

**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: ЛЕЙКОЦИТАРНІ ПОКАЗНИКИ КРОВІ НЕЛІНІЙНИХ
ЛАБОРАТОРНИХ ЩУРІВ ПРИ ВИПОЮВАННІ КУЛЬТУРАЛЬНОЮ
ВОДОЮ З-ПІД *HIRUDO VERBANA*

Виконала: студентка 2 курсу, групи 8.0912-з

спеціальності 091 Біологія

освітньої програми Біологія

М. І. Богославець

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

Рецензент к.б.н., доц. В. В. Копійка

Запоріжжя - 2023

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

Факультет біологічний

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

Рівень вищої освіти магістр

Спеціальність 091 Біологія

Освітня програма Біологія

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

О.Г. Куш

“ _____ ”

_____ 2022 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТЦІ

Марії Іванівні Богославець

1 Тема роботи: Лейкоцитарні показники крові нелінійних лабораторних щурів при впоюванні культуральною водою з-під *Hirudo verbana*

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

затверджені наказом ЗНУ від « 01 » травня 2023 року № 645-с

2 Строк подання студентом роботи грудень 2023 року

3 Вихідні дані до роботи: літературні джерела за темою роботи.

4 Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити): 1. Проаналізувати загальну кількість лейкоцитів, лейкоцитарну формулу крові нелінійних лабораторних щурів старого віку при впоюванні культуральною водою з-під *Hirudo verbana*. 2. Проаналізувати лейкоцитарні індекси крові нелінійних лабораторних щурів старого віку при впоюванні культуральною водою з-під *H. verbana*. 3. Проаналізувати фагоцитарну активність нейтрофілів крові нелінійних лабораторних щурів старого віку при впоюванні культуральною водою з-під *H. verbana*

5 Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень): Табл. 3.1-3.3: загальна кількість лейкоцитів та лейкоцитарна формула крові; лейкоцитарні індекси крові; фагоцитарна активність нейтрофілів крові нелінійних лабораторних щурів старого віку при впоюванні культуральною водою з-під *H. verbana*.

6 Консультанти розділів роботи

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

7 Дата видачі завдання _____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Аналіз літературних джерел та підбір методів за темою дослідження.	Жовтень – листопад 2022	Виконано
2.	Оформлення розділу «Огляд наукової літератури».	Листопад 2022 – січень 2023	Виконано
3.	Формування розділу «Матеріали та методи дослідження»	Січень – березень 2023	Виконано
4.	Оформлення розділу «Охорона праці»	Березень – квітень 2023	Виконано
5.	Поповнення експериментальної бази даних дослідження	Квітень - червень 2023	Виконано
6.	Статистична обробка й інтерпретація результатів дослідження	Вересень – жовтень 2023	Виконано
7.	Оформлення розділу «Експериментальна частина»	Жовтень - листопад 2023	Виконано
8.	Оформлення та попередній захист кваліфікаційної роботи	Листопад - грудень 2023	Виконано

Студент _____

М. І. Богославець

Керівник роботи _____

Р. О. Литвиненко

Нормоконтроль пройдено

Нормоконтролер _____

Є. Ю. Гороховський

РЕФЕРАТ

Робота викладена на 61 сторінці друкованого тексту, містить 5 таблиць та 1 рисунок. Перелік посилань включає 53 джерела, з них 35 іншомовних.

Об'єктом дослідження були лейкоцитарні показники крові нелінійних лабораторних щурів.

Метою роботи було дослідження стану лейкоцитарних показників крові нелінійних лабораторних щурів при випоюванні культуральною водою з-під *Hirudo verbana*.

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

В результаті дослідження встановлено, що після випоювання нелінійних лабораторних щурів культуральною водою з-під *H. verbana* спостерігались зміни в показниках лейкоцитарної формули, лейкоцитарних індексів, підвищення загальної кількості лейкоцитів, підвищення фагоцитарного показника та фагоцитарного числа порівняно з контрольною групою.

Новизна роботи полягає в тому, що більш детально розкрито вплив біологічно активних речовин на лейкоцитарні показники крові нелінійних лабораторних щурів при випоюванні культуральною водою з-під *H. verbana*.

Значущість роботи – результати роботи доповнюють дані щодо впливу екзогенних біологічно активних речовин п'явки медичної на показники крові нелінійних лабораторних щурів.

Практичне значення: одержані результати можна використовувати при викладанні навчальних дисциплін спеціальності 091 Біологія та біохімія.

БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ РЕЧОВИНИ, ГІРУДОТЕРАПІЯ, МЕДИЧНА П'ЯВКА, ЛЕЙКОЦИТАРНА ФОРМУЛА, ЛЕЙКОЦИТАРНІ ІНДЕКСИ, ФАГОЦИТАРНА АКТИВНІСТЬ.

ABSTRACT

The work is presented on 61 pages of printed text, contains 5 tables and 1 figure. The list of references includes 53 sources, of which 35 are in foreign languages.

The object of the study was leukocyte blood parameters of non-linear laboratory rats.

The aim of the work was to study the state of leukocyte blood parameters of non-linear laboratory rats when drinking cultural water from *Hirudo verbana*.

Research methods: immunological (determination of the total number of leukocytes, leukocyte formula, leukocyte indices, phagocytic activity of blood neutrophils) and statistical.

As a result of the study, it was established that after drinking of non-linear laboratory rats with cultured water from *H. verbana*, changes in leukocyte formula indicators, leukocyte indices, an increase in the total number of leukocytes, an increase in the phagocytic index and phagocytic number were observed compared to the control group.

The novelty of the work is that the influence of biologically active substances on the blood leukocyte parameters of non-linear laboratory rats when drinking cultured water from *H. verbana* was revealed in more detail.

Significance of the work – the results of the work complement the data on the effect of exogenous biologically active substances of the medical leech on the blood parameters of non-linear laboratory rats.

Practical significance: the obtained results can be used in the teaching of educational disciplines of the specialty 091 Biology and Biochemistry.

BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES, HIRUDOTHERAPY, MEDICAL LEECH, LEUKOCYTIC FORMULA, LEUKOCYTE INDICES, PHAGOCYtic ACTIVITY.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	8
ВСТУП	9
1 ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ	12
1.1 Гірудотерапія: короткий огляд	12
1.2 Біологічні ефекти гірудологічного впливу.....	15
1.2.1 Деградація позаклітинного матриксу.....	15
1.2.2 Збільшення кровотоку.....	15
1.2.3 Антикоагулянтний ефект	16
1.2.4 Пригнічення функції тромбоцитів.....	17
1.2.5 Знеболююча та протизапальна дія.....	18
1.2.6 Протимікробний ефект	19
1.2.7 Інші можливі ефекти біологічно активних речовин медичної п'явки....	19
1.3 Лікування медичними п'явками – загальна перспектива	20
1.4 Характеристика кровотворення у лабораторних щурів	22
1.5 Зміни процесу кровотворення у лабораторних щурів в різних фізіологічних умовах	27
2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	30
2.1 Об'єкти та матеріали дослідження	30
2.2 Методи дослідження	31
2.2.1 Визначення загальної кількості лейкоцитів	31
2.2.2 Визначення лейкоцитарної формули крові	32
2.2.3 Розрахунок лейкоцитарних індексів	37
2.2.4 Визначення фагоцитарної активності нейтрофілів	38
2.2.5 Статистичні методи дослідження	39
3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	41
3.1 Загальна кількість лейкоцитів та лейкоцитарна формула крові нелінійних лабораторних щурів старого віку при впоюванні культуральною водою з-під <i>Hirudo verbana</i>	41

3.2 Лейкоцитарні індекси крові нелінійних лабораторних щурів старого віку при впоюванні культуральною водою з-під <i>Hirudo verbana</i>	43
3.3 Фагоцитарна активність нейтрофілів крові нелінійних лабораторних щурів старого віку при впоюванні культуральною водою з-під <i>Hirudo verbana</i>	44
4 ОХОРОНА ПРАЦІ.....	47
ВИСНОВКИ.....	55
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	56
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ.....	57

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

БАР – біологічно активні речовини

ГТ – гірудотерапія

МП – медичні п'явки

ВСТУП

Актуальність дослідження. На сьогодні дуже різко підвищився відсоток захворювань та патологічних станів інфекційної та не інфекційної природи. В більшості випадків усі патологічні стани в організмі виникають із-за порушення гомеостатичного стану імунної системи, яка не здатна на повну протистояти їм. У результаті чого підвищується інтерес до пошуку різних методів та створення нових високоефективних і малотоксичних біологічно активних речовин (БАР) із імуномодуляторною дією [1-7].

Гірудотерапія (ГТ) є лікувальним методом, при якому використовують медичних п'явок (МП). Дія гірудину та його похідних має значний вклад у профілактиці та лікуванні багатьох захворювань. За час тривалої філогенетичної еволюції зв'язок між паразитом і хазяїном все більше зміцнювався і розвивався. Вони адаптувалися один до одного, їхня імунна система стала витривалішою. І тепер паразит здатний виживати за допомогою господаря, а господар з їх допомогою також отримує позитивний ефект для здоров'я [8, 9]. В останнє десятиліття багато наукових досліджень показали позитивний вплив МП у профілактиці та лікуванні різних захворювань людини і тварин. Наприклад, досліди на лабораторних щурах показали збільшення маси тіла та багатьох важливих органів, підвищення гемоглобіну, покращення показників печінки та позитивну дію при загоєнні ран [6, 10-12]. У ветеринарії ГТ успішно використовують при ендометриті у дрібних домашніх тварин, при інтоксикації та гематомах у собак [8]; у коней, собак і котів при дисплазії кульшового суглоба, гострих і хронічних артритих, захворюваннях, пов'язаних із запаленням сухожилів і фасцій, захворюваннях хребта, лікуванні рубців [9, 12-14]; у корів при лікуванні маститу для підвищення надоїв і фізіологічних показників крові, у кіз для покращення фізіологічних показників, надоїв, плодючості приплоду [15, 16].

МП у даний час також широко використовуються в медицині для профілактики і лікування багатьох захворювань людини. Адже МП володіють широким спектром терапевтичної дії: регулюють гемостаз й судинний тонус, мають регенераційні, протизапальні, антимікробні, нейротропні та імуномодуляторні ефекти. Імуномодуляторний ефект проявляється у зрушеннях клітин як вродженого, так і адаптивного імунітету. Їх використовують, наприклад, при лікуванні ішемічної хвороби серця, серцевої недостатності, атеросклеротичного кардіосклерозу, постінфарктного кардіосклерозу, гіпертонічної хвороби, у профілактиці ішемічного інсульту та багато інших [1, 3, 5, 11-13, 16-18]. Показана ефективність ГТ у хворих із транзиторними судомами, в комплексному лікуванні кардіоемболічного інсульту в гострому періоді, енцефалопатії, з гострими порушеннями мозкового кровообігу, венозним застоєм, у пластично-відновній хірургії, при остеоартрозі, мігрені, з діабетичною стопою, шкірних захворюваннях, ускладненнях раку та лікуванні ран, у лікуванні жіночих захворювань та профілактиці безпліддя [17, 19, 20]. Також дослідники отримали позитивні результати щодо негативного впливу МП на мікобактерії туберкульозу [21].

В останні роки численні дослідження гірудину та його похідних швидко зросли, особливо щодо ефектів відновлення ран, проти фіброзу та антидіабетичних ускладнень [13, 22]. Крім того, дослідження інших фармакологічних ефектів, включаючи антитромботичний ефект, протипухлинний ефект, ефект проти гіперурикемії та вплив на церебральний крововилив, ІgА-нефропатію, гостре ураження легень, а також інфаркт міокарда також досягли певного прогресу [23, 24]. Молекулярні механізми, що лежать в основі цих фармакологічних властивостей виявлені лише частково і потребують подальших досліджень. Представлена велика кількість досліджень які показують використання ГТ у медицині та ветеринарії, але на сьогодні імуномодуляторний ефект МП та її окремих ендо- та екзогенних БАР залишається все ще мало вивченим.

Мета дослідження – дослідити стан лейкоцитарних показників крові

нелінійних лабораторних щурів при вipoюванні культуральною водою з-під *Hirudo verbana*.

Відповідно до мети були сформовані наступні завдання дослідження:

1) проаналізувати загальну кількість лейкоцитів, лейкоцитарну формулу крові нелінійних лабораторних щурів старого віку при вipoюванні культуральною водою з-під *H. verbana*;

2) проаналізувати лейкоцитарні індекси крові нелінійних лабораторних щурів старого віку при вipoюванні культуральною водою з-під *H. verbana*;

3) проаналізувати фагоцитарну активність нейтрофілів крові нелінійних лабораторних щурів старого віку при вipoюванні культуральною водою з-під *H. verbana*.

