

**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 ІНДЕКСИ ПРИ ВИКОРИСТАННІ *HIRUDO  
VERBANA* ЯК НЕІНВАЗИВНОГО ІНСТРУМЕНТУ ДЛЯ ЗАБОРУ КРОВІ  
ССАВЦІВ

Виконала: студентка 2 курсу, групи 8.0912-б

спеціальності 091 Біологія

освітньої програми Біологія

А.О. Артеменко

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

Рецензент д.б.н., професор, зав. кафедри О. Г. Куш

**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**

Анні Олександрівні Артеменко

1 Тема роботи: Лейкоцитарні індекси при використанні *Hirudo verbana* як неінвазивного інструменту для забору крові ссавців

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

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

2 Строк подання студентом роботи грудень 2023 року

3 Вихідні дані до роботи Курсова робота на тему: «Імунна система тварини під впливом біологічно активних речовин медичної п'явки. цитостатики, як імуносупресивні препарати»

4 Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити): 1. Проаналізувати загальну кількість лейкоцитів капілярної крові донорів та при використанні *Hirudo verbana* для забору крові. 2. Проаналізувати лейкоцитарну формулу капілярної крові донорів та при використанні *Hirudo verbana* для забору крові. 3. Проаналізувати лейкоцитарні індекси капілярної крові донорів та при використанні *Hirudo verbana* для забору крові.

5 Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень): Табл. 3.1, 3.2. Загальна кількість лейкоцитів, лейкоцитарна формула, лейкоцитарні індекси капілярної крові донорів та при використанні *Hirudo verbana* для забору крові.

## 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 за темою дослідження. Підбір методів для проведення експерименту.	Жовтень – листопад 2022	Виконано
2.	Формування розділу «Огляд наукової літератури».	Грудень 2022 – січень 2023	Виконано
3.	Формування розділу «Матеріали та методи дослідження»	Січень – лютий 2023	Виконано
4.	Оформлення розділу «Охорона праці»	Березень – квітень 2023	Виконано
5.	Створення бази даних експериментального дослідження	Квітень - травень 2023	Виконано
6.	Статистична обробка та інтерпретація експериментальних даних	Вересень – жовтень 2023	Виконано
7.	Формування розділу «Експериментальна частина»	Жовтень - листопад 2023	Виконано
8.	Оформлення та попередній захист кваліфікаційної роботи	Листопад - грудень 2023	Виконано

Студент \_\_\_\_\_ А. О. Артеменко

Керівник роботи \_\_\_\_\_ Р. О. Литвиненко

**Нормоконтроль пройдено**

Нормоконтролер \_\_\_\_\_ Є.Ю. Гороховський

## РЕФЕРАТ

Робота викладена на 65 сторінках друкованого тексту, містить 15 таблиць, 3 рисунки. Список літератури включає 56 джерел.

Метою роботи було визначити основні лейкоцитарні індекси при використанні *Hirudo verbana* як неінвазивного інструменту для забору крові ссавців. Дослідження було проведене на базі навчально-науково-дослідної лабораторії клітинної та організменної біотехнології Запорізького національного університету. Матеріалом для дослідження була кров 12 умовно здорових донорів, отримана звичайним методом і з використанням *H. verbana*.

Методи дослідження: імунологічні (загальна кількість лейкоцитів, лейкоцитарна формула крові, лейкоцитарні індекси) та статистичні.

Було з'ясовано, що в крові донорів, отриманій з використанням *H. verbana* збільшена кількість лейкоцитів, виявлено зміни в лейкоцитарній формулі крові (зростає відносний вміст лімфоцитів та знижується – сегментоядерних нейтрофілів), порівняно з капілярною кров'ю. Статистично значимо змінюються такі лейкоцитарні індекси, як індекс співвідношення еозинофілів до лімфоцитів, індекс співвідношення лімфоцитів до еозинофілів, індекс співвідношення лімфоцитів до моноцитів та індекс співвідношення нейтрофілів до лімфоцитів.

Новизна роботи полягає у визначенні лейкоцитарних індексів крові людини при використанні *H. verbana* як інструменту для забору крові.

Теоретичне значення: *H. verbana* змінює лейкоцитарний склад крові, у зв'язку з чим змінюються і лейкоцитарні індекси.

**МЕДИЧНА П'ЯВКА, ЗАБІР КРОВІ, ГІРУДОВПЛИВ, БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ РЕЧОВИНИ, ЛЕЙКОЦИТАРНІ ІНДЕКСИ.**

## ABSTRACT

The work is presented on 65 pages of printed text, contains 15 tables, 3 figures. The list of references includes 56 sources.

The aim of the work was to determine the main leukocyte indices when using *Hirudo verbana* as a non-invasive tool for blood sampling of mammals. The study was conducted on the basis of the educational-scientific-research laboratory of cellular and organismal biotechnology of the Zaporizhia National University. The research material was the blood of 12 conditionally healthy donors, obtained by the usual method and using *H. verbana*.

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

It was found that in the blood of donors obtained with the use of *H. verbana*, the number of leukocytes increased, and changes in the leukocyte formula of the blood were detected (the relative content of lymphocytes increased and segmented neutrophils decreased), compared to capillary blood. Leukocyte indices such as ratio index of eosinophils to lymphocytes, ratio index of lymphocytes to eosinophils, ratio index of lymphocytes to monocytes and ratio index of neutrophils to lymphocytes change statistically significantly.

The novelty of the work consists in determining the leukocyte indices of the blood of humans when using *H. verbana* as a tool for blood sampling.

Theoretical significance: *H. verbana* changes the leukocytic composition of the blood, in connection with which leukocyte indices also change.

MEDICINAL LEECH, BLOOD SAMPLING, HIRUDOINFLUENCE, BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES, LEUKOCYTE INDICES.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ.....	8
ВСТУП.....	9
1 ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	11
1.1. Загальна характеристика п'явок виду <i>Hirudo verbana</i> .....	11
1.1.1. Зовнішній вигляд і систематичне положення.....	11
1.1.2. Фармакологічні властивості секрету слинних залоз медичної п'явки...13	
1.1.3. Особливості застосування медичної п'явки у різних галузях.....18	
1.1.4. Вплив біологічно активних речовин секрету слинних залоз медичної п'явки та шлункового мікрооточення на клітини крові.....21	
1.2. Способи забору крові у ссавців: переваги та недоліки.....24	
1.3. Загальна характеристика лейкоцитарних показників крові у нормі та при патології.....31	
1.4. Лейкоцитарні індекси та їх інформативність.....38	
2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	42
2.1. Матеріали та об'єкти дослідження.....	42
2.2. Методи досліджень.....	43
2.2.1. Методи забору крові .....	43
2.2.1.1. Звичайний спосіб (із використанням традиційного інструментарію).....	43
2.2.1.2. Застосування п'явок виду <i>Hirudo verbana</i> (приставка до тіла).....	43
2.2.2. Методи визначення лейкоцитарних показників крові.....	44
2.2.2.1. Визначення загальної кількості лейкоцитів за допомогою камери Горяєва.....	44
2.2.2.2. Визначення лейкоцитарної формули крові.....	45
2.2.2.3. Визначення лейкоцитарних індексів.....	45
2.2.3. Статистична обробка даних.....	46

3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	48
3.1. Загальна кількість лейкоцитів та лейкоцитарна формула капілярної крові донорів та при використанні <i>Hirudo verbana</i> для забору крові ...	48
3.2. Лейкоцитарні індекси капілярної крові донорів та при використанні <i>Hirudo verbana</i> для забору крові .....	50
4 ОХОРОНА ПРАЦІ.....	53
ВИСНОВКИ.....	58
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	58
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ.....	60

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ  
І ТЕРМІНІВ

БАР – біологічно активні речовини

ГТ – гірудотерапія

ІСЕЛ – індекс співвідношення еозинофілів до лімфоцитів

ІСЛЕ – індекс співвідношення лімфоцитів до еозинофілів

ІСЛМ – індекс співвідношення лімфоцитів до моноцитів

ІСЛН – індекс співвідношення лімфоцитів до нейтрофілів

ІСЛНс – індекс співвідношення лімфоцитів до сегментоядерних  
нейтрофілів

ІСНЛ – індекс співвідношення нейтрофілів до лімфоцитів

ІСНМ – індекс співвідношення нейтрофілів до моноцитів

ІСНпЛ – індекс співвідношення паличкоядерних нейтрофілів до  
лімфоцитів

ІСНсЛ – індекс співвідношення сегментоядерних нейтрофілів до  
лімфоцитів

ІСНсМ – індекс співвідношення сегментоядерних нейтрофілів до  
моноцитів

ІСНсНп – індекс співвідношення сегментоядерних нейтрофілів до  
паличкоядерних нейтрофілів



## ВСТУП

Наразі гірудотерапія (ГТ) є одним із найдієвіших методів лікування різних хвороб, включаючи ішемічний мозковий інсульт, варикозне розширення вен, тромбофлебіт, гіпертонію, стенокардію, інфаркт міокарда, атеросклероз, різні хвороби шкіри та легень, мігрені, глаукому, гайморити, неврити, бронхіальну астму, а також різні гінекологічні захворювання. Це все завдяки тому, що секрет слини медичних п'явок різних видів, які активно застосовуються при ГТ, містить багато біологічно активних речовин (БАР), які володіють цілющими властивостями по відношенню до лікування широкого кола хвороб [1-3]. Останнім часом медичні п'явки різних видів пропонують застосовувати для забору крові у тварин з метою біохімічного та гематологічного аналізу, так як цей спосіб забору крові на відміну від традиційних методів є неінвазійним та безболісним і не викликає при цьому різних неприємних відчуттів. Хоча цей спосіб дещо спотворює лейкоцитарні показники крові, їх можна «виправити» шляхом множення чи ділення на коефіцієнти, отримані при здійсненні кореляційного аналізу за Пірсоном [4]. Актуальність роботи полягає у визначенні лейкоцитарних індексів при використанні п'явок виду *Hirudo verbana* як неінвазивного інструменту для забору крові людини і лабораторних щурів. Дослідження із визначенням окремих лейкоцитарних індексів, які демонструють різне співвідношення тих чи інших формених елементів крові, при гірудовпливі було проведене раніше один раз [5], у зв'язку з чим назріла необхідність у проведенні власних досліджень.

Мета роботи – визначити основні лейкоцитарні індекси при використанні *Hirudo verbana* як неінвазивного інструменту для забору крові ссавців.

Відповідно до мети дослідження було сформульовано наступні завдання:

- 1) проаналізувати загальну кількість лейкоцитів капілярної крові донорів та при використанні *Hirudo verbana* для забору крові;
- 2) проаналізувати лейкоцитарну формулу капілярної крові донорів та при використанні *Hirudo verbana* для забору крові;
- 3) проаналізувати лейкоцитарні індекси капілярної крові донорів та при використанні *Hirudo verbana* для забору крові;
- 4) порівняти результати, отримані двома способами забору крові: звичайним способом та з використанням *Hirudo verbana*.

Об'єкт дослідження – кров ссавців (людини).

Предмет дослідження – лейкоцитарні індекси крові ссавців (людини) при використанні *Hirudo verbana* як неінвазивного інструменту для забору біоматеріалу.

Методи дослідження: імунологічні (загальна кількість лейкоцитів, лейкоцитарна формула крові, лейкоцитарні індекси), статистичні.

Новизна роботи полягає у визначенні лейкоцитарних індексів крові людини при використанні *Hirudo verbana* як інструменту для забору крові.

Теоретичне значення: *H. verbana* змінює лейкоцитарний склад крові, у зв'язку з чим змінюються і лейкоцитарні індекси.

Практичне значення: результати роботи можуть враховуватися в навчальному процесі як показники норми загальної кількості лейкоцитів, лейкоцитарної формули і лейкоцитарних індексів крові людини. Кров, отримана із використанням *H. verbana* при її приставці до тіла, може бути використана для попередньої оцінки стану організму.

Апробацію результатів дослідження проведено на X Міжнародній науково-практичній конференції «Modern Problems of Science, Education and Society» (грудень 2023, Київ, Україна) з публікацією тез.

## 1 ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Загальна характеристика п'явок виду *Hirudo verbana*

Медична п'явка (*Hirudo verbana*) належить до кровосисних організмів, у секреті слинних залоз яких містяться різні біологічно активні речовини (БАР) із широким спектром їхньої лікувальної дії. Завдяки цьому п'явки подібного виду активно застосовуються у різних галузях, починаючи з медицини та косметології і закінчуючи забором крові для біохімічних та імунологічних досліджень [4, 6, 7, 8].

#### 1.1.1. Зовнішній вигляд і систематичне положення

П'явки виду *H. verbana* на відміну від інших медичних п'явок характеризуються більш строкатим тілом, яке у довжину становить близько 8 см, а в ширину – до 1 см. При цьому ширина передньої присоски складає 0,5 см, а задньої присоски – 0,7 см [9].

На горіхово-коричневій спинній частині п'явок виду *H. verbana* наявні товсті помаранчево-червоні поздовжні смуги, що обрамлені тонкими чорними смугами, а на кожному з боків наявна товста чорна поздовжня смуга, яка «розділяє» спинну частину і черево. Черевна частина п'явок виду *H. verbana* світло-бежева із двома чорними рідкуватими поздовжніми смугами біля кожного з боків [9].

На рис. 1.1 показано зовнішній вигляд п'явки виду *H. verbana bilineata* ssp. nov. збоку [9].



Рисунок 1.1 – Зовнішній вигляд п'явки виду *Hirudo verbana bilineata* ssp. nov. збоку [9].

Характеристика таксономічного положення п'явок виду *H. verbana bilineata* ssp. nov. висвітлена у табл. 1.1 [9].

Таблиця 1.1 – Таксономічне положення п'явок виду *H. verbana bilineata* ssp. nov. [9]

Тип	Annelida Lamarck
Клас	Clitellata Michaelsen
Підклас	Hirudinea Lamarck
Ряд	Hirudinida Siddall et al.
Підряд	Hirudiniformes Caballero
Рід	<i>Hirudo</i> Linnaeus
Вид	<i>Hirudo verbana</i> Carena
Підвид	<i>Hirudo verbana bilineata</i> ssp. nov.

Згідно з табл. 1.1, п'явки *H. verbana bilineata* ssp. nov. відносяться до виду *H. verbana*, роду *Hirudo* (або П'явки), підряду Hirudiniformes (або Щелепні п'явки), ряду Hirudinida (або Безхоботні п'явки), підкласу Hirudinea (або П'явки), класу Clitellata (або Пояскові черви) і типу Annelida (або Кільчасті черви) [9].

Отже, п'явки виду *H. verbana* характеризуються строкатим зовнішнім виглядом і згідно систематичного положення є кільчастими червами.

### 1.1.2. Фармакологічні властивості секрету слинних залоз медичної п'явки

Слинні залози медичних п'явок виду *H. verbana* виробляють ряд БАР, що володіють фармакологічною дією відносно широкого кола хвороб. Секрет слинних залоз п'явок досить ефективно «лікує» такі хвороби, як, наприклад, ішемічний мозковий інсульт, варикозне розширення вен, тромбофлебіт, гіпертонія, стенокардія, інфаркт міокарда, атеросклероз, різні хвороби шкіри та легень, мігрені, глаукома, гайморити, неврити, бронхіальна астма, а також різні гінекологічні захворювання [1, 2, 6].

У табл. 1.2 зазначені фармакологічні властивості основних БАР, що виробляються п'явками виду *H. verbana* [3].

Таблиця 1.2 – Фармакологічні властивості основних БАР, що виробляються п'явками виду *H. verbana* [3]

Назва БАР	Фармакологічні властивості
1	2
Гірудин	Пригнічення механізму згортання крові через інгібування тромбіну
Калін	Пригнічення механізму згортання крові через інгібування процесу адгезії та агрегації тромбоцитів, а також інгібування фактора Віллебранда
Апіраза	Пригнічення механізму згортання крові через інгібування процесу агрегації тромбоцитів під посередництвом АДФ
Антагоніст РАФ	Пригнічення механізму згортання крові через інгібування процесу адгезії й активації тромбоцитів, а також міграції тромбоцитів до вогнища запалення шляхом зниження активності РАФ – фосфогліцериду із коагуляційними властивостями

## Продовження таблиці 1.2

1	2
Інгібітор фактору Ха	Пригнічення механізму згортання крові через інгібування процесу перетворення протромбіну в тромбін шляхом зниження активності фактору Ха із коагуляційними властивостями
Пептидаза (дестабілаза)	Пригнічення механізму згортання крові через руйнування $\epsilon$ -( $\gamma$ -глутаміл)-лізин-ізопептидних зв'язків у молекулах фібрину, а також антибіотична активність через руйнування подібних зв'язків у мембранних білках багатьох бактерій, одноклітинних грибів та архей
Гіалуронідаза	Літична активність через гідролітичне розщеплення та деполімеризацію гіалуронової кислоти та її похідних у складі різних сполучних тканин, включаючи ті, що утворюють суглоби (підвищення еластичності та рухливості суглобів)
Колагеназа	Літична активність через гідроліз колагенових волокон I типу, а також пригнічення механізму згортання крові через інгібування колаген-індукованої агрегації тромбоцитів
Бделіни	Протизапальна властивість через інгібування трипсину і плазміну
Гірустазин	Протизапальна властивість через інгібування тканинного калікреїну, трипсину, хімотрипсину і нейтрофільного катепсину G
LDTI (leech derived tryptase inhibitor)	Протизапальна властивість через інгібування триптази

Продовження таблиці 1.2

1	2
LCI (leech carboxypeptidase inhibitor)	Посилення кровотоку через інгібування карбоксипептидази А – ферменту, що в активному стані гідролізує кініни
Егліни	Протизапальна властивість через інгібування активності $\alpha$ -хімотрипсину, хімази тучних клітин, субтилізину, нейтрофільної еластази і нейтрофільного катепсину G

Найвідомішим із прикладів основних БАР, що виробляються слинними залозами медичних п'явок всіх видів, є гірудин, назва якого походить від родової назви п'явки – *Hirudo*. Так як станом на сьогодні гірудин є найбільш дослідженою основною БАР із секрету слинних залоз п'явок, на честь подібної речовини терапію із застосуванням п'явок було названо гірудотерапією (ГТ) [3, 10].

Згідно з табл. 1.2, гірудин є речовиною, що пригнічує процес згортання крові внаслідок інгібування тромбіну – попередника утворення тромбу. За хімічними властивостями гірудин є мінібілком, що складається із 65 амінокислотних залишків і містить у своїй структурі 3 дисульфідні зв'язки. На рис. 1.2 зображено первинну структуру гірудину, механізм його зв'язування з тромбіном, а також ділянки на молекулі тромбіну, на яких відбувається прикріплення гірудину до тромбіну [3, 10, 11].

Своїм N-термінальним доменом (Val1-Val2-Tyr3; позначено зеленим кольором на рис. 1.2 зліва) гірудин зв'язується з активним центром тромбіну, утворюючи  $\beta$ -складчастий шар із залишками 214-217 (Ser214-Trp215-Gly216-Glu217) тромбіну (на рис. 1.2 справа позначено світло-зеленим кольором). У той час за допомогою C-термінального домену (Asp53-Asp55-Glu57-Glu58-Glu61-Glu62; позначено червоним кольором на рис. 1.2 зліва) гірудин зв'язується з аніонним центром тромбіну (на рис. 1.2 справа позначено червоним кольором) [10, 11-14].





## Продовження таблиці 1.3

1	2
Ліпаза	Метаболізм жирів через гідроліз ліпідних субстратів
Простагландини	Збільшення проникності кровоносних судин через їхнє розширення
Ацетилхолін	Специфічна стимуляція виділення простагландинів, які сприяють розширенню судин та збільшенню їхньої проникності
Гістаміноподібні сполуки	Судинорозширювальний ефект, подовження часу кровотечі
Фібриназа	Пригнічення утворення рубцевої тканини та різних спайок
Хлороміцетин	Антибіотична активність проти різних грампозитивних і грамнегативних бактерій
Анальгетикоподібні речовини	Анальгезуючий ефект через інгібування дії прозапальних речовин
Стероїдні гормони (тестостерон, естрадіол, прогестерон, кортизол, дегідроепіандростерон)	Вплив на більшість метаболічних реакцій в організмі
Нейромедіатори (серотонін, гістамін)	Серотонін – регуляція харчової поведінки п'явки. Гістамін – вазодилатація мікроциркуляторних судин
Еластаза	Пригнічення активності еластину, фібрину, імуноглобулінів, а також компонентів комплекменту через їхній гідроліз. Інгібування активності нейтрофілів

## Продовження таблиці 1.3

1	2
Тригліцидаза	Розкладання тригліцидів
Незамінні амінокислоти (аланін, лізин, глутамат, триптофан, лейцин)	«Будівельні матеріали» для синтезу нових білків слини п'явок
Біогенні елементи (натрій, калій і фосфор)	Натрій і калій – підтримка гомеостазу слини п'явок. Фосфор – джерело для побудови нуклеїнових кислот
Мікроелементи (йод, селен, сірка, бром)	Йод, селен, бром – кофактори для роботи більшості ферментів слини п'явок. Сірка – джерело для створення дисульфідних зв'язків у структурі такої речовини, як гірудин

Отже, секрет слинних залоз п'явок виду *H. verbana* містить ряд основних БАР, серед яких особливо відзначається гірудин, який був найбільш досліджений і через це отримав свою назву від родової назви п'явки. Також у слині п'явок виду *H. verbana* містяться допоміжні БАР, які не тільки впливають на різні якості основних БАР, але й допомагають опосередковувати їхню дію в організмі-хазяїні.

### 1.1.3. Особливості застосування медичної п'явки у різних галузях

ГТ із використанням п'явок виду *H. verbana* проводять у різноманітних медичних галузях завдяки тому, що слина цих п'явок володіє широким спектром фармакотерапевтичної дії. Так, ГТ застосовується для лікування

різних хвороб у таких «відгалуженнях» медицини, як дерматологія, кардіологія, офтальмологія, отоларингологія та ін. У табл. 1.4 зазначено сфери застосування ГТ у медицині за участю п'явок виду *H. verbana* [3].

Таблиця 1.4 – Сфери застосування гірудотерапії у медицині за участю п'явок виду *H. verbana* [3]

Галузь медицини	Спектр хвороб, по відношенню до яких застосовується ГТ
1	2
Дерматологія	Хронічні дерматози, лейоміома шкіри, псоріаз, еритематозний вовчак
Кардіологія	Серцева недостатність, гіпертонічна хвороба, інфекційний міокардит, кардіалгія, стенокардія, ішемічна хвороба серця
Офтальмологія	Глаукома, геморагічно-фібриноїдний синдром
Отоларингологія	З боку вух – гостра сенсоневральна приглухуватість, гострі та хронічні захворювання середнього і внутрішнього вуха, гострий зовнішній дифузний отит, вушні шуми, травми вушної раковини. З боку дихальних шляхів – бронхіальна астма, рецидивуючі фурункули носа, хронічний тонзиліт
Травматологія	Радикулопатії, артрити, остеохондроз, артрози, суглобова форма ревматоїдного артрити, остеоартрит колінного суглоба
Невропатологія	Цереброваскулярні захворювання
Гінекологія	Ендометріоз, міома матки, хронічні запалення придатків, чоловіче та жіноче безпліддя, захворювання передміхурової залози

Продовження таблиці 1.4

1	2
Терапевтична медицина	Нефрити, діабетична стопа
Ендокринологія	Цукровий діабет
Хірургія	Тромбофлебіти, варикозне розширення вен, венозний застій, рецидивуюча бешиха на тлі варикозної хвороби вен
Стоматологія	Хронічні та дистрофічні захворювання слинних залоз, стоматити, альвеоліти, пульпіти, хронічні захворювання слизової оболонки рота, синдром печії слизової оболонки рота, верхівковий періодонтит
Педіатрія	Важкі форми перитоніту з ускладненнями
Психотерапія	Психоемоційне вигорання
Алергологія	Різні алергії
Онкологія	Різні онкологічні захворювання, такі, як, наприклад, рак простати

Згідно з табл. 1.4, ГТ із використанням п'явок виду *H. verbana* проводиться у різних галузях медицини для лікування великої кількості хвороб, адже слина п'явок цього виду володіє широким спектром фармакологічної дії завдяки тому, що в ній міститься велика кількість БАР із різною терапевтичною дією [3].

Отже, п'явки виду *H. verbana* при здійсненні ГТ використовуються у різних медичних сферах для лікування широкого кола хвороб, адже слина цих п'явок містить велику кількість різних БАР, кожна з яких володіє тим чи іншим фармакологічним ефектом.

#### 1.1.4. Вплив біологічно активних речовин секрету слинних залоз медичної п'явки та шлункового мікрооточення на клітини крові

При проведенні досліджень щодо впливу слини, виділеної з п'явок виду *H. verbana*, на загальну кількість лейкоцитів та лейкоцитарну формулу у зразках крові статевозрілих самок щурів було з'ясовано, що ГТ підвищує загальну кількість лейкоцитів у крові, а також підвищує відносний вміст паличкоядерних нейтрофілів, лімфоцитів та еозинофілів, і знижує відносний вміст сегментоядерних нейтрофілів і моноцитів. У табл. 1.5 зазначено зміни лейкоцитарної формули крові статевозрілих самок щурів за впливу слини п'явок виду *H. verbana* згідно узагальнення даних трьох різних досліджень [7, 21, 22].

Таблиця 1.5 – Зміни лейкоцитарної формули крові статевозрілих самок щурів за впливу слини п'явок виду *H. verbana* (згідно узагальнення даних трьох різних досліджень [7, 21, 22])

Групи тварин	Загальна кількість лейкоцитів, $\times 10^9/\text{л}$	Лейкоцитарна формула, %				
		Нейтрофіли		Еозинофіли	Лімфоцити	Моноцити
		Сегментоядерні	Паличкоядерні			
Контроль, n = 40	5,93 ±	17,5 ±	6,6 ±	0,40 ±	71,3 ±	4,2 ±
	1,165	4,91	1,65	0,12	3,84	4,04
Експеримент, n = 40	9,88 ±	17,3 ±	6,7 ±	0,50 ±	71,7 ±	3,8 ±
	2,385	4,28	3,12	0,090	3,86	1,89

Згідно з табл. 1.5, ГТ змінює лейкоцитарний склад крові, зокрема сприяє збільшенню кількості лейкоцитів. При цьому із окремих типів

лейкоцитів крові після гірудовпливу спостерігається тенденція до збільшення рівня паличкоядерних нейтрофілів, лімфоцитів та еозинофілів [7, 21, 22]. Стосовно сегментоядерних нейтрофілів і моноцитів, кількість цих клітин у крові після гірудовпливу, навпаки, зменшується [7, 21, 22].

У той час при проведенні досліджень щодо визначення лейкоцитарної формули крові людей-добровольців, які проходили ГТ [5], так само була відмічена тенденція до підвищення загальної кількості лейкоцитів, а також підвищення відносної кількості еозинофілів та паличкоядерних нейтрофілів і зниження відносної кількості сегментоядерних нейтрофілів. Натомість у крові людей на відміну від щурів при здійсненні ГТ збільшувалася кількість моноцитів і знижувалася кількість лімфоцитів. У таблиці 1.6 продемонстровано зміни лейкоцитарної формули крові людини при проведенні ГТ [5].

Таблиця 1.6 – Зміни лейкоцитарної формули крові людей-добровольців при проведенні гірудотерапії [5]

Група	Загальна кількість лейкоцитів, Г/л	Лейкоцитарна формула, %				
		Нейтрофіли		Еозинофіли	Лімфоцити	Моноцити
		Сегментоядерні	Паличкоядерні			
До ГТ, n = 12	5,84 ± 0,485	57,9 ± 1,96	6,4 ± 0,86	2,2 ± 0,38	29,8 ± 2,46	3,6 ± 0,49
Після ГТ, n = 12	5,94 ± 0,522	55,9 ± 1,26	8,7 ± 0,85	2,7 ± 0,42	27,0 ± 1,06	5,6 ± 0,52

Згідно з табл. 1.6, у крові людини при ГТ окрім загальної кількості лейкоцитів підвищується також відносна кількість еозинофілів, паличкоядерних нейтрофілів і моноцитів. При цьому підвищену імунну

активність проявляють такі формені елементи, як сегментоядерні нейтрофіли і лімфоцити [5].

У табл. 1.7 проведено порівняння щодо зміни лейкоцитарної формули крові людей-добровольців та 220-денних лабораторних щурів при проведенні ГТ. Згідно з табл. 1.7, після проведення ГТ у крові як людей, так і щурів, відбувається збільшення загальної кількості лейкоцитів, а також збільшення відносної кількості паличкоядерних нейтрофілів та еозинофілів і зменшення відносної кількості сегментоядерних нейтрофілів. Натомість у крові людини після проведення ГТ знижується відносна кількість лімфоцитів і підвищується відносна кількість моноцитів, тоді як у крові щурів після проведення ГТ, навпаки, відносна кількість лімфоцитів підвищується, а відносна кількість моноцитів знижується [5, 7, 21, 22].

Таблиця 1.7 – Зміни лейкоцитарної формули крові людей-добровольців та 220-денних лабораторних щурів при проведенні ГТ [5, 7, 21, 22]

Гематологічний показник	Людина, n = 12		Лабораторні щури, n = 40	
	До ГТ	Після ГТ	До ГТ	Після ГТ
Загальна кількість лейкоцитів, Г/л	5,84 ± 0,485	5,94 ± 0,522	5,93 ± 1,165	9,88 ± 2,385
Лейкоцитарна формула:				
Сегментоядерні нейтрофіли, %	57,9 ± 1,96	55,9 ± 1,26	17,7 ± 4,91	17,2 ± 4,28
Паличкоядерні нейтрофіли, %	6,4 ± 0,86	8,7 ± 0,85	6,6 ± 1,65	6,7 ± 3,12
Еозинофіли, %	2,2 ± 0,38	2,7 ± 0,42	0,4 ± 0,12	0,43 ± 0,090
Лімфоцити, %	29,8 ± 2,46	27,0 ± 1,06	72,5 ± 3,845	72,7 ± 3,86
Моноцити, %	3,6 ± 0,49	5,6 ± 0,52	4,2 ± 4,04	3,8 ± 1,89

Що стосується впливу шлункового мікрооточення медичної п'явки на показники крові людини, то в роботі [3] показано, що у крові, яка

знаходилася у шлунковій кишці п'явок після їх приставки до тіла, відбувається зміна лейкоцитарної формули у бік збільшення кількості окремих клітин через дегідратацію крові, а також зменшення кількості інших клітин через їхню підвищену імунну активність із подальшим апоптозом.

При впливі БАР медичної п'явки на організменному рівні у людини і щура в крові збільшується загальна кількість лейкоцитів, а також відносна кількість паличкоядерних нейтрофілів та еозинофілів, і зменшується відносна кількість сегментоядерних нейтрофілів. Стосовно лімфоцитів та моноцитів, відносна кількість перших після проходженні ГТ у людини зменшується, а у щура, навпаки, збільшується, натомість відносна кількість других після проходженні ГТ у людини збільшується, а у щура, навпаки, зменшується.

## 1.2. Способи забору крові у ссавців: переваги та недоліки

Стосовно забору крові у людини та лабораторних щурів існують такі два основні способи [3, 4, 23, 24]:

- звичайний із використанням традиційного інструментарію (ланцетів чи скарифікаторів для взяття капілярної крові з пальця людини, а також шприців чи спеціальних систем для забору венозної крові з будь-яких вен людини і щура, забір артеріальної крові);

- спосіб із використанням медичних п'явок у якості неінвазивного та відносно безболісного інструменту для взяття капілярної крові з будь-якої частини тіла ссавців.

Наявні способи забору крові у ссавців [3, 4, 23-36] мають як переваги, так і недоліки.

Щодо звичайного способу забору капілярної крові у людини, він має ряд переваг та недоліків. По-перше, для взяття капілярної крові людини із застосуванням ланцетів чи скарифікаторів використовується безіменний



палець, на подушечці якого знаходиться найменше нервових закінчень і найбільш густа мережа поверхневих кровоносних судин, що дозволяє мінімізувати больові відчуття при заборі крові з одночасним отриманням більш-менш достатнього об'єму крові для здійснення різних загальноклінічних аналізів [25]. По-друге, об'єм капілярної крові, що отримується з пальця людини, є замалим і підходить лише для здійснення загальноклінічних аналізів у той час, як для здійснення інших, більш розгорнутих аналізів потрібні більші об'єми крові. До того ж метод забору капілярної крові з пальця людини із використанням ланцету чи скарифікатора є інвазійною процедурою, і, отже, доволі травматичною і у деяких випадках болючою процедурою по відношенню до осіб, які є чутливими до болю [25, 26]. Також при недотриманні правил асептики подібний метод забору капілярної крові з пальця людини може призвести до зараження. Стосовно використання цього методу забору крові по відношенню до новонароджених і дітей дошкільного і шкільного віку, в них ця процедура через не повністю сформовану психіку може призвести до виникнення сильного стресу і різних психічних захворювань, починаючи звичайними психологічними травмами і закінчуючи фобіями [26].

Стосовно звичайного способу забору венозної крові у людини та лабораторних тварин (наприклад, лабораторних щурів), цей метод також має свої переваги та недоліки. Існують різні методики забору крові у лабораторних тварин [25].

У щурів кров зазвичай отримують з кінчика хвоста, і при цьому спочатку на операційному столику у лежачому положенні на спині фіксують наркотизованого щура, потім розігрівають хвіст шляхом його занурення у теплу воду (35 °С), після чого хвіст витягують з води, насухо витирають чистою ганчіркою та обробляють розчином етилового спирту. Далі ножицями відсікають невелику частину кінчика хвоста (~5 мм) і, стиснувши основу хвоста, збирають кров самопливом у меланжер [27].

Крім того, існує ще один метод забору крові з хвоста щурів. Перед цим тварину фіксують у камері Когана, потім хвіст щура занурюється у теплу воду (40-45° C) на 10 хвилин для того, щоб розширилася хвостова вена, і при цьому самого щура укутують електрогрівкою. Далі на місці пункції у середній третині хвоста видаляють шерсть і проводять дезінфекцію розчином етилового спирту. Після цього хвіст щура утримується лівою рукою, а помічник стискає вену біля основи хвоста з метою її кращого наповнення кров'ю. Потім у середній третині хвоста роблять пункцію латеральної вени хвоста за допомогою системи для вакуумного забору крові, а помічник при цьому масажує верхню третину хвоста у напрямку верх-низ для покращення току крові. Після отримання зразка крові об'ємом 0,5-1 мл голку-метелик витягають з вени, а саме місце проколу дезінфікують розчином етилового спирту. Кров, що залишилася в катетері, видувають у пробірку місткістю 4 мл шляхом від'єднання катетера від люер-адаптера, відрізання голки ножицями і видування крові за допомогою шприця місткістю 2 мл [28].

Також у щурів збирають кров з серця за наступною методикою. Спочатку щура вводять в ефірний наркоз, після чого його фіксують у положенні на спині на операційному столику. Потім в області серця видаляють шерсть, дезінфікують місце проколу і пальпаторно визначають місце, де відчувається верхівковий поштовх серця. Далі шприцем проколюють місце, яке лежить на 1 см краніальніше від місця верхівкового поштовху серця і на 2 мм латеральніше від краю грудини, вводячи голку перпендикулярно до площини грудної клітки і витягуючи поршень шприця на себе. Після появи крові у шприці голку надалі не просувають і набирають 3-5 мл крові [27].

У кроликів також збирають кров з серця наступним чином. Спочатку кролик піддається анестезії при введенні розчину тіопенталу у краєву вену вуха, після чого його поміщають у лежаче положення на спині. Потім ділянку на рівні з точкою ліктя голять, дезінфікують і перпендикулярно до площини грудної клітки пунктують шприцем, тримаючись за його пластмасову

частину і фіксуючи руку на грудях кролика для уникнення непотрібного руху голки. Поршень шприця витягують на себе, і при появі крові без подальшого просування голки углиб набирають потрібну кількість крові [27].

Також існує метод отримання крові з вушної раковини кроликів. Спочатку тварину фіксують будь-яким способом і вводять заспокійливий засіб типу ацепромазину чи флуанізону, які сприяють розширенню периферійних кровоносних судин. Ділянку на шкірі вуха голять широким лезом скальпеля, підтримуючи вказівним пальцем вухо знизу для уникнення пошкодження шкіри, а потім дезінфікують. Далі із використанням голки роблять поздовжній прокол центральної артерії, фіксуючи голку шляхом її втримування великим пальцем для уникнення випадкового вилучення у випадку руху тварини. Після цього до голки прикріплюють пробірку, тримаючи останню на рівні, нижчому за місце проколу для більш легкого току крові. Потім після отримання достатнього об'єму крові пробірку відкріплюють від голки і після цього, придавлюючи місце пункції ватою, вилучають саму голку, тримаючи вату придавленою до місця проколу упродовж певного часу для зупинки кровотечі [27].

У мишей кров отримують зі стегнової вени за наступною методикою. Спочатку мишу фіксують у пластмасовій трубці з отворами в кінці для доступу повітря. Задню лапку голять лезом скальпеля у напрямку зростання шерсті доки, доти не стане видно вени. Далі під кутом  $90^\circ$  до шкіри злегка проколюють місце пункції до появи краплі крові, після чого кров збирають у тубу для мікрогематокриту, приставлену отвором до місця пункції [27].

У коней, а також дрібної та великої рогатої худоби кров зазвичай отримують з яремної вени наступним чином. Спочатку на місці пункції видаляють шерсть, а потім саму ділянку обробляють розчином етилового спирту чи настоянкою йоду. Після цього тварину фіксують, тримаючи за роги чи недоуздок, і біля основи шиї накладають гумовий джгут, затягуючи його без зав'язування його кінців у вузол доти, доки яремна вена не наповниться кров'ю і не стане прощупуватися у яремному жолобі.

Дезінфікованою шляхом кип'ятіння голкою пунктують яремну вену в напрямку низ-верх і вперед на глибину  $\sim 4$  см. Далі після появи крові до голки приставляють пробірку і кров збирають в об'ємі  $2/3$  від обсягу пробірки. Після цього гумовий джгут послаблюють, затискають вену на ділянці вище пункції пальцями і швидко виймають голку, пропускаючи надалі крізь неї воду для видалення залишків крові, а потім дезінфікуючи її у киплячій воді стерилізатора. Пробірку закривають ватним корком, а місце пункції змащують йодом для зупинки кровотечі [29].

У свиней кров отримують з вуха чи хвоста. Перед цим свиню фіксують шляхом накладання на її верхні щелепи металевих щипців чи мотуззяної петлі. Потім для припливу крові у зоні вуха долонями руки чи браншами ножиць злегка постукують по вуху, після чого зовнішній край вуха протирають розчином етилового спирту і за допомогою скальпеля надрізають гілочку вени. Стосовно взяття крові з хвоста, на його кінці спочатку видаляють шерсть, після чого для припливу крові по хвосту злегка постукують браншами ножиць, а потім місце на кінці хвоста протирають розчином етилового спирту і за допомогою скальпеля чи ножиць відрізають сам кінець хвоста довжиною  $\sim 1$  см. Далі кров збирають у пробірку, після чого її закривають ватним корком [29].

Щодо переваг і недоліків вищевказаних методів забору крові у тварин, ці методи, по-перше, дозволяють отримати кров у будь-якому об'ємі і, по-друге, вони є інвазійними і травматичними, що може спричинити виникнення не тільки значних больових відчуттів у тварин, а й також сильний стрес. До того ж ці методи за недотримання правил антисептики можуть призвести до зараження [27, 29].

Стосовно переваг і недоліків забору крові з вени людини, венозна кров, по-перше, на відміну від капілярної з пальця отримується у значно більших об'ємах, що дозволяє здійснювати значно більший спектр аналізів, включаючи інформацію про різні інфекції, аутоімунні захворювання, гормональний дисбаланс, порушення роботи органів травної та серцево-

судинної системи через біохімічний профіль, анемію, імунний профіль, а також наявність алергії, які майже неможливо виявити у капілярній крові. По-друге, метод забору венозної крові із застосуванням шприців та інших систем, принцип яких полягає у здійсненні черезшкірного проколу вени, так само є інвазійним, що призводить до травматизації судин й іноді виникнення значних больових відчуттів у місці проколу. Крім того, при недотриманні правил асептики є можливим зараження [25, 26].

До того ж цей метод забору венозної крові навряд чи підійде новонародженим, дітям дошкільного і шкільного віку, а також підліткам через їхню не повністю сформовану психіку, так як в них через це може виникнути сильний стрес, а також різні психічні захворювання від психологічних травм до серйозних фобій. Окрім цього існує проблема щодо застосування методу забору венозної крові в осіб, які мають тонкі та ламкі вени, а також такі вени, які «ховаються» досить глибоко під шкірою і внаслідок цього не можуть бути намацаними і детектованими наочно [26, 30].

Зважаючи на те, що вищеописані методи забору капілярної та венозної крові є інвазійними і внаслідок цього мають більше недоліків, ніж переваг, існує ще метод забору капілярної крові із використанням медичних п'явок будь-яких видів. Цей метод на відміну від двох попередніх методів забору крові має значну перевагу, так як є неінвазійним і абсолютно безболісним методом забору крові, що дозволяє його використовувати навіть по відношенню до новонароджених і дітей будь-якого віку без ризику спричинення сильного стресу і психологічних травм [4].

Також метод забору крові із використанням п'явок різних видів дозволяє отримувати будь-який об'єм крові у залежності від кількості п'явок, що може бути значно більшим, ніж об'єм капілярної крові, який отримується з пальця людини із використанням ланцету чи скарифікатора, що дозволяє збільшити спектр аналізів, які можна проводити із «п'явочною» кров'ю. При цьому кров із використанням п'явок будь-яких видів можна брати навіть в

об'ємі, що дорівнює об'єму венозної крові, яка береться на аналіз, із тією відмінністю, що за цієї умови не потрібно проколувати вену [4].

Натомість існують дані про те, що забір крові із використанням медичних п'явок будь-яких видів змінює цитологічний склад крові, внаслідок чого спотворюються результати стосовно визначення загальної кількості лейкоцитів у певній одиниці об'єму крові, а також лейкоцитарної формули. Але на противагу цьому існує метод щодо коригування спотворених результатів гематологічного аналізу «п'явочної» крові із застосуванням кореляційного аналізу за Пірсоном [4, 7, 21, 22].

Також існує такий статистичний метод для перевірки значущості відмінностей між результатами, отриманими із використанням п'явок і звичайного методу забору крові, як критерій  $\chi^2$ -квадрат. При цьому існують дані, що вказують на статистично достовірну різницю між результатами, отриманими при аналізі капілярної крові з пальця, і результатами, отриманими при аналізі крові зі шлунка п'явки [31]

Виходить, що забір крові із використанням медичних п'явок будь-яких видів на відміну від звичайних способів забору крові має набагато більше переваг, ніж недоліків. Але водночас такий єдиний недолік цього способу забору крові, як зміна цитологічного складу крові, можна легко підкоригувати зі здійсненням кореляційного аналізу за Пірсоном [4, 7, 21, 22].

Отже, звичайний спосіб забору крові, що полягає у заборі капілярної крові з пальця людини із використанням ланцету чи скарифікатора, а також заборі венозної крові шляхом проколів вени у людини та тварин, є інвазійним і травматичним, у зв'язку з чим він має більше недоліків, ніж переваг. У той час спосіб забору крові із використанням п'явок будь-яких видів є неінвазійним та нетравматичним, через що він має більше переваг, ніж недоліків.

### 1.3. Загальна характеристика лейкоцитарних показників крові у нормі та при патології

Стосовно загальної кількості лейкоцитів у людській крові в нормі, цей показник є досить варіабельним і складає  $4-10 \times 10^9/\text{л}$ . При цьому стан, за якого загальна кількість лейкоцитів у крові людини є меншою за  $4 \times 10^9/\text{л}$ , характеризується як лейкопенія, а стан, за якого загальна кількість лейкоцитів у крові людини є більшою за  $10 \times 10^9/\text{л}$  (за даними інших авторів більшою за  $9 \times 10^9/\text{л}$ ), характеризується як лейкоцитоз [32].

Щодо лейкоцитарної формули людської крові у нормі, вона зазвичай характеризується значним переважанням сегментоядерних нейтрофілів, потім за ними слідує лімфоцити, далі – моноцити, на четвертому місці знаходяться паличкоядерні нейтрофіли, а на п'ятому і шостому місці, відповідно, знаходяться еозинофіли і базофіли. У табл. 1.8 зазначено характеристику загальної кількості лейкоцитів і лейкоцитарної формули крові людини у нормі [32].

Таблиця 1.8 – Характеристика загальної кількості лейкоцитів і лейкоцитарної формули крові людини у нормі [32]

Гематологічний показник	Референтні значення
Загальна кількість лейкоцитів, $\times 10^9/\text{л}$	$7 \pm 3$
Лейкоцитарна формула:	
Сегментоядерні нейтрофіли, %	$59,5 \pm 12,5$
Паличкоядерні нейтрофіли, %	$3,5 \pm 2,5$
Еозинофіли, %	$2,75 \pm 2,25$
Лімфоцити, %	$28 \pm 9$
Моноцити, %	$7 \pm 4$
Базофіли, %	0-1

Згідно з табл. 1.8, лейкоцитарна формула крові людини так само, як і загальна кількість лейкоцитів, характеризується певними референтними значеннями, вихід за межі яких вказує на ту чи іншу патологію. Наприклад, вміст у крові людини сегментоядерних нейтрофілів у значенні менше за 47% відносно всіх лейкоцитів (або  $<1,8 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $4 \times 10^9/\text{л}$  чи  $<4,7 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $10 \times 10^9/\text{л}$ ) охарактеризовує нейтропенію за сегментоядерними нейтрофілами, а вміст у крові людини подібних нейтрофілів у значенні більше за 72% відносно всіх лейкоцитів (або  $>2,9 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $4 \times 10^9/\text{л}$  чи  $>7,2 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $10 \times 10^9/\text{л}$ ), відповідно, охарактеризовує нейтрофіліоз за цим типом нейтрофілів [32].

Відповідно до цього при вмісті у крові людини паличкоядерних нейтрофілів, меншому за 1% відносно всіх лейкоцитів (або  $<0,04 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $4 \times 10^9/\text{л}$  чи  $<0,1 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $10 \times 10^9/\text{л}$ ), спостерігається нейтропенія за паличкоядерними нейтрофілами, а при вмісті у крові людини подібних нейтрофілів, більшому за 6% відносно всіх лейкоцитів (або  $>0,24 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $4 \times 10^9/\text{л}$  чи  $>0,6 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $10 \times 10^9/\text{л}$ ), спостерігається паличкоядерний нейтрофіліоз. У випадку вмісту у крові людини еозинофілів, меншого за 0,5% відносно всіх лейкоцитів (або  $<0,02 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $4 \times 10^9/\text{л}$  чи  $<0,05 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $10 \times 10^9/\text{л}$ ), відмічається еозинопенія, а при вмісті у крові людини подібних формених елементів, більшому за 5% відносно всіх лейкоцитів (або  $>0,2 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $4 \times 10^9/\text{л}$  чи  $>0,5 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $10 \times 10^9/\text{л}$ ), відмічається еозинофілія [32].

Стосовно вмісту у крові людини лімфоцитів, меншому за 19% відносно всіх лейкоцитів (або  $<0,7 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $4 \times 10^9/\text{л}$  чи  $<1,9 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $10 \times 10^9/\text{л}$ ), у цьому випадку спостерігається лімфопенія, а при вмісті у крові людини подібних



клітин, більшому за 37% відносно всіх лейкоцитів (або  $>1,4 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $4 \times 10^9/\text{л}$  чи  $>3,7 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $10 \times 10^9/\text{л}$ ), спостерігається лімфоцитоз. Вміст у крові людини моноцитів у значенні менше за 3% відносно всіх лейкоцитів (або  $<0,1 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $4 \times 10^9/\text{л}$  чи  $<0,3 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $10 \times 10^9/\text{л}$ ) вказує на монопенію, а вміст у крові людини подібних формених елементів у значенні більше за 11% відносно всіх лейкоцитів (або  $>0,4 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $4 \times 10^9/\text{л}$  чи  $>1,1 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $10 \times 10^9/\text{л}$ ), відповідно, вказує на моноцитоз [32].

Щодо патологій, пов'язаних зі зменшенням чи збільшенням вмісту базофілів у крові людини, у медичній практиці відомо лише про базофілію – стан, при якому вміст базофілів є більшим за 1% відносно всіх лейкоцитів (або  $>0,04 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $4 \times 10^9/\text{л}$  чи  $>0,1 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $10 \times 10^9/\text{л}$ ). Існування такого стану, як базопенія, не є можливим через те, що нижня межа референтних значень стосовно вмісту базофілів у крові людини відносно всіх лейкоцитів у нормі становить 0%, коли базофіли є взагалі відсутніми у крові людини [32].

Стосовно загальної кількості лейкоцитів у крові щурів у нормі, цей показник так само є варіабельним і складає  $4,77-7,1 \times 10^9/\text{л}$ . При цьому стан, за якого загальна кількість лейкоцитів у крові щура є меншою за  $4,77 \times 10^9/\text{л}$ , характеризується як лейкопенія, а стан, за якого загальна кількість лейкоцитів у крові щура є більшою за  $7,1 \times 10^9/\text{л}$ , характеризується як лейкоцитоз [7, 21, 22].

Показники лейкоцитарної формули крові лабораторних щурів залежать від віку тварини: у молодих статевозрілих тварин переважає лімфоцитарний профіль крові, а в старих тварин – зменшується кількість лімфоцитів та зростає кількість нейтрофілів [3]. Щодо лейкоцитарної формули крові 220-денних лабораторних щурів у нормі, вона на відміну від такої у людини характеризується значним переважанням лімфоцитів, потім за ними слідує

сегментоядерні нейтрофіли, далі – паличкоядерні нейтрофіли, на четвертому місці знаходяться моноцити, а на п'ятому місці – еозинофіли. Такі формені елементи, як базофіли, практично не зустрічаються у крові щурів [7, 21, 23].

Стосовно морфології ядра різних типів лейкоцитів, відомо, що у сегментоядерних нейтрофілів ядро містить від 3 до 5 перетяжкоподібних сегментів, паличкоядерні нейтрофіли мають паличкоподібне ядро у вигляді літери «I» або «С», а еозинофіли характеризуються 2-3-сегментним ядром, що зазвичай поділене на окремі широкі фрагменти. У той час у базофілів форма ядра є невизначеною і часто займає увесь об'єм клітини, лімфоцити мають округле чи бобоподібне ядро, а моноцити характеризуються поліморфним ядром, яке буває округлим чи бобоподібним із різними вдавленнями [32, 33].

На рис. 1.3 у якості прикладу представлено морфологію ядра різних типів лейкоцитів у мазку людської крові, пофарбованому за Романовським-Гімзою [33, 34].

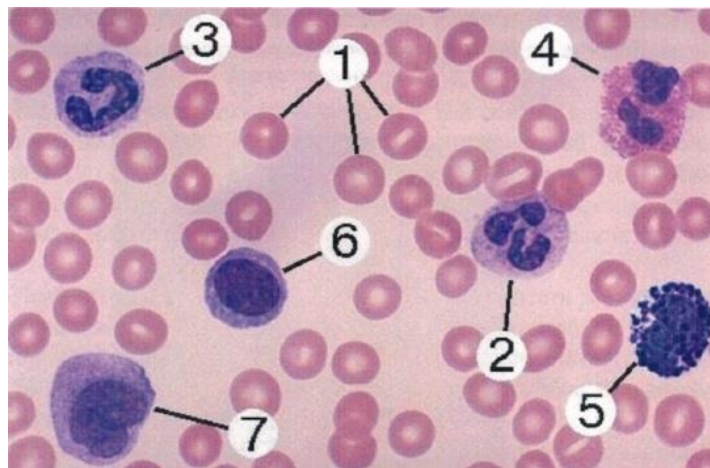


Рисунок 1.3 – Морфологія ядра різних типів лейкоцитів (2-7) у мазку людської крові, пофарбованому за Романовським-Гімзою: 1) еритроцити; 2) сегментоядерний нейтрофіл; 3) паличкоядерний нