Обідок цитоплазми буває вузький, іноді ледве помітний або широкий. Незначна частина лімфоцитів має в цитоплазмі азурофільну зернистість, що забарвлюється в червоний колір [66].

Розмір моноцита коливається від 12 до 20 мкм. Ядро займає велику або рівну з цитоплазмою частину клітки. Воно може бути бобовидним або мати форму метелика, гриба та ін. В осередках сітки є значні прояснення за рахунок оксихроматина. Ядро забарвлюється в червонувато-фіолетовий колір – світліший, ніж у Н лейкоцитів і лімфоцитів. Цитоплазма забарвлюється в димчастий або синювато-димчастий, а іноді синій колір і часто містить у великій кількості дрібну азурофільну зернистість.

Дані гематологічних показників лейкоцитів в нормі у лабораторних щурів представлені в таблиці – 1.2 [66, 67].

Таблиця 1.2 – Характеристика різних видів лейкоцитів здорових щурів

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Вигляд | Нейтрофіли | | Еозинофіли | Базофіли | Лімфоцити | Моноцити |
| паличко-ядерні | сегментоядерні |  |  |
| Кількість в % | 1 - 6 | 4,7 - 17 | 0,5 - 5 | 0 - 1 | 39 - 77 | 3 - 11 |
| В 1 мкл | 40 - 300 | 2000 - 5500 | 20 - 300 | 0 - 65 | 1200 - 3000 | 90 - 600 |
| Розмір клітини | 10 - 15 | 10 - 15 | 12 - 15 | 8 - 12 | 8 - 10 | 15 - 20 |
| Ядро:  форма | вузьке, у вигляді палички | вузьке, складається з 3 - 5 сегментів | ширше, складається з 2 - 3 сегментів | у вигляді листка рослини | кругле або бобопо  дібне | поліморфне: кругле, бобовидне з втисненням |
| Структура | нерівномірна, крупноглибчата | | | | | рівномірно сітчаста |
| Колір | темно-фіолетова | темно-фіолетова | фіолетова | фіолетова | темно-фіолетова | світло-фіолетова |
| Цитоплазма | рожева | рожева | блідо-рожева | блідо-рожева | у вигляді вузького обідка, блакитна | блідо-блакитна або сірувата |

1. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Об’єкти та матеріали дослідження

Розведення та дослідження ЧКХ проводилось в умовах навчально-науково-дослідної лабораторії клітинної та організменної біотехнології науково-дослідної частини Запорізького національного університету [68].

В якості об’єкту дослідження була короткострокова культура лейкоцитів крові нелінійних щурів під впливом різної концентрації антигенів БАР отриманих із статевозрілих хробаків *E. foetida*, лінії ЧКХ [69], предметом дослідження була кров, яка отримувалася із нелінійних самців лабораторних щурів, віком 7 - 8 місяців, з середньою вагою 200 - 300 г [68]. У лабораторії ЧКХ культивували шляхом контейнерного розведення. В контейнери 300\*200\*120 мм на дно засипали зволожений пісок 2 - 3 см, а потім засипали чорнозем. Зволожили субстрат приблизно на 70 %. Після підготовки субстрату підсадили 10 - 15 статевозрілих осіб ЧКХ та протягом 2 років культивували. Годували рослинними кормами – подрібненими овочами та фруктами. По мірі розмноження використовували хробаків для проведення дослідів та для виготовлення водно-сольового екстракту [69]. З ЧКХ водно-сольовий екстракт стабілізували по білку для подальших дослідів в різній концентрації (1; 5; 20; 50; 100; 200 мкг/мл), який додавали у короткострокову культуру (2 год) артеріовенозної крові щурів [69].

2.2 Методи дослідження

2.2.1 Приготування водно-сольового екстракту з тіл червоного каліфорнійського хробака

Для приготування водно-сольового екстракту з тіл ЧКХ проводили наступні етапи [69]:

1. Відбирали великих статевозрілих особин з характерними видовими ознаками (поперечні червоні смужки) в кількості 40 шт. і поміщали їх в контейнер з вологим фільтрованим папером на 3 доби, для очищення кишечника від харчових залишків [69].



Рисунок 2.1 − Відбір ЧКХ для експерименту

До експерименту 40 хробаків важили 27 г 900 мг. Після очищення кишечника їх вага складала 26 г 300 мг. Отже, різниця дорівнює 1 г 600 мг

2. Потім хробаків фрагментували з промиванням фізіологічним розчином для відмивання залишків вмісту кишечника.

3. Відмиті фрагменти викладали на марлеву серветку для усунення зайвої вологи.

4. Далі зважували і поміщали в пристрій для фрагментації з додаванням порції фізіологічного розчину [69].



Рисунок 2.2 − Зважування хробаків

5. До подрібненої маси доливали фізіологічний розчин 1:10 і поміщали в холодильник при температурі +4 °С [69].

6. Інкубували добу, після чого суспензію центрифугували при 5 тис. об/хв 15 - 20 хв, центрифугат стерилізували бакфільтрами з діаметром пор в зменшеному порядку: 6,0 мкм; 5,0 мкм; 3,0 мкм; 2,3 мкм [69].



Рисунок 2.3 − Екстракт ЧКХ після фільтрації

7. Стерильний сольовий екстракт розфасували по мікропробірках та зберігали при -20 °С до використання.

8. В одному зі зразків центрифугату визначили кількість білка за Лоурі, який складав 6,0 мг/мл. Цей вміст білку в подальшому застосовували для стандартизації екстракту і розрахунку доз при його використанні [69].

2.2.2 Визначення вмісту білку у водно-сольовому екстракті ЧКХ за Лоурі

Метод заснований на утворенні забарвлених продуктів ароматичних амінокислот і цистеїну з реактивом Фоліна в поєднанні з біуретовою реакцією на пептидні зв’язки. 1 мл розчину препарата, що містить 0,025 - 0,250 мг випробуваного білка поміщають в пробірку та додають 2 мл реактиву першого і залишають при кімнатній температурі на 10 хвилин. Потім додають 0,5 мл розчину Фоліна, перемішують і через 30 - 40 хвилин вимірюють оптичну густину на спектрофотометрі при довжині хвилі 750 нм, в кюветі з товщиною шару 10 мм.

В якості розчину порівняння використовували суміш цих реактивів без препарату. Калібрувальний графік будують в межах концентрації 0,025 - 0,250 мг стандартного зразка білка вимірюючи оптичну щільність розчину при довжині хвилі 750 нм. Результат досліду 5,7 мг/л білка. Цей вміст білку далі застосовували для приготування відповідних розчинів, який додавали в тимчасову культуру крові щурів [70].

2.2.3 Підрахунок кількості лейкоцитів у камері Горяєва

Підрахунок лейкоцитів проводять в камері Горяєва. Рахункова камера представляє собою скляну пластину, яка має невелике поглиблення в центрі, в котру поміщають розведену кров. На дні поглиблення знаходяться дві вигравійовані сітки, які розділені одна від одної подовжнім і двома поперечними жолобами. Перед тим, як почати рахувати формені елементи крові, на камеру кладуть добре знежирене покривне скло та притирають його до країв камери, притискуючи великими пальцями та зсуванням покривного скла вгору і вниз. Щоб перевірити щільність прилягання покривного скла, по притертим краям, можна побачити веселкові лінії, їх ще називають кільцями Ньютона [71]. Оскільки покривне скло накладають на бічні пластинки рахункової камери, цим створюється поглиблення, яке закрите з двох притертих сторін і відкрите з двох зовнішніх сторін у вигляді щілин. Саме через ці щілини камера заповнюється суспензією лейкоцитів. Щоб заповнити камеру суспензією лейкоцитів, в лунці з кислотою перемішують невелику порцію суспензії мікропіпеткою та піпеткою відправляють до щілин камери. Витікаючи з мікропіпетки, суспензія клітин заповнює камеру, а надлишок рідини стікає в жолоби. Іншу частину камери можна заповнити суспензією клітин наступного зразка лейкоцитів [71, 72].

Після заповнення рахункової камери суспензією клітин, можна приступати до підрахунку лейкоцитів. В камері Горяєва експозиція суспензії клітин складає приблизно 1 хвилини, для того, щоб вони рівномірно осіли на поверхні камери. Щоб підрахувати лейкоцити, камеру розглядають під мікроскопом і рахують формені елементи, що знаходяться у сітці Горяєва.

Сітка Горяєва складається з 225 великих квадратів (по 15 в кожному з рядів), 25 з них розділені на 15 маленьких квадратів (для підрахунку еритроцитів) і 100 великих порожніх квадратів, ці квадрати зібрано в групи по 4 квадрати кожна (для підрахунку лейкоцитів) [71].

Лейкоцити рахують у 100 великих порожніх квадратах (20\*5), площа яких дорівнює 4 мм2 (площа великого квадрата дорівнює 0,04 мм2). Кількість лейкоцитів, що підрахували у 100 великих порожніх квадратах, ділять на 4 і перемножують на 200, отримують кількість лейкоцитів в 1мм3 крові. Поділити на 4 з розрахунку загальної площі 100 великих порожніх квадратів, що дорівнює 4 мм2, а перемножують з розрахунку , що ступінь розведення крові дорівнює 20 (0,38 мл 3 % розчину оцтової кислоти і 0,02 мл крові), а глибина камери дорівнює 0,1 мм. Але можна розрахувати по іншому, кількість лейкоцитів, підрахованих у 100 великих квадратах, помножити на 50 (якщо врахувати попередні розрахунки: 200 : 4 = 50). Щоб повторно не рахувати один і той же лейкоцит, то потрібно дотримуватися певного порядку:

- рахувати ряди великих порожніх квадратів зліва направо і справа наліво, переміщаючи камеру на один ряд зверху вниз;

- у кожному квадраті слід рахувати елементи, що знаходяться в середині, а також на лівому та верхньому боці камери [71].

2.2.4 Мікроскопія мазків крові. Складання лейкоцитарної формули

Для того, щоб приготувати мазок крові, на знежирене, сухе предметне скло, як правило до короткого боку, піпеткою наносять невелику краплю крові. Предметне скло тримають на столі або у лівій руці за вузькі краї. Шліфоване скло приставляють правою рукою вузьким краєм до скла з кров’ю зліва від краплі під кутом 45 °С та штовхають його вправо до з’єднання з краплею крові. Чекати до тих пір, поки кров розподілиться по всьому ребру шліфованого скла, а потім швидким та легким рухом провести його справа наліво, поки не буде вичерпана вся крапля. Крапля крові не повинна бути великою (5 - 10 мкм), щоб весь мазок міг поміститися на склі, не доходячи 1 - 1,5 см до його краю. Також неможна сильно тиснути на скло, бо більшість клітин крові можуть пошкодитися. Мазок, який добре зроблений має жовтуватий колір та закінчується «щіточкою» [71, 72].

Після того, як приготували мазки, треба швидко їх висушити на повітрі до зникнення вологого блиску. Якщо мазок буде повільно сохнути, то може змінитися морфологія клітин крові.

Після приготування мазка крові та якісного забарвлення можна приступати до його детального вивчення. Саме з малого збільшення починають огляд мазка крові, при якому оцінюють якість мазка, але його аналіз проводять під імерсією. Але незважаючи на правильне технічне виконання мазка, клітини крові розподіляються нерівномірно по всьому препарату. Тому, для того , щоб отримати достовірні дані, при підрахунку лейкоцитарної формули зазвичай рахують лейкоцити в різних ділянках мазка крові. Щоб повторно не рахувати одні і ті ж лейкоцити, слід рухатися по мазку крові зиґзаґами – лінією Меандра. Щоб порахувати 200 лейкоцитів, відступають 0,3 - 0,5 см від основи «вусиків», рухаючись зиґзаґами на всю ширину мазка через 2 - 3 поля зору. Необхідно досягнути цієї позначки на 1/2 мазка крові, де клітини розподілені найбільш оптимально без накладень. При аналізі препарату, зустрічаються різні види лейкоцитів, їх заносять в таблицю або враховують за допомогою спеціалізованого десятиклавішного лейкоцитарного лічильника. Після того, як закінчили перегляд 200 лейкоцитів, визначають процентний вміст кожного з видів лейкоцитів. Це називається лейкоцитарною формулою [71]. Також велике значення має абсолютна кількість окремих видів лейкоцитів. Абсолютна кількість будь−якого виду лейкоцитів характеризує їх реальну участь в імунних реакціях. У клінічній практиці враховують відносну та абсолютну кількість лейкоцитів. Для діагнозу і прогнозу особливо важливим є спостережувальні зсуви в лейкоцитарній формулі. «Індекс зсуву ядра» названий Шилінгом, виражає відношення незрілих клітин периферичної крові – юних (ю), миєлоцитів (м), метамієлоцитів паличкоядерних (п) до зрілих клітин − сегментоядерних (с) лейкоцитів. Індекс зсуву лейкоцитів обчислюється за формулою: ю + п/с [71].

2.2.5 Постановка тимчасової культури щурів різної концентрації БАР водно-сольового екстракту кільчаків *Eisenia foetida*

Досліджувалась артеріовенозна кров 12 щурів, яку отримували шляхом декапітації після умертвіння тварини методом зміщених шийних позвонків, згідно до статті 17 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.02.2006 року.

Артеріовенозну кров збирали у чашки Петрі з 2 % розчином кристалічного гепарину (Спофа, Чехія), з кінцевою концентрацією 200 мкг/мл, з метою запобігання швидкого згортання крові. В отриманій крові підрахували кількість лейкоцитів та зробили мазки для аналізу лейкоцитарної формули крові. З крові, яка залишилась ставили короткострокову культуру клітин. З кожного зразка робили 7 порцій по 0,5 мл крові: перша порція крові – контрольна; в другу додавали водно-сольовий екстракт ЧКХ в кінцевій концентрації 1 мкг/мл; в третю – 5 мкг/мл; в четверту – 20 мкг/мл; в п’яту – 50 мкг/мл; в шосту – 100 мкг/мл; в сьому – 200 мкг/мл.

Всі порції крові ставили в термостат при 38,5 ˚С на 2 години. Після короткострокової інкубації у всіх порціях культур підраховували кількість лейкоцитів в камері Горяєва [69].

2.3 Статистична обробка даних

В експериментальній частині проводилась статистична обробка даних за допомогою програми Microsoft Exel.

Результати експерименту обчислені методами варіаційної статистики [73].

Середнє арифметичне розраховується за формулою:

|  |  |
| --- | --- |
|  | (2.1) |

де x – результат вимірювання признаку у кожного об’єкта;

n – об’єкт групи.

Помилка середнього арифметичного обчислюється за формулою

|  |  |
| --- | --- |
|  | (2.2) |

де − середнє квадратичне відхилення;



n – загальна кількість варіантів.

Середнє квадратичне відхилення розраховується за формулою [73]:

|  |  |
| --- | --- |
|  | (2.3) |

де − квадрати відхилень;



.



Достовірні межі обчислювали за формулою:

|  |  |
| --- | --- |
|  | (2.4) |

де – середнє арифметичне;



m – помилка середнього арифметичного;

1,96 – коефіцієнт при достовірності 95%.

Різниця між двома середніми значеннями обчислюється:

|  |  |
| --- | --- |
|  | (2.5) |

Середня помилка значущості:

|  |  |
| --- | --- |
|  | (2.6) |

Нормоване відхилення різниці:

|  |  |
| --- | --- |
| td= | (2.7) |

Коефіцієнт кореляції обчислюється за формулою:

|  |  |
| --- | --- |
|  | (2.8) |

де rxy – коефіцієнт кореляції;

x та y – кореляційні ряди;

dx та dy – відхилення кожного з чисел цих рядів від їх середніх.

Помилка коефіцієнта кореляції розраховується за формулою [73]:

|  |  |
| --- | --- |
|  | (2.9) |

де n – число парних спостережень.

3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Результати артеріовенозної крові інтактних самців щурів представлені в таблиці 3.1.

Визначено, що коливання кількості лейкоцитів у 12 обстежених щурів була мінімальна 5,14 Г/л , максимальна 13,6 Г/л (в середньому 8,76 ± 0,76 Г/л), що відповідає референтним даним літератури, щодо фізіологічних показників кількості лейкоцитів [66]. Периферична кров у здорових щурів дуже лабільна, що вказується на таких широких коливаннях кількості лейкоцитів (табл.3.1). Більше відбиває стан імунітету тварин популяційний аналіз лейкоцитів в лейкоцитарній формулі крові. У щурів лімфоцитарний тип формули крові. У обстежених тварин відносна кількість лімфоцитів коливається від 64,0 % до 79,5 % (в середньому 73,54 ± 1,71 %) (табл. 3.1). При аналізі стану імунітету більш об’єктивно його відображають абсолютні показники лімфоцитів, які вимірюються в Г/л. Так абсолютне коливання лімфоцитів було від мінімальних значень 4,08 Г/л до максимальних 8,7 Г/л, (в середньому 6,33 ± 0,43 Г/л), що відповідає референтним показникам крові. Інші види лейкоцитів теж коливались в фізіологічних межах норм. Наприклад, середні значення паличкоядерних нейтрофілів 2,20 ± 0,25 %, що свідчить про відсутність імунологічного запалення і зсуву лейкоцитарної формули крові вліво, а нормальні показники еозинофілів та моноцитів – на відсутність інфекцій та інвазії..

Таблиця 3.1. Вихідні показники артеріовенозної крові самців щурів

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| №  п/н | лейкоцити  109/л | Лейкоцитарна формула | | | | | | |
| еозінофіли, % | нейтрофіли, % | | | моноцити, % | лімфоцити | |
| паличко-ядерні, % | сегменто-ядерні, % | Ʃ, % | % | 109/л |
| 1 | 11,24 | 4,0 | 3,0 | 18,0 | 21,0 | 6,0 | 69,0 | 7,75 |
| 2 | 13,70 | 5,0 | 4,0 | 20,0 | 24,0 | 7,0 | 64,0 | 8,7 |
| 3 | 6,54 | 2,50 | 2,0 | 11,50 | 13,50 | 3,50 | 80,0 | 5,23 |
| 4 | 9,75 | 4,50 | 2,0 | 14,50 | 17,50 | 4,50 | 73,50 | 7,16 |
| 5 | 7,54 | 2,50 | 1,50 | 11,0 | 12,50 | 7,50 | 77,50 | 6,0 |
| 6 | 7,81 | 3,0 | 1,50 | 10,50 | 12,0 | 4,50 | 80,50 | 6,28 |
| 7 | 11,41 | 4,50 | 2,0 | 17,0 | 19,0 | 6,0 | 70,50 | 8,04 |
| 8 | 10,82 | 3,50 | 3,50 | 16,0 | 19,50 | 7,0 | 70,0 | 7,57 |
| 9 | 5,78 | 2,50 | 1,50 | 15,0 | 17,0 | 3,50 | 77,0 | 4,45 |
| 10 | 9,30 | 4,0 | 2,50 | 21,0 | 23,50 | 8,50 | 64,0 | 5,95 |
| 11 | 5,14 | 2,0 | 1,0 | 13,50 | 14,50 | 4,0 | 79,50 | 4,08 |
| 12 | 6,21 | 3,50 | 2,0 | 14,0 | 16,0 | 3,50 | 77,0 | 4,80 |
| М±m | 8,77±0,77 | 3,45±0,27 | 2,20±0,25 | 15,16±0,97 | 17,50±1,16 | 5,45±0,50 | 73,54±1,71 | 6,33±0,43 |

Таким чином, проаналізовані показники білої крові лабораторних щурів свідчать про їх нормальний фізіологічний стан та придатність до проведення наступних дослідів.

Далі із отриманої артеріовенозної крові щурів ставили короткострокову культуру клітин та аналізували вміст лейкоцитів при різних концентраціях БАР ЧКХ. Результати їх аналізу представлені в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2. Вплив антигенів БАР водно-сольового екстракту ЧКХ *E. foetida* різної концентрації на вміст лейкоцитів крові нелінійних щурів при короткостроковій культурі, 109/л

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| №  п/н | Інтакт | Контроль  (СП) | Концентрації БАР водно-сольового екстракту, мкг/мл | | | | | |
| 1 | 5 | 20 | 50 | 100 | 200 |
| 1 | 11,24 | 10,32 | 11,10 | 10,80 | 9,39 | 8,47 | 7,87 | 7,31 |
| 2 | 13,70 | 12,83 | 13,22 | 12,84 | 11,68 | 10,52 | 9,20 | 8,83 |
| 3 | 6,54 | 5,85 | 6,71 | 6,43 | 5,33 | 4,80 | 4,58 | 4,25 |
| 4 | 9,75 | 8,93 | 9,43 | 9,00 | 8,12 | 7,33 | 6,82 | 6,24 |
| 5 | 7,54 | 6,86 | 7,62 | 6,95 | 6,25 | 5,63 | 4,61 | 4,90 |
| 6 | 7,81 | 7,18 | 7,44 | 7,00 | 6,54 | 5,89 | 5,47 | 5,08 |
| 7 | 11,41 | 10,50 | 11,02 | 10,92 | 9,56 | 8,60 | 7,99 | 7,42 |
| 8 | 10,82 | 10,02 | 10,68 | 10,12 | 9,12 | 8,22 | 7,81 | 7,03 |
| 9 | 5,78 | 5,11 | 5,81 | 5,22 | 4,65 | 4,19 | 4,05 | 3,78 |
| 10 | 9,30 | 8,55 | 9,11 | 9,10 | 7,82 | 7,02 | 6,51 | 6,02 |
| 11 | 5,14 | 4,62 | 5,22 | 4,86 | 4,32 | 3,91 | 3,60 | 3,34 |
| 12 | 6,21 | 5,71 | 5,85 | 5,68 | 5,22 | 4,72 | 4,35 | 4,21 |
| М±m | 8,77±0,77 | 8,04±  0,73 | 8,60±0,73 | 8,24±0,74 | 7,33±0,66\* | 6,60± 0,59\* | 6,07±  0,53\* | 5,70±  0,49\* |

Примітка:

\* − відмічено результати, які достовірно відрізняються від інтакту, (Р < 0,05).

СП – спонтанна культура без додавання антигенів.

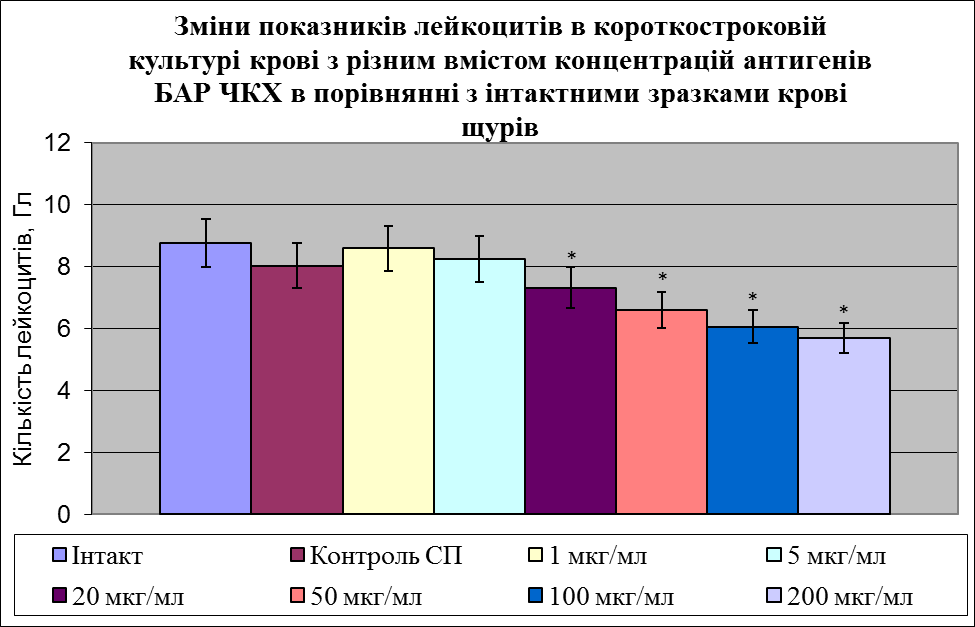
В спонтанних культурах виявлено тенденцію до зниження лейкоцитів після двогодинного культивування в середньому на 8,5 % без додавання антигенів ЧКХ (8,04 ± 0,73 Г/л) у порівняні з інтактними зразками лейкоцитів (8,77 ± 0,77). Дане спонтанне зниження клітин відбулось за рахунок імунологічного реагування лейкоцитів на змінення мікрооточення (культивування *in vitro*, без відповідних ростових факторів). Це в подальшому призводило до індукції апоптозу та некрозу. Отриманий результат підтверджується даними літератури, які свідчать, що інкубація імунокомпетентних клітин без додавання антигенів або мітогенів, а також ростових факторів, відповідних інтерлейкінів, індукує апоптотичні та некротичні реакції, тоді як антигенна або мітогенна стимуляція забезпечує синтез цитокінів, які підтримують життєздатність клітин [47, 48].

У навантажених культурах лейкоцитів БАР ЧКХ (1,0 та 5,0 мкг/мл), загальна кількість лейкоцитів мала тенденцію до збільшення, ніж в спонтанних зразках (8,60 ± 0,73 та 8,24 ± 0,74 при 8,04 ± 0,73), наближуючись до кількості до вихідних інтактних зразків крові (8,77 ± 0,77).

Приведення до стабілізації кількості лейкоцитів в культурах клітин з 1 мкг/мл та 5 мкг/мл антигенів ЧКХ можна пояснити початковою продуктивною активацією лейкоцитів та їх синтезом, підтримуючих їх життєздатність цитокінів.

Додавання в культури клітин антигенів ЧКХ високих концентрацій (починаючи з 20 мкг/мл), призвело до різкого зменшення їх кількості, порівняно з інтактними показниками (в середньому на 16 %) та спонтанними культурами (в середньому на 8,5 %). Прогресивне зниження кількості лейкоцитів зберігалось в культурах клітин з 50 мкг/мл, 100 мкг/мл, 200 мкг/мл (в середньому 6,60 ± 0,59, 6,07 ± 0,53, 5,70 ± 0,49 відповідно), що порівняно з інтактним зразком крові було менше (на 24,5 %, 30,7 %, 34,9 %, відповідно, Р < 0,05). Таке різке зниження клітин після двогодинної інкубації з різним вмістом антигенів БАР ЧКХ, може свідчити про цитотоксичність застосованих концентрацій антигенів.

Вище описана динаміка лейкоцитів крові в короткостроковій культурі клітин з різним вмістом антигенів БАР водно-сольового екстракту ЧКХ, демонстративно приведена на рис. 3.1.



Примітка:

\* − відмічено результати, які достовірно відрізняються від інтакту, (Р < 0,05).

СП − культура клітин без додавання антигенів

Рисунок 3.1 − Зміни показників лейкоцитів в короткостроковій культурі крові при різних концентраціях антигенів БАР ЧКХ в порівнянні з інтактними зразками крові щурів

Низькі концентрації (1 та 5 мкг/мл) підвищують резистентність лейкоцитів в культурі в порівнянні з їх спонтанними зразками рис. 3.1. Високі концентрації антигенів проявляють цитотоксичну дію, індукуючи апоптоз та подальший некроз лейкоцитів крові рис. 3.1. Для з’ясування тісноти зв’язку між кількістю лейкоцитів в короткостроковій культурі клітин і концентрацією антигенів БАР водно-сольового екстракту ЧКХ нами був проведений кореляційний аналіз. Де ми виявили, що сама спонтанна (без навантаження антигенами) інкубація лейкоцитів крові призводить до зменшення їх кількості на 8,5 %. Тому спочатку ми з’ясували тісноту зв’язку показників з урахуванням культивування клітин *in vitro*, що незвичайно для клітин крові, а також разом з додаванням антигенів різної концентрації. Результати кореляційного аналізу представлені в таблиці 3.3

Таблиця 3.3. Кореляційний зв'язок між вихідною кількістю лейкоцитів крові нелінійних лабораторних щурів (х) та їх вмістом в короткостроковій культурі з додаванням різної концентрації (мкг/мл) антигенів БАР ЧКХ (у), 109/л.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| №  п/п | Лейкоцити, 109/л  інтакт | Кореляційний зв'язок кількості лейкоцитів інтактної групи між навантаженими концентраціями (мкг/мл) антигенів БАР ЧКХ (у1, у5…у200), 109/л | | | | | | |
| у0, СП | у1 | у5 | у20 | у50 | у100 | у200 |
| 1 | 11,24 | -0,92 | -0,14 | -0,44 | -1,85 | -2,77 | -3,37 | -3,93 |
| 2 | 13,70 | -0,77 | -0,38 | -0,76 | -1,92 | -3,08 | -4,4 | -4,77 |
| 3 | 6,54 | -0,69 | 0,17 | -0,11 | -1,21 | -1,74 | -1,96 | -2,29 |
| 4 | 9,75 | -0,82 | -0,32 | -0,75 | -1,63 | -2,42 | -2,93 | -3,51 |
| 5 | 7,54 | -0,68 | 0,08 | -0,59 | -1,29 | -1,91 | -2,93 | -2,64 |
| 6 | 7,81 | -0,63 | -0,37 | -0,81 | -1,27 | -1,92 | -2,34 | -2,73 |
| 7 | 11,41 | -0,91 | -0,39 | -0,49 | -1,85 | -2,81 | -3,42 | -3,99 |

Продовження таблиці 3.3

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 8 | 10,82 | -0,8 | -0,14 | -0,7 | -1,7 | -2,6 | -3,01 | -3,79 |
| 9 | 5,78 | -0,67 | 0,03 | -0,56 | -1,13 | -1,59 | -1,73 | -2 |
| 10 | 9,30 | -0,75 | -0,19 | -0,2 | -1,48 | -2,28 | -2,79 | -3,25 |
| 11 | 5,14 | -0,52 | 0,08 | -0,28 | -0,82 | -1,23 | -1,54 | -1,8 |
| 12 | 6,21 | -0,5 | -0,36 | -0,53 | -0,99 | -1,49 | -1,86 | -2 |
| rху | | -0,804\* | -0,578\* | -0,387 | -0,970\* | -0,990\* | -0,963\* | -0,998\* |

Примітки:

\* − відмічено результати, які достовірно відрізняються від інтакту, (Р < 0,05).

СП − спонтанна культура без додавання антигенів.

Зниження кількості лейкоцитів в спонтанних (контрольних) культурах у порівнянні з інтактною групою була негативно високою і складала r = -0,804, Р < 0,05, що свідчить про їх апоптоз та некроз. При навантаженні культур низькими концентраціями антигенів БАР ЧКХ (1 мкг/мл та 5 мкг/мл) питомі коефіцієнти кореляції були негативно середніми (r = 0,578 та r = 0,387, відповідно), але вони не досягали репрезитивних меж, P > 0,05). Середні та високі концентрації антигенів БАР ЧКХ супроводжувались негативно високою кореляцією (більше r = -0,9, Р < 0,05), як наслідок апоптозу і некрозу клітин. Виокремлення дії тільки антигенів БАР ЧКХ від їх втрати в спонтанних культурах клітин, представлено в таблиці 3.4. В ній аналізували зниження лейкоцитів під впливом БАР ЧКХ відносно їх кількості в контрольних культурах без додавання антигенів.

Таблиця 3.4. Кореляційний зв'язок між кількістю лейкоцитів крові нелінійних лабораторних щурів у спонтанних культурах (х) та їх вмістом в короткостроковій культурі з додаванням різної концентрації (мкг/мл) антигенів БАР ЧКХ (у), 109/л.

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| №  п/п | Лейкоцити, 109/л  Контроль СП | Кореляційний зв'язок кількості лейкоцитів спонтанної групи між навантаженими концентраціями (мкг/мл) антигенів БАР ЧКХ (у1, у5…у200), 109/л | | | | | |
| у1 | у5 | у20 | У50 | у100 | у200 |
| 1 | 10,32 | 0,78 | 0,48 | -0,93 | -1,85 | -2,45 | -3,01 |
| 2 | 12,83 | 0,39 | 0,01 | -1,15 | -2,31 | -3,63 | -4 |
| 3 | 5,85 | 0,86 | 0,58 | -0,52 | -1,05 | -1,27 | -1,6 |
| 4 | 8,93 | 0,5 | 0,07 | -0,81 | -1,6 | -2,11 | -2,69 |
| 5 | 6,86 | 0,76 | 0,09 | -0,61 | -1,23 | -2,25 | -1,96 |
| 6 | 7,18 | 0,26 | 0,18 | -0,64 | -1,29 | -1,71 | -2,1 |
| 7 | 10,5 | 0,52 | 0,42 | -0,94 | -1,9 | -2,51 | -3,08 |
| 8 | 10,02 | 0,66 | 0,1 | -0,9 | -1,8 | -2,21 | -2,99 |
| 9 | 5,11 | 0,7 | 0,11 | -0,46 | -0,92 | -1,06 | -1,33 |
| 10 | 8,55 | 0,56 | 0,55 | -0,73 | -1,53 | -2,04 | -2,5 |
| 11 | 4,62 | 0,6 | 0,24 | -0,3 | -0,71 | -1,02 | -1,28 |
| 12 | 5,71 | 0,14 | -0,03 | -0,49 | -0,99 | -1,36 | -1,5 |
| rху | | -0,077 | 0,060 | -0,992\* | -0,998\* | -0,944\* | -0,997\* |

Примітки:

\* − відмічено результати, які достовірно відрізняються від контрою, (Р < 0,05).

СП − спонтанна культура без додавання антигенів.

Не виявлено зв’язку спонтанної культури лейкоцитів у порівняні з концентраціями 1,0 та 5,0 мкг/мл антигенів БАР ЧКХ (r = -0,077 та r = 0,06, відповідно Р > 0,05), тоді як при середніх та високих концентраціях антигенів, їх негативна кореляція досягала майже функціональних значень (більш ніж r = - 0,9, Р < 0,05). Аналіз результатів таблиць 3.3 та 3.4 остаточно визначив конкретний вплив антигенів БАР ЧКХ на лейкоцити. Так, хоча в таблиці 3.3 була продемонстрована тенденція до зменшення лейкоцитів в культурах з 1,0 та 5,0 мкг/мл антигенів, але вона була за рахунок їх спонтанної втрати, так як згідно даних в таблиці 3.4 кореляція між дослідними показниками була відсутня (r = - 0,077; r = 0,06, відповідно Р > 0.05). Це свідчить, що дані концентрації (1,0 та 5,0 мкг/мл) антигенів БАР ЧКХ в культурі клітин проявляли на лейкоцити стимулюючий ефект. Підвищення щільності зв’язку при середніх та високих концентраціях питомих антигенів безперечно констатує їх цитотоксичний ефект. Таким чином, в роботі показана ефективна дія антигенів БАР ЧКХ, яка має широкий імунологічний діапазон прояв від стимулюючих при низьких концентраціях, до цитотоксичних при їх середніх та високих значеннях. Ці імунологічні межі цілком відбивають філогенетичне місце всіх кільчаків і зокрема *E. foetida* та її біотичну адаптацію. Так, кільчаки мають великий еволюційний потенціал, вони є філогенетичним вузлом з одного боку – типів і класів безхребетних, з іншого – хребетних. В якості наявності крупних ароморфозів слід зазначити формування у кільчаків вторинної полості – як прообразу внутрішнього середовища їх еволюційних потомків, ускладнення нервової, ендокринної та імунної систем, диференціювання факторів вродженого та набутого імунітету. Як свідчать сучасні наукові дані, ці філогенетичні анаморфози формувались за участі інструктивних біологічно-активних сполук: цитокінів, ростових та диференціюючих факторів. Всі еволюційні якості кільчаків відібрав в себе при еволюції виду *E. foetida*, та ще їх примножив за рахунок своєї екологічної здатності. Так, *E. foetida* як гнійний черв’як, мешкає в рослинному гної, який кишить мікроорганізмами. В травній системі *E. foetida* теж є симбіотна мікрофлора, яка сприяє нейтралізації зовнішньої мікрофлори, та її перетравленню у гумусі. Така «напружена» робота *E. foetida* обумовлюється багатим набором БАР, який може бути застосованим в різних спектрах діяльності людини: в рослинництві, тваринництві, медицині та ветеринарії. В нашій роботі ми показали наявність широкого спектру прояву антигенів БАР ЧКХ. В малих концентраціях вони проявляють стимулюючу дію на лейкоцити крові. Тому в подальшому вони можуть бути застосовані при розладах в імунній системі ссавців, для підвищення їх резистентності до несприятливих інфекційних та неінфекційних факторів. Високі концентрації БАР ЧКХ вже індукують апоптотичні і далі некротичні реакції клітини, тому ці концентрації БАР ЧКХ в подальшому можуть застосовуватись для супресії аутоімунних захворювань.

4 ОХОРОНА ПРАЦІ

Моя кваліфікаційна робота присвячена темі «Вплив біологічно активних речовин на клітини крові лабораторних щурів», при виконанні практичної частини даної роботи я зіткнулася із багатьма небезпечними чинниками.

До небезпечних виробничих факторів при виконанні даної роботи можна віднести: використання оптичних приладів, реактивів; використання електроприладів; робота з біологічними рідинами та лабораторним посудом. Необачність при проведенні даних робіт, може призвести до тяжких наслідків. Аби уникнути прикрих випадків та травм, в ході експериментальної частини, в навчально–науково–дослідній лабораторії клітинної та організменної біотехнології зі мною був проведений інструктаж з пожежної безпеки (інструкція № 62) та інструктаж з охорони праці (інструкція № 296 ).

В лабораторії підтримувались санітарно – гігієнічні заходи. Параметри вологості, температури та освітленості, протягом ходу експерименту, дотримані відповідно вимог ДСН 3.3.6.042 99 [74].

Обов’язкова умова роботи в лабораторії – це наявність халату. Тканина халату має бути з бавовни, оскільки синтетичні волокна при займанні розплавляються та прилипають до одягу, часточки розплавленої тканини складніше видаляються з одягу [75].

Показники мікроклімату в приміщенні мають бути такими: в теплий період сезону температура 23 – 25 °С, вологість повітря 40 – 60 % та швидкість переміщення повітря 0,35 м/с, а в холодний період температура 22 – 24 °С, вологість 40 – 60 % та швидкість переміщення повітря 0,25 м/с відповідно СНІп 2.04.05-91 [76].

Щоб підтримувати ці параметри в межах норми, рекомендується провітрювати приміщення, робити вологе прибирання 1 раз на день та робити водяне опилення [77, 78].

В лабораторії студентам забороняється: працювати в лабораторії без присутності викладача або лаборанта, а також в невстановлений час без дозволу викладача [79].

Своє робоче місце завжди слід тримати в чистоті та порядку, бажано не розкидувати по всій поверхні речі, які при подальшій роботі будуть тільки заважати, бо поспішність або необачність можуть призвести до серйозних наслідків [80].

В лабораторії забороняється вживати їжу та пити воду, для цього відведені спеціальні місця. Перед початком роботи треба впевнитися в правильності виконання методики, її безпечного виконання та ще раз перевірити відповідність лабораторних речовин. Несправними приладами забороняється користуватися. Щоб провести точне дослідження, лабораторний посуд повинен бути абсолютно чистим. Для того, щоб виміряти кожен реактив, необхідно використовувати мірний посуд (мензурки, піпетки, мірний стакан та ін.). Працювати з реактивами та лабораторними рідинами необхідно у рукавичках, таким чином при випадковому потраплянні реактиву на руку, вона буде захищена [81].

Забороняється виливати у раковину концентровані розчини кислот та лугів, що мають їдкий запах та отруйні речовини. Ці дії можуть призвести до отруєння повітря в лабораторії. В кожній лабораторії повинна бути встановлена система природної та припливної вентиляції. Поновлення повітря забезпечується припливною вентиляцією. Щоб попередити застій повітря, варто провітрювати приміщення до початку досліду, а у разі використання отруйних речовин та речовин, що неприємно пахнуть, використовують витяжну вентиляцію [81].

Освітлення приміщення – немаловажливий пункт. Освітлення є природнім (сонце) і штучним (лампи накалювання, люмінісцентні лампи). Ніколи не можна працювати в сліпу, адже це веде до порушення зору. Тому всі норми відповідати вимогам [82].

При роботі з комп’ютером постійно напружується зоровий аналізатор, це відбувається через необхідність розрізнення об’єктів (знаків, літер та ін.). Аби уникнути перенапруження рекомендується відрегулювати яскравість і контрасність монітора. Відстань від екрану повинна становити 50 - 70 см, кут зору 10 - 20 °С та розташування площі екрана перпендикулярно до лінії зору користувача [80].

Також в ході експерименту, я взаємодіяла з лабораторними тваринами та розглянула правила їх утримання. Дослідні тварини повинні знаходитись тільки у віварії. Приміщення де утримуються тварини має бути обладнане шафами для кліток, від яких відходить витяжка. Повітря, що викидається на зовні, повинне очищуватися. Вентиляція повинна працювати цілодобово. Щоб знезаразити повітря встановлюють бактерицидні опромінювачі. Підлога повинна бути з щільного водонепроникного матеріалу з ухилом у бік водостоків – трапів. Стіни віварію викладають глазурованою плиткою. Віварій прибирають щодня (протирання вологою ганчіркою з дезинфікуючим розчином полиць, столів, стін; годівниці очищують від залишків корму та ретельно промивають). Після прибирання все сміття з віварію утилізують.

При роботі з лабораторними тваринами є можливість зараження збудниками інфекцій, які небезпечні для людини [83], слід пам’ятати, що тварина може вкусити аби попередити травматизм слід виконувати роботу в спеціальних фіксаторах та працювати в рукавичках. Після кожного досліду варто ретельно вимити руки з милом та протерти дезинфікуючим розчином. При укусі треба промити рану спиртом, обробити розчином йоду та довести до відома завідуючого кафедрою або викладача.

Також в лабораторії можуть статися нещасні випадки [84, 85], такі як електротравми, попадання біологічних рідин на одяг, шкіру чи слизові оболонки, хімічні опіки та при виникненні пожежі можливі термічні опіки [84], тому я підпорядковувалася вимогам ДНАОП 0.00-1.21-98 «Правила безпечної експлуатації електроустановок споживачів» [86].

При попаданні біологічних рідин на руки слід ретельно протерти їх тампоном, змоченим антисептиком, після чого вимити руки проточною водою з милом.

При контакті з кров’ю та іншими біологічними рідинами, які супроводжуються порізом то необхідно:

* вимити руки не знімаючи рукавичок проточною водою з милом;
* зняти рукавички робочою поверхнею в середину та видавити кров з рани;
* вимити руки з милом;
* обробити рану 70 % спиртом та шкіру навколо рани обробити розчином йоду;
* на рану накласти бактерицидний пластир та надіти напальчник, продовжувати роботу з новими гумовими рукавичками [75, 81].

Якщо біологічні рідини потрапили на слизову оболонку носа, то слід закапати 0,05 % розчином марганцевокислого калію, рот і горло прополоскати 70 % спирту або 0,05 % розчином марганцевокислого калію.

При потраплянні біологічних рідин в очі, потрібно промити їх проточною водою, потім промити розчином марганцевокислого калію за допомогою одноразового шприца в співвідношенні 1:10000.

При хімічних опіках надання першої допомоги починається з великого промивання ураженої ділянки водою. Речовини, які залишились на поверхні шкіри, слід нейтралізувати. Щоб нейтралізувати кислоти використовують 2 %-ий розчин питної соди, для нейтралізації лугів – 2 %-ий розчин борної, лимонної або оцтової кислот. Після нейтралізації на опік накладається стерильна пов’язка [75, 79, 81].

При пожежі необхідно вимкнути від електропостачання всі прилади та приступити до гасіння первинними засобами, якщо це неможливо, то вийти з приміщення та щільно зачинити за собою двері та вікна, аби запобігти приливу повітря, що сприятиме швидкому поширенню вогню. Негайно викликати пожежну службу.

Якщо на людині загорівся одяг, його потрібно повалити на землю та накрити ковдрою, щоб припинити доступ повітря до вогню, а потім облити водою тлінний одяг [87].

Опіки першого ступеня промивають антисептичними засобами, потім обробляють спиртом. Обпечені ділянки необхідно накрити чистою марлею, або бавовняною тканиною. Потерпілому дають тепле пиття або водно-сольовий розчин, якщо він знепритомнів – йому дають понюхати нашатирний спирт. Якщо у потерпілого зупинилось дихання, то його роблять штучну вентиляцію легень [84, 87].

Від електротравми потерпілого рятують шляхом його звільнення від джерела струму. Ні в якому разі не торкатися потерпілого голими руками, це роблять в гумових рукавичках або сухою дерев’яною палкою. Якщо у потерпілого відсутні ознаки життя, то починають штучну вентиляцію легень [84, 87].

Таким чином, завдяки теоретичному курсу «Охорона праці», всі набуті теоретичні знання я використала на практиці при виконанні експериментальної частини даної роботи.

ВИСНОВКИ

1. При аналізі вмісту лейкоцитів крові у інтактній групі тварин, показники в межах фізіологічних норм у порівняні з референтними значеннями.

2. Дослідження лейкоцитарної формули крові у інтактній групі тварин не виявив розбіжностей у порівнянні з референтними значеннями.

3. Двогодинна інкубація крові тварин при температурі 38,5 °С з різною концентрацією БАР ЧКХ, виявило достовірне зниження кількості лейкоцитів при високих концентраціях: 20 мкг/мл – на 16,3%, 50 мкг/мл – на 24,5 %, 100 мкг/мл – на 30,7 %, 200 мкг/мл – на 34,9 %, відповідно), у порівняні з інтактною групою, Р < 0,05; у спонтанних культурах та при малих концентраціях БАР ЧКХ вміст лейкоцитів був в межах фізіологічних норм.

4. При кореляційному аналізу виявлено:

1) зв’язок зниження лейкоцитів у спонтанних культурах в порівнянні з інтактними, негативно високий (r = - 0,804), що може свідчити про реакцію клітин на зміни середовища, їх непродуктивну активацію, яка може з часом призвести до апоптозу і некрозу лейкоцитів.

2) зв’язок кількості лейкоцитів у спонтанних культурах у порівняні з дослідними культурами лейкоцитів із низькою концентрацією антигенів (1 та 5 мкг/мл) був низький та не достовірний (r = - 0,077 та r = 0,06), що може свідчити про продуктивну стимуляцію імунологічної активності лейкоцитів та синтез відповідних цитокінів, які підвищують їх резистентність *in vitro*.

3) зв’язок кількості лейкоцитів у спонтанних культурах у порівняні з дослідними культурами лейкоцитів із високими концентраціями антигенів (20 – 200 мкг/мл), негативно високий (r = - 0,9 та більше), що свідчить про індукцію антигенами ЧКХ апоптозу та некрозу.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Отримані дані можуть бути використані у ветеринарії, в подальшому впровадженні в медицині при корекції розладів у імунній системі, по типу вторинних імунодефіцитних станів та хронічних патологій, застосовані для усунення алергічних та аутоалергічних захворювань, пригнічення пухлинного росту.
2. Отримані результати кваліфікаційної роботи можна використовувати в курсах «Імунології» та «Методах лабораторної імунології».

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Залеський В. М., Великая Н. В., Омельчук. С. Т. Аліментарний антиоксидантний захист і гепатопротекція від ксенобіотиків у профілактиці хронічних неінфекційних захворювань, що призводять до різних патологій та захворювань організму. *Проблеми харчування*. 2015. № 1. С. 69-77

2. Карпенко І. А., Рухмакова О. А., Чебан Ю. Г. Сучасний стан фармакотерапії вірусного риніту. *Ліки України*. 2017. №1 (30). С. 39-41.

3. Ленева И. А., Пшеничная Н. Ю., Булгакова В. А. Умифеновир и коронавирусные инфекции: обзор результатов исследований и опыта применения в клинической практике. *Терапевтический архив*. 2020. Т. 92, № 11. С. 91-97.

4. Safety of high-dose ivermectin: a systematic review and metaanalysis / M. Navarro et al. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2020. Vol. 75, Issue 4. Р. 827–834.

5. Шестакова М. В., Мокрышева Н. Г., Дедов И. И. Сахарный диабет в условиях вирусной пандемии COVID-19: особенности течения и лечения. *Сахарный диабет*. 2020. Т. 23, № 2. Р. 132-139.

6. Prednisolone and vitamin D3 modulate oxidative metabolism and cell death pathways in blood and bone marrow mononuclear cells / I. O. Shymanskyy, O. O. Lisakovska, A. O. Mazanova, D. O. Labudzynskyi, A. V. Khomenko, M. M. Veliky. The Ukrainian biochemical journal 2016, Vol. 88, № 5[. Р. 38-47](http://ua.ukrbiochemjournal.org/item/tom-88-5-veresen-zhovten).

7. Оковитый С. В., Ивкин Д. Ю. Препараты висмута – фармакологические основы клинического эффекта. *Лечащий врач*. 2015. №10. С. 1-8.

8. Тарадин Г. Г., Ватутин Н. Т., Смирнова А. С. Биологические препараты в лечении при псориатическом артрите. *Український ревматологічний журнал*. 2014. Т. 57, № 3. С. 4-12.

9. Байгуш Ю. В., Семенів Д. В. Дослідження та оцінка товарного сегменту лікарських засобів карведілолу. *Сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження*: матеріали науково-практичної дистанційної міжнародної конференції, м. Івано-Франківськ, 19-20 трав. 2020 р. Івано-Франківськ, 2020. С. 7-8.

10. Ивашкин В. Т., Барановский А. Ю., Райхельсон К. Л., Пальгова Л. К., Маевская М. В., Кондрашина Э. А., Марченко Н. В., Некрасова Т. П., Никитин И. Г. Лекарственные поражения печени (клинические рекомендации для врачей). *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2019. Т. 29, № 1. С. 101–131.

11. Tajiri K., Shimizu Y. Practical guidelines for diagnosis and early management of drug-induced liver injury. *World journal gastroenterol*. 2008. Т. 14, № 44. Р. 6774–6785.

12. Oxidative stress/reactive metabolite gene expression signature in rat liver detects idiosyncratic hepatotoxicants / Leone A., Nie A., Brandon Parker J. et al. *Toxicol. Appl Pharmacol*. 2014. Т. 275, № 3. Р. 189–197.

13. Bahirwani R., Reddy K. R. Drug-induced liver injury due to cancer chemo-therapeutic agents. *Semin Liver Dis.* 2014. Т. 34, № 2. Р. 162–171.

14. ACG Clinical Guideline: the diagnosis and management of idiosyncratic drug-induced liver injury / N. P. Chalasani, P. H. Hayashi, H. L. Bonkovsky et al. *Am Journal Gastroenterol.* 2014. Т. 109, № 7. Р. 950–966.

15. Drug-induced liver injurywith autoimmune features / A. S. Delemos, D. M. Foureau, C. Jacobs et al. *Semin Liver Dis*. 2014. Т. 34, № 2. Р. 194–204.

16. Ortega-Alonso A., Stephens C., Lucena M. I., Andrade R. J. Case character-ization, clinical features and risk factors in drug-induced liver injury. *Int. Mol. Sci*. 2016. Т. 17, № 5. Р. 712-714.

17. Drug-induced liver injury: interactions between drug properties and host factors / M. Chen, A. Suzuki, J. Borlak et al. *Journal Hepatol.* 2015. Т. 63, № 2. Р. 503–514.

18. Dara L., Liu Z., Kaplowitz N. Mechanisms of adaptation and progression in idiosyncratic drug induced liver injury, clinical implications. *Liver Int.* 2016. Т. 36, № 2. Р. 158–165.

19. Danan G., Teschke R. Rucam in drug and herb induced liver injury: the update. *Int. Journal Mol. Sci*. 2016. Т. 17, № 1. Р. 12-14.

20. Albumin dialysis with a noncell artificial liver support device in patients with acute liver failure: a randomized, controlled trial / F. Saliba, C. Camus, F. Durand et al. *Ann Intern Med.* 2013. Т. 159, № 8. Р. 522–531.

21. Stine J. G., Lewis J. H. Current and future directions in the treatment and prevention of drug-induced liver injury: a systematic review. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2016. Т. 10, № 4. Р. 517–536.

22. Björnsson E. S. Risk of drug-induced liver injury from tumor necrosis factor antagonists. *Clin gastroenterology hepatol.* 2015. Т. 13, № 3. Р. 602–608.

23. Конопацкова О. М., Аверьянова С. В. Применение Ремаксола при полихимиотерапии у больных раком молочной железы. *Онкология. Журнал им. П.А. Герцена.* 2015. Т. 4, № 6. Р. 35–37.

24. The use of SAMe in chemotherapy-indised liver injury. Clinical Reviews in Oncology / B. Vincenzi, A. Russo, A. Terenzio, A. Galvano, D. Santini, F. Vorini et al*. Hematology*. 2018. Т. 130, № 70. Р. 1-7.

25. A multicenter and randomized controlled trial of bicyclol in the treatment of statin-induced liver injury / N. Wu, L. Wang, Z. Han, Y. Guo, C. Zhu, Y. Gao et al. *Med Sci Monit*. 2017. Т. 23. Р. 5760–5766.

26. Liu X., Zhao M., Mi J., Chen H., Sheng L., Li Y. Protective Effect of Bicyclol on Anti-Tuberculosis Drug Induced Liver Injury in Rats. *Molecules*. 2017. Р. 522-524.

27. Shang W., Feng Y., Li J., Wang X., Xie H., Feng G. Effect of bicyclol tablets on drug induced liver injuries after kidney transplantation. *Open Medicine*. 2017. Т. 12. Р. 62–69.

28. Пальгова Л. К., Борисова И. В., Жесткова Н. В., Тарасова М. А. Применение эссенциальных фосфолипидов в лечении лекарственных поражений печени при беременности. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2017. Т. 16, № 2. С. 14–23.

29. Лекарственные поражения почек: уч. пособие / Д. Х.Калимуллина и др. Уфа : Вагант, 2016. 71с.

30. Доценко Э. А., Рождественский Д. А., ЮПАТОВ Г. И. Иммунодефициты и некоторые иммуномодулирующие средства. *Аллергология и иммунология.* 2014. Т. 13, №3. С.103-120.

31. Кисличенко О. А. Фармакогностичне вивчення рослин для розробки лікарських засобів для лікування серцево-судинних захворювань : дис. … д-ра фарм. Наук : 15.00.02, Харків, 2020. 200 с.

32. Шостак Т. А., Калинюк Т. Г., Гудзь Н. І. Особливості фармацевтичної розробки рослинних препаратів (Огляд літератури*). Фітотерапія. Часопис*. 2014. № 4. С. 77-82.

33. Бензель І. Л. Сучасний стан і перспективи використання лікарських рослин в офтальмології. *Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження* : матеріали І міжнар. наук. практ. інтернет-конф. (м. Харків, 5 квітня 2018 р.). Харків, 2018. С. 19-20.

34. Бензель І. Л., Бензель Л. В. Пошук перспективних рослинних джерела танідів флори україни. *Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження* : матеріали І міжнар. наук.практ. інтернет-конф. (м. Харків, 5 квітня 2018 р.).Харків, 2018. С. 20-21.

35. Захарова Т. К., Зубарева Е. В. Возможности использования при составлении травяных сборов количественных показателей содержания танинов в дикорастущих растениях. *Ботанические исследования в Сибири*. 2016. Вып. 24. С. 42-43.

36. Верховодова Ю. В. Вивчення впливу екстрактів шавлії лікарської на діурез у щурів. Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій : тези доповідей всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяченої 80-річчю з дня народження доктора фармацевтичних наук, професора О. М. Гайдукевича (м. Харків, 12-13 квітня 2018 р.). Харків, 2018. С. 31-32.

37. Рослини з протимікробними властивостями / Н. Є. Стадницька, О. З. Комаровська-Порохнявець, Х. Я. Кіщак, О. Б. Миколів, Б. Я. Литвин, Конечна Р.Т., Новіков В.П. *Lviv Polytechnic National University* 2011. С. 111-116.

38. Савоськіна В. О. Оцінка клінічної ефективності застосування топічного препарату природного походження у дерматології. *Дерматологія та венерологія*. 2019. № 2 (84). С. 22-26.

39. Кляченко О. Л., Янсе Л. А., Ліханов А. Ф. Екстракція біологічно активних речовин із решток перикарпіїв буряків цукрових (Beta Vulgaris L. ssp. Vulgaris). *Фактори експериментальної еволюції організмів.* 2019. Т. 25. С. 243-246.

40. Гладских Л. В. Новые подходы биомедицины к коррекции адаптационных механизмов оздоровления и омоложения. *Пластическая хирургия и косметология*. 2011. № 2. С. 321-325.

41 Китаєва А. П., Хамід К. О., Семенова З. Т. Лікувальні властивості меду різних регіонів України. *Вісник аграрної науки Причорномор'я*. 2016. Вип. 2 (89). С. 137-143.

42. Адамчук Л. О. Акульонок О. І., Бріндза Я. Застосування меду в оздоровчому харчуванні. *Безпека продуктів харчування та технологія переробки продовольчої сировини*. 2017. Вип. 2 (96). С. 268-276.

43.  Aminov R. F., Frolov A. K. Influence of ectoparasite - Hirudo verbana on morphogenetic reactions of the host organism – rattus. *Current trends in immunology*. 2017. *18*. Р. 107-117.

44. Aminov R. F., Frolov A. K. The impact of fetal load of Hirudo verbana saline extract antigens morphometrical, hematological and immunological parameters of rats in the early stages of postembryonic development. *Annals of parasitology.*2018. Т. *64*, № 1. Р.13-20.

45. Амінов Р. Ф., Фролов О. К. Фагоцитарна та метаболічна активність нейтрофілів щурів на ранніх етапах постембріонального розвитку за впливу біологічно активних речовин сольового екстракту *Hirudo verbana. Regulatory Mechanisms in Biosystems.* 2016. № *7*. С. 96-100.

46. Амінов Р. Ф., Фролов О. К. Проліферативна активність клітин кісткового мозку щурів за впливу біологічно активних речовин медичної п’явки. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2017. Т. *8*, № 4. Р. 501-505.

47. Амінов Р. Ф., Фролов О. К., Федотов Є. Р. Реакція бластної трансформації лімфоцитів крові нелінійних самиць щурів, їх приплоду на ранніх етапах постембріонального розвитку на фоні впливу сольового екстракту Hirudo verbana. *Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки*. 2018. № *1*. С. 46-52.

48. Амінов Р. Ф. Гемопоетична активність кісткового мозку щура на фоні впливу сольового екстракту Hirudo verbana Carena, 1820. *Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія «Біологія».* 2018. № *30*. с. 87-94.

49. Кощаев А. Г. Биотехнология вермикультивирования органических отходов. *Научный журнал КубГАУ*. 2014. №95(01). С. 1-30.

50. Колесник Н. Л., Симон М. Ю., Маренков О. М., Шарамок Т. С. Червоний  каліфорнійський  черв'як  (Eisenia  foetida  andrei)цінний  кормовий  об'єкт  у  рибництві  (Огляд). Рибогосподарська наука україни. 2018. № 4. С. 256-248.

## 51. Энтеральный препарат, содержащий экстракт биомассы красного калифорнийского дождевого червя eisenia foetidae в виде таблеток "вермин": пат. 2177784 Росия: МПК7 А61К9/20.№ 99111405/14; заяв. 01.06.1999; опубл. 10.01.2002.

52. Eisenia Foetida. URL: https://uk.wikipedia.org/wiki/Eisenia\_fetida

# 53. Каліфорнійські хробаки. URL: <http://vermi-ferma.com.ua/krasniy-kaliforniyskiy-cherv-opisanie-vida.php?lang=ua>

# 54 Загальна будова червоного каліфорнійського хробака URL: [https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D1%96%D0%BB%D1%8C%D1%87%D0%B0%D1%81%D1%82%D1%96\_%D1%87%D0%B5%D1%80%D0%B2%D0%B](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D1%96%D0%BB%D1%8C%D1%87%D0%B0%D1%81%D1%82%D1%96_%D1%87%D0%B5%D1%80%D0%B2%D0%25B)

# 55. Біологія. URL: <http://ukr8bio.narod.ru/page76.htm>

# 56. Кровоносна система. URL: <https://disted.edu.vn.ua/courses/learn/1962>

# 57. Червоні черв'яки. Розведення каліфорнійських черв'яків в домашніх умовах. Розведення в промислових масштабах. URL: <https://itree.ru/krasnye-chervi-razvedenie-kaliforniiskih-chervei-v-domashnih-usloviyah/>

# 58. Червятник: кто перерабатывает ваш мусор. URL: <https://ok-wood.com.ua/blog/worms-farm.html>

59. Розведення хробаків – започатковуємо вермиферму URL: <https://homebiznes.in.ua/rozvedennya-hrobakiv-zapochatkovujemo-vermyfermu/>

## 60. [Использование красного калифорнийского червя и биогумуса.](http://kvadro-44.ru/index.php/ru/nasha-produktsiya/dlya-selskogo-khozyajstva/krasnyj-kalifornijskij-cherv/ispolzovanie-krasnogo-kalifornijskogo-chervya-i-biogumusa.html)URL:<http://kvadro-44.ru/index.php/ru/nasha-produktsiya/dlya-selskogo-khozyajstva/krasnyj-kalifornijskij-cherv/ispolzovanie-krasnogo-kalifornijskogo-chervya-i-biogumusa.html>

61. Duran L., Henriquez C. Crecimiento y reproducción de la lombriz roja (Eisenia foetida) en cinco sustratos orgánicos. Universidad de Costa Rica. Limón, Costa Rica. 2009. URL:<http://www.mag.go.cr/rev_agr/v33n02_275>.

62. Ramnarain Y. I., Abdullah A. A., Lydia O. "Vermicomposting of different organic materials using the epigeic earthworm Eisenia foetida." *International journal of recycling of organic waste in agriculture.* 2018. Т. 8, № 1. Р. 23–36.

63. Garg V. K., Yadav Y. K., Sheoran A., Kausik P. Livestock excreta management through vermicomposting using an epigeic earthworm *Eisenia foetida.* *Environmentalist*. 2006. 26(4). Р. 269–276.

64. Kartikaninngsih H., Maharani S., Sartika F. Antibacterial Activity Ethyl Acetate Extracts Of Earthworms (Lumbricus Rubellus, Eisenia Foetida, Nereis Sp) Toward Staphylococcus Aureus, Enterococcus Faecalis, Salmonella Thyposa Invitro. *Jurnal biologi el – Hayah.* 2019. Vol. 7, №. 2. Р. 62-73.

65. Ejaz S.-A. M., Awan U. A., Ali St., Kiyani A., Shafique I., Zafar A. In vitro screening of mucus and solvent extracts of Eisenia foetida against human bacterial and fungal pathogens Pakistan. *Journal of pharms. science*. 2016. Vol. 29, № l(3), P. 969-977.

66. Морфологія клітин крові лабораторних тварин і людини: Атлас. Запорожан В. М., Напханюк В. К., Горянова Н. О. Одеса : Одес. держ. мед. ун-т. 2002, 118 с.

67. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / И. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Захария, Б. В. Западнюк. Киев : «Вища школа», 1983. 383 с.

68. Новосад Н. В. Лабораторні тварини і техніка біологічного експерименту: Навчально-методичний посібник для студентів біологічного факультету денного та заочного відділень. (Напрям підготовки «Біологія»). Запоріжжя : ЗНУ, 2011. 86 с.

69. Влияние биологически активных веществ кольчецов на количественные показатели крови крыс / Р. А. Литвиненко, Ю. М. Сароз, Д. А. Лемешко, А. П. Сергиенко*. Студентські наукові студії. Збірник наукових праць студентів*. Херсон : ХДУ, 2011. С. 122-124.

70. Реакція Фоліна. URL: <https://chem21.info/info/1071568/>

71. Фролов О. К., Копійка В. В., Федотов Є. Р. Великий практикум по імунології «Методологія імунної системи ссавців»: Навчально-методичний посібник. Запоріжжя : Copy Art, 2012. 152 с.

72. Клиническая лабораторная диагностика: Национальное руководство. Т.1 / Под ред. В. В. Долгова. Москва : ГЭОТАР Медиа, 2012. 928 с.

73. Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н. Основные принципы применения статистических методов в клинических испытаниях. Київ : Морион, 2002. 160 с.

74. ДСН 3.3.6.042 99. Санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень: [Чинний від 1999–12–01]. Вид. офіц. Київ : МОЗ України, 1999. 10с.

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

76. СНІп 2.04.05–91. Опалення, вентиляція і кондиціонування :[Чинний від 1996–06–27]. Вид. офіц. Київ : Киев ЗНІІП, 1996. – 89 с.

77. ДСТУ 12.1.005–88. Загальні санітарно–гігієнічні вимоги до повітря робочої зони: [Чинний від 1989–01–01]. Затв. МЗ СРСР у 1988 р. 70 с.

78. Трахтенберг І. М., Коршун М. М., Чебанова О. В. Гігієна праці та виробнича санітарія. Київ : Вища школа, 1997. 462 с.

79. Савчук О. М. Основи охорони праці: конспект лекцій в 2–х ч. Запоріжжя : Просвіта, 2000. 124с.

80. Гандзюк М. П., Желібо Е. П. Основи охорони праці. Київ : Каравела, 2003. 405 с.

81. Правила охорони праці в лабораторіях: ДНАОП 2.1.20-1.03-99. [Чинний від 1999-04-20]. Київ : Держнагляд охорони праці України 1999. 80 с.

82. ДБН В.2.5–28–2006. Природне і штучне освітлення: [Чинний від 2006–10–01]. Вид. офіц. Київ : МінБуд України, 2006. 128 с.

83. Про затвердження нормативно-правових актів щодо захисту від зараження ВІЛ–інфекцію при виконанні професійних обов’язків:наказ № 995 МОЗ України від 05.11.13. Київ : МОЗ України, 2013. 9 с.

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

85. ДНАОП 2.2.30-80. Надання першої допомоги при електроураженнях: [Чинний від 1980–04–10]. Затверджено наказом від 1980. 12 с.

86. ДНАОП 0.00–1.21–98. Правила безпеки експлуатації електроустановок споживачів: [Чинний від 1998–01–09]. ]. Вид. офіц. Київ : Міністерство юстиції України, 1998. 394 с.

87. Лунячек В. Є., Давиденко Ю. С. Охорона праці і пожежна безпека в закладах освіти. Київ : Наукова думка, 2000. 123 с.