Об'єкт дослідження – лейкоцитарні показники крові нелінійних лабораторних щурів.

Предмет дослідження – зрушення лейкоцитарних показників крові нелінійних лабораторних щурів при вipoюванні культуральною водою з-під *H. verbana*.

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

Теоретичне та практичне значення одержаних результатів. Результати роботи доповнюють дані щодо впливу екзогенних БАР МП на показники крові нелінійних лабораторних щурів. Одержані результати можна використовувати при викладанні навчальних дисциплін спеціальності 091 Біологія та біохімія.

1 ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Гірудотерапія: короткий огляд

Гірудотерапія – це лікування за допомогою медичних п'явок (МП, *Hirudo medicinalis*, *H. verbana*, *H. orientalis*). МП використовувалися для лікування пацієнтів протягом століть. У минулому п'явки виявилися ефективним засобом лікування ряду захворювань, включаючи лікування бойових поранень. В даний час МП можуть використовуватися для лікування артриту, абсцесів, тромбозів, деяких венозних захворювань і міастенії. МП також можуть використовуватися в пластичній хірургії і при деяких проблемах з кровообігом. Під час годування МП виділяє в рану складну суміш різних біологічно і фармакологічно активних речовин. Гірудин є основною складовою слини МП. Іноді його використовують для опису всіх активних компонентів слини МП [15].

На сьогодні досліджується слина МП для виявлення конкретних специфічних лікарських сполук, які можуть бути використані для посилення антикоагулянтних властивостей крові та розщеплення тромбів. Це може сприяти розробці препаратів для лікування серцево-судинних захворювань, таких як інфаркт міокарда або ж інсульт. У минулому МП використовувалися для видалення застійної крові з посиленням кровообігу та сприяння загоєнню пошкодженої або інфікованої тканини, що допомогло запобігти розвитку гангрени [3]. МП живляться кров'ю, використовуючи свій хоботок для проколу шкіри (укусу). Укус МП, подібний до комаринного і є неболючим із-за того, що виділяється гістаміноподібна речовина. Ще слина п'явки містить анестетик, завдяки якому пацієнтами не відчувається біль від укусу. Окрім цього, слина містить речовини, що перешкоджають згортанню крові. Інші фактори, такі як холодна шкіра, куріння або проблеми, пов'язані з віком, можуть впливати на анестетичні властивості при укусі МП. Ці проблеми можливо вирішити через розігрівання та очищення шкіри [5, 25].

Дія МП на живі організми відбувається при виділенні БАР з їх слинних залоз. У слині МП є близько 100 різних БАР. Одна з них, яка є найбільш поширеною – це гірудин – речовина, яка зменшує процес згортання крові. Речовини, виділені зі слинних залоз МП, мають також протизапальну, знеболювальну та бактеріостатичну дію. Вони відновлюють порушену мікроциркуляцію і судинну проникність тканин й органів, знижують гіпоксію, зменшують артеріальний тиск, підвищують імунітет і покращують біоенергетичний статус речовин [20].

В доповнення до уже вказаних БАР, що МП виділяє в оточуюче середовище зі слини, а також кондиційоване середовище в якому МП утримується можна назвати й ті, які виділяються додатково. Так, наприклад, екзогенні БАР виділяються водночас із продуктами життєдіяльності (злущеними залишками кутикули, сечею, гуано, слизом та ін.) [26].

За дослідженням Рассадіної К.В. (2006) встановлено, що метаболіти, які виробляються МП до навколишнього середовища містять речовини з дуже високою біологічною активністю (гірудин, ферменти: апіраза, тригліцеридаза, гіалуронідаза, еластаза, білки сироватки крові її годувальника – глобуліни і альбуміни). На додаток ще метаболіти МП включають 19 амінокислот у різних концентраціях, так максимальна концентрація у глютамінової кислоти, триптофана, лізіна, аланіна, лейцина. Також метаболіти МП містять певні біогенні елементи, зокрема фосфор, натрій, калій та деякі мікроелементи, такі як йод, сірка, селен та ін. І як результат вода, яку обробляють МП включає в себе сукупність БАР. Це і біогенні елементи, і незамінні амінокислоти, різні знеболюючі й протизапальні речовини, білки плазми крові, а також мікроелементи. Підтверджено дослідями на білих лабораторних мишах, що ця вода, оброблена МП не має біологічної небезпеки і також не має в своєму складі патогенної мікрофлори і є нетоксичною. Тому К.В. Рассадіна (2006) рекомендує використання цієї води з лікувальною метою [22, 26]. Ще можна додати, що воду, оброблену п'явками застосовують в ветеринарії, народній

медицині, з метою лікування різних шлунково-кишкових захворювань, запальних процесів та дерматологічних захворювань [18].

Механізм дії МП відбувається в блокуванні дії тромбіну і переходу фібриногену в фібрин. Виділення з їх слинних залоз також перешкоджає прикріпленню тромбоцитів, що повністю пригнічує їхню агрегацію на поверхні колагену. Таким чином, слина МП має прямий вплив на клітинні та плазмові фактори, що сприяють при цьому згортанню крові [27].

У сучасній медицині ГТ широко застосовується в реконструктивній хірургії як засіб для видалення застійної крові з тканини при пересадці або повторному прикріпленні кінцівок. Накопичення застійної крові в ранах може призвести до підвищення венозного тиску, що заважає нормальному кровообігу та доставці кисню та поживних речовин до ранової зони. Застосування ГТ, яка призводить до зменшення кількості венозної крові за допомогою МП, дозволяє знизити кров'яний тиск і зберегти кінцівки або тканини. Слина МП містить важливі біохімічні речовини, такі як вазодилататори, антикоагулянти та анестетики, що робить їх особливо ефективними для цієї процедури [24, 28].

Протилежним щодо загальнопоширеного є уявлення, що МП традиційно поглинають лише невелику кількість крові, це приблизно 5 мл. Але якщо на уражену ділянку накласти більше п'явок, їх вплив посилиться. Після процедур (тривалість яких 3-7 днів) пошкоджені вени достатньо зцілюються, щоб значно зменшити нагромадження крові в кінцівках. У результаті уражена область поступово відновлює нормальний колір і венозний тиск, сприяючи кращому кровотоку до пошкоджених тканин та прискоренню процесу загоєння ран [28].

1.2 Біологічні ефекти гірудологічного впливу

На сьогодні багато науковців уже дослідили різноманітні біологічні механізми дії МП. Якщо брати дослідження МП, то у їх виділеннях відмічено близько 100 різних білків, що відрізняються молекулярною масою, але лише деякі з них мають важливу активну біологічну роль. Ефекти впливу ділять на 6 основних типів для їх більшої зрозумілості, хоча вони між собою взаємопов'язані і зазвичай їх досліджують разом [3, 13].

1.2.1 Деградація позаклітинного матриксу

Після укусу МП дуже швидко виділяють ферменти колагеназу та гіалуронідазу для того аби покращити проникнення до тканин та подальше розходження їх БАР. Також ці ж самі ферменти відіграють роль у підтримці антимікробної дії [3, 18].

1.2.2 Збільшення кровотоку

В свою чергу годування МП і їх подальший терапевтичний ефект потребують дуже посиленого кровотоку. Він підтримується за рахунок гістаміноподібних молекул, що викликають вазодилатацію. Також виникає із-за локальної судинної проникності. Ще додатково з секретами МП виділяється ацетилхолін, що також викликає розширення судин й при цьому розслаблення ендотеліальних м'язів [1].

1.2.3 Антикоагулянтний ефект

Каскад згортання крові – це така ланцюгова реакція, яка забезпечує зупинку крові. БАР п'явок впливають на різні етапи зменшення каскаду дії згортання. Вони можуть інгібувати згортання, розщеплювати фібрин, пригнічувати тромбін і змінювати процес згортання крові [5]. Виявлено, що найсильнішою хімічною речовиною, що виділяється зі слини МП, є гірудин, який взаємодіє з тромбіном у зворотному напрямку [11].

Всі біологічні функції тромбіну блокуються в рівномолярному тромбін-гірудиновому комплексі. Тож, гірудин інгібує не тільки згортання фібриногену, а й інші гемостатичні реакції, активовані тромбіном. Це активація факторів згортання крові V, VIII і XIII, а також активація тромбоцитів, викликана тромбіном [3, 29].

Тому, шляхом миттєвого гальмування утворення тромбіну після активації системи згортання крові, гірудин позитивно впливає на активацію протромбіну, що фактично призводить до прискореного утворення протромбіну, і запобігає генерації тромбу. Таким способом, залежно від концентрації гірудину в крові, згортання може уповільнюватися або повністю пригнічуватися [20].

Коагуляція під час годування для МП є смертельною, тому необхідний антикоагулянтний вплив. Коагуляційний каскад є зворотною ланцюговою реакцією, і БАР, що виділяються МП, можуть впливати на різні етапи цього процесу. Гірудин і гелін, в основному мають дію інгібіторів тромбіну, інгібіторів фактора Ха, що перериває послідовність реакцій, а дестабілаза має фібринолітичну дію. Тромбін сильно впливає на активацію тромбоцитів і вивільнення аденозиндифосфату, тому ці інгібітори можуть опосередковано негативно впливати на функції тромбоцитів [17].

Гірудин – це білок масою 7,1 кДа, який незворотно зв'язується з тромбіном, що призводить до споживання активного тромбіну та прояву

антитромбінової активності. Цей зв'язок з речовиною є дуже цікавим і багаторазово досліджувався різними науковцями [1, 12, 30]. Вважається, що гірудин може бути терапевтичною альтернативою гепарину, адже він має вищу антикоагулянтну активність і менше побічних ефектів. Гелін також виражає інгібуючу дію на хімотрипсин, катепсин G і нейтрофільну еластазу [28].

Інгібітор фактора Ха перериває каскад згортання крові та має прямий антикоагулянтний ефект. Його важлива роль полягає в лікуванні остеоартриту та ревматоїдного артрити. Крім того, інші препарати, такі як антистазин, інгібітор C1 та егліні, також можуть мати антикоагулянтний ефект, шляхом можливого прямого або непрямого інгібування факторів згортання крові [28].

Дестабілаза є ферментом з глікозидазною активністю, яка проявляє як антибактеріальну, так і фібринолітичну дію. Фермент має різні ізоформи з виключно різними можливостями та екстрагується при цьому з різних видів МП. Дестабілаза виявляє значну деградуєчу дію на стабілізований фібрин і також може мати важливе значення як антикоагулянт. Нещодавно були виявлені нові антикоагулянтні пептиди з різних видів МП, такі, наприклад, як новий протеїн п'явки-1. Крім того, було виділено багато інших пептидів, але їх функція на сьогодні невідома [3, 13-15].

1.2.4 Пригнічення функції тромбоцитів

Смертельними для МП є руйнація стінок кровоносних судин і при цьому, яка викликає каскад коагуляції та активізацію тромбоцитів. Тому із-за цього у всіх виділеннях МП міститься багато БАР, які точково на ділянках пригнічують як активізацію тромбоцитів, так і коагуляцію [23].

Руйнація стінок судин у нормальних хазяїнів провокує подальше розходження й вивільнення часток колагену, що є цілями вільного фактора

фон Віллебранда. Так як фактор фон Віллебранда є так званним мостом, то цей комплекс дуже сильно є зв'язаним із глікопротеїном Іb на тромбоцитах. Із-за такого зв'язку провокуються ефекти підвищеного регулювання. Тромбоцити при цьому кріпляться один до одного для утворення блокуючої ділянки і зупинки крововиливу. В цей час також запускається ще один ланцюг із виділенням інших речовин (наприклад, тромбоксану А) для каскаду коагуляції й активування тромбоцитів [11]. У виділеннях п'явки різноманітні молекули, такі як калін, апіраза, декорсин та ін. починають реагувати на різні компоненти представленого ланцюга [3, 15].

1.2.5 Знеболююча та протизапальна дія

Науковцями встановлено, що для того, щоб уникнути виявлення п'явки господарем при годуванні, вони мають протизапальний та знеболювальний ефект. Але до наших часів ще не було виділено ні однієї молекули із виділень МП з анальгетичною дією. Тому з цього питання проводиться багато досліджень. Так деякі дослідники встановили, що окремі антистазини й кінінази мають можливість інгібувати кінін-каліккреїновий механізм, що вважається ключовим ноцицептивним шляхом [16, 22].

Протизапальний ефект є більш дослідженим та встановленим. Так із мексиканської п'явки був виділений антистазин, що є сильним блокатором фактора Ха та виконує інгібуючу функцію на кінін-каліккреїнову систему. Фактор Ха в свою чергу виступає каталізатором протромбіну і має ключову роль у коагуляційному каскаді [3]. За дослідженнями антистазин виконує як протизапальну, так і антикоагулянтну функцію [27].

Катепсин G й еластаза в нейтрофілах людини також провокують активацію фактора Ха, що є стимулятором протромбіну. І так в підсумку пригнічення цими речовинами може провокувати ще додаткову

антикоагулянтну дію [28].

1.2.6 Протимікробний ефект

В теперішній час тільки 2 ключові молекули виділень МП (хлороміцетин й дестабілаза) викликають атимікробний ефект. Так за дослідженнями дестабілаза виконує β -глікозидазну активність для подальшого розриву зв'язків α β 1-4, та є значимою у пептидоглікановому прошарку у стінках бактеріальних клітин. Тому видно, що цей ефект є аналогічним до впливу лізоциму або ж мурамідози в слині й слізній рідині людини [30]. Науковці також встановили, що антимікробна активність має залежність не тільки від активності ферментів глікозидази, а й включає в себе неферментативні складники. Ще однією речовиною у виділеннях МП є левоміцетин, який також виступає дуже сильним антибіотиком, але даних щодо цієї молекули дуже мало. Наступними виділеними з МП речовинами із антимікробним ефектом є теромізін, пептид В та теромацин [3, 22].

1.2.7 Інші можливі ефекти біологічно активних речовин медичної п'явки

За багатьма *in vitro* дослідженнями встановлено протионкологічний ефект в виділених речовинах у слині МП. Так як зазвичай коагуляція має зв'язок із утворенням метастазів та подальшим розвитком пухлин, інгібування цього зв'язку також може виявляти протипухлинну дію. Гірудин є однією із найбільш досліджених речовин в цьому плані, особливо під час утворення метастазів при мезотеліомі. Також вказується, що деякі інші речовини-антикоагулянти мають таку ж саму дію та при цьому чинять вплив на

зменшення кількості та росту клітин й ангіогенез пухлини [8]. За іншими дослідженнями показано, що речовини у слині МП провокують апоптоз і подальшу диференціацію клітин, що в подальшому веде до того, що клітинний цикл зупиняється [5, 14]. Також є дані щодо впливу БАР МП, який протистоїть дегенерації клітин. Так, наприклад, дестабілаза, бделластазин й гірудин є цитопротекторами. Вони проявляють позитивну каталізуючу дію, в основному на нейрони, але щодо цього також недостатньо даних [17].

1.3 Лікування медичними п'явками – загальна перспектива

ГТ та фармакологічні препарати на основі секрету слинних залоз МП на сьогодні ефективно використовують із метою профілактики та лікування багатьох захворювань. У цей перелік захворювань входять: псоріаз, серцева недостатність, гіпертонічна хвороба, інфекційний міокардит, стенокардія, радикулопатії, артрити, остеохондрози, артрози, варикози та інші судинні і не тільки розлади [1-4].

У медичній практиці зарубіжних країн МП широко використовують при трансплантаціях із метою усунення застою венозної крові, лікування захворювань нервової системи, до того ж із превентивною антибіотикотерапією [14]. Також гірудотерапію в останні роки почали використовувати в лікуванні інфекційних захворювань, для профілактики онкологічних захворювань і терапії раку, жіночому й чоловічому безплідді, діабеті, захворюванні передміхурової залози, бронхіальній астмі [23, 24, 26].

Екстракти слини МП також досліджувалися щодо можливого впливу на церебральне ішеміє-реперфузійне пошкодження. Однак хоча, як зазначалося раніше, екстракти слини МП індукують апоптоз, ці дослідження показали, що екстракти мають протилежні дії, захищаючи клітини головного мозку від ішемічно-реперфузійного пошкодження. Значні зміни рівнів

супероксиддисмутази, оксиду азоту та малонового діальдегіду, а також експресії молекул адгезії були виявлені на клітинах головного мозку, оброблених екстрактами слини МП [7].

При укусі МП гіалуронідаза і колагеназа відкривають доступ до тканин і судин; розширення судин відбувається під дією гістаміноподібних молекул; пригнічуються функції тромбоцитів, активність кінінів і коагуляційний каскад; і запальні реакції пригнічуються. Крім того, при цьому спостерігається знеболююча та протимікробна дія. В експериментах на мишах було показано позитивний вплив на відновлення ран/тканин [30].

Немає єдиної думки щодо тривалості застосування і кількості одночасно застосовуваних МП. Ці показники можуть змінюватись залежно від клінічної оцінки лікаря. Загальна тривалість ГТ є ще одним нез'ясованим питанням. Лікарі повинні враховувати період кровотечі після застосування, який може спричинити надмірну крововтрату. Рекомендується клінічний моніторинг і лабораторні дослідження (аналіз крові). Необхідність переливання крові пов'язана з кількістю застосованих МП, тривалістю їх застосування, станом хворого та супутньою патологією [1, 19, 21].

Є деякі потенційні ускладнення щодо ГТ. Слід враховувати наявність алергії на МП і виділення їх БАР. Інфекція – це серйозний стан, який демонструє широку варіабельність від місцевих інфекцій до бактеріємії. Антибіотикопрофілактика істотно знижує ризик зараження від МП. Крім того, МП можуть бути переносниками деяких вірусів, грибів і паразитів у тварин, але, здається, застосування МП до людей також викликає інфекцію. Однак ці ускладнення рідкісні, а найпоширенішими побічними ефектами є свербіж і кровотеча в області застосування. Ці несприятливі наслідки можна усунути невеликими втручаннями [10, 29]. Ортостатична гіпотензія та вазовагальні симптоми можуть виникати, особливо у пацієнтів літнього віку. Також повідомлялося про регіональну лімфаденопатію. ГТ зазвичай залишає шрам, тому пацієнти повинні бути проінформовані про це, особливо перед нанесенням на окремі частини тіла. Оскільки ця терапія має потенційний ризик

захворювань, що передаються через кров, повторне використання МП суворо заборонено [18].

Отже, ГТ є цінною традиційною технікою з сильною біохімічною дією. Але хоча способи дії та БАР ще чекають подальших досліджень, їхня користь при певних захворюваннях уже очевидна. Слід зазначити, що ГТ не є методом лікування сама по собі, але вона може бути важливою частиною комплексного підходу [18, 28].

1.4 Характеристика кровотворення у лабораторних щурів

Кровотворення – це процес підтримки в крові сталого рівня формених елементів, під час якого зберігається рівність між кількістю новоутворених клітин крові та кількістю втрачених. Еритроцити в середньому мають тривалість життя 120 днів, перед тим як вони будуть фагоцитовані і потім перетравлені макрофагами у селезінці. Тривалість життя різних лейкоцитів може варіювати від кількох днів (нейтрофіли) до 20-30 років (деякі Т-лімфоцити), рис. 1.1 [31]. Якщо коротко, кровотворення – це процес, за яким організм утворює нові клітини крові. Основною функцією кровотворення є забезпечення достатньою кількістю формених елементів крові для нормального функціонування організму.

Контроль кровотворення здійснюється складними ефективними механізмами, що забезпечують регуляцію та постійну підтримку оптимальної кількості кожного типу клітин крові [32]. Ці механізми при цьому є достатньо гнучкими, що дає можливість збільшувати хід гемопоезу у 10-20 разів у разі інфекції або втрати крові. Більш того кожен тип інфекції неоднаково впливає на кровотворення. Так, наприклад, деякі бактерійні інфекції, викликані бактеріями, провокують вибіркоче збільшення вироблення нейтрофілів, при цьому відповіддю на зараження є зростання рівня еозинофілів у крові. З цієї

причини дослідження лейкоцитарної формули крові можна застосовувати щодо діагностики як інфекційних так і інших запальних захворювань [32, 33].



Рис. 1.1 Схема кровотворення за І.Л. Чертковим та І.О. Воробйовим [31]

Можна виокремити основні механізми контролю кровотворення:

- 1) контролюється винятково гормонами, як-от тромбопоетин, еритропоетин і гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор (ГКСФ);
- 2) контролюється механізмами відтворення «аномальних», тобто нетипових клітин, що може призвести загалом до порушення нормальної роботи кровоносної системи;
- 3) регуляція за допомогою елементів імунної системи (макрофаги та лейкоцити), що можуть здійснювати контроль шляхом розпізнавання та видалення «аномальних» клітин;
- 4) контроль за допомогою взаємодії з іншими функціональними системами організму (нервовою та ендокринною).

Механізми регуляції гомеостазу кровотворення в організмі:

- 1) видалення деяких клітин за допомогою стимулювання апоптозу;

2) контроль рівня продукування цитокінів клітинами стромальної тканини кісткового мозку;

3) продукція цитокінів іншими типами клітин, як активованими Т-лімфоцитами, так і макрофагами;

4) регулювання експресії рецепторів до кровотворних факторів росту (стимуляторів кровотворення) у гемопоетичних стовбурових клітинах та у клітинах, що знаходяться в перехідному стані (ще не досягли зрілості) і проходять подальшу диференціацію.

Якщо один або декілька із цих регуляторних механізмів будуть порушені, це може призвести до серйозних і навіть летальних змін у функціонуванні цілого організму. Прикладом можуть слугувати патологічні зрушення в експресії певних цитокінів, що регулюють гемопоез, та їхніх рецепторів і як наслідок відбувається нерегульоване проліферування клітин і в подальшому виникнення окремих типів лейкемії [33, 34].

В характеристику кровотворення також входять процеси агрегації тромбоцитів, фагоцитозу, синтезу гемоглобіну та інші важливі процеси, що й забезпечують нормальну функцію крові.

Еритропоез – це процес структурної, метаболічної та функціональної диференціації, починаючи від проліферації поліпотентної стовбурової клітини і закінчуючи формуванням зрілих червоних кров'яних клітин (еритроцитів), який відбувається в кістковому мозку. Еритроцити утворюють гемоглобін, що забезпечує транспортування кисню до тканин тіла. Процес еритропоезу контролюється різними факторами, зокрема гормоном еритропоетином, який виробляється в нирках. Порушення процесу еритропоезу може призвести до розвитку різних захворювань, таких як анемія.

Мегалобластичний тип еритропоезу – це тип еритропоезу, що відбувається з участю мегалобластів, аномально великих клітин, які фактично з'являються в кістковому мозку та крові при дефіциті вітаміну В12 та фолієвої кислоти. Цей тип еритропоезу полягає у процесі дозрівання клітин, коли в їх цитоплазмі поступово накопичується гемоглобін, відбувається конденсація

ядерного хроматину, а також інволюція ядра [31, 35].

Процес мегалобластичного типу еритропоезу фактично спричинений дефіцитом вітаміну В12 та фолієвої кислоти, який є необхідним для нормального функціонування еритроїдних клітин і синтезу ДНК. При дефіциті цих вітамінів процес синтезу ДНК у клітинах зупиняється, що призводить до збільшення розміру клітин та зменшення кількості еритроцитів. Тривалість життя мегалоцитів становить 2-3 тижні та ці клітини легко піддаються гемолізу.

При кисневому голодуванні, викликаного різними причинами, кількість еритроцитів у крові зростає. При цьому місцеве кисневе голодування кісткового мозку не призводить до посилення еритропоезу. Дослідженнями встановлено, що плазма крові тварини, що зазнавала кисневого голодування, при переливанні іншій нормальній тварині, починає стимулювати у нього еритропоез [36].

При кисневому голодуванні, що викликане вдиханням газових сумішей з низьким вмістом кисню, анемією, тривалим перебуванням на великих висотах або захворюванням органів дихання в організмі підвищується кількість речовин-стимуляторів кровотворення – еритропоетинів. Еспериментально доведено, що у тварин після видалення нирок еритропоетини в крові більше не утворюються. З порушенням продукування еритропоетинів багато дослідників пов'язують різні захворювання системи крові, такі, як недостатня продукція еритроцитів і зменшення їх кількості в крові (анемії), або ж надлишкову продукцію і збільшення їх кількості (поліцитемію) [36, 37].

Лейкоцитопоез — процес утворення лейкоцитів (білих кров'яних клітин) в кровотворній тканині, що відбувається в кістковому мозку, селезінці, лімфатичних вузлах і тимусі. Лейкоцитопоез включає декілька стадій: диференціація гемопоетичних стовбурових клітин у клітинах-пропередниках лейкоцитів, їх диференціація і дозрівання в спеціалізовані типи лейкоцитів (лімфоцити, моноцити, гранулоцити та ін.).

Лейкоцити зазвичай поділяють на 2 групи: гранулоцити або зернисті (нейтрофіли, еозинофіли та базофіли) і агранулоцити або ж незернисті (лімфоцити і моноцити) [32-35].

Регуляція лейкоцитопоезу є складним процесом, який забезпечується за допомогою взаємодії різноманітних факторів й механізмів. Вирішальне значення для впливу на лейкоцитопоез відіграють цитокіни (інтерлейкін-3, інтерлейкін-6 і ГКСФ), гематопоетичні ростові фактори (еритропоетин і макрофагоцитарний колонієстимулюючий фактор (МКСФ)), гормони (глюкокортикоїди, естрогени, андрогени і тироксин) й рецептори на поверхні лейкоцитів (рецептори для інтерлейкіну-3, для інтерлейкіну-7 і ГКСФ) [36].

Питання регуляції лейкоцитопоезу вивчене недостатньо, постійно виходять нові статті з уточнюючими даними. Також мало вивченою є роль нервової системи в регуляції лейкоцитопоезу, хоча чимала інервація кровотворних тканин також має біологічне значення. Так в експериментальних умовах визначено, що подразнення симпатичних нервів призводить до збільшення кількості нейтрофілів в крові, а подразнення блукаючого нерва – зменшення кількості лейкоцитів. Так за даними Ф. Чубальського [32], подразнення блукаючого нерва спонукає перерозподіл лейкоцитів в крові: їх вміст наростає в мезентеріальних судинах і зменшується в периферичних судинах, а подразнення симпатичних нервів дає абсолютно протилежний ефект.

Також необхідно зазначити, що після їжі на пікі шлункового травлення, збільшується вміст лейкоцитів у крові, яка циркулює в судинах. Це явище називається перерозподільним або ж травним лейкоцитозом [38]. Учнями знаменитого фізіолога В.П. Павлова показано, що травний лейкоцитоз може бути викликаний також умовнорефлекторним шляхом [33].

За експериментами С.Н. Чернігівського, органи системи крові (кістковий мозок, селезінка, лімфатичні вузли) мають значну чисельність рецепторів, подразнення яких викликає різноманітні фізіологічні реакції. Тож, можна стверджувати про двосторонній зв'язок кровотворних органів з нервовою системою. При цьому вони отримують сигнали з центральної

нервової системи для регуляції їх стану і є джерелом рефлексів, що змінюють стан органів системи крові і організму в цілому.

Больове роздратування, емоційне збудження, стреси, різноманітні нервові напруження, фізичні та емоційні перенавантаження викликають збільшення кількості лейкоцитів у крові [36].

Гормональні зміни також мають значний вплив на лейкопоез, так при введенні адреналіну, глюкокортикоїдів відбувається зміна кількості лейкоцитів в крові. Як нервові, так і гуморальні впливи на лейкоцитопоез опосередковують свою дію на кістковий мозок через лейкопоетини в макрофагах, що утворюються в кісткового мозку. В сучасних умовах лейкоцитопоез досліджується багатьма науковцями, які знаходять все нові речовини для впливу на систему крові, як стимулювання лейкопоезу, так і його пригнічення [35-37].

1.5 Зміни процесу кровотворення у лабораторних щурів в різних фізіологічних умовах

Процес кровотворення – це біологічний процес, що відбувається в кістковому мозку, і який реагує на зміни в залежності від різноманітних фізіологічних умов організму.

1. Вагітність. Протягом періоду вагітності, процес кровотворення прискорюється для задоволення підвищеного попиту на кров для забезпечення плоду киснем і поживними речовинами.

2. Фізичні навантаження та будь-яка фізична активність. Внаслідок інтенсивних фізичних навантажень, організм потребує більше кисню, що призводить до збільшення виробництва червоних кров'яних тілець для його транспортування.

3. Висота. Люди, які проживають на високій висоті, де вміст кисню в

повітрі нижчий, матимуть більше червоних кров'яних тілець, оскільки зменшений вміст кисню у повітрі вимагає більш ефективного його транспортування до тканин організму.

4. Вік. Процес кровотворення також трансформується з віком. У немовлят кровотворення відбувається в більшості кісток, а у дорослих в основному в черепних кістках, хребцях, грудній кістці та кістках тазу.

5. Захворювання та інфекції. Інфекції й хвороби можуть підвищити виробництво білих кров'яних тілець для боротьби в подальшому з хвороботворними мікроорганізмами.

6. Травлення. Білкова недостатність або недостатність вітамінів та мінералів, необхідних для нормального кровотворення, таких як вітамін В12 і залізо, може призводити до анемії.

7. Гіпоксія. Недостатній вміст кисню у повітрі або ж нездатність організму ефективно використовувати кисень, як то відбувається під час захворювань легень або/і серця, може призвести до стимулювання кісткового мозку виробляти більшу кількість червоних кров'яних тілець.

8. Стрес. Під час різних стресових ситуацій організм виробляє гормони стресу, такі як кортизол, які можуть підвищити виробництво білих кров'яних тілець, які є частиною імунної системи організму.

Всі ці фізіологічні зміни впливають на процес кровотворення, генеруючи організм пристосовуватися до змінених умов життя і потреб.

Також фізіологічні фактори демонструють, як важливо для кісткового мозку швидко та ефективно реагувати на трансформації у фізіологічних умовах для підтримки гомеостазу організму [4, 39, 40].

Зазначимо зрушення кровотворення, які відбуваються з віком. Під час вікових змін в організмі людини і тварин звичайно відбуваються зміни в системі кровотворення. Подібно до інших органів і систем, кровотворення також піддається впливу фізіологічного старіння. Здебільшого число еритроцитів та лейкоцитів трансформується зі зростанням віку [41].

Таким чином, загалом вплив БАР МП є достатньо вивченим, цим займається

безліч науковців, але питання впливу на кров є досить широким і, за дослідженнями показано, що виділення МП дуже різні, мають багато ефектів і окремі з них все ж таки потребують уточнення і подальших досліджень.

2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Об'єкти та матеріали дослідження

Лабораторні щури. Експериментальні дослідження зазвичай проводять на білих нелінійних статевозрілих лабораторних щурах [42]. Для дослідження використовують тварин, які перед цим пройшли карантинний режим та не мали зовнішніх проявів будь-яких захворювань. Тварини утримуються в спеціалізованому віварії в стандартних пластмасових клітках з природним та додатковим штучним освітленням, температура в приміщенні 22-24 °С. Тварин годують збалансованим комбінованим кормом, щури також мають вільний доступ до питної води та їжі [42, 43]. Всі дії з тваринами мають проводитись з дотриманням регламентованих правил та норм щодо поводження з лабораторними тваринами. Це принципи біоетики, законодавчі вимоги та норми, що відповідають положенню «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (Страсбург, 1986), Порядок проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах, Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» й Положення про Комітет з питань біоетики [44]. Дослідження потрібно здійснювати в один і той же час доби, краще до обіду [43].

Медичні п'явки. Для участі в експерименті зазвичай беруть голодних товарних медичних п'явок (*Hirudo verbana* Cargen, 1820). Це тварини, вік яких приблизно 7-8 місяців. Запорізький національний університет вирощує на базі навчально-науково-дослідної лабораторії клітинної та організменної біотехнології МП за санітарно-епідеміологічним висновком МОЗ України. Цих МП останній раз годували кров'ю великої рогатої худоби близько 3-4 місяців до цього. МП тримають у великих посудинах (3 л) із дехлорованою відстояною водогінною водою: ситі по 10-15, голодні – по 15-25 тварин за температури +23-24°C [29].

Отримання зразка крові для дослідження. Дослідних варин, що були під наркозом виводили з експерименту методом декапітації, збирали артеріовенозну кров і стабілізували гепарином [43].

Схема експерименту. В дослідження взято групу старих нелінійних лабораторних щурів віком 20-24 місяці (n=12, самці), яких було поділено на 2 групи: 1) 6 щурів, які споживали звичайну відстояну водопровідну воду впродовж місяця; 2) 6 щурів, які споживали культуральну воду з-під МП впродовж місяця. Тварин годували збалансованим комбікормом. Щури мали доступ до питної та культуральної води без обмежень, а до їжі – в період між 9:00 – 17:00. Тварин утримували в однакових умовах: у стандартних пластмасових клітках при температурі 22-24 °C при природному й додатковому штучному освітленні в період з 8 до 17 години. Підстилкою слугувала тирса.

Для отримання культуральної води з-під МП брали голодних тварин віком 5 місяців, відсаджували у бутлі об'ємом 3 л у кількості 25 тварин, які культивували 5 діб. Для випоювання експериментальної групи тварин брали культуральну воду без розведення, яку перед використанням фільтрували через паперові фільтри для видалення великих часток продуктів життєдіяльності п'явок (слизу, харчової линьки тощо).

В отриманих по завершенні експерименту зразках крові після декапітації тварин аналізували загальну кількість лейкоцитів, лейкоцитарну формулу крові, фагоцитарну активність нейтрофілів та лейкоцитарні індекси.

2.2 Методи дослідження

2.2.1 Визначення загальної кількості лейкоцитів

Кількість лейкоцитів аналізують за стандартною методикою. Досліджувана венозна кров стабілізована антикоагулянтом (гепарином). В

лунку серологічного планшету додають 0,4 мл 5% розчину оцтової кислоти, підфарбовану декількома краплинами розчину метиленового синього, щоб зафарбувалися ядра лейкоцитів та 0,02 мл стабілізованої крові [25, 35]. Суміш ретельно перемішують піпеткою та залишають на 1-2 хв, поки не відбудеться повне розчинення еритроцитів, після чого знову сумлінно перемішують та заповнюють нею камеру Горяєва, лишаючи її в горизонтальному положенні на 1 хв, щоб лейкоцити осіли. Лейкоцити рахують під мікроскопом у 100 великих квадратах камери Горяєва при малому збільшенні (окуляр 7×, об'єктив 20×).

Розрахунок чисельності лейкоцитів роблять за формулою:

$$X = a \times 50, \quad (2.1)$$

де X – число лейкоцитів у 1 мкл крові ($\times 10^9/\text{л}$);

a – число лейкоцитів у 100 великих квадратах [45-47].


2.2.2 Визначення лейкоцитарної формули крові

Дослідження зафарбованих мазків крові. Мазки крові для морфологічного дослідження готують за стандартною методикою [46, 48]. Висушені на повітрі мазки крові фіксують етиловим спиртом протягом 5 хв, потім 4 хв роблять експозицію у фосфатному буфері Соренсена (рН 6,8). Найчастіше використовують фарбування 10-15% розчином Романовського-Гімза протягом 35 хв, після чого ще раз ополіскують у дистильованій воді, диференціюють у 0,01% розчині соляної кислоти на дистильованій воді, щоб видалити надлишки фарби, ополіскують у декількох частинах дистильованої води, висушують на повітрі. Пофарбовані мазки крові досліджують під мікроскопом, при цьому використовують об'єктив $\times 100$ та імерсійне масло. Імерсійне масло після дослідження видаляють з мазка сухою ваткою.

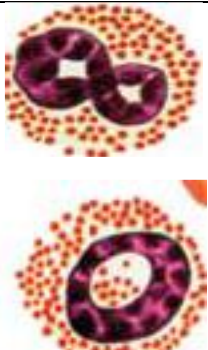

Лейкоцити диференціюють за певними морфологічними ознаками, рахують 200 клітин. Після завершення аналізування 200 лейкоцитів визначають лейкоцитарну формулу — абсолютне та відносне співвідношення різних видів лейкоцитів.

У зафарбованих мазках крові щурів визначають форму, розмір, забарвлення клітин та їхніх структурних елементів – ядра, цитоплазми, включень та пропорції між форменими елементами досліджуваної крові (табл. 2.1).





Таблиця 2.1 – Морфологічний опис та ознаки лейкоцитів периферичної крові лабораторних щурів [38, 46, 48].

Морфологічний опис	Зображення
1	2
<p>Лейкоцити.</p> <p>Залежно від властивостей цитоплазми і характеру зернистості їх ділять на гранулоцити/зернисті (еозинофіли, базофіли і нейтрофіли) та агранулоцити/незернисті (лімфоцити і моноцити). Кількість лейкоцитів дорівнює $(7,3-14,3) \times 10^9/\text{л}$ (Г/л).</p>	
<p>Базофіли.</p> <p>Великі округлої або овальної форми клітини (11–17 мкм). Цитоплазма блідо-рожева або сіро-блакитна, що обумовлено розчиненням гранул під час приготування мазка. Великі гранули є округлими або розпливчастими, зафарбовані в темно-фіолетовий або ж чорний колір, нерідко можуть бути зруйновані, а на їх місці утворюються вакуолі. Ядро неправильної форми, сферичне чи посегментоване, погано помітне, дуже блідо фарбується за рахунок переважання еухроматину.</p>	

Продовження таблиці 2.1.

1	2
<p>Еозинофіли.</p> <p>Великі округлої форми клітини (9-22 мкм). Ядро – фіолетове, цитоплазма блідо-блакитна з рожево-червоною зернистістю (гранули круглі). Гранули густо заповнюють цитоплазму.</p>	
<p>Нейтрофіли.</p> <p>Клітини круглої форми (9,5-14,5 мкм). В залежності від форми і ступеня забарвлення ядра виділяють міелоцити, юні, паличкоядерні й сегментоядерні нейтрофіли.</p>	
<p>Міелоцити.</p> <p>Найбільш молоді клітини крові, що мають нерівномірно забарвлене в фіолетовий колір масивне кругле або овальне ядро. Цитоплазма рожевого або блідо-синього кольору, з дуже дрібною світло-рожевою зернистістю. У крові здорових тварин міелоцити не зустрічаються.</p>	
<p>Юні нейтрофіли.</p> <p>Ядро – фіолетове: широке з центральним вдавленням (бобоподібної форми) або дещо витягнуте (підковоподібне). Світлі ділянки хроматину чергуються з більш темними. Цитоплазма рожевого кольору, погано фарбується, з дрібною, світло-рожевою зернистістю. У периферичній крові дорослої тварин не завжди вдається виявити.</p>	

Продовження таблиці 2.1.

1	2
<p>Паличкоядерні нейтрофіли.</p> <p>Характеризуються трансформацією ядра в паличкоподібну форму. Ядро забарвлене нерівномірно в темно-фіолетовий колір, більш-менш однакового діаметра по всій довжині, але може бути зігнуте у вигляді півмісяця. Цитоплазма блідо-рожевого кольору, з азурофільною зернистістю, має багато дрібних блідих рівномірно розташованих гранул.</p>	
<p>Сегментоядерні нейтрофіли.</p> <p>Відрізняються від паличкоядерних лише ядром, яке складається з 2-5 і більше сегментів, з'єднаних тонкими, ледь помітними перемичками. Ядро забарвлене нерівномірно в темно-фіолетовий колір.</p>	
<p>Лімфоцити.</p> <p>За розміром ділять на малі (6-9 мкм), середні (10-14 мкм) і великі (14 мкм й більше). Домінуюча складова лімфоцита – ядро, яке округлої або овальної форми, сильно забарвлене в темно-синій колір. Цитоплазма світло-синя з перинуклеарною зоною (просвітлення навколо ядра).</p>	
<p>Моноцити.</p> <p>Це великі клітини (12-24 мкм), округлої або дещо неправильної форми. Ядро має різноманітну форму: бобоподібну, округлу або підковоподібну; забарвлена нерівномірно в слабо-фіолетовий колір з темними плямами. Цитоплазма сіро-блакитного, сіро-синюватого кольору, біля ядра має дрібну пилеподібну зернистість.</p>	

Основою для дослідження лейкоцитарної формули є здатність суміші основних барвників (азур) і кислих барвників (еозин) закрашувати складові клітин крові в різноманітні кольори та їх відтінки. Якщо мазок зроблений неякісно це приводить до того, що лейкоцити розподіляються нерівномірного і це дає їх неправильне співвідношення при підрахунку. Також якщо мазок товстий формені елементи в крові стануть не помітними. Для зручності підрахунку зазвичай користуються гематологічним лічильником (може бути додаток на телефоні), або ж ведуть записи клітин на папері. Також дуже важливим є те, що більш великі форми клітин крові (нейтрофіли, моноцити та ін.) знаходяться здебільшого на периферії, а більш дрібні (лімфоцити та ін.) розташовуються ближче до центра. Популяції клітин рахують завжди типово: спочатку половину по одному поздовжньому краю в мазку, а іншу половину по протилежному краю. Рахують за системою зигзагу: близько 3-4 полів зору по краю мазка, згодом 3-4 поля зору прямо до середини мазка, потім у 3-4 полях зору паралельно до краю мазка і знову потім повертаються до краю мазка - також 3-4 поля. І так доти, доки не не буде половини клітин, а потім потрібно перейти на протилежний бік, де рахують іншу половину дослідних клітин. Результати потрібно відобразити у таблиці, де буде показаний процент кожного виду лейкоцитів відносно до інших [38, 48] (табл. 2.2) .

Таблиця 2.2 - Лейкоцитарна формула крові білих нелінійних щурів, % [48]

Базофіли	Еозинофіли	Нейтрофіли			Лімфоцити	Моноцити
		Юні	Паличко- ядерні	Сегменто- ядерні		
0	0,8-5,0	0	0,1-0,7	13,7-30,26	44,0-97,9	1,6-5,2

2.2.3 Розрахунок лейкоцитарних індексів

Лейкоцитарні індекси, у яких використано параметри лейкоцитарної формули, вважаються показниками, що характеризують ступінь виразності ендогенної інтоксикації в організмі людини та тварин. Встановлено, що вони мають діагностичне та прогностичне значення, оскільки дозволяють оцінити роботу ефекторних механізмів імунної системи, а також рівень імунологічної реактивності, що визначають процес формування неспецифічних адаптаційних реакцій.

Лейкоцитарний індекс (ЛІ) – це відношення кількості (%) лімфоцитів до нейтрофілів (паличкоядерні, сегментоядерні), що відображає взаємини гуморальної та клітинної ланок імунної системи [49].

Індекс Кребса (ІК) є відношенням загальної кількості (%) нейтрофілів до лімфоцитів; побічно характеризує, по-перше, активність фагоцитарних реакцій та факторів специфічного імунітету, по-друге, їх участь у підтримці загальної реактивності організму.

Лейкоцитарний індекс інтоксикації (ЛІІ) – показник, що характеризує ступінь ендогенної інтоксикації та гостроти запалення. Розрахунок проводиться за формулою Кальф-Каліфа на підставі даних при аналізі мікроскопії лейкоцитарної формули. Лейкоцитарний індекс інтоксикації являє собою співвідношення рівня (%) нейтрофілів (паличкоядерних + сегментоядерних) та суми лімфоцитів, моноцитів та еозинофілів; характеризує активність процесів фагоцитозу та проліферації нейтрофілів. Автор вводить у формулу цифрові значення деяких клітин, щоб призвести до «біологічного рівноваги» позитивні і негативні впливу, обумовлені значенням кожної клітини. У нормі лейкоцитарний індекс інтоксикації у людини становить $1,0 \pm 0,5$ у.о. Вперше цей метод був використаний у 1941 р., останнім часом широко застосовується у загальній та гнійній хірургії, гінекології, онкології, лорпатології, дерматології [47, 49].

Ядерний індекс (ЯІ) – це відношення загальної кількості (%) моноцитів та паличкоядерних нейтрофілів до рівня сегментоядерних нейтрофілів. Він характеризує швидкість регенерації нейтрофілів та моноцитів, а також тривалість їх циркуляції у кров'яному руслі.

Індекс співвідношення нейтрофілів та моноцитів (ІСНМ) показує рівновагу між кількістю (%) нейтрофілів (паличкоядерні + сегментоядерні) та моноцитів. Він дозволяє судити про співвідношення компонентів мікрофагально-макрофагальної системи.

Індекс співвідношення лімфоцитів та моноцитів (ІСЛМ) показує баланс між лімфоцитами та моноцитами та відображає взаємини афекторної та ефекторної ланки імунологічного процесу. Моноцити крові можуть мігрувати в тканини організму та диференціюватися в макрофаги, а потім спільно з лімфоцитами брати участь у процесах розпізнавання антигенів. Отже, величина індексу співвідношення лімфоцитів та моноцитів характеризує ступінь алергізації організму [47, 49].

2.2.4 Визначення фагоцитарної активності нейтрофілів

Фагоцитоз – це процес поглинання фагоцитами мікробних клітин, вірусів та власних клітин організму. Дослідження фагоцитозу дозволяє виявити порушення клітинної ланки імунітету. Для оцінки фагоцитозу досліджують два основні показники: фагоцитарне число і фагоцитарний індекс. Перший показник визначає здатність нейтрофілів до поглинання сторонніх частинок (шляхом розрахунку кількості сторонніх об'єктів, поглинених фагоцитами). Норма цього показника становить 5-10 сторонніх частинок. Другий показник характеризує процес перетравлення нейтрофілами мікробних клітин [39]. Нормальне значення показника фагоцитарного індексу має перевищувати 1,0. Також можуть досліджуватися й інші показники

фагоцитозу, такі як кількість активних фагоцитів, фагоцитарний показник і фагоцитарна ємність крові. Фагоцитарний показник характеризує процент нейтрофілів, що беруть участь у процесі фагоцитозу. Ця величина має бути лише на рівні 65-95%. Розмір фагоцитарної ємності крові характеризує кількість мікробних тіл, поглинених фагоцитами 1 літра крові [26, 47].

Фагоцитарна активність нейтрофілів встановлювалась у за стандартним методом у тесті з дріжджами (*Saccharomyces cerevisiae*) [26]. Постановка реакції фагоцитозу досліджувалась так: до лунки планшету, що використовується для серологічних досліджень дозатором додавали 50 мкл цільної дослідної крові, що була стабілізована гепарином та додавали 50 мкл 1% суспензії дріжджів. Потім ретельно перемішували за допомогою піпетування та інкубували в термостаті протягом 30 хвилин за температури 37°C, кожні 10 хвилин струшували, а потім уже готували мазки, які треба було зафіксувати та зафарбувати за методом Папенгейма [26, 47]. Коли мазок був готовий, у різних його місцях рахували 200 нейтрофілів, використовуючи мікроскоп з імерсійний об'єктивом (об'єктив $\times 100$, окуляр $\times 7$).

У препараті рахували чисельність фагоцитів без дріжджів та з дріжджами, ще рахували чисельність дріжджів, поглинених на 1 нейтрофіл. Було досліджено такі показники фагоцитарної активності нейтрофілів, як фагоцитарний показник (процент нейтрофілів, що приймали участь у фагоцитозі, від загальної чисельності); фагоцитарне число (середня чисельність мікроорганізмів, що були поглинені 1 нейтрофілом) [47, 49].

2.2.5. Статистичні методи дослідження

Матеріали роботи систематизували та результати були представлені у розрахунках, виконаних, використовуючи пакет програм Microsoft XP «Excel», а статистичні підрахунки проведені з використанням пакету програм IBM SPSS

Statistics 20,0 (USA). Використовували методи параметричної статистики, а відмінності уважались достовірними за рівня значимості 0,05 ($p \leq 0,05$) [45].

Середнє арифметичне розраховували за формулою (2.2):

$$\bar{X} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} \quad (2.2)$$

де x_1, x_2 і т.д – певна ознака; n – це кількість вимірів цієї ознаки.

Різницю між будь-яким виміром з вибірки і середнім арифметичним цієї вибірки визначали відхиленням варіанти x_i від \bar{X} : $x_i - \bar{X}$.

Середнє квадратичне відхилення визначали за формулою (2.3):

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad (2.3)$$

де X_i – значення i -тої варіанти, $i=1, \dots, n$, \bar{X} – середнє арифметичне, а n – об'єм генеральної сукупності.

Похибку середнього значення визначали за формулою (2.4):

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

Оцінку достовірності різниць між групами визначали за методом Стьюдента за формулою (2.5):

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\Delta_1^2 + \Delta_2^2}}, \quad (2.5)$$

де \bar{X}_1 і \bar{X}_2 – середні значення в групах, Δ_1 і Δ_2 – помилки репрезентативності в групах [45].

3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1 Загальна кількість лейкоцитів та лейкоцитарна формула крові нелінійних лабораторних щурів старого віку при впоюванні культуральною водою з-під *Hirudo verbana*

Результати загальної кількості лейкоцитів та лейкоцитарної формули крові нелінійних лабораторних щурів старого віку контрольної та дослідної групи (впоювання культуральною водою з-під *H. verbana*) представлені в таблиці 3.1. Під час експерименту показник кількості лейкоцитів у експериментальній групі (впоювання культуральною водою з-під *H. verbana*) був вищим на 14,7% і складав $8,75 \pm 0,359$ Г/л ($p \leq 0,05$) при аналогічному показнику контрольних тварин $7,63 \pm 0,356$ Г/л, але показники були у межах норми [48]. За результатами проведеного дослідження (табл. 3.1) видно, що кількісні показники та відсоткове співвідношення сегментоядерних нейтрофілів та лімфоцитів крові не мали статистичних відмінностей ($p > 0,05$) у дослідній групі (впоювання культуральною водою з-під *H. verbana*) нелінійних лабораторних щурів старого віку порівняно з контрольною. Також не було виявлено достовірної різниці в відсотковому співвідношенні нейтрофілів загалом порівняно з контролем ($p > 0,05$). Однак абсолютний вміст нейтрофілів у дослідній групі щурів був вищим на 16,7% порівняно з контролем ($p \leq 0,05$).

Цікавим є те, що найбільша достовірна різниця спостерігалась в співвідношенні моноцитів – підвищення їх відносної кількості на 62,1% (від $3,75 \pm 0,382$ до $6,08 \pm 0,300\%$, $p \leq 0,05$) та абсолютної – на 82,7% (від $0,29 \pm 0,040$ до $0,53 \pm 0,040$ Г/л, $p \leq 0,05$), порівняно з контролем.

Вміст паличкоядерних нейтрофілів підвищився у відносних показниках в 2 рази та абсолютних – в 2,7 рази порівняно з контролем при $p \leq 0,05$, однак показники в обох групах були в межах референтних значень [48].

Таблиця 3.1 – Загальна кількість лейкоцитів та лейкоцитарна формула крові нелінійних лабораторних щурів старого віку при впоюванні культуральною водою з-під *Hirudo verbana* ($x_{\text{ср}} \pm m$)

Гематологічний показник	Од. вимір.	Контроль, n=6	Дослід, n=6	P
Кількість лейкоцитів	Г/л	7,63±0,356	8,75±0,359*	0,05
Сегментоядерні нейтрофіли	%	41,08±1,456	39,75±1,900	0,59
	Г/л	3,11±0,095	3,46±0,174	0,12
Паличкоядерні нейтрофіли	%	1,58±0,374	3,58±0,374*	0,004
	Г/л	0,12±0,034	0,32±0,041*	0,0047
Нейтрофіли всього	%	42,67±1,339	43,33±1,887	0,07
	Г/л	3,24±0,115	3,78±0,192*	0,04
Еозинофіли	%	4,33±0,494	2,25±0,461*	0,01
	Г/л	0,33±0,044	0,19±0,037*	0,03
Лімфоцити	%	49,25±0,642	48,33±2,257	0,71
	Г/л	3,76±0,214	4,24±0,328	0,25
Моноцити	%	3,75±0,382	6,08±0,300*	0,00097
	Г/л	0,29±0,040	0,53±0,040*	0,0015

Примітка. * – $p \leq 0,05$, що вказує на достовірну різницю між значеннями за t-критерієм Стьюдента.

Абсолютна кількість еозинофілів була нижчою на 42,4% ($p \leq 0,05$), а у відсотковому співвідношенні – на 48% ($p \leq 0,05$) у експериментальній групі лабораторних щурів старого віку (впоювання культуральною водою з-під *H. verbana*) порівняно з контрольною (табл. 3.1).

3.2 Лейкоцитарні індекси крові нелінійних лабораторних щурів старого віку при впоюванні культуральною водою з-під *Hirudo verbana*

Результати визначення лейкоцитарних індексів крові нелінійних лабораторних щурів старого віку контрольної та дослідної групи (впоювання культуральною водою з-під *H. verbana*) представлені в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2 – Лейкоцитарні індекси крові нелінійних лабораторних щурів старого віку при впоюванні культуральною водою з-під *Hirudo verbana*, ($x_{cp} \pm m$)

Показники, у.о.	Контроль, n=6	Дослід, n=6	P
Лейкоцитарний індекс (ЛІ)	1,16±0,051	1,14±0,114	0,864
Індекс Кребса (ІК)	0,87±0,038	0,91±0,074	0,605
Лейкоцитарний індекс інтоксикації (ЛІІ)	0,75±0,041	0,77±0,055	0,73
Ядерний індекс (ЯІ)	0,13±0,017	0,25±0,021*	0,0016
Індекс співвідношення нейтрофілів та моноцитів (ІСНМ)	12,16±1,572	7,20±0,460*	0,0231
Індекс співвідношення лімфоцитів та моноцитів (ІСЛМ)	13,82±1,405	8,07±0,613*	0,0071

Примітка. * – $p \leq 0,05$, що вказує на достовірну різницю між значеннями за t-критерієм Стьюдента.

За результатами проведеного дослідження встановлено достовірну різницю ($p \leq 0,05$) таких лейкоцитарних індексів крові нелінійних лабораторних щурів старого віку при впоюванні культуральною водою з-під *H. verbana* порівняно з контрольною групою: підвищення ядерного індексу (характеризує швидкість регенерації нейтрофілів та моноцитів, а також тривалість їх циркуляції у кров'яному руслі) на 92,3% (з 0,13±0,017 до

0,25±0,021 у.о.), зниження індексу співвідношення нейтрофілів та моноцитів (характеризує співвідношення компонентів мікрофагально-макрофагальної системи) на 40,8% (з 12,16±1,572 до 7,20±0,460 у.о.) та зниження індексу співвідношення лімфоцитів та моноцитів (показує баланс між лімфоцитами і моноцитами, відображає взаємини афекторної й ефекторної ланки імунологічного процесу) на 41,6% (з 13,82±1,405 до 8,07±0,613 у.о.) порівняно з контролем при $p \leq 0,05$.

Лейкоцитарний індекс (відображає взаємини гуморальної та клітинної ланок імунної системи), індекс Кребса (характеризує активність фагоцитарних реакцій і факторів специфічного імунітету, їх участь у підтримці загальної реактивності організму) та лейкоцитарний індекс інтоксикації (характеризує ступінь ендогенної інтоксикації та гостроти запалення) не мали достовірної різниці ($p > 0,05$) в показниках крові дослідних щурів старшого віку (випоювання культуральною водою з-під *H. verbana*) порівняно з контролем.

3.3 Фагоцитарна активність нейтрофілів крові нелінійних лабораторних щурів старшого віку при випоюванні культуральною водою з-під *Hirudo verbana*

Результати визначення фагоцитарної активності нейтрофілів крові нелінійних лабораторних щурів старшого віку контрольної та дослідної групи (випоювання культуральною водою з-під *H. verbana*) представлені в таблиці 3.3. За результатами проведеного дослідження встановлено достовірну різницю в фагоцитарній активності нейтрофілів крові нелінійних лабораторних щурів старшого віку при випоюванні культуральною водою з-під *Hirudo verbana* порівняно з контролем. Так фагоцитарний показник в дослідній групі щурів був на 6% вище (67,5±1,15% в контролі та 71,58±1,18% в досліді), а фагоцитарне число на 7,7% вище (4,16±0,113 у.о. в контролі та 4,48±0,072 у.о. в досліді) порівняно з аналогічними показниками контрольної групи

тварин при $p \leq 0,05$.

Таблиця 3.3 – Фагоцитарна активність нейтрофілів крові нелінійних лабораторних щурів старого віку при впоюванні культуральною водою з-під *Hirudo verbana*, ($\bar{x}_{cp} \pm m$)

Показники	Контроль, n=6	Дослід, n=6	P
Фагоцитарний показник, %	67,50±1,155	71,58±1,179*	0,032
Фагоцитарне число, у.о.	4,16±0,113	4,48±0,072*	0,045

Примітка. * – $p \leq 0,05$, що вказує на достовірну різницю між значеннями за t-критерієм Стьюдента.

Тож, за результатами проведеного дослідження встановлено достовірну різницю порівняно з групою контролю в таких показниках крові лабораторних щурів старого віку при впоюванні культуральною водою з-під *H. verbana*:

1) підвищення кількості лейкоцитів у дослідній групі на 14,7% порівняно з контролем при $p \leq 0,05$;

2) підвищення абсолютного вмісту нейтрофілів на 16,7%, підвищення відносної кількості моноцитів на 62,1% та абсолютної – на 82,7%, підвищення відносного вмісту паличкоядерних нейтрофілів в 2 рази та абсолютного – в 2,7 рази, зниження абсолютної кількості еозинофілів на 42,4% та відносної – на 48% порівняно з контролем при $p \leq 0,05$, разом з тим показники лейкоцитарної формули в обох групах були в межах референтних значень;

3) підвищення ядерного індексу на 92,3%, зниження індексу співвідношення нейтрофілів та моноцитів на 40,8% та зниження індексу співвідношення лімфоцитів та моноцитів на 41,6% порівняно з контролем при $p \leq 0,05$;

4) підвищення фагоцитарного показника на 6% та фагоцитарного

числа на 7,7% порівняно з контролем при $p \leq 0,05$.

Ці зміни в показниках крові можна вважати реакцією, що є проявом стимулюючого ефекту БАР МП. Також за даними літератури саме позитивний ефект впливу БАР МП відмічено у старих щурів, у яких активність периферичних органів імунного захисту є зниженою, якщо порівнювати їх з молодими лабораторними статевозрілими щурами. Це в першу чергу пов'язано із віковими інволюційними процесами як в центральних так і в периферичних органах імунної системи [26]. Варто відмітити, що в нашому випадку дослідна група тварин отримувала БАР МП шляхом випоювання, а не приставки МП.

За дослідженнями [22] екстракт МП активує лімфоцити периферичної крові. Після сеансів гірудотерапії відновлюється фагоцитарна та секреторна функції поліморфноядерних лейкоцитів, а також відбувається незначне зменшення кількості зрілих імунних клітин – $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ та підвищення $CD20^+$ лімфоцитів [26]. За даними [25, 26] екстракт МП впливає на збільшення спонтанної проліферації мононуклеарних клітин периферичної крові і в цей час зростає стимульована, що призводить до певного збільшення коефіцієнту стимуляції.

Підвищення фагоцитарного показника та фагоцитарного числа порівняно з контрольною групою тварин збігаються з даними інших статей про підвищення фагоцитарної активності нейтрофілів під впливом БАР МП. Адже нейтрофіли є першою лінією захисту від проникнення в організм різноманітних грибів, бактерій і інших найпростіших. Тому збільшення поглинальної активності може бути переконливим доказом підвищення функціональної захисної здатності клітин до фагоцитозу [10, 26, 29].

4 ОХОРОНА ПРАЦІ

Тема роботи присвячена вивченню впливу БАР МП на лейкоцитарні показники крові нелінійних лабораторних щурів при випоюванні культуральною водою з-під *Hirudo verbana*, під час роботи могла стикатися з екстреними та непередбачуваними ситуаціями та певними виробничими факторами при проведенні дослідів в лабораторії та роботі у віварії. Тому потрібно знати вимоги безпеки при митті лабораторного посуду, про техніку безпеки під час роботи з біоматеріалами, особливо кров'ю, з лабораторними тваринами, у нашому випадку лабораторними щурами та медичними п'явками. Ще треба знати вимоги безпеки в аварійних ситуаціях, правила пожежної безпеки в лабораторії, правила електробезпеки в лабораторії, правила роботи у віварії, вимоги до роботи на комп'ютері.

Дослідження виконували на базі навчально-науково-дослідної лабораторії клітинної та організменної біотехнології Запорізького національного університету. Перед початком робіт зі мною проводили інструктаж за інструкцією № 60 з охорони праці «При роботі з хімічними реактивами та скляним посудом» та № 62 «При роботі з електричними приладами».

Для виконання різних завдань біологічні матеріали зазвичай обробляють у лабораторіях, де можуть вирощуватися живі мікроорганізми, виокремлюватися органи, клітинні складові та здійснюватися багато інших дій. Аналіз різноманітних проб матеріалів, узятих у людей або тварин, діагностика захворювань, різні епідеміологічні та наукові дослідження і фармацевтичні розробки – це лише невелика частка дій, яка проводиться, використовуючи мікроорганізми. Щодня працівники біологічних лабораторій зустрічаються з небезпечними патогенами або ж їх продуктами, а тому для багатьох галузей питання біологічної небезпеки/безпеки є надзвичайно актуальними. В останній час деякими країнами вже було розроблено і

впроваджено нормативні акти з лабораторного біозахисту, за якими регулюється зберігання, користування біологічними матеріалами та доступ до них для подальшого забезпечення їх використання за призначенням [50-53].

На виконавців робіт в лабораторії можуть впливати різні небезпечні та шкідливі виробничі фактори:

- механічні (виробниче обладнання);
- біологічні (гельмінти, мікроорганізми, найпростіші, культури клітин тощо);
- хімічні (дезінфекційні засоби, реактиви, подразнюючі, канцерогенні, алергенні, мутагенні та ін. речовини);
- фізичні (випромінювання, електричний струм, підвищений вміст шкідливих речовин у повітрі робочої зони, недостатня освітленість, відхилення вологості і температури робочої зони від встановлених норм, тощо);
- людські (нервово-психічні, фізичні та ін. фактори);
- пожежна безпека [51-53].

Лабораторія повинна бути забезпечена електрикою, газом, засобами зв'язку, водопроводом, каналізацією, вентиляцією та опаленням.

Вимоги безпеки перед початком роботи. При вході в приміщення лабораторії співробітники повинні залишати верхній одяг, сумки та інші особисті речі у спеціально відведеному місці. Надягти спецодяг, який встановлено діючими нормами і перевірити наявність і справність приладів, вентиляції, штепсельних рознімачів, рубильників, наявність заземлення, перевірити освітленість робочого місця. Перед експлуатацією електромедичних приладів та іншого електричного устаткування треба впевнитися, що він прийнятий до експлуатації.

Вимоги безпеки під час роботи. Робоче місце має утримуватися в чистоті та в порядку, мати достатньо освітлення. При роботі треба застосовувати призначені для цього засоби індивідуального захисту. Пити воду, зберігати і вживати їжу, користуватися особистими речами дозволяється лише в

спеціально відведеному місці. Забороняється залишати електроустаткування включеним без догляду і працювати на несправному устаткуванні або ж без заземлення. Також не можна використовувати устаткування робіт, які для цього не призначені чи у невідповідних умовах. По закінченні роботи з будь-яким електроприладом необхідно відключити його від мережі. Для того, щоб запобігти перевтомі та не псувати свій зір під час користування оптичними приладами, а особливо при мікроскопірованні необхідно забезпечити правильне освітлення поля зору, що є передбаченим для даного типу мікроскопу або ж приладу [52].

При роботі з комп'ютером: загальний час безперервної роботи на комп'ютері не повинен перевищувати 6 годин за одну зміну, треба дотримуватись регламентованих перерв тривалістю 15 хвилин через кожен годину роботи.

При роботі з їдкими і вогнебезпечними засобами: основний запас цих речовин зберігається в спеціальному сховищі. Переливання, наповнення судин лугом чи концентрованою кислотою треба проводити піпеткою з гумовою грушею. Усі реактиви повинні мати чіткі написи. Судини з летучими речовинами мають відкриватися лише в момент використання. Відкривати посудини із концентрованими лугами, кислотами або ж розчинниками і готувати з них розчини дозволяється лише у витяжній шафі з включеною вентиляцією. Під час розведення концентрованої кислоти для уникнення розбризкування, в кислоту треба додавати воду, а не навпаки. Якщо пролились неотруйні розчини достатньо витерти поверхню столу ганчіркою із використанням гумових рукавичок. Якщо пролився луг – його потрібно засипати піском, далі видалити пісок і залити це місце сильно розведеною соляною або ж оцтовою кислотою. Після цього видалити кислоту ганчіркою, вимити стіл та рукавички водою. Категорично забороняється спільне збереження вогнебезпечних, легкозаймистих і вибухонебезпечних речовин разом з лугами і кислотами [51-53].

Вимоги безпеки при митті лабораторного посуду. Скляний посуд можна помити різними способами: очищати механічно за допомогою йоржів, а згодом обробити хімічним шляхом; занурити в мильний содовий розчин (має бути гарячим), посуд також кип'ятять у цьому миючому розчині. Перед тим, як мити посуд хромовою сумішшю, її необхідно промити водою для уникнення вибуху і викиду продукту реакції. Заходи щодо безпеки під час миття посуду з лугом або кислотою такі ж самі як і при роботі з кислотами і лугами. Після того, як помили посуд, його треба промити великою кількістю води, адже мийні розчини при змішуванні можуть давати побічні з'єднання.

Під час роботи з кров'ю треба користуватися тільки автоматичними піпетками. Якщо відбулось забруднення дослідною кров'ю спецодягу або робочого місця, одяг потрібно запарити, а стіл і руки вимити з 3% перекисом водню. Для дезінфекції різних лабораторних об'єктів у роботі найчастіше користуються 1-3% розчином хлораміну, автоклавуванням, а також кип'ятінням. Поточне прибирання приміщень лабораторії проводять лише із застосуванням дезінфікуючих розчинів. Повітря в приміщенні боксів, або ж загалом лабораторії, періодично має піддаватися дезінфекції бактерицидними лампами [50, 51].

Вимоги безпеки в аварійних ситуаціях:

- при виникненні пожежі потрібно діяти за наявною інструкцією з пожежної безпеки;
- під час припинення подачі електроенергії треба виключити усі ввімкнені в мережу електроприлади;
- під час травмування, отруєння або ж раптового гострого захворюванні потерпілий (свідок події) зобов'язується негайно сповістити про це завідувача лабораторією;
- працівники лабораторії мають вміти надати першу медичну допомогу під час нещасного випадку, а в аптечці швидкої допомоги мають бути конкретні медикаменти та перев'язувальні засоби;

- про аварію, яка сталась, і проведених після цього заходах з ліквідації її негайно повідомляють адміністрацію.

Вимоги безпеки по закінченні роботи:

- упорядкувати своє робоче місце;
- після роботи з кров'ю брудний посуд замочити у дезінфікуючих розчинах;
- поверхні робочих столів обробити дезінфікуючим розчином, руки обробити 70% етиловим спиртом, а потім помити теплою водою з милом.

Той, хто є черговим або ж співробітник, який іде з лабораторії останнім повинен: перевірити та закрити усі крани, вимкнути з мережі усе електрообладнання, за винятком того, що за технічним регламентом має працювати цілодобово, прибрати з приміщення лабораторії усі відходи, закрити вікна, двері та замкнути лабораторію на замок. Про всі недоліки і несправності, виявлені під час роботи, треба повідомляти завідувачу лабораторією [51, 52].

Правила пожежної безпеки в лабораторії. Всі приміщення лабораторії повинні відповідати вимогам пожежної безпеки згідно з ГОСТ12.1, 004-91 та мати засоби для гасіння пожеж згідно з ГОСТ12.4.009-83. Тому лабораторія має бути обладнана пожежними кранами із пожежними рукавами, мати вогнегасник на видному місці. Усі працівники лабораторії мають знати правила поводження з газовими приладами, вогненебезпечними та вибухонебезпечними речовинами, а також вміти поводитися з вогнегасником, протигазом та іншими засобами для гасіння пожежі, що є в лабораторії. Без дозволу завідувача лабораторією та особи, що є відповідальною за протипожежні заходи, заборонено установлювати лабораторні і нагрівальні прилади для проведення випробувань та перероблення електропроводки. Кожен співробітник лабораторії, який помітив задимлення, вогонь або інші ознаки пожежі повинен терміново викликати пожежну частину; повідомити завідувача лабораторією, який має вжити заходів для евакуації співробітників, обмеження поширення вогню та ліквідації пожежі [53].

Інструкція з техніки безпеки і правилам роботи з експериментальними тваринами. Тварини для проведення дослідів повинні надходити тільки до віварію. Щури, миші повинні до дослідів знаходитися замкненими в клітках. Категорично забороняється: тримати тварин поза клітками, залишаючи їх на кафедрі на ніч тощо. При фіксації щурів варто попередньо міцно захопити шкіру в потиличній області між вухами, після чого, тримаючи тварину у вертикальному положенні, накинути лямки на задні і передні кінцівки і закріпити їх. Тільки після такої попередньої підготовки тварину можна остаточно фіксувати у верстаті. Там, де це можливо, краще перед фіксацією тварину наркотизувати. По закінченні дослідів тварина звільняється з верстата в порядку, зворотній фіксації, і переноситься в клітку. Після кожного дослідів треба ретельно вимити руки теплою водою з милом, або ж протерти дезінфікуючим розчином. При укусі щуром треба терміново промити рану спиртовим розчином, обробити розчином йоду [44].

Правилами роботи у віварії. Для віварію відводять окреме приміщення з окремим входом, щоб було відокремлене від лабораторії і робочих кімнат. Якщо віварій розташований в одній будівлі з виробничим приміщенням, то його відділяють від інших приміщень проходом з обладнаним тамбуром. У тамбур і коридори під невеликим тиском подається свіже повітря. У приміщенні, де знаходяться тварини, мають бути спеціально обладнані шафи для кліток з підведеною витяжкою. Повітря, яке викидається назовні, повинно очищуватися. Вентиляція віварію повинна працювати цілодобово. Для знезараження повітря встановлюють бактерицидні опромінювачі. У приміщенні віварію на виду мають бути вивішені правила внутрішнього розпорядку із затвердженням керівника. Тварини обслуговуються постійно закріпленим персоналом, а сторонні особи в приміщення не допускаються. Транспортування тварин з віварію в лабораторію і назад має здійснюватися в спеціальних продезінфікованих ящиках. А щурів і мишей доставляють в тих же клітках, в яких вони утримуються у віварії.

Основною небезпекою для співробітників, які працюють із дрібними лабораторними тваринами, є вірогідність зараження збудниками інфекцій (особливо від укусів), що є небезпечними для людини. Для попередження травмування (укусів чи подряпин) усі дії з лабораторними тваринами треба виконувати в спеціальних боксах та обов'язково в рукавичках. Прибирання віварію проводять щодня. Спільне утримання здорових і заражених тварин забороняється [43-45].

Згідно нормативних документів умертвіння тварин не може бути проведеним у присутності інших тварин. Для евтаназії тварин, що вийшли з експерименту має бути відведена спеціальна кімната, обладнана відповідно її призначенню та забезпечена водопроводом.

Сучасне суспільство прагне гуманізувати наукові дослідження, заохочуючи зменшення кількості тварин для використання в експериментах та застосування інших альтернативних методів. Але застосування традиційних експериментальних досліджень на тваринах складає значну частину досліджень та вимагає накопичення та аналізу великого масиву інформації, отриманої ефективними й гуманними методами. Серед вимог, які висуває сучасне суспільство до наукових досліджень, саме дотримання етичних та моральноправових принципів їх проведення має найбільший суспільний резонанс. Підсумковими документами на сьогодні є Міжнародні рекомендації з проведення медико-біологічних досліджень на тваринах, затверджені ВООЗ у 1984 році, Директива № 2010/63/ЄС про захист тварин, що використовуються з науковою метою, Європейська конвенція щодо захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та іншою науковою метою, законодавчі акти багатьох країн. Ці представлені документи й визначають правила щодо проведення експериментів використовуючи тварин як об'єкт, встановлюють стандарти моніторингу експериментів, умов утримання та використання лабораторних тварин [44].

В свою чергу використання тварин має ряд суттєвих переваг, а саме:

- висока вірогідність щодо виявлення впливу дослідної речовини або певного фізичного фактору на людину, адже за морфофункціональними показниками організм теплокровної тварини є найближчою моделлю;

- наявність однакових органів;

- подібність хімічного складу та структури певних тканин;

- подібність основних біохімічних процесів;

- можливість досліджувати одночасно велике число показників фізіологічного стану організму;

- можливість використовувати різні схеми введення речовини або впливу певного фактору;

- вища точність в експериментах, порівнюючи з альтернативними методами;

- реакції, які розвиваються в організмі людини та тварини після певного дослідного впливу у більшості своїй однотипні [41, 42, 44].

Таким чином дотримання правил техніки безпеки та охорони праці при виконанні кваліфікаційної роботи дало можливість уникнути екстрених або ж небезпечних, травмуючих ситуацій як під час роботи в лабораторії, так і у віварії і вдома на комп'ютері.

ВИСНОВКИ

1. У нелінійних лабораторних щурів старого віку після впоювання культуральною водою з-під *H. verbana* виявлено підвищення загальної кількості лейкоцитів на 14,7% (з $7,63 \pm 0,356$ до $8,75 \pm 0,359$ Г/л) порівняно з контролем при $p \leq 0,05$. В лейкоцитарній формулі крові виявлено підвищення абсолютного вмісту нейтрофілів на 16,7% (з $3,24 \pm 0,115$ до $3,78 \pm 0,192$ Г/л), підвищення відносної кількості моноцитів на 62,1% (з $3,75 \pm 0,382$ до $6,08 \pm 0,300\%$) та абсолютної – на 82,7% (з $0,29 \pm 0,040$ до $0,53 \pm 0,040$ Г/л), підвищення відносного вмісту паличкоядерних нейтрофілів в 2 рази (з $1,58 \pm 0,374$ до $3,58 \pm 0,374\%$) та абсолютного – в 2,7 рази (з $0,12 \pm 0,034$ до $0,32 \pm 0,041$ Г/л), зниження абсолютної кількості еозинофілів на 42,4% (з $0,33 \pm 0,044$ до $0,19 \pm 0,037$ Г/л) та відносної – на 48% (з $4,33 \pm 0,494$ до $2,25 \pm 0,461\%$) порівняно з контролем при $p \leq 0,05$, разом з тим показники загальної кількості лейкоцитів і лейкоцитарної формули в обох групах лабораторних щурів були в межах референтних значень.

2. Виявлено зміни лейкоцитарних індексів крові у нелінійних лабораторних щурів старого віку після впоювання культуральною водою з-під *H. verbana*, зокрема підвищення ядерного індексу на 92,3% (з $0,13 \pm 0,017$ до $0,25 \pm 0,021$ у.о.), зниження індексу співвідношення нейтрофілів та моноцитів на 40,8% (з $12,16 \pm 1,572$ до $7,20 \pm 0,460$ у.о.) та зниження індексу співвідношення лімфоцитів та моноцитів на 41,6% (з $13,82 \pm 1,405$ до $8,07 \pm 0,613$ у.о.) порівняно з контролем при $p \leq 0,05$.

3. У нелінійних лабораторних щурів старого віку при впоюванні культуральною водою з-під *H. verbana* при аналізі фагоцитарної активності нейтрофілів крові виявлено достовірне підвищення фагоцитарного показника на 6% (з $67,5 \pm 1,15$ до $71,58 \pm 1,18\%$) та фагоцитарного числа на 7,7% (з $4,16 \pm 0,113$ до $4,48 \pm 0,072$ у.о.) порівняно з контролем при $p \leq 0,05$.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Одержані результати можуть бути використані при викладанні навчальних дисциплін за спеціальністю 091 Біологія та біохімія, а саме «Техніка біологічного експерименту», «Імунологія», «Великий практикум з імунології», «Імунологічні методи лабораторної діагностики» тощо.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Leech therapeutic applications / A. M. Abdulkader et. al. *Indian J Pharm Sci.* 2013. Vol. 75. P. 127-137.
2. Aminov R. F., Frolov A. K. The impact of fetal load of *Hirudo verbana* saline extract antigens on morphometrical, hematological and immunological parameters of rats in the early stages of post-embryonic development. *Annals of Parasitology.* 2018. Vol. 64, № 1. P. 13-20.
3. Sig A. K., Guney M., Guclub A. U., Ozmenc E. Medicinal leech therapy — an overall perspective. *Integrative Medicine Research.* 2017. Vol. 6 (4). P. 337-343.
4. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European Leukemia Net. / M. Baccarani et al. *J. Clin. Oncol.* 2009. Vol. 35. P. 6041-6051.
5. Abdullah S., Dar L. M., Rashid A., Tewari A. Hirudotherapy/leech therapy: applications and indications in surgery. *Arch Clin Exp Surg.* 2012. Vol. 1 (3). P. 172-180.
6. Cialdai F., Colciago A., Pantalone D. Effect of unloading condition on the healing process and effectiveness of platelet rich plasma as a countermeasure: study on in vivo and in vitro wound healing models. *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21. P. 407.
7. Frolov A. K., Litvinenko R. A. Effect of medicinal leeches' antigens on the proliferative response of human blood mononuclear cells and cytokine production in vitro. *Annals of Parasitology.* 2015. Vol. 61№ 2. P. 97-104.
8. Kermanian C. S., Buote N. J., Bergman P. J. Medicinal leech therapy in veterinary medicine: a retrospective study. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2022. Vol. 58, № 6. P. 303-308.
9. Mousavian A., Sabzevari S., Parsazad S., Moosavian H. Leech therapy protects free flaps against venous congestion, thrombus formation, and ischemia reperfusion injury: benefits, complications, and contradictions. *Arch Bone Jt Surg.*

2022. Vol. 10, № 3. P. 252-260.

10. Aminov R. F., Frolov A. K. Proliferative activity of bone marrow cells of rats under the influence of biologically active substances of a medical leech. *Regulatory mechanisms in biosystems*. 2017. Vol. 8, № 4. P. 501-505.

11. Şenel E., Özkan A. T., Mumcuoglu K. Y. Scientometric analysis of medicinal leech therapy. *J Ayurveda Integr Med*. 2020. Vol. 11, № 4. P. 534-538.

12. Godekmerdan A., Arusan S., Bayar B. Tıbbi Sülükler ve Hirudoterapi. Medicinal Leeches and Hirudotherapy. *Turkiye Parazitol*. 2011. Vol. 35. P. 234-239.

13. Barz H. Admirable Use of Leeches. *Dtsch Arztebl Int*. 2019. Vol. 12, № 116 (15). P. 267.

14. Labarite A., Parsh B. How to manage leech therapy *Nursing*. 2020. Vol. 50, № 11. P. 11-12.

15. Markwardt F. Hirudin as alternative anticoagulant – a historical review. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2002. Vol. 28 (5). P. 405-414.

16. Singh A. P. Medicinal leech therapy (hirudotherapy): a brief overview. Complementary. *Therapies in clinical practice*. 2010. Vol. 16, № 4. P. 213-215.

17. Afify O., Lauder S. N. Improving Symptoms of Peripheral Artery Disease With Hirudotherapy *Cureus*. 2021. Vol. 13, № 7: e16270.

18. Nair H. K. R., Ahmad N. W., Ahmad N. Hirudotherapy in wound healing. *The international journal of lower extremity wounds*. 2022. Vol. 21(4). P. 425-431.

19. McCracken Ja.A., Koehler S.M., Sharma R. Rethinking antimicrobial prophylaxis in patients receiving medicinal leech therapy. *Am J Health Syst Pharm*. 2022. Vol. 79, № 1. P. e14-e19.

20. Junren C., Xiaofang X., Huiqiong Z. Pharmacological activities and mechanisms of hirudin and its derivatives – A Review. *Frontiers in Pharmacology*. 2021. Vol. 12. Article 660757.

21. Kiladjian J. J., Barbui T. From leeches to interferon: should cytoreduction be prescribed for all patients with polycythemia vera? *Leukemia*. 2020. Vol. 34, № 11. P. 2837-2839.

22. Frolov A., Litvinenko R. Viability of lower crustaceans under the influence of biologically active substances of biotechnological water from the medicinal leech (*Hirudo verbana*). *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*. 2014. Вип. 64. С. 313–319

23. Karino M., Okuma S., Ide T. A Case of medical leech therapy for venous congestion following forearm flap reconstruction. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2018. Vol. 45, № 13. P. 2135-2137.

24. Girardello R., Baranzin N., Molteni M. The medicinal leech as a valuable model for better understanding the role of a TLR4-like receptor in the inflammatory process. *Cell Tissue Res*. 2019. Vol. 377, № 2. P. 245-257.

25. Aminov R., Aminova A. Indirect effect of substances of the hemophagous parasite *Hirudo verbana* on the immune system. *Annals of Parasitology*. 2021. Vol. 67, № 4. P. 603-610.

26. 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.

27. Sohn J. H., Kang H. A., Rao K. J. Current status of the anticoagulant hirudin: its biotechnological production and clinical practice. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2001. Vol. 57. P. 606-613.

28. Eguileor M., Grimaldi A., Tettamanti G. Different types of response to foreign antigens by leech leukocytes. *Tissue Cell*. 2000. Vol. 32. P. 40-48.

29. Амінов Р. Ф. Природний імуномодулятор із тіл медичних п'явок: отримання та застосування : монографія. Запоріжжя : ЗНУ, 2022. 164 с.

30. Al-Sayed S.E., Abdel-Latif M., Abdel-Haleem H. M. Therapeutic effects of *Hirudo medicinalis* extract antigens on modulation of CD4⁺CD25⁺Foxp3 T cell activity in murine eimeriosis. *Veterinary Parasitology*. 2022. Vol. 309. P. 109772.

31. Jenne C. N., Urrutia R., Kubes P. Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2013. Vol. 35, № 3. P. 254-261.

32. Клінічна гематологія. Частина 1. Анемії : метод. вказ. для студентів і

лікарів-інтернів / упоряд. Л. В. Журавльова, О. О. Янкевич. Харків : ХНМУ, 2015. 44 с.

33. WHO classification of tumor of haematopoetic and lymphoid tissues / S.H. Swerdlow et al. Lyon : LARS, 2008. 439 p.

34. Malandrino N., Wu W.C., Taveira T.H. Association between red blood cell distribution width and macrovascular and microvascular complications in diabetes. *Diabetologia*. 2012. Vol. 55, № 1. P. 226-235.

35. Greer J. P., Wintrobe M. M. Wintrobe's Clinical Hematology. *Williams & Wilkins*. 2008. Vol. 1, 2. 3232 p.

36. Hoffman M., Monroe D. M. Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. *Hematol. Oncol. Clin. N. Am.* 2007. Vol. 21. P. 1-11.

37. Huang S., Xu L., Sun Y. An improved protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Journal of Orthopaedic Translation*. 2015. Vol. 3, № 26. P. 33.

38. Thiel H., Diem H., Haferlach T. Color atlas of hematology. Practical Microscopic and clinical diagnosis. Thieme, Stuttgart – NY, 2004. 208 p.

39. Сучасна імунологія (курс лекцій) / І. А. Іонов, Т. Є. Комісова, О. М. Сукач, О. О. Катеринич. Харків : ЧП Петров В. В., 2017. 107 с.

40. Кузнецова Л.В. Клінічна та лабораторна імунологія. Національний підручник / за ред. Кузнецової Л. В., Бабаджана В. Д., Фролова В. М. К. : ООО "Поліграф плюс". Київ, 2012. 922 с.

41. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія : підручник для студ. вищ. мед. навч. заклад / за ред. В. П. Широбокова ; вид. 2-ге. Вінниця : нова книга, 2011. 952 с.

42. Манько В. В., Гальків М. О., Клевець М. Ю. Основи техніки лабораторних робіт у фізіологічних дослідженнях. Львів : ЛНУ ім. Івана Франка, 2005. 133 с.

43. Задорожна Г. О., Хоменко О. М. Методичний посібник для виконання експериментальних робіт із використанням щурів. Дніпро, 2019. 40 с.

44. Чудак Р. А., Побережець Ю. М. Методичні рекомендації для виконання лабораторних робіт та організації самостійної роботи з дисципліни «Експериментально-біологічна лабораторія та лабораторні тварини» для студентів спеціальності 212 «Ветеринарна гігієна, санітарія і експертиза» для аграрних вищих навчальних закладів III-IV рівнів акредитації. 2018, 116 с.

45. Статистична обробка експериментальних даних : навчальний посібник / О. П. Мельниченко, І. Л. Якименко, Р. Л. Шевченко. Біла Церква, 2006. 34 с.

46. Гасюк О. М. Клітинні основи кровотворення : навч.-метод. посіб. Херсон : ФОП Вишемирський В. С., 2019. 92 с.

47. Методи дослідження в гематології : навчальний посібник / І. О. Дудченко, Г. А. Фадєєва, В. В. Качковська, О. В. Орловський ; за заг. ред. Л. Н. Приступи. Суми : Сумський державний університет, 2019. 55 с.

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

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

50. Куріс Ю. В. Основи охорони праці та безпека життєдіяльності: навчально-методичний посібник для здобувачів ступеня вищої освіти «бакалавр» для студентів всіх спеціальностей денної та заочної форм навчання. Запоріжжя : ЗНУ, 2020. 197 с.

51. Масікевич Ю. Г., Грачова Т. І., Жуковський О. М. Основи охорони праці та охорона праці в галузі (навчальний посібник). Електронний навчальний посібник. Чернівці : БДМУ, 2015. 78 с.

52. Салига Ю. Т., Лучка І. В., Росаловський В. П. Основи біобезпеки для науково-дослідних установ біологічного профілю. Львів : Растр-7, 2017. 218 с.

53. Голінько В. І. Основи охорони праці : підручник. 2-ге вид. Д. : НГУ, 2014. 271 с.