

**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: ФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ НЕЙТРОФІЛЬНИХ
ГРАНУЛОЦИТІВ ЛАБОРАТОРНИХ ЩУРІВ ПРИ ГІРУДОЛОГІЧНОМУ
ВПЛИВІ**

Виконала: студентка 2 курсу, групи 8.0911-б-з

спеціальності 091 Біологія

освітньої програми Біологія

Федорченко В. О.

(прізвище та ініціали)

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

Рецензент доцент, к.б.н. Малько М.М.

Запоріжжя – 2022

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет біологічний

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

Рівень вищої освіти магістр

Спеціальність 091 Біологія

Освітня програма Біологія

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

О.Г. Куц

“ ”

20__ року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТЦІ

Федорченко Владиславі Олександрівні

1 Тема роботи: Функціональні властивості нейтрофільних гранулоцитів лабораторних щурів при гірудологічному впливі

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

затверджені наказом ЗНУ від « 12 » липня 2022 № 835-с

2 Строк подання студентом роботи грудень 2022 року

3 Вихідні дані до роботи: наукові статті, монографії, довідкова література за темою роботи.

4 Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити): 1. Визначити загальну кількість лейкоцитів та лейкоцитарну формулу крові у нелінійних лабораторних щурів старого віку до та після гірудовпливу. 2. Визначити індекс співвідношення сегментоядерних та паличкоядерних нейтрофілів у нелінійних лабораторних щурів старого віку до та після гірудовпливу. 3. Проаналізувати фагоцитарну активність нейтрофільних гранулоцитів нелінійних лабораторних щурів старого віку до та після гірудовпливу. 4. Визначити морфологічні особливості нейтрофілів крові нелінійних лабораторних щурів старого віку до та після гірудовпливу.

5 Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень): 4 таблиці : 3.1. Загальна кількість лейкоцитів та лейкоцитарна формула крові нелінійних лабораторних щурів при гірудовпливі, 3.2. Індекс співвідношення сегментоядерних та паличкоядерних нейтрофілів крові нелінійних лабораторних щурів старого віку при гірудовпливі, 3.3. Фагоцитарна активність нейтрофілів периферичної крові нелінійних лабораторних щурів старого віку при гірудовпливі, 3.4. Морфометричні показники нейтрофілів крові нелінійних лабораторних щурів старого віку при гірудовпливі.

6 Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
4	Гороховський Є.Ю., доцент, к.б.н.		

7 Дата видачі завдання _____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

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

Студент

(підпис)

Федорченко В.О.

(прізвище та ініціали)

Керівник роботи

(підпис)

Литвиненко Р.О.

(прізвище та ініціали)

Нормоконтроль пройдено

Нормоконтролер

(підпис)

Гороховський Є.Ю.

(прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Дана робота розміщена на 59 сторінках друкованого тексту, містить 6 таблиць, 1 рисунок. Список літератури включає 51 джерело, у тому числі 4 із них латиницею та 15 за останні 5 років.

Об'єктом дослідження була периферична кров нелінійних лабораторних щурів старого віку під впливом біологічно активних речовин (БАР) слини медичної п'явки (МП).

Мета роботи: проаналізувати особливості функціональних властивостей нейтрофільних гранулоцитів нелінійних лабораторних щурів старого віку при гірудологічному впливі.

Методи дослідження: імунологічні (визначення загальної кількості лейкоцитів, лейкоцитарної формули крові, фагоцитарної активності та розмірів нейтрофілів), статистичні (t-критерій Ст'юдента).

У результаті дослідження встановлено, що гірудовплив впливає на показники лейкоцитарної формули крові, а саме відбувається збільшення відносного вмісту лімфоцитів та моноцитів, підвищуються показники фагоцитарної активності нейтрофілів (фагоцитарний показник, фагоцитарне число), зменшується діаметр нейтрофілів та індекс співвідношення сегменто- та паличкоядерних нейтрофілів. Ці показники свідчать про імуотропний вплив БАР слини МП на організм, зменшення впливу хвороботворних факторів та покращення імунного стану організму.

Новизна роботи: доповнено наукові дані щодо впливу БАР МП на функціональні властивості нейтрофільних гранулоцитів крові лабораторних щурів старого віку.

Практичне значення роботи. На основі отриманих даних можуть оптимізувати методики лікування з урахуванням особливостей гірудовпливу на імунологічні властивості лейкоцитів крові.

**ГІРУДОВПЛИВ, НЕЙТРОФІЛИ, ФАГОЦИТАРНА АКТИВНІСТЬ,
МЕДИЧНА П'ЯВКА, БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ РЕЧОВИНИ**

ABSTRACT

This work is placed on 59 pages of printed text, contains 6 tables, 1 figure. The bibliography includes 51 sources, including 4 of them in Latin and 15 from the last 5 years.

The object of the study was the peripheral blood of non-linear laboratory rats of old age under the influence of biologically active substances (BAS) of medical leech (ML) saliva.

The purpose of the work: to analyze the features of the functional properties of neutrophilic granulocytes of nonlinear laboratory rats of old age under hirudological influence.

Research methods: immunological (determination of the total number of leukocytes, leukocyte blood formula, phagocytic activity and size of neutrophils), statistical (Student's t-test).

As a result of the study, it was established that hirudoinfluence affects the indicators of the blood leukocyte formula, namely, the relative content of lymphocytes and monocytes increases, the indicators of the phagocytic activity of neutrophils increase (phagocytic index, phagocytic number), the diameter of neutrophils and the index of the ratio of segmented and rod neutrophils decrease. These indicators testify to the immunotropic effect of the BAS of ML saliva on the body, the reduction of the influence of disease-causing factors and the improvement of the immune state of the body.

The novelty of the work: added scientific data on the influence of BAS of the saliva of a ML on the functional properties of neutrophil granulocytes of the blood of old laboratory rats.

Practical meaning of work. On the basis of the obtained data, treatment methods can be optimized, taking into account the specifics of the hirudoinfluence on the immunological properties of blood leukocytes.

HIRODOINFLUENCE, NEUTROPHILS, PHAGOCYtic ACTIVITY,
MEDICAL LEECH, BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ	8
ВСТУП	9
1 ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ	12
1.1 Біологічно активні речовини медичної п'явки та їх ефекти	12
1.2 Симбіонтна мікрофлора медичної п'явки та її значення	20
1.3 Особливості застосування гірудотерапії в медицині	22
1.4 Особливості застосування гірудотерапії в ветеринарній практиці	29
1.5 Вплив біологічно активних речовин медичної п'явки на показники імунної системи людини та тварин в умовах <i>in vivo</i> та <i>in vitro</i>	31
2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	34
2.1 Матеріали та об'єкти досліджень	34
2.2 Методи досліджень	35
2.2.1 Визначення загальної кількості лейкоцитів.....	35
2.2.2 Визначення лейкоцитарної формули крові	36
2.2.3 Цитоморфометричні дослідження нейтрофілів у мазку крові	37
2.2.4 Визначення індексу співвідношення сегментоядерних та паличкоядерних нейтрофілів	38
2.2.5 Визначення фагоцитарної активності нейтрофілів	39
2.2.6 Статистичні методи дослідження	40
3 ЕСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	41
3.1 Лейкоцитарні показники периферичної крові нелінійних лабораторних щурів старого віку при гірудовпливі	41
3.2 Індекс співвідношення сегментоядерних та паличкоядерних нейтрофілів периферичної крові нелінійних лабораторних щурів старого віку при гірудовпливі	43

3.3 Фагоцитарна активність нейтрофілів периферичної крові нелінійних лабораторних щурів старого віку при гірудовпливі	44
3.4 Морфофункціональні показники нейтрофілів периферичної крові нелінійних лабораторних щурів старого віку при гірудовпливі	45
4 ОХОРОНА ПРАЦІ	47
ВИСНОВКИ	52
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	53
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ	54

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ

ГТ — гірудотерапія

ГВ — гірудовплив

БАР — біологічно активні речовини

МП — медична п'явка

ФК — фагоцитарний показник

ФЧ — фагоцитарне число

ФЄК — фагоцитарна ємність крові

КАФ — кількість активних фагоцитів

ЦНС — центральна нервова система

CD — кластер диференціювання — певна структура мембрани лімфоцита, що типується моноклональними антитілами

ВСТУП

Гірудотерапія (ГТ, лікування п'явками) бере свій початок ще з давніх давен. Укус п'явки дає позитивний ефект, це і помітили давні люди. Перші пам'ятки про користь п'явки зустрічаються в різних стародавніх текстах: давньоіндійських, перських, давньоєврейських тощо. Впродовж багатьох тисячоліть, одним із найпопулярніших способів лікування низки хвороб було кровопускання, то одним із напрямів медицини тих часів вважали ГТ.

В слині медичної п'явки (МП) міститься більше 100 біологічно активних речовин (БАР), які мають терапевтичне значення, включаючи антикоагулянт (гірудин), що виконують судинорозширювальну, тромболітичну, протизапальну, протинабрякову, анестезуючу та болезаспокійливу дію, пригнічують адгезію та агрегацію, відновлюють пошкоджену судинну проникність тканин і органів, усувають гіпоксію, позбавляють тварин від інфарктів та інсультів, детоксикують організм антиоксидантними шляхами, деградацію позаклітинного матриксу та антимікробний ефект [1]. В наші часи досліджено, що в місці де присмокталась п'явка, мікросудини мають здатність розширюватися, а в інших областях, які знаходяться віддалено, судини звужуються, таким чином, цей процес забезпечує відтік крові з внутрішніх органів людини [2]. Таким чином, механізми які впливають (гуморальні, рефлекторні, судинні), морфо- та біохімічні зміни у крові призводять до того, що відбувається процес, який забезпечує відновлення фізіологічної сукупності пристосувальних реакцій організму, яка була порушена до усунення або максимального звуження дії на нього різноманітних патогенних факторів зовнішнього або внутрішнього середовища.

Лікування п'явками дає позитивні результати. Внаслідок ГТ відбувається відновлення сталості внутрішнього середовища організму (гомеостазу), наприклад: стабілізується температура тіла, артеріальний тиск, вміст глюкози у крові тощо.

Важливий механізм, який виконує ГТ є її рефлекторний вплив на організм, місцевий та загальний [2]. За даними наукових досліджень доведено, що здатність поглинати мікроби (фагоцитарна активність) нейтрофілів при лікуванні п'явками підвищується в 2-3 рази [2,3]. В організмі самої ж п'явки спостерігаються подібні механізми. Процес очищення крові, яка була висмоктана від мікроорганізмів, проходить не тільки завдяки фагоцитозу в кишковому каналі п'явки, а й за допомогою такої ж дії бактерії- симбіота, який мешкає в п'явці. «Ризик генералізації інфекційного процесу, як зазначає В. Савінов, — якоюсь мірою компенсується активацією фагоцитозу, бактеріостатичними властивостями секрету слинних залоз п'явки, а також імуноактивними речовинами, що містяться в останньому. І все ж гірудотерапевт повинен бути впевнений у компетентності імунної системи у кожного конкретного пацієнта. Тільки в цьому випадку гірудотерапія не призведе до ускладнень» [4].

Актуальність дослідження зумовлена інтересом до вивчення слини МП та пов'язана з позитивним впливом гірудотерапії на стан імунної системи. Функціонування нейтрофільних гранулоцитів у периферичній крові, є одним із маркерів імунної системи організму.

Мета роботи: проаналізувати особливості функціональних властивостей нейтрофільних гранулоцитів нелінійних лабораторних щурів старого віку при гірудологічному впливі.

Заради досягнення запланованої мети було сформовано такий перелік завдань:

- 1) визначити загальну кількість лейкоцитів та лейкоцитарну формулу крові у нелінійних лабораторних щурів старого віку до та після гірудологічного впливу;
- 2) визначити індекс співвідношення сегментоядерних та паличкоядерних нейтрофілів у нелінійних лабораторних щурів старого віку до та після гірудологічного впливу;

3) проаналізувати фагоцитарну (поглинальну) активність нейтрофільних гранулоцитів (фагоцитарне число, фагоцитарний показник) нелінійних лабораторних щурів старого віку до та після гірудологічного впливу;

4) визначити морфологічні особливості (розмірні характеристики) нейтрофільних гранулоцитів нелінійних лабораторних щурів старого віку до та після гірудологічного впливу.

Об'єктом дослідження була периферична кров нелінійних лабораторних щурів старого віку під впливом БАР слини МП.

Предмет дослідження – лейкоцитарні показники, зокрема нейтрофільних гранулоцитів, крові нелінійних лабораторних щурів старого віку під впливом БАР слини МП.

Методи дослідження: імунологічні (визначення загальної кількості лейкоцитів, лейкоцитарної формули крові, фагоцитарної активності та розмірів нейтрофілів), статистичні (t-критерій Ст'юдента).

Новизна роботи: доповнено наукові дані щодо впливу біологічно активних речовин слини медичної п'явки на функціональні властивості нейтрофільних гранулоцитів крові лабораторних щурів старого віку.

Практичне значення роботи. На основі отриманих даних можуть оптимізувати методики лікування з урахуванням особливостей гірудовпливу на імунологічні властивості лейкоцитів крові. Результати можуть бути впроваджені при викладанні окремих тем навчальних дисциплін.

Робота розміщена на 59 сторінках, містить 1 рисунок, 6 таблиць.

1 ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Біологічно активні речовини медичної п'явки та їх ефекти

На сьогодні серед усього біорозмаїття виду розрізняють три форми медичної п'явки (МП): аптекарська (*Hirudo verbana* Carena, 1820), лікувальна (*H. medicinalis* Linnaeus, 1758) та східна (*H. orientalis* S. Utevsky et Trontelj, 2005) [5, 6]. Найпоширенішою медичною п'явкою в Україні є *H. verbana*, хоча медичні постачальники часто неправильно позначають її як *H. medicinalis*. Ця плутанина виникає внаслідок нещодавнього уточнення таксономії *Hirudo* та проблеми диференціації видів виключно на основі моделей пігментації. Види *Hirudo* поширені в Африці, Азії та Європі: *H. orientalis* (Закавказзя та Іран), *H. nipponia* (Східна Азія), *H. troctina* (Північна Африка), *H. verbana* (Південно-Східна Європа та Туреччина) та *H. medicinalis* (континентальна Європа та Великобританія).

Для того, щоб провести ідентифікацію певного виду, рекомендується провести штрих-кодування ДНК за допомогою гена субдиниці 1 цитохром С-оксидази. Невідомим є те, чи залежить результат терапії, від того, який вид п'явки використовувався, адже відрізнити види п'явок можна за складом кишкової мікрофлори (Graf, 1999; Siddall et al., 2007; Laufer et al., 2008; Whitaker et al., 2014) та за білком слини, який вона виділяє (Baskova et al., 2008; Siddall et al., 2011) [7].

Після пошкодження шкірних покривів залишається характерна трипроменева ранка. Між зубчиками відкриваються протоки численних слинних залоз, секрет яких виливається в ранку і, перешкоджаючи згортанню крові, забезпечує харчування тварини до насичення.

Цікаво, що у п'явки виявлено кілька CD-маркерів, які схожі на маркери ссавців, наприклад, HmCD45 (на 55% ідентичний до людського CD45) і HmCD20, HmCD19, HmCD61 (на 32%, 31% і 31%, відповідно, ідентичні до мишиних CD20, CD19 і CD61). Eguileor та ін., використовуючи людські МКАТ

для виявлення різних типів гемоцитів п'явки встановили, що макрофагоподібні клітини позитивні до CD25, CD14, CD61, CD68, CD11b і CD11c, НК-клітини — до CD25, CD56, CD57 і CD16, а гранулоцити — до CD11b і CD11c [8].

За дослідженнями К. В. Рассадіної [9] встановлено, що до складу важливих метаболітів, які виділяє слина МП у навколишнє середовище входять речовини з високою біологічною активністю, зокрема: білки сироватки крові - альбуміни і глобуліни, гірудин, ферменти: гіалуронідаза, тригліцеридаза, коалугеназа, еластаза, апіраза [8]. До метаболітів МП також входять 19 амінокислот (у найбільших концентраціях: триптофан, глютамінова кислота, аланін, лізин, лейцин), біогенні елементи — калій, натрій, фосфор і мікроелементи (селен, йод, бром, сірка).

Слина п'явки містить біологічно активні сполуки, в основному білки та пептиди. Серед білків і пептидів, які входять до складу екстракту слини п'явки, виділені манілаза, буфіриди, гелін, та гірулін P18, калін, лефаксин, гіалуронідаз, НМW bdilline групи В-3 [8, 10, 11].

Серед БАР, якіє в слині п'явки, виділяють: гірудин, гіалуронідазу, калін, дестабілазу, апіразу, еглїни (інгібітори еластази, катепсину G), бделліни, декорсин (антагоніст глікопротеїну, інгібітор агрегації тромбоцитів), гірустатин, пігуамерін (інгібітор), калікреїну плазми, антагоніст активації тромбоцитів (антитромбічний ефект), інгібітори триптази, хлороміцетин (антибіотик), гістаміноподібні речовини, інгібітори комплекменту, інгібітори карбоксипептидази А та ацетилхолін. Найбільш вивчені компоненти секрету слинних залоз: гірудин, гістаміноподібна речовина, простацикліни, простагландини, гіалуронідаза, ліпаза, апіраза, колагеназа, калін і саратин; субтилїзин, еластаза та катипсин G, нейротрофічні фактори та інгібітор калікреїну плазми крові.

Хімаза є хемотаксичним фактором для нейтрофілів, еозинофілів та інших клітин, що беруть участь у розвитку запальних процесів [12]. Одним з цитокінів, що продукуються клітинами, є фактор некрозу пухлини. Припускають, що він може бути основним фактором, який регулює продукцію інтерлейкіну-6 в

інфільтруючих лейкоцитах та ініціює каскад цитокінів, відповідальних за індукцію молекул міжклітинної адгезії-1 та подальші нейтрофіл-опосередковані ушкодження [13].

Тканино-ушкоджуюча здатність нейтрофілів обумовлена наявністю систем, що генерують супероксид-аніон, та гідролітичних ферментів, що знаходяться в цитоплазматичних гранулах. Серед найбільш деструктивних протеїназ нейтрофілів виділяють еластазу - серинову протеїназу, яка здатна розщеплювати протеогликани, фібронектин, колагени, фібриноген/фібрин, фактори зсідання крові, білки системи комплементу, імуноглобуліни. У кишковому каналі МП міститься бактерія-симбіонт *Aeromonas hydrophila*, яка забезпечує бактеріостатичний ефект [14]. Загальний склад слини п'явки представлений у таблиці 1.1.

БАР, що продукуються п'явками, забезпечують широкий спектр впливу на організм місцевого та загального характеру [2, 15]:

1) Антитромбічна дія. Блокує тромбоцитарно-судинну та плазмову ланки внутрішнього механізму згортання крові, а також плазмову ланку гемостатичного процесу на пізніших стадіях його розвитку та перешкоджає, таким чином, тромбоутворенню.

2) Тромболітична дія. Зумовлена діяльністю дестабілізації-М, що сприяє лізису тромбів. Механізм розчинення тромбів такий, що БАР впливають тільки на фібринові згустки, що сформувалися, в яких полімери фібрину «прошиті» ізопептидними зв'язками.

3) Репаративний вплив на пошкоджену стінку кровоносної судини. Пов'язаний з придушенням синтезу клітинами ендотелію прокоагулянтів та протизапальних речовин, поділу та проліферації гладком'язових клітин інтими. Секрет слинних залоз сприяє нормалізації діяльності судинного ендотелію та синтезу речовин з антикоагулянтними, протизапальними властивостями, вазодилататорами.

4) Антиатерогенна дія. БАР активно впливають на процеси обміну ліпідів, що призводить до нормальних умов функціонування; знижують рівень холестерину, забезпечують регрес атероматозних бляшок.

Таблиця 1.1 - Склад слини п'явки [14]

Біологічно активна речовина	Біологічний ефект
Гірудин	пригнічує згортання крові шляхом зв'язування з тромбіном
Калін / саратин	пригнічує згортання крові, але блокує зв'язування колагену, що призводить до опосередкованої агрегації тромбоцитів
Дестабілаза	має глікозидазну активність і мономериуючу активність, розчиняє жири, а також має антимікробну дію
Гірустатин (серинпротеїназа)	пригнічує калікреїн, трипсин, хімотрипсин і катепсин G, а також прискорює гіперфузію запобігає повторній оклюзії
Гіалуронідаза	зменшує в'язкість і робить тканини більш легко проникними для ін'єкційних рідин, антибіотиків
Інгібітор триптази	пригнічує протеолітичні ферменти
Хімаза	пригнічує активність протеолітичного ферменту, продукує субстилізін, еластазу, катепсин
Інгібітор фактора X	пригнічує активність фактора згортання крові Ха шляхом утворення еквімолярних комплексів
Карбоксипептидаза А	збільшує приплив крові до місця укусу
Гістамін	судинорозширювальний ефект

5) Гіпотензивна дія. Секрет слинних залоз МП сприяє нормалізації функції ендотелію судин, що призводить до зниження рівня ендотеліну-1 та зменшення загального периферичного опору судин.

6) Антигіпоксична дія. Обумовлена низькомолекулярними фракціями секрету слинних залоз.

7) Нейротрофічна дія.

8) Анальгетична дія. Знеболення як у місці постановки МП, так і центральної дії.

9) Антиатеросклеротична дія.

10) Психокорегуюча дія.

11) Імуномодуюча дія. Активація захисних функцій організму на рівні макрофагальної ланки, системи комплементу та інших рівнях імунної системи людини та тварин.

12) Бактерицидний, противірусний ефект тощо [15].

П'явки використовують три основні стратегії для пригнічення гемостазу:

1) пригнічення зшитих тромбоцитів шляхом запобігання адгезії тромбоцитів до колагену; 2) пригнічення адгезії тромбоцитів до фібриногену; 3) пригнічення тромбіну. Серед інгібіторів тромбіну п'явки антистазин діє на фактор Ха (фактор згортання крові), антагоніст протромбіну. Антистазин є інгібітором серинових протеаз і утворений двома тандемно повторюваними доменами, кожен з яких включає десять залишків цистеїну. Ці домени також містяться в інших антикоагулянтах п'явок, які належать до родини антистазиноподібних білків, таких як гілантен, теростазин, теромін, бделластазин, гуамерин, пігуамерин, гірустазин, поецистазин і гігастазин. І гілантен, і теростазин також націлені на фактор Ха, тоді як теромін націлений на тромбін; вважається, що пігуамерин, гуамерин, бделластазин, гірустазин діють на плазмін, трипсин і лейкоцитарну еластазу, хоча їхня роль у пригніченні гемостазу недостатньо вивчена.

Варто окремо виділити нормалізуючий вплив лікування п'явками на ланцюг реакцій системи згортання крові. Біологічний зміст каскаду

ферментативних реакцій у тому, що події розвиваються із самоприскоренням, тобто кожна наступна стадія значно коротша за попередню.

Таким чином, у каскадній реакції досягається значне посилення первинного сигналу. При порушенні цілісності кровоносних судин відбувається активація внутрішнього механізму згортання крові, при більш вираженому пошкодженні судинної стінки — активація зовнішнього механізму згортання крові за допомогою викиду тканинного тромбoplastину. На негативно зарядженій поверхні колагену, субендотелію, а також на поверхні активованих тромбоцитів відбувається активація білків згортання крові, і в насамперед фХП та прекаллікреїну.

Завершальним етапом тромбоутворення є утворення тромбіну з подальшим перетворенням фібриногену в фібрин [16]. Здатність секрету слинних залоз МП інгібувати судинно-тромбоцитарний гемостаз необхідна для отримання п'явкою крові, що представляє єдине джерело її харчування. Ця ж здатність секрету необхідна для підтримки рідкого стану крові в кишковому каналі п'явки, що є умовою для її подальшого ефективного перетравлення екзота ендопептидазами. Дія ферменту дестабілізази спрямована на розчинення згустків стабілізованого фібрину у випадку, якщо вони утворилися в кишковому каналі.

Гіпотензивна дія ГТ обумовлена не стільки механічним розвантаженням кровотоку в процесі крововилучення, скільки дією низькомолекулярних БАР, що продукуються МП.

Кровопускання, яке здійснюють п'явки, сприяє зменшенню локальних запальних набряків, венозного застою, покращення мікроциркуляції. Крім того компоненти секрету слинних залоз мають протизапальну, бактерицидну, протибольову дію [15, 17]. Перераховані вище терапевтичні ефекти, визначають широке застосування ГТ у стоматологічній практиці (при періодонтитах, захворюваннях тканин пародонту, слизової оболонки порожнини рота, абсцесах і флегмонах щелепно-лицьової області та багатьох інших захворюваннях).

Інгібітори протеаз, які присутні у секреті п'явок та у вмісті її кишкового каналу, обмежують дію протеаз судинної стінки, уповільнюючи перетравлення насмоктаної крові. Ліполітична активність секрету п'явок необхідна для метаболізму ліпідів крові [17]. Ці ж властивості секрету забезпечують лікувальний ефект МП при ГТ. Наявність здатності блокувати трипсин і хімотрипсин забезпечує фізіологічно активні компоненти з МП від розщеплення у шлунково-кишковому тракті експериментальних тварин при пероральному введенні [17].

Еволюційно сформований тип харчування МП визначає і специфіку впливу її слини на систему згортання крові [18]. Стратегія цього процесу фізіологічно виправдана. БАР слини п'явки блокують внутрішній механізм згортання крові на ранній стадії його активації. Секрет п'явок блокує активність калікреїну та фактора XII згортання крові. Фактор Ха є ферментом, який виконує функцію каталізатора та перетворює протромбін у тромбін за допомогою іонів Ca^{2+} [8].

БАР, які виділяє МП, мають низку властивостей, а саме володіють протизапальною та знеболювальною дією, знижують артеріальний тиск, знімають спазм, тощо.

Тіло МП вкрите щільною кутикулою та має на спині жовто-гарячі смужки [19]. Шлунково-кишковий тракт МПпредставлений трьома основними відділами: глотка, шлункова кишка та кишківник. Кожен із відділів виконує певні функції. Глотка відіграє роль м'язової області, вона розташована за щелепами та прилягає до слинних залоз.Шлункова кишка є найбільшим відділом шлунково-кишкового тракту. Тут міститься непереварена їжа з якої у результаті виділяються осмоліти та вода. Пари сечових міхурів фланкують кожен сліпу кишку в шлунковій кишці, сприяють видаленню води та самі колонізовані окремою мікробною спільнотою. Травлення відбувається у кишечнику на протязі двох-трьох тижнів.Її шлунково-кишковий тракт пристосований для поглинання великої кількості крові, який перевищує її власну вагу у 3-7 разів [9]. Завдяки своїй анатомії, п'явка може перебиватися у годуванні до 6 місяців.

У процесі харчування п'явки виділяють в рану різні біологічно та фармакологічно активні речовини. Окремі компоненти слини виробляються в розкиданих клітинах слинних залоз, які не зливаються, щоб утворити правильну залозу. Тіла клітин розташовані в області глотки. Вивідні протоки клітин залози розподіляються по зубних валиках щелеп і виходять між кожним із кальцифікованих зубів.

Тіло п'явки складається з 33 сегментів, перші 4 з яких – утворюють передню присоску, та містять на кожному по 60 зубців [19]. П'явки мають два типи присосок; це передні та задні присоски. Задня присоска використовується для пересування та прикріплення, тоді як передня присоска використовується для смоктання крові і містить три або дві щелепи, гострі зуби, які роблять Y і V розріз відповідно на шкірі господаря. Плаває вертикальними хвилеподібними рухами у воді та поза нею, повзає або рухається за допомогою своїх задніх присосок. Рот п'явки поміщається в передню нішу або присоску і представлений трьома щелепами. П'явки мають близько 30 зубів на щелепах, кожна щелепа містить близько 10 зубів. П'явки довго живуть у середовищі з високою вологістю і можуть бути під впливом змін температури. Доросла п'явка може прожити приблизно 18-27 років у придатних умовах. П'явки можуть виживати в діапазоні температур від 0 до 30°C.

Завдяки секретії сполук, які виконують функцію антикоагулянтів, у п'явок є здатність до згортання крові, що дуже необхідно для подальшого харчування. Антикоагулянти це особливі білки, які мають здатність пригнічувати процес гемостазу, завдяки взаємодії з різними компонентами.

Вченими доведено користь від застосування ГТ у медицині та ветеринарній медицині. У слині п'явок крім грудину містяться також такі інгібітори, як трипсин, плазмін та хімоцин, інгібітор фактору Ха згортання крові, високо специфічні ферменти: гіалуронідаза, дестабілізаза, апіраза, колагеназа, та багато інших сполук [8, 10, 11].

Первинна структура грудину містить 65 залишків амінокислот, які мають високу частку глютамінової та аспаргінової кислоти [19]. Функція гірудину

полягає у тому, що він пригнічує згортання крові, за допомогою вибіркового зв'язування з тромбіном.

1.2 Симбіонтна мікрофлора медичної п'явки та її значення

Наскільки відомо, в перших мікробіологічних дослідженнях із шлунка п'явки було виділено лише один вид бактерій. Цей бактеріальний симбіонт був названий *Bacterium hirudinicum* Lehmsick і Hornborstel у 1941 році. Через десять років К. Бюзінг і його співробітники перейменували його в *Pseudomonas hirudinis*. Наявність лише одного виду бактерій у п'явки різко контрастує з великою різноманітністю бактеріальної флори, яка зустрічається в травному тракті більшості інших тварин. Бактерії, виділені з п'явок, дали позитивний результат тесту на бета-гемоліз і, як було виявлено, виробляли позаклітинні протеази та ліпази. Через чисту культуру цих ферментів, які можуть бути важливими для травлення крові, ці бактерії були класифіковані як симбіонти.

Точна роль симбіотичних бактерій у симбіозі досі не повністю зрозуміла, але було запропоновано три потенційні функції:

1. Бактерії можуть допомогти перетравлювати проковтнуту кров.
2. Бактерії можуть виробляти необхідні поживні речовини для п'явки.
3. Бактерії можуть перешкоджати росту інших бактерій.

Класичним доказом того, що бактерія бере участь у травленні крові або синтезі поживних речовин, є інактивація бактерії антибіотиками. Тести на чутливість до антибіотиків можна використовувати, щоб визначити, чи бере участь бактерія в синтезі такої поживної речовини, як вітамін В12, який присутній у низьких концентраціях у крові. Дві групи дослідників вивчали вплив різних антибіотиків на фізіологію травлення п'явок. Антибіотик хлораміцитин – є дуже сильним антибактеріальним засобом, він виробляється бактерією–

симбіотом *Aeromonas hydrophila*, який знаходиться у МП [20]. Büsing і співавтори, які обробляли МП хлорамфеніколом (1 мг на мл крові), спостерігали зменшення втрати води та виділення азоту після годування. Слід враховувати два фактори:

1. Хлорамфенікол відносно швидко переходить із кишечника в кров (принаймні у людини).

2. Тваринам вводили відносно високі дози препарату.

Отже, неможливо з упевненістю встановити, чи справді антибіотик мав безпосередню дію на п'явок. Зебе та інші спостерігали зниження поглинання кисню та виділення NH_3 у п'явок, які отримували канаміцин. Знову застосовували дуже високі дози препарату (1 мг на мл канаміцину). Однак, на відміну від хлорамфеніколу, канаміцин погано всмоктується в кишечнику, тому, ймовірно, він мав менший вплив на тварин [21]. Загалом, ці відкриття принаймні свідчать про те, що симбіонти впливають на метаболізм і фізіологію МП.

У 1960-х роках симбіонт, відкритий Леменсіком, був перейменований у *Aeromonas hydrophila*. Відтоді таксономія *Aeromonas* зазнала складних змін, і було описано багато нових видів. Ще одна добре відома проблема - неправильна ідентифікація різних *Aeromonas* видів за допомогою комерційних тестових наборів, особливо старих систем. Більшість дослідників, які вивчали бактеріальну флору МПу минулому, використовували лише комерційні тестові набори для ідентифікації симбіонтів, більшість з яких були ідентифіковані як *Aeromonas hydrophila*.

Мікрофлора МП включає в себе *Aeromonas hydrophila* – грамнегативну паличку, бактерію-симбіота, яка постійно живе в кишечнику МП. Також виділяють *Aeromonas veronii*, яка відіграє значну роль у перетравленні білків, жирів та вуглеводів [22]. Бактерії роду *Aeromonas* живуть як у водному середовищі, так і в наземному. Вони вільно можуть жити в прісній та солоній воді [23]. Більшість аеромонад рухомі за рахунок джгутиків та містять у своєму складі ферменти: аргініндегідролазу, желатиназу, тощо. Тому на сьогоднішній день, проводяться дослідження, щодо конструювання поживних середовищ та

виділення аеромонад із об'єктів навколишнього середовища [24]. У теперішній час, доведена роль *Aeromonas hydrophila*, у виникненні харчових інфекцій, не дивлячись на те, що більш детальна їх ідентифікація почала розроблятися лише в останній час [23].

Більшість аеромонад пов'язані із захворюваннями людини. Найбільш патогенними звісно є: *Aeromonas hydrophila* та *Aeromonas veronii biovar sobria*. Точна таксономічна ідентифікація, мабуть, менш важлива в клінічній медицині, оскільки *Aeromonas hydrophila* та *Aeromonas veronii biovar sobria* спричиняють два основних захворювання - це гастроентерит та ранові інфекції, а для цих двох видів п'явок, застосовуються запобіжні заходи [23, 25].

1.3 Особливості застосування гірудотерапії в медицині

Лікування п'явками зародилось багато тисячоліть тому. Гірудотерапія виникла значно раніше гірудології. Існує багато свідчень, в яких сказано про використання ГТ ще у 1568-1308 рр. до н.е. у Єгипті [26]. Згадки про користь п'явок зустрічаються в перських, давньоєврейських та давньоіндійських текстах. Протягом тисячоліть одним із самих відомих способів лікування різних хвороб було кровопускання, тому ГТ вважали одним із напрямів цієї медичної методики.

У давньому Вавилоні, ГТ була дуже популярною, тому свого «лікувального» Бога вони зображували з п'явкою в руках [26]. У давнину ще не були відомі властивості слини п'явки. Давньоримський науковець Пліній Старший, який жив у I ст. н.е., у своїй праці «Натуральна історія» давав рекомендації, щодо використання п'явок з косметичною метою, при лихоманці різного походження та лікування багатьох інших хвороб. Лікарі Римської Імперії, Олександр Тральський (525 – 605 рр. н.е.), Аецій (502- 572 рр н.е.), призначали п'явки для лікування порушень менструального циклу у жінок, при головних болях, укусах тварин, при захворюваннях шкіри, тощо [26, 27].

У 1350 р. Флорентійський принц Марчіані, дав наказ у якому говорилося, що всі жителі повинні прикладати п'явки до тіла. Цим самим він попередив своїх підданих про чуму [26]. У 19 ст. були зроблені перші спроби вивчення терапевтичної дії п'явки та її наукового обґрунтування. Сучасна технологія вирощування п'явок у штучних умовах розроблена в 40–50-х роках минулого століття[28].

На сьогоднішній день встановлено, що п'явка є дуже складним і неспецифічним подразником, щодо організму людини чи тварини. Тому лише наприкінці минулого століття науковці розпочали свою працю над створенням наукового підґрунтя ГТ. Вченими було доведено, що саме завдяки слині, яку виділяє МП у кров, існує та зберігається позитивний ефект ГТ.

В наші часи встановлено, що в місці куди присадили п'явку, мікросудини розширюються, а в інших, віддалених областях, судини звужуються, таким чином, цей процес забезпечує відтік крові з внутрішніх органів людини [2]. При цьому, вплив різних механізмів (гуморальних, рефлекторних, судинних), морфо- та біохімічних змін у крові призводить до того, що відбувається відновлення порушеної фізіологічної сукупності пристосувальних реакцій організму до усунення або максимального обмеження дії на нього різних патогенних факторів зовнішнього або внутрішнього середовища.

Як наслідок, лікування п'явками допомагає відновити сталість внутрішнього середовища (гомеостаз): температуру тіла, концентрацію глюкози чи артеріального тиску [29].

За допомогою ГТ лікують такі хвороби:

- серцево-судинної системи: ішемічна хвороба серця, стенокардія, гіпертонічна хвороба, серцева недостатність;
- периферичної нервової системи: радикуліти, неврити, поліневропатії, невралгії, гангліоневрити;
- опорно-рухового апарату та нервової системи: поліартрити, міозити, наслідки травм хребта, кінцівок, поширений остеохондроз хребта, ускладнений грижеутворенням;

- легень та верхніх дихальних шляхів: хронічний бронхіт, пневмонія, дихальна недостатність;
- шлунково-кишкового тракту: хронічний гастрит, виразкова хвороба шлунка та 12-палої кишки, запори, хронічний холецистит та панкреатит;
- урологічними: хронічний пієлонефрит, простатит, аденома передміхурової залози, імпотенція;
- гінекологічні: гострі та хронічні захворювання матки та придатків, фіброміоми, спайковий процес, хворобливі менструації, безпліддя;
- офтальмологічні: глаукома, запальні захворювання очей, катаракта;
- хвороби кровоносної системи: варикозна хвороба вен нижніх кінцівок, гострий та хронічний тромбофлебіт, геморої, тріщини прямої кишки;
- алергічні: кропив'янка, нейродерміт, бронхіальна астма;
- дерматологічні: інфільтрати, фурункули, карбункули.

Доведено ефективність застосування ГТ у хворих з патологіями ЦНС [30]. Такий ефект можна пояснити наявністю в голівці п'явки нейротрофічних факторів та речовин білкової природи. Укус п'явки є джерелом імпульсів, які передаються до нервової системи. Сегментарна реакція зумовлена нервовими імпульсами, які спричинені подразниками, вони поширюються по аферентним волокнам до спинного мозку, повертаються до соматичних нервів і м'язів, а по вегетативним волокнам йдуть до внутрішніх органів, судин, різних залоз.

Рефлекторною відповіддю організму є сегментарна реакція, яка виражається в стабілізації функціонального стану органів [30, 31].

У експериментальних дослідженнях українського науковця А.Й. Лабінського ефективності лікування дисциркуляторної енцефалопатії II ст. з використанням ГТ у поєднанні з нутриціологічними методами показані позитивні результати (табл. 1.2) змін у тканинах хворих.

Застосування ГТ навіть після 4-5 процедур значно полегшує перебіг хвороби та покращує біохімічний склад крові пацієнта [29, 32].

Також на сьогодні активно досліджені методики лікування проблем з зором, зокрема і глаукоми, за допомогою ГТ [33, 34].

Таблиця 1.2. - Динаміка біохімічних змін у тканинах хворих до і після процедур гірудотерапії [32].

Фракції ліпідів до і після лікування		Кількість	У _{хв}	Р	Т (коефіцієнт Стюдента)	Коефіцієнт кореляції
Полярні ліпіди	до лікування	0,13	0,0016	<0,05	2,85	0,60
	після лікування	0,16	0,0021			
Ефіри холестерину	до лікування	0,20	0,0015	≥0,05	1,37	0,63
	після лікування	0,21	0,0022			
Вільні жирні кислоти	до лікування	0,22	0,0019	≥0,05	-0,85	0,51
	після лікування	0,21	0,0021			
Триацил гліцерини	до лікування	0,21	0,0019	<0,05	-2,97	0,56
	після лікування	0,18	0,0028			
Вільний холестерин	до лікування	0,37	0,0046	<0,05	-2,65	0,76
	після лікування	0,33	0,0038			

Так, вченими доведено на практиці, що протягом усього періоду лікування п'явками відзначалося подовження активованого парціального (часткового) тромбoplastинового часу (АПТЧ/АЧТЧ). АЧТЧ є показником внутрішньої системи активації протромбіну та характеризує утворення протромбінази та тромбіну, залежить від вмісту в плазмі крові II, V, VIII, IX, X, XI, XII факторів згортання та фібриногену, не залежить від кількості тромбоцитів. Норма становить 3042 с.

Скорочення АЧТЧ означає гіперкоагуляцію. У обстежених хворих первинною відкритокутовою глаукомою початкової стадії до лікування воно становило $36,64 \pm 0,68$ с, після лікування $43,37 \pm 2,44$ с ($p < 0,001$) та через 3 місяці після лікування було $38,65 \pm 2,47$ с ($p > 0,05$), що свідчило про наявність у крові підвищеного вмісту інгібіторів факторів згортання. Це пояснюється надходженнями ззовні в результаті ГТ. Подовження АЧТВ склало 18% після ГТ та 5% через 3 місяці. У віддалені терміни спостереження цей показник був близький до вихідного значення. Таким чином, ГТ у хворих на початковій стадії

первинної відкритокутової глаукоми викликає зміни в гемореології, переважно впливаючи на коагуляційну ланку гемостазу, про що свідчать подовження часу згортання крові та АЧТЧ. Поліпшення властивостей згортання крові веде до нормалізації інтраокулярної та церебральної гемодинаміки і, як наслідок, гідродинаміки ока, підвищення функціональної активності сітківки. Крім того, в умовах більш комфортного рівня ВГД збільшується надходження нейротрофічних факторів до гангліозних клітин сітківки, підвищуючи їх стійкість до ішемії. Позитивні результати лікування зору зберігалися протягом шести місяців спостереження, з поступовим поверненням до вихідного стану до закінчення цього терміну [34].

Окрім цього, на сьогодні вивчений та доведений позитивний вплив ГТ на корекцію плеторичного синдрому у хворих істинною поліцитемією (ІП) похилого та старечого віку. Типовою патологією геріатричної гематології є справжня поліцитемія (ІП, еритремія, хвороба Вакеза, поліцитемія червона, істинна). Це хронічне мієлопроліферативне захворювання з ураженням стовбурової клітини, проліферацією трьох паростків кровотворення, підвищеним утворенням еритроцитів та, у меншій мірі, тромбоцитів та еритроцитів. Згідно з даними групи з вивчення ІП (PVSG, США), частота поліцитемії становить 0,38 на 100 хворих. Неминучий розвиток та прогресування ІП у цих хворих пов'язані з плеторичним синдромом, що викликає підвищення в'язкості крові та розвиток тромбофілії. Це є причиною макро- та мікроциркуляторних розладів, венозних та артеріальних тромбозів, тромбоемболії. Ситуація посилюється розвитком патогенетично обумовленої та прогресуючої артеріальної гіпертонії, а пізніше ішемічної хвороби серця. Вчені довели, що використання ГТ дозволяє коригувати плеторичний синдром, покращувати реологію крові, нівелювати тромбофілічний синдром, чинити ангіотропну дію, підвищувати ефективність медикаментозного лікування цих хворих [30].

Для перевірки об'єктивності використання методу ГТ при артеріальній гіпертонії вченими пропонується протягом курсу лікування (3 рази на тиждень впродовж 4-х місяців) проводити клінічне неврологічне обстеження,

нейропсихологічне дослідження для оцінки когнітивного дефекту, проби Шульте, проби на короткочасну слухову та зорову пам'ять, колірний тест Люшера, добове ЕКГ-, АТ моніторування, варіаційна термоалгометрія, клінічний та біохімічний аналізи крові, досліджувати показники коагулограми. При лікуванні п'явками спостерігається ряд позитивних клінічних змін. Так, до лікування у хворих значення МНО, АЧГЧ та рівень плазміногену знаходилися в межах норми, але зазначалося достовірне збільшення на 42% концентрації фібриногену та в 2 рази РКМФ у крові. Після п'яти сеансів ГТ було виявлено зростання на 10% ($p > 0,05$) вмісту фібриногену, на 20,6% РКМФ ($p > 0,05$) та достовірне збільшення рівня плазміногену з $79,1 \pm 5,7\%$ до $101,6 \pm 6,1\%$ ($p < 0,05$). При проходженні стандартного курсу ГТ вміст фібриногену та РКМФ знижується до нормальних значень, а концентрація у плазмі плазміногену стає на 31,3% вище за вихідний рівень ($p < 0,05$). Стан функціональної активності тромбоцитів у процесі постановки МП покращується на 5-7%, спонтанна агрегація тромбоцитів зазвичай підвищена [30].

Вплив ГТ на показники центральної гемодинаміки змінюється залежно від рівня артеріального тиску. У хворих з нормальним артеріальним тиском змін не відбувається зазвичай. У хворих з артеріальною гіпертонією вченими виявлено достовірне зниження середньодобового систолічного АТ та індексу часу систолічного АТ, тенденція до зменшення величини діастолічного артеріального тиску. Гіпотензивний ефект ГТ було підтверджено низкою досліджень.

Доведено, що уразі успішного лікування серцевої недостатності у хворих відзначається поліпшення інотропної здатності та діастолічного розслаблення міокарда. Курсове лікування МП хворих на хронічну серцеву недостатність з нормальним рівнем артеріального тиску призводило до недостовірного зменшення розмірів лівого шлуночка серця в систолу та діастолу та недостовірне зростання фракції виштовхування, що пов'язано зі зменшенням об'єму циркулюючої крові та венозного повернення до серця. Це обумовлено достовірним зниженням величини систолічного АТ у хворих у процесі

лікування, за рахунок чого відбувається зменшення післянавантаження на міокард[30, 31].

Позитивний ефект ГТ на розслаблення міокарда лівого шлуночка у хворих обумовлений антиішемічною дією секрету слинних залоз п'явки, поліпшенням показників внутрішньосерцевої та центральної гемодинаміки.

ГТ може бути використана у складі рекомендованої "стандартної" терапії хворих на ішемічну хворобу серця з II - III функціональним класом хронічної серцевої недостатності, особливо, коли вона ще й супроводжувана артеріальною гіпертонією [29].

На сьогоднішній день фармакологія, досягла значних успіхів, але дуже часто залишається безсилою проти багатьох захворювань. Під впливом цього, стався всплеск інтересу до вивчення ГТ та п'явок, як основних об'єктів цієї методики.

Отож, можна зробити висновки, що слина п'явки містить різні БАР, такі як: гірудин, гіалуронідаза, калін, дестабіліза, апіраза, егліни, бделліни, декорсин, гіростатин, інгібітори триптази та гістаміноподібні речовини, інгібітори комплементу, інгібітори карбоксипептидази А та ацетилхолін. Біохімічний склад, який виділяється зі слини п'явки, різноманітний і має такі ефекти, як антикоагулянтний, судинорозширювальний, тромболітичний, протизапальний, пригнічення тромбоцитів, збільшення кровотоку та регуляторних функцій тромбіну та антимікробні впливи.

Однак при лікуванні методами ГТ слід пам'ятати, що ГТ не є панацеєю від усіх хвороб, вона використовується як супровідний засіб. Необхідно також суворо враховувати протипоказання до застосування МП. До них відносяться захворювання, що супроводжуються кровотечею (гемофілія, тромбоцитопенія та інші), недокрів'я, різке виснаження організму, вагітність, індивідуальна непереносимість п'явок тощо.

1.4 Особливості застосування гірудотерапії в ветеринарній практиці

На сьогоднішній день, широкого застосування ГТ знайшла у ветеринарній практиці, що доводить позитивний вплив ГТ на організм [11]. ГТ віднайшла своє застосування у ветеринарії, як спосіб лікування хвороб собак, кішок, коней, корів, тощо. Найбільш поширеними показаннями до застосування п'явок є дисплазія тазостегнового та ліктьового суглобів, гострий і хронічний артрит, захворювання, пов'язані із запаленням сухожиль, зв'язок і фасцій, захворювання хребців і лікування рубців [21].

Лікування п'явками – безболісна процедура, яка займає в середньому від 30 до 120 хвилин, час залежить від розміру тварини. ГТ успішно використовується у ветеринарії, як метод корекції запальних процесів, порушення мікроциркуляції та інше [21].

У багатьох тварин, наприклад собак, котів, коней, ГТ є показанням для лікування хвороб тканин, які супроводжуються венозним застоєм після операції. Так як у слинних залоз МП міститься комплекс БАР з широким спектром біологічної дії (протинабрякова, бактеріостатична, знеболююча та інші), тому застосування п'явок у ветеринарії зростає.

а. Отримання та зберігання

МП, які використовуються при лікуванні тварин, повинні надходити зі спеціальних п'явкових ферм. Оскільки п'явки з природи можуть бути заражені вірусами та бактеріями, їх суворо забороняється брати.

Для забезпечення якості партії п'явки, які були імпортовані, повинні бути обстежені, пройти вірусологічне та мікробне дослідження крові та води, пройти 32-тижневий карантин.

Відбирають тільки здорових п'явок, вони повинні бути чуйними на дотик, рухливими і гнучкими. П'явки мають бути поставлені за один-два дні до процедури, і мати здоровий вигляд. Зберігання проводять у чистій склянці з водою, яку змінюють декілька разів на тиждень. Годувати п'явку категорично

забороняється. У п'явок дуже мала потреба в кисні, тому не потрібно зважати, якщо склянка в якій вони зберігаються, може закриватися. В 1 л слід зберігати не більше 5-10 МП, оскільки виділення ними продуктів метаболізму може забруднити партію.

б. Процедура

В залежності від рани або захворювання яке , лікують, коні, коти та собаки отримують 1-7 сеансів ГТ. Кількість п'явок, які використовуються під час процедури, залежить від виду тварини, його розмірів і характеристик: маленька тварина, вагою до 10 кг – отримує 1 МП, для лікування корови, використовують від 5 до 15 п'явок[21].

Згідно з багатьма повідомленнями[21] для тварин з хворими копитами природно зайти у воду з п'явками. Завдяки своїм терморецепторам п'явки потрапляють до ділянок організму, які мають високий рівень кровопостачання або запалення. Деякі терапевти використовують таку поведінку у своїй процедурі. Інші терапевти ставлять МП на рану, де вона проколне шкіру своїми щелепами.

Завдяки компонентам, які містяться в слині МП, тварина не відчуває болю під час процедури, адже слина МП сприяє змашенню та зволоженню. Проковтування крові сприяє виділенню антикоагулянта гірудину, кров всмоктується завдяки ритмічним скороченням глотки. П'явки залишаються на уражених місцях до насичення (від 5 до 15 мл крові), що може займати від 20-50 хвилин у дрібних тварин до 120 хвилин у коней.

Останнім часом п'явки використовуються для забору крові у тварин. Забір крові за допомогою МП представляє перспективну неінвазивну альтернативу венепункції. Але на сьогоднішній день, кров з п'явок використовується лише для якісного скринінгу генетичних або серологічних захворювань. Дослідження показали що п'явки витягують до 20 мл крові за 20-55 хв. Незважаючи на те, що більшість гематологічних і біохімічних параметрів були значно змінені у зразках, отриманих від п'явок, їхні значення показали сильні ($r = 0,62-0,79$; параметри 10/24) до дуже сильних ($r > 0,8$; 13/24 параметри)

кореляції з венепункцією за всіма параметрами крові, крім натрію ($r = 0,39$). Оскільки зміни параметрів і кореляції були подібними між видами, простих міжвидових регресійних формул було достатньо, щоб виправити зміни, тим самим забезпечуючи хорошу повторюваність між п'явками та венепункцією за більшістю параметрів. Тому можна свідчити про те, що МП можна використовувати як надійну альтернативу для венепункції та навіть кількісного аналізу. Це відкриває нові можливості для покращення стану тварин, програмах збереження та екофізіологічних дослідженнях, де часто потрібна кількісна оцінка параметрів крові [1].

1.5 Вплив біологічно активних речовин медичної п'явки на показники імунної системи людини та тварин в умовах *in vivo* та *in vitro*

Позитивні терапевтичні ефекти ГТ мають опосередкований імуномодулюючий вплив на імунну систему. Протизапальний ефект ГТ спостерігається при реальному спостереженні, а також лабораторними методами спостереження за стимуляцією фагоцитарних реакцій, а також корекцією популяції хелперів-супресорів у крові пацієнтів [8]. Однак подальше уточнення впливу ГТ на імунну систему, дозволить об'єктивніше патогенетично це обґрунтувати. Також відкрите питання ідентичності антигенів різних видів МП.

Досліджена імунотропна дія БАР слини МП на обмежений об'єм крові людини (експеримент *in vitro*). Досліджували зразки крові (венозна та залишкова після годування нею п'явок у флаконі з біологічною мембраною), в яких визначали кількість лейкоцитів, лейкоцитарну формулу. У зразках венозної крові після приставки МП для годування спостерігались суттєві відмінності порівняно з інтактною венозною кров'ю. Так, у порції крові добровольців, обробленої слиною МП протягом 10 – 15 хв., спостерігався слабкий гемоліз еритроцитів, формені елементи крові втрачали седиментаційні властивості, тоді як у інтактній

крові швидкість осідання еритроцитів у середньому складала 9 мм/год. Як показали результати досліджень, найбільшою мірою зменшилась кількість нейтрофілів.

Так, сегментоядерні нейтрофіли – клітини з коротким періодом життя, які знаходяться на кінцевій стадії диференціювання і першими реагують на антигенне навантаження реакцією нетозу [8]. Також спостерігалось зменшення числа лімфоцитів, в основному за рахунок Т-хелперів (CD^{4+} і CD^{25+}), на 21,7% та 48,5% ($p < 0,05$). Зміни субпопуляційного складу циркулюючих лімфоцитів відбувалися шляхом у зменшення кількості Т-лімфоцитів (CD^{3+}) на 14,4%, а також зниження кількості CD^{4+} клітин на 13,3% паралельно зі зростанням кількості CD^{8+} лімфоцитів на 49,4% ($p < 0,05$), при цьому кількість CD^{25+} лімфоцитів зменшується (на 39,4%), а CD^{16+} (кількість циркулюючих природних кілерних клітин) збільшується на 28,2% ($p < 0,05$) [8].

Також досліджено імунотропний вплив БАР МП *in vitro* в культурі мононуклеарів людини, стимульованій мітогенами (ФГА, КонА) та АГ сольового екстракту тіл кільчеців. Виявлено проліферативну реакцію у вигляді бластів, рівень кожного з них відповідав стану імунітету та природі відповідних їм мітогенів [8].

Варто враховувати факт, при якому імуномодуляторні ефекти БАР МП *in vivo* опосередковуються завдяки непрямым впливам (із-за підвищення рівня прозапальних цитокінів, колонієстимулюючих факторів, регуляції процесів дозрівання та міграції клітин та ін.), останні доцільно досліджувати при їх моделюванні в культурі мононуклеарів крові і клітин інших типів тканин. Саме тому важливо вивчити та аналізувати вплив БАР МП у системах *in vitro*.

Формування імунної відповіді розпочинається зі взаємодії патернів із ПРР (TLRs) клітин вродженого імунітету, які через клітинні контакти і за допомогою цитокінів залучають до імуногенезу лімфоцити [8]. З цих позицій отримує логічне пояснення також факт збільшення РБТЛ після гірудовпливу (ГВ), як результат збільшення в рециркуляції сенсibilізованих до АГ аптечної МП лімфоцитів, які мають спільні патерни з іншими видами.

В експериментах *in vivo*, тобто тих, які проводяться не з використанням ізольованої крові людини, а на організменному рівні - лабораторних щурах, науковцями також доведено ефективність використання ГТ в цілях стимуляції імунної системи людини та тварин. Індукція апоптозу і наступного некрозу клітин крові хазяїна-годувальника АГ кільчеців, скоріше за все, є однією з форм їх імунної захисної реакції.

Дослідження *in vivo* показали, що БАР МП чинять виражену імуномодуляторну дію, яка у людини та лабораторних щурів проявляється зниженням кількості ефекторних клітин запалення, посиленням поглинальної активності нейтрофілів, зміною співвідношення субпопуляцій лімфоцитів (нормалізація хелперних та супресорних популяцій); тоді як *in vitro* виявлено підвищення проліферативної активності лімфоцитів та зниження продукції прозапальних цитокінів мононуклеарними лейкоцитами людини. Здатність БАР МП викликати апоптоз лімфоцитів у культурі шляхом дозозалежної активації вибіркового апоптозу клітин імунної системи господарів, імовірно, є одним з компонентів протизапального ефекту — основного терапевтичного механізму ГТ [8].

2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Матеріали та об'єкти досліджень

Експериментальні дослідження було проведено на 18 білих нелінійних лабораторних щурах (самцях) старого віку (20-24 місяці). Маса піддослідних тварин становила від 250 до 350 г. Для дослідження використовувалися тварини, котрі не мали зовнішніх ознак та проявів захворювань і пройшли режим карантину [35, 36]. Щурів утримували у віварії, у спеціальних пластмасових клітках при умовах змішаного освітлення за температури 22-24 °С. Для годування щурів використовували збалансований комбікорм, поїли відстояною водою, забраною з водопроводу.

Експеримент було проведено з дотриманням усіх регламентованих норм та правил поводження із лабораторними тваринами [35] на базі навчально-наукової дослідної лабораторії клітинної та організменної біотехнології Запорізького національного університету.

Тварин розподілили на 2 групи: перша група була контрольною (інтактною), кількість 9 особин; друга група була дослідною, також у кількості 9 особин. Дослідній групі здійснювалася триразова приставка по 1 голодній МП з інтервалом в дві доби. Імунологічні характеристики крові досліджували на наступну добу після останньої приставки МП.

Приставку МП здійснювали достатньо швидко, відразу після фіксування тварини, хутро у загривковій ділянці голили для приставки в це місце 2 МП. Після того, як одна присмокувалася, іншу МП знімали, в таких умовах лише 1 МП проходила повний цикл годування. Після того, як МП відпадала від тіла щура, рану присипали очищеним порошком крейди в умовах стерильності. Після приставки МП кожен щур ізолювався в окрему закриту клітку для загоєння отриманих від гірудовпливу ран. Результати гірудовпливу на лабораторних щурів оцінювали через 24 години після останнього використання МП.

Для проведення гірудовпливу тваринам використовували медичних п'явок виду *Hirudo verbanavіkom* близько 7 місяців, останнє годування яких кров'ю великої рогатої худоби в лабораторних умовах відбулося не менше 4 місяців тому.

Після декапітації збирали артеріовенозну кров від досліджуваних тварин, стабілізували її гепарином та аналізували загальну кількість лейкоцитів пробірковим методом за П'ятницьким, лейкоцитарну формулу крові з паралельним визначенням цитоморфометричних показників нейтрофілів крові (середні лінійні розміри), індекс співвідношення сегментоядерних та паличкоядерних нейтрофілів та фагоцитарну активність нейтрофілів (оцінка поглинальної здатності в тесті з пекарськими дріжджами з визначенням ФП, ФЧ, КАФ, ФЄК).

2.2 Методи досліджень

2.2.1 Визначення загальної кількості лейкоцитів

Оцінку кількості лейкоцитів було проведено за методом П'ятницького. Стабілізовану за допомогою антикоагулянта венозну кров досліджували шляхом розведення в 20 разів. Внесли 0,38 мл 3% розчину метан карбонової кислоти в лунку планшета, підфарбовану метиленовим синім і додавали 0,02 мл взятої крові, потім, для отримання повного лізису еритроцитів, кров перемішали, заповнили нею камеру Горяєва та залишили її в горизонтальному положенні на 1 хв. для осідання лейкоцитів. Лейкоцити рахували за допомогою мікроскопу при малому збільшенні (окуляр К7×, об'єктив 20×). Підрахунок вели з використанням камери Горяєва у 100 великих квадратах, зліва направо, зверху вниз, щоб повторно не підрахувати одні і ті ж клітини. Для того, щоб розрахувати кількість лейкоцитів (10^9 /л або Г/л), ми брали до уваги такі показники: кількість підрахованих квадратів (100), об'єм одного великого

квадрату (1/250 мкл) та розведення крові (20). Розрахунок проводили за формулою:

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

де X – число лейкоцитів у 1 мкл крові;

a – число лейкоцитів у 100 великих квадратах [8, 36].

Референтні значення для лабораторних щурів старого віку становлять $9,5 \pm 0,8 \times 10^9$ /л [37].

2.2.2 Визначення лейкоцитарної формули крові

Для морфологічного дослідження були приготовані мазки крові за стандартним методом [38] і пофарбовані за Папенгеймом [39].

Дослідження забарвленого мазка крові проводили за допомогою мікроскопу з використанням імерсійного об'єктиву (100×). Для того, щоб відокремити лейкоцити один від одного за конкретними морфологічними ознаками, використовували 11-клавішний лічильник і рахували 200 лейкоцитів, при цьому починаючи з щіточки мазка. З метою отримання дійсних результатів лейкоцити спостерігали та рахували в різних ділянках мазка. Для уникнення повторного підрахунку одних і тих же клітин рухались по мазку крові зигзагами. Після завершення аналізу визначали лейкоцитарну формулу як відсоткове співвідношення різних видів лейкоцитів згідно з морфологічними ознаками [38].

Лейкоцити периферичної крові, в нормальному стані, представлені різними типоформами, вони розподіляються в забарвлених препаратах в таких пропорціях: лімфоцити 17-35%, моноцити 3-9%, паличкоядерні нейтрофіли 2-7%, сегментоядерні нейтрофіли 55-74%, базофіли 0-1%, еозинофіли 0,4-4%.

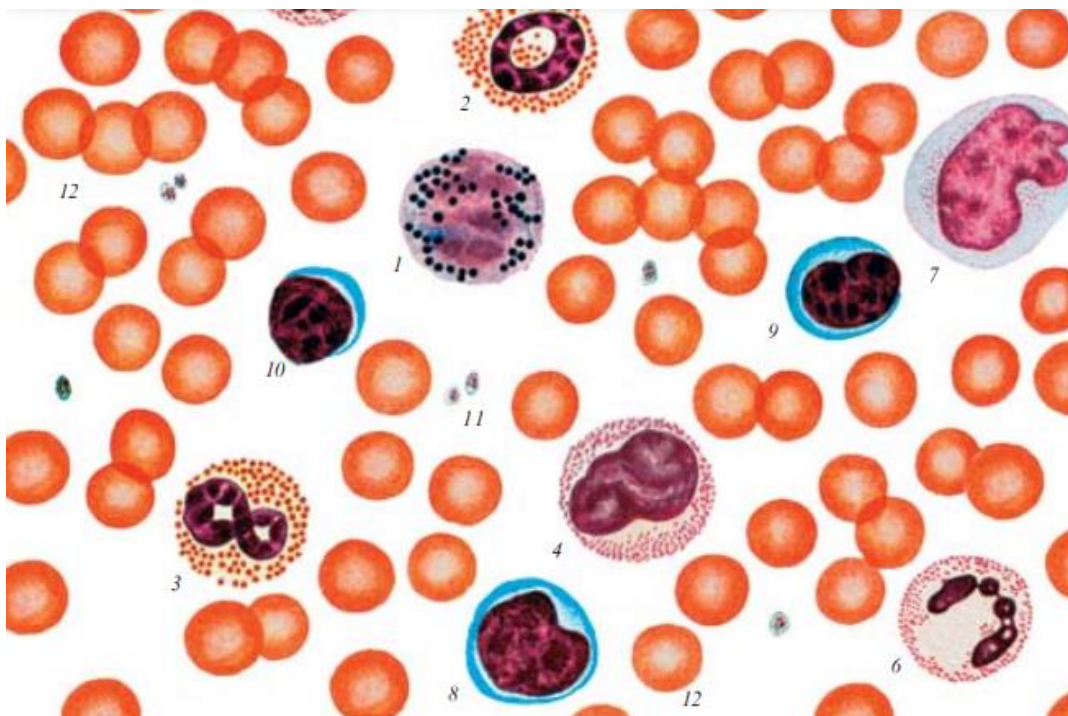


Рисунок 2.1 – Клітини крові щурів: 1 – базофільний гранулоцит; 2, 3 – еозинофільні гранулоцити (паличкоядерні); 4–6 – нейтрофільні гранулоцити (4 – міелоцит; 5 – паличкоядерний; 6 – сегментоядерний); 7 – моноцит; 8–10 – лімфоцити (8 – великий; 9 – середній; 10 – малий); 11 – тромбоцити; 12 – еритроцити [37]

В абсолютних цифрах в 1 мкл крові міститься: лімфоцитів 1300-2900, моноцитів 100-650, паличкоядерних 40-320, сегментоядерних 1600-4200, базофілів 0-110, еозинофілів 10-230 [37]. Дані вказані для статевозрілих дорослих щурів.

2.2.3 Цитоморфометричні дослідження нейтрофілів у мазку крові

Цитоморфометричне дослідження нейтрофілів артеріовенозної крові лабораторних щурів виконували у мазку крові згідно з методикою [8, 38, 39].

Аналізували розмірні характеристики мінімум 50 нейтрофілів у кожному зразку за допомогою окуляр-мікрометра (об'єктив 100×, окуляр К7×) [39]. Досліджували максимальний і мінімальний діаметр клітини в умовних одиницях, на основі чого рахували середнє для кожної клітини і середнє для усіх досліджених клітин у кожному зразку. Діаметр клітини в мкм знаходили шляхом множення середнього діаметру на ціну поділки, що становила 6 мкм при використанні об'єктива 100×, окуляра К7×.

В нормі середні розміри нейтрофілів у лабораторних щурів знаходяться в межах 7 -15 мкм [39].

2.2.4 Визначення індексу співвідношення сегментоядерних та паличкоядерних нейтрофілів

Індекс співвідношення сегментоядерних та паличкоядерних нейтрофілів визначаємо за формулою [38]:

$$ІСНПН= С/П, \quad (2.2)$$

де С – кількість сегментоядерних нейтрофілів,

П – кількість паличкоядерних нейтрофілів.

Паличкоядерний нейтрофіл - юний різновид нейтрофілів. У нього S-подібне або кільцеве ядро(на відміну сегментоядерного). Паличкоядерні нейтрофіли є одним з останніх етапів диференціювання нейтрофільного ряду гранулоцитів (зернистих лейкоцитів) в сегментоядерні нейтрофіли. У крові міститься лише 1–6% паличкоядерних нейтрофілів із загальної кількості лейкоцитів. Паличкоядерні нейтрофіли присутні в крові недовго. У них швидко

сегментується ядро (відбувається дозрівання), і вони перетворюються на сегментоядерні.

Клінічне значення має так званий «зсув (зміщення) лейкоцитарної формули вправо чи вліво». Під зрушенням розуміють зміну співвідношення сегментоядерних та паличкоядерних (зрілих та юних) нейтрофілів.

Зсув формули вліво - збільшення частки юних (паличкоядерних) нейтрофілів у судинах периферичної крові, поява метамієлоцитів та мієлоцитів. Така картина периферичної крові найбільш типова для будь-якого запального процесу особливо виражена в гострій стадії.

Зсув формули вправо - зменшення або зникнення паличкоядерних (юних) нейтрофілів за рахунок числа сегментоядерних (зрілих) нейтрофілів з гіперсегментованими ядрами. Це характерно для мегалобластних анемії, хронічної недостатності нирок та печінки [40].

2.2.5 Визначення фагоцитарної активності нейтрофілів

Для визначення фагоцитарної активності нейтрофілів використовували методику [8, 40, 41] з дріжджами *Saccharomyces cerevisiae*.

Постановку методики виконували таким чином: у лунку серологічного планшету вносили 50 мкл стабілізованої за допомогою гепарину цільної крові та 50 мкл 1% суспензії дріжджів; після чого ретельно перемішували. Здійснювали інкубацію в термостаті тривалістю 30 хвилин за температури 37⁰С, струшували планшет кожні 10 хвилин, по завершенні інкубування робили мазки; фіксування та фарбування проводили за Папенгеймом. В мазках за допомогою імерсійної системи, аналізували 200 нейтрофілів, враховували клітини, що фагоцитували дріжджі та ні, аналізували і кількість дріжджів, яку поглинув кожен нейтрофіл.

Оцінку фагоцитарної активності нейтрофілів проводили шляхом визначення фагоцитарного показника (ФП, %) - відсотка фагоцитованих клітин з

числа порахованих нейтрофілів; фагоцитарного числа (ФЧ, у.о.) - середня кількість мікроорганізмів, поглинених одним активним нейтрофілом; кількість активних фагоцитів (КАФ, Г/л) - абсолютне число фагоцитуючих нейтрофілів у 1 л крові; фагоцитарну ємність крові (ФЄК, Г/л) - кількість мікроорганізмів, що можуть поглинути фагоцити 1 л крові [41].

2.2.6 Статистичні методи дослідження

Систематизацію матеріалів дослідження та представлення розрахунків результатів виконано з використанням пакету прикладних програм Microsoft XP «Exel» та IBMSPSSStatistics 20,0 з використанням методів параметричної статистики.

Оцінку отриманих даних здійснювали з використанням методів статистичного опису та перевірки статистичних гіпотез [42, 43].

Для кожної вибірки обчислювали середньовибіркові характеристики: середнє арифметичне від суми всіх фіксованих значень набору, похибку середнього, медіану, моду, асиметричність, максимум та мінімум і т.д.

Перевірку достовірності гіпотези про рівність середніх вибірових величин здійснювали за допомогою двовибіркового t-критерію Ст'юдента (t-критерій середньоквадратичного відхилення), при цьому результати розрахунків пред'явлені у вигляді $x_{cp} \pm m$, де $x_{cp}(M)$ — середнє значення ознаки, m — середня похибка середнього арифметичного.

$$t = \frac{(M|d)}{\sigma_d/\sqrt{N}} \quad (2.3)$$

де M_d — середня різниця значень,

σ_d — стандартне відхилення різниць.

Статистично значимими вважали відмінності при $p \leq 0,05$ [42, 43].

3 ЕСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1 Лейкоцитарні показники периферичної крові нелінійних лабораторних щурів старого віку при гірудовпливі

Результати статистичного аналізу загальної кількості лейкоцитів та лейкоцитарної формули периферичної крові нелінійних лабораторних щурів старого віку під впливом БАР слини МП представлені у табл. 3.1.

Загальна кількість лейкоцитів [36] у інтактних нелінійних лабораторних щурів старого віку складала $8,01 \pm 0,26$ Г/л, після гірудовпливу знизилась на 12,2% і становила $7,03 \pm 0,51$ Г/л при $p > 0,05$.

Проаналізовано відносну та абсолютну кількість еозинофілів, нейтрофілів (паличкоядерних та сегментоядерних), моноцитів, лімфоцитів. В дослідженні імунних особливостей організму за допомогою аналізу лейкоцитарної формули крові, в першу чергу, увагу потрібно звернути на кількість нейтрофілів та їх зміни в результаті гірудовпливу.

Нейтрофіли є одним із головних компонентів вродженого імунітету [44]. Вони забезпечують першу лінію захисту організму від інфекції. В основі протекційної функції лейкоцитів, близько половини яких складають нейтрофіли, лежить фагоцитарний процес, який полягає в їх здатності розпізнавати, поглинати, вбивати та перетравлювати чужорідні клітини. Активація нейтрофілів супроводжується насамперед вивільненням вмісту секреторних гранул. При розвитку локального запалення макрофаги, активовані бактеріями або пошкодженнями тканини, виділяють прозапальні цитокіни, такі як IL-1 або фактор некрозу пухлини (TNF- α).

За результатами аналізу лейкоцитарної формули крові щурів старого віку контрольної групи та тварин після гірудовпливу (табл. 3.1.) робимо висновки, що гірудовплив корегує лейкоцитарні показники крові, а саме, відбувається збільшення лімфоцитів на 17,7% та моноцитів на 73,3%, зниження еозинофілів на 49,9%, нейтрофілів на 21,6%, при $p < 0,05$, порівняно з контролем,

відповідальних за імунітет організму та знищення хвороботворних елементів і новоутворень.

Таблиця 3.1 – Загальна кількість лейкоцитів та лейкоцитарна формула крові нелінійних лабораторних щурів старого віку при гірудовпливі, $x_{cp} \pm m$

Показники, одиниці вимірювання		Досліджувані групи		p	
		Контроль, n=9	Дослід, n=9		
Лейкоцити, Г/л		8,01± 0,26	7,03± 0,51*	>0,05	
Лейкоцитарна формула крові	Еозинофіли	%	4,11±0,35	2,06±0,27*	< 0,05
		Г/л	0,33±0,03	0,15±0,03*	< 0,05
	Нейтрофіли	%	42,89±0,85	33,61±1,72*	< 0,05
		Г/л	3,42±0,08	2,41±0,29*	< 0,05
	Паличкоядерні	%	2,56 ±0,176	4,33±0,312*	< 0,05
		Г/л	0,20±0,020	0,31±0,04*	< 0,05
	Сегментоядерні	%	40,33±1	29,27±1,53*	< 0,05
		Г/л	3,21±0,06	2,10±0,25*	< 0,05
	Моноцити	%	3,56±0,31	6,17±0,56*	< 0,05
		Г/л	0,29±0,03	0,45±0,07*	< 0,05
	Лімфоцити	%	49,44±0,41	58,17±2,10*	< 0,05
		Г/л	3,97±0,15	4,11±0,17	>0,05

Примітка.* – відмінності між контролем та дослідною групою статистично значимі при $p < 0,05$.

Для більшості показників є статистична значимість ($p \leq 0,05$), тобто, дану методику можна вважати дієвою.

3.2 Індекс співвідношення сегментоядерних та паличкоядерних нейтрофілів периферичної крові нелінійних лабораторних щурів старого віку при гірудовпливі

Результати досліджень (табл. 3.2) свідчать про те, що співвідношення сегментоядерних та паличкоядерних нейтрофілів периферичної крові нелінійних лабораторних щурів старого віку при гірудовпливі зменшується в 2,4 рази від результатів контрольної групи. Як відомо, зменшення індексу співвідношення сегментоядерних та паличкоядерних нейтрофілів свідчить про збільшення продукції незрілих форм гранулоцитів на момент обстеження. На фоні загального перерозподілу співвідношення лейкоцитів у формулі крові (збільшення кількості лімфоцитів, моноцитів та зниження кількості сегментоядерних нейтрофілів) це не свідчить про наявність запального процесу.

Тобто, відбувається зменшення кількості нейтрофілів, хоча кількість паличкоядерних форм після ГВ збільшилась, але в межах норми, тому співвідношення менше. Це може свідчити про зменшення навантаження на імунну систему і відсутність факторів, що спричиняють запальні процеси і потребують активного утворення нових нейтрофілів для боротьби з ними.

Таблиця 3.2 – Індекс співвідношення сегментоядерних та паличкоядерних нейтрофілів крові нелінійних лабораторних щурів старого віку при гірудовпливі,

$\bar{x} \pm m$

Групи тварин	ІССП	p
Контроль, n =9	16,6±1,56	< 0,05.
Дослід, n =9	6,9±0,44*	

Примітка.* – відмінності між контролем та дослідною групою статистично значимі при $p < 0,05$.

3.3 Фагоцитарна активність нейтрофілів периферичної крові нелінійних лабораторних щурів старого віку при гірудовпливі

Результати досліджень фагоцитарної активності нейтрофілів периферичної крові нелінійних лабораторних щурів старого віку при гірудовпливі показані у табл. 3.3.

Таблиця 3.3 – Фагоцитарна активність нейтрофілів крові нелінійних лабораторних щурів старого віку при гірудовпливі, $\bar{x} \pm m$

Показник, од.вим.	Групи тварин		p
	Контроль, n =9	Дослід, n =9	
ФП, %	69,2±0,71	74,1±0,76	> 0,05
ФЧ, у.о.	4,3±0,09	4,6±0,15	> 0,05
ФЄК, Г/л	14,4±0,55	11,3±1,60*	< 0,05
КАФ, Г/л	2,4±0,07	1,8±0,22*	< 0,05

Примітка.* – відмінності між контролем та дослідною групою статистично значимі при $p < 0,05$.

Отже, при гірудовпливі спостерігається тенденція до збільшення ФП з 69,2±0,71% до 74,1±0,76%, ФЧ зростає з 4,3±0,09 у.о. до 4,6±0,15 у.о. ($p > 0,05$), що вказує на покращення фагоцитарної функції нейтрофілів. ФЄК зменшується з 14,4±0,55 Г/л до 11,3±1,60 Г/л і КАФ також зменшується з 2,4±0,07 Г/л до 1,8±0,22 Г/л ($p < 0,05$) за рахунок зниження загальної кількості лейкоцитів та зокрема нейтрофілів.

Ці показники можуть свідчити про позитивний вплив БАР МП на організм щурів старого віку і дозволяють рекомендувати лікування МП при багатьох хворобах.

3.4 Морфофункціональні показники нейтрофілів периферичної крові нелінійних лабораторних щурів старого віку при гірудовпливі

Нейтрофіли експресують і продукують широкий спектр цитокінів, серед яких хемокіни, колонієстимулюючі фактори, прозапальні цитокіни (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-18, MIF та інші), імунорегуляторні цитокіни (IL-12, IL-21, IL-2, IL-27, TSL та інші), протизапальні цитокіни (IL-1ra, TGF β 1, TGF β 2), фактори ангіогенезу та фіброгенезу (VEGF, BV8, HBEG, FGF2, TGF α , HG, ангіопоетин), цитокіни суперродини фактора некрозу пухлини (TNF) та деякі інші цитокіни, такі як RBEF, мідкін, онкостатин М, активін, ендотелін. За рахунок виділення різноманітних цитокінів нейтрофіли можуть бути залучені в процеси, не пов'язані з імунним захистом, такі як гемопоез, ангіогенез та загоєння ран. Крім того, нейтрофіли можуть брати участь у розвитку деяких аутоімунних та злоякісних захворювань [40].

Результати досліджень лінійних розмірів нейтрофілів крові у мазку контрольної та дослідної груп нелінійних лабораторних щурів старого віку представлені в табл. 3.4. Після гірудовпливу середній діаметр нейтрофілів крові зменшується на 2,7% при $p < 0,05$. Зменшення розмірів клітин може свідчити про їх активацію або ж про зниження їх синтетичної активності.

Таблиця 3.4 – Морфометричні показники нейтрофілів крові нелінійних лабораторних щурів старого віку при гірудовпливі, $x_{cp} \pm m$

Групи тварин	Середній діаметр нейтрофілів, мкм	p
Контроль, n =9	10,14 \pm 0,06	< 0,05
Дослід, n =9	9,87 \pm 0,05	

Примітка.* – відмінності між контролем та дослідною групою статистично значимі при $p < 0,05$.

Згідно даних літератури, нейтрофіли під час активації мають здатність протискуватись через стінки ендотелію судин та мігрувати до тканин, де живуть протягом 1-2 днів. Приблизно 30% нейтрофілів, які залишають кровотік, мігрують у печінку та кістковий мозок, 15% прямують до селезінки, 20% у легені. Основними факторами хемотаксису, які спрямовують переміщення нейтрофілів у тканини є - лейкотрієн B₄ та IL-8. У процесі міграції нейтрофілів беруть участь молекули адгезії, а саме, β₂-інтегрини, P- і E-селектини, а також фермент, що секретується нейтрофілами еластазу. Відомо, що нейтрофіли набагато численніші за довго живучі макрофаги. Патогени, які проникають в організм, в першу чергу зустрічаються саме з нейтрофілами. Через 3-5 діб перебування у тканинах нейтрофіли піддаються апоптозу і поглинаються резидентними макрофагами [45].

4 ОХОРОНА ПРАЦІ

Тема моєї роботи «Функціональні властивості нейтрофільних гранулоцитів лабораторних щурів при гірудологічному впливі». Виконання даної роботи передбачає проведення експериментальних досліджень на лабораторних щурах з використанням медичних п'явок, хімічних реактивів, електроприладів, а також виконання правил пожежної безпеки, правил поводження з лабораторними тваринами та хімічними реагентами високого та середнього класу небезпеки.

Перед тим, як приступити до роботи, я ознайомилася з правилами роботи із біологічними об'єктами, що можуть нести загрозу для здоров'я, ознайомилась з інструкцією із охорони праці при роботі з хімічними реактивами і скляним посудом, електричними приладами та інструкцією з пожежної безпеки ЗНУ.

В процесі виконання досліджень ми керувалися правилами та нормами українського законодавства щодо охорони праці [35, 46, 47] та норм проведення наукових досліджень в біологічних лабораторіях. Зокрема, це «Правила охорони праці в лабораторіях ветеринарної медицини», «Положення про організацію роботи з охорони праці учасників навчально-виховного процесу в установах і навчальних закладах», «Державні санітарні правила» [35]. Також керувалися положенням №2010/63/EU Європейського парламенту і ради європейської спілки з охорони тварин, що використовуються у наукових цілях та внутрішніми правилами та розпорядженнями, діючими в ЗНУ.

Дослідження проводять на дрібних тваринах: щурах з використанням медичних п'явок. Тварини утримуються у спеціальному приміщенні з діючою вентиляцією [35]. До роботи в дослідженні на тваринах допускаються особи не молодші 18 років, які:

- перед роботою пройшли медогляд і які мають медичних протипоказань;
- пройшли вступний інструктаж з техніки безпеки на робочому місці;
- що пройшли кваліфікаційне навчання на знання прийомів та методів роботи;

- пройшли перевірку знань вимог безпечного виконання роботи та отримали допуск до самостійної роботи »;

У процесі лабораторних досліджень можливий вплив наступних небезпечних та шкідливих виробничих факторів:

- лабораторні тварини несуть пасивну небезпеку зараження зоопаразитарними інфекціями, а також можливість травматичної активної дії за певних умов;

- робота з хімічними реактивами та біоматеріалами;

- загазованість повітря робочої зони;

- недостатня освітленість робочої зони;

- вплив електричного струму [49, 50].

Перед початком роботи студент повинен підготувати та надіти спеціальний одяг та засоби індивідуального захисту, перевірити правильність розфасовки та зберігання біологічно активних хімічних сполук, лікарських субстанцій. Увімкнути витяжку за 30 хвилин до початку роботи [48].

Керівник лабораторії проводить інструктаж з виконавцями роботи з інструкцій, лабораторних методик, знання яких необхідне для виконання досліджень.

Приготувати обладнання для перенесення тварин. Переносити тварин з віварію у спеціальних ємностях, що виключають втечу тварин.

Дослідження на тваринах слід проводити з великою обережністю, дотримуючись усіх вимог інструкції з техніки безпеки.

В цілях забезпечення безпеки студенти та співробітники під час роботи з тваринами повинні суворо дотримуватися таких правил:

- У приміщенні, де знаходяться тварини, має бути тихо. При тваринах не можна голосно розмовляти, кричати, включати радіо тощо.

- З лабораторними тваринами треба поводитися дбайливо, не завдавати їм болю.

- Всі операції з вилучення тварин з кліток робити руками, захищеними рукавичками.

- Зберігати чистоту робочої зони, дотримуватися правил особистої гігієни.
- Всі роботи з небезпечними хімічними реагентами проводити під витяжкою.
- Після закінчення роботи тварин помістити у відповідні клітки та віднести до приміщення для тварин.
- Загиблих тварин відразу поміщати в герметичні поліетиленові пакети, щільно їх закривати.
- Не знаходитися у лабораторії більш ніж на 2 – 3 години після закінчення досліду.

При розтині тварин поверх халату надягають поліетиленовий фартух, на руки - гумові рукавички. Гумові рукавички необхідно використовувати при загальному прибиранні робочих місць та камер.

При укусі щуром варто негайно промити рану спиртом, обробити розчином йоду і довести до відома завідуючому кафедрою або викладачеві. Тварина, що вкусила людину, повинна на протязі 2 тижнів знаходитися у віварію під наглядом лікаря. Знищувати тварину не можна [35].

Всі роботи, пов'язані з можливістю виділення токсичних та пожежо- та вибухонебезпечних парів і газів повинні проводитися у витяжній шафі.

При використанні в роботі легкозаймистих речовин дотримуватися правил роботи з ними і працювати тільки при включеній витяжній вентиляції.

Під час роботи з тваринами бруд на лабораторному столі неприпустимий. Робоче місце не має бути зашаржене сторонніми предметами. На ньому має знаходитися тільки те обладнання, яке потрібне в даний момент.

Вимоги охорони праці в аварійних ситуаціях. Про кожну аварію або аварійну ситуацію негайно повідомити керівнику робіт та керівнику підрозділу, який у свою чергу повідомляє адміністрацію закладу [48].

Після закінчення робіт студент має дотримуватися таких правил:

- Ретельно прибрати від слідів крові та іншого біологічного матеріалу робоче місце.
- Вимити інструменти, при необхідності продезінфікувати їх.

- Після роботи, не знімаючи рукавичок, ретельно вимити руки з милом, витерти насухо і зняти рукавички, висушити їх і пересипати тальком. Руки миють і обробляють 70° етиловим спиртом.

- Вимкнути вентиляцію.

Повідомити керівника про роботу, та вжити заходів у випадку неполадок, виявлених у процесі досліджень.

Дослідження із використанням МП проводилися на базі лабораторії клітинної та організменної біотехнології науково-дослідної частини. Лабораторія спеціалізується на вдосконаленні біотехнології вирощення, застосування та вивчення МП у кількості трьох видів, а також червоного каліфорнійського хропаку (ЧКХ), нижчих ракоподібних (дафнії).

Аналіз пожежної безпеки зводиться до визначення наявності горючих речовин і можливих шляхів поширення пожежі та засобів, які необхідні для пожежогасіння [49, 50].

Для аналізу та систематизації отриманих результатів необхідно обов'язково вносити всі дані в електронні таблиці, документи, тощо. Тому робота в лабораторії включає в себе також роботу за комп'ютером [51]. Під час роботи за комп'ютером необхідно дотримуватись таких основних правил:

- вмикати та вимикати прилад тільки за допомогою вимикача;
- не можна вживати їжу та напої;
- забороняється залишати ввімкнене обладнання без нагляду;
- суворо дотримуватись вимог із електробезпеки та пожежної безпеки;
- якщо під час роботи на комп'ютері виникли якісь збої та несправності, необхідно попередити про це завідувача або інженера;
- при закінченні роботи необхідно обов'язково вимкнути прилад.

Недотримання правил та інструкцій під час роботи в лабораторії може призвести до нещасних випадків. Тому кожен студент повинен знати та вміти надати першу допомогу потерпілому[48]:

- для надання першої допомоги в кабінеті завжди має бути аптечка;

- при термічних опіках потрібно швидко охолодити місце, що обгоріло водою та промити його 5% розчином марганцевокислого калію або присипати харчовою содою;

- у випадку опіків кислотою, необхідно спочатку промити водою, потім обробити 3% розчином гідрокарбонату натрію;

- у разі потрапляння на шкіру лугу, необхідно промити уражене місце водою та 2% розчином оцтової кислоти, використовуючи ватний тампон, щоб запобігти розтіканню рідини по шкірі;

- у випадку порізів, треба обробити рану йодом, або іншим засобом та заклеїти її лейкопластирем;

У тяжких випадках необхідно негайно викликати швидку [48].

Таким чином, дотримання правил техніки безпеки та охорони праці при виконанні кваліфікаційної роботи дозволило уникнути виникненню нещасних випадків та надзвичайних ситуацій.

ВИСНОВКИ

1. Загальна кількість лейкоцитів у інтактних лабораторних щурів старого віку була в межах норми, після гірудовпливу виявлено зниження кількості лейкоцитів на 12,2% з $8,01 \pm 0,26$ Г/л в контролі до $7,03 \pm 0,51$ Г/л після гірудовпливу при $p > 0,05$. Показники лейкоцитарної формули були в межах норми, після гірудовпливу виявлено збільшення відносного вмісту лімфоцитів на 17,7% та моноцитів на 73,3%, зниження еозинофілів на 49,9%, нейтрофілів на 21,6%, при $p < 0,05$.

2. Індекс співвідношення сегментоядерних та паличкоядерних нейтрофілів у нелінійних лабораторних щурів старого віку після гірудологічного впливу зменшується з $16,6 \pm 1,56$ до $6,9 \pm 0,44$ у.о. при $p < 0,05$.

3. Фагоцитарна (поглинальна) активність нейтрофільних гранулоцитів нелінійних лабораторних щурів старого віку після гірудологічного впливу змінюється: фагоцитарний показник збільшується з $69,2 \pm 0,71\%$ до $74,1 \pm 0,76\%$, фагоцитарне число зростає з $4,3 \pm 0,09$ у.о. до $4,6 \pm 0,15$ у.о. ($p > 0,05$), фагоцитарна ємність крові зменшується з $14,4 \pm 0,55$ Г/л до $11,3 \pm 1,60$ Г/л і кількість активних фагоцитів також зменшується з $2,4 \pm 0,07$ Г/л до $1,8 \pm 0,22$ Г/л ($p < 0,05$) за рахунок зниження загальної кількості лейкоцитів та зокрема нейтрофілів.

4. Лінійні розміри нейтрофільних гранулоцитів у мазку крові лабораторних щурів старого віку після гірудологічного впливу зменшуються на 2,7% з $10,14 \pm 0,06$ мкм до $9,87 \pm 0,05$ мкм ($p < 0,05$).

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

На основі отриманих даних можуть оптимізувати методики лікування з урахуванням особливостей гірудовпливу на імунологічні властивості лейкоцитів крові. Результати можуть бути впроваджені при викладанні окремих тем навчальних дисциплін: «Імунологія», «Великий практикум з імунології», «Техніка біологічного експерименту».

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Амінов Р. Ф. Вплив гірудопунктури та екстракту з тканин медичної п'явки на імунну реактивність самиць та приплоду щурів у постембріональному онтогенезі : дис. ... канд. біол. наук: 03.00.09. Київ, 2018. 149 с.
2. Кравченко А., Чхайло М. Актуальні проблеми корекції фізичного стану футболістів із вадами зору із застосуванням природних засобів. *Збірник наукових праць. Спортивна медицина, лікувальна фізична культура і фізична реабілітація*. 2008. №1. С. 69-73.
3. Амінов Р. Ф. Вплив біологічно активних речовин кільцеців на фагоцитарну активність лейкоцитів крові в культурі. *Збірник наукових праць студентів, аспірантів і молодих вчених «Молода наука». Біологічні науки*. 2014. № 4. С. 3-5.
4. Савінов В.О. Комплексна гірудотерапія. Керівництво для лікарів. М.: Знання, 2016, 218 с.
5. Щетініна О. О. Лікування гострої та хронічної патології вуха із застосуванням медичної п'явки *Hirudo medicinalis* та лікарських засобів на її основі : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14.01.19 «Оториноларингологія». К., 2001. 19 с.
6. Лабінський А. Й. Ефективність немедикаментної терапії хворих із перенесеним ішемічним мозковим інсультом (гірудотерапія у поєднанні із нутріціологічною корекцією). *Acta medica Leopoliensia*. 2015. Т. 21, № 4. С. 16-19.
7. Кузнецова Л. В., Фролов В. М., Пересадін М. О., Круглова О. В. Сучасні підходи до гірудорефлексотерапії при захворюваннях серцево-судинної системи. *Український морфологічний альманах*. 2017. Т. 8, № 1. С. 32–35.
8. Литвиненко Р. О. Імуномодуляторні властивості біологічно активних речовин медичної п'явки в умовах гірудовпливу : дис. канд. біол. наук :

03.00.09. Запоріжжя, 2016. 169 с. URL:
http://scc.univ.kiev.ua/upload/iblock/189/dis_Lytvynenko%20R.O._new.pdf (дата
звернення: 25.09.2022)

9. Фролов О. К., Литвиненко Р. О. Клітинні і тканинні реакції *Hirudoverbana* (Carena, 1820) в посттрофічному процесі. *Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки*. 2014. № 2. С. 176-189.

10. Амінов Р. Ф. Проліферативна активність лімфоцитів крові нелінійних самиць щурів, їх приплоду на ранніх етапах постембріонального розвитку на фоні гірудовпливу. *Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки*. 2018. № 1. С. 40-45.

11. Амінов Р. Ф. 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.

12. Вершигора А. Ю., Пастер Є. У., Колибо Д.В. Імунологія. Підручник для студентів біологічних спеціальностей вищих навчальних закладів. 2020. С.17-86, С. 677-700. URL:
https://biology.univ.kiev.ua/images/stories/Kafedry/Microbiologiya/Library/Rozdil_19.pdf

13. Продукція фактичного некрозу пухлин при лімфопроліферативних захворюваннях: взаємодія пухлин та організму / В.А. Матлан, Н.А. Володько, В.А. Барилка та ін. *Оригінальні дослідження. Онкологія*. 2000. №3. С. 167-171.

14. Амінов Р. Ф. Природний імуномодулятор із тіл медичних п'явок: отримання та застосування: монографія. Запоріжжя : Запорізький національний університет, 2022. 164 с.

15. Амінов Р. Ф., Фролов О. К., Федотов Є. Р., Макєєва Л. В. Морфометричні показники тіла щурів на ранніх етапах постембріонального розвитку на фоні впливу антигенів сольового екстракту медичної п'явки в передембріональний і ембріональний періоди розвитку. *Вісник Запорізького*

національного університету. *Біологічні науки*. 2016. № 1. С. 43-48. URL: <http://dspace.zsmu.edu.ua/handle/123456789/4763>

16. Стасишин О. В. Сучасний погляд на функцію гомеостазу. *Український медичний часопис. Актуальні питання клінічної практики*. 2020. № 6. URL: <https://www.umj.com.ua/article/194994/suchasnij-poglyad-na-funktsiyu-sistemi-gemostazu>

17. Ковальова О.В., Ковальова А.А., Шкопинський Є.О., Кошля О.В. Гірудотерапія – як засіб фізичної реабілітації. *MedixAnti-Aging*. 2013. №2. С.18-23. URL: www.health-medix.com/articles/anti_aging/2013-06-04/aesthet.pdf

18. Гірудотерапія : навчальний посібник / Л. В. Кузнецова, В. М. Фролов, Т. П. Гарник та ін. ; за ред. Л.В. Кузнецової. Вінниця : ПП Балюк І.Б., 2010. 236 с.

19. Ковальов В. М., Павлій О. І., Ісакова Т.І. Фармакологія з основами біохімії рослин. Харків, 2004. С. 101-102.

20. Куплевська Л. А. Натуропатична медицина. Гірудотерапія і фізіологія здоров'я. Львів, 2019. 231 с.

21. Sobczak N., Kantyka M. Hirudotherapy in veterinary medicine. *Annals of Parasitology*. 2014. Vol. 60(2). P. 89-92.

22. Органотропність до кишечника медичної п'явки *Aeromonas hydrophyla* – бактерії-ендосимбіонту / О. К. Фролов, В. В. Копійка, Є. Р. Федотов та ін. *Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки*. 2012. № 2. С. 40-46.

23. Laufer A. S., Siddall M. E., Graf J. Characterization of the digestive-tract microbiota of *Hirudo orientalis*, a European Medicinal leech. *Applied and environmental microbiology*. 2008. Vol. 74, № 19. P. 6151–6154.

24. Вплив екзогенних біологічно активних речовин медичної п'явки на біологічні властивості *Escherichia coli* 3921/41 / О. К. Фролов та ін. *Microbiology&Biotechnology*. 2014. No 2(26). С. 94–100. URL: [https://doi.org/10.18524/2307-4663.2014.2\(26\).48281](https://doi.org/10.18524/2307-4663.2014.2(26).48281)

25. Назаренко С. М. Визначення стійкості культури (*Aeromonas hydrophila*) до впливу ультрафіолетового випромінювання. *Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і Державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок*. 2014. Вип. 15, № 1. С. 143-146. URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Ntbibt_2014_15_1_30
26. Кирилівник В.С., Цвень П. В., Кузьмін І. В. Історія гірудотерапії з найдавніших часів до початку 18-го століття н.е. *Вінницький національний університет*. 2012. №4. С. 84-90.
27. Верещак О. В. Диференційоване застосування гірудотерапії в комплексному лікуванні алкогольної та опіоїдної залежності : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14.01.17 «Наркологія». Харків, 2007. 20 с.
28. Климович Л. В. Історія та наукове обґрунтування гірудотерапії. *Медицина невідкладних станів*. 2012. № 7-8. С. 58-62.
29. Лабінський А. Й. Клініко-біохімічне дослідження хворих з транзиторними ішемічними атаками при гірудотерапії. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. 2012. № 1. С. 101–104.
30. Назаров П. С., Дорошенко П. Г. Гірудотерапія інфекційного міокардиту. *Лікарська справа*. 2018. № 6. С. 146–148.
31. Кузнецова Л. В., Фролов В. М., Пересадін М. О., Круглова О. В. Сучасні підходи до гірудорефлексотерапії при захворюваннях серцево-судинної системи. *Український морфологічний альманах*. 2010. Т. 8, № 1. С. 32–35.
32. Лабінський А. Й. Комбіноване лікування дисциркуляторної енцефалопатії: гірудотерапія в поєднанні з нутриціологічними методами. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2015. №2-3. С. 83-86.
33. Hirudo (Leech) for proliferative vitreous retinopathy: A protocol for systemic review and meta-analysis / Н. Huang et al. *Medicine*. 2021. Vol.100 (3). P. e24412. DOI: 10.1097/MD.00000000000024412.
34. Безкоровайна І. М. Метаболічні фактори і їх роль в патогенезі первинної відкритокутової глаукоми. *Українська медична стоматологічна*

академія.

2007.

URL:

http://repository.pdmu.edu.ua:8080/bitstream/123456789/3022/1/metabolichni_factor_u.pdf

35. ДНАОП 2.1.29.1.03-99 Правила охорони праці в лабораторіях ветеринарної медицини. Державний нормативний акт про охорону праці. Київ, 1999. 62 с.

36. Литвиненко Р. О. Життєздатність формених елементів крові людини в кишковому середовищі медичної п'явки. *Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки*. 2013. № 1. С. 84-92.

37. Морфологія клітин крові лабораторних тварин і людини: атлас / В. М. Запорожан та ін. Одеса: Одес. держ. мед. ун-т, 2002. 118 с. URL: <https://repo.odmu.edu.ua/xmlui/bitstream/handle/123456789/1321/ZaporozhanMorfologiya.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (дата звернення: 03.10.2022).

38. Годлевський А. І., Саволюк С. І. Діагностика та моніторинг ендотоксикозу у хірургічних хворих : монографія. Вінниця : Нова Книга, 2015. 232 с.

39. Пат. 62690 Україна, МПК G01N1/28, G01N1/30. Спосіб фарбування мазків венозної крові / О. К. Фролов, Є. Р. Федотов, В. В. Копійка, Л. О. Фролова ; заявник та патентотримач Запорізький державний університет. № 2003044023 ; заявл. 30.04.2003 ; опубл. 15.12.2003, Бюл. №1.

40. Дослідження крові тварин та клінічна інтерпретація отриманих результатів : методичні рекомендації для студентів факультету ветеринарної медицини керівників та слухачів Інституту післядипломного навчання керівників і спеціалістів ветеринарної медицини / В.І. Левченко та ін. Біла Церква, 2002. 56 с.

41. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / Беркало Л. В., Бобович О. В., Боброва Н. О. ; під ред. проф. Кайдашева І. П. Полтава: Полімет, 2003. 320 с.

42. Ромакін В. В. Комп'ютерний аналіз даних: навчальний посібник. Миколаїв: Вид-во МДГУ ім. Петра Могили. 2006. 144 с.

43. Статистика: конспект лекцій : навч. посіб. для студ. / уклад. Н.Л. Кузьмінська. Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2018. 162 с.

44. Основи імунології: функції та розлади імунної системи : посібник ; пер. 6-го англ. видання / А. К. Аббас, Е. Г. Ліхтман, Ш. Піллай; наук. ред. пер. В. Чоп'як. Київ : ВСВ «Медицина», 2020. viii, 328 с.

45. Henry K. M., Loynes C. A., Whyte M. K., Renshaw S. A. Zebrafish as a model for the study of neutrophil biology. *Journal Of Leukocyte Biology*. 2018. Vol. 94, №4. P. 633-642.

46. Винокурова Л.Е., Васильчук М.В., Гаман М.В. Основи охорони праці. 2-е вид., допов., перероб. К.: Вікторія, 2001. 192 с.

47. Жидецький В. Ц., Джигирей В. С., Мельников О. В. Основи охорони праці. 2-е вид., стереотипне. Львів: Афіша, 2000. 348 с.

48. ДСП 9.9.5.-080-2002 Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю. Державні санітарні правила. Видання офіційне. Київ, 2002. 48 с.

49. Про організацію пожежної безпеки у Запорізькому національному університеті. URL: <https://www.znu.edu.ua/cms/index.php?action> (дата звернення: 22.07.2022)

50. Наказ ректора ЗНУ «Про протипожежну безпеку та протипожежний режим в університеті». URL: <https://www.znu.edu.ua/3641.ukr.html> (дата звернення: 22.07.2022)

51. Вимоги щодо безпеки працівників під час роботи з екранними пристроями, затверджені наказом Мінсоцполітики від 14.02.2018. № 207. URL: <http://surl.li/duuyur> (дата звернення: 15.08.2022)

Декларація
академічної доброчесності
здобувача ступеня вищої освіти ЗНУ

Я, Федорченко Владислава Олександрівна, студентка 2 курсу, заочної форми навчання, біологічного факультету, спеціальності 091 біологія, освітньої програми «Біологія» адреса електронної пошти vladavinichenko@gmail.com, підтверджую, що написана мною кваліфікаційна робота на тему «Функціональні властивості нейтрофільних гранулоцитів лабораторних щурів при гірудологічному впливі» відповідає вимогам академічної доброчесності та не містить порушень, що визначені у ст. 42 Закону України «Про освіту», зі змістом яких ознайомена.

Заявляю, що надана мною для перевірки електронна версія роботи є ідентичною її друкованій версії.

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

Дата_____	Підпис_____	ПІБ (студент) Федорченко В.О.
Дата_____	Підпис_____	ПІБ (науковий керівник) Литвиненко Р.О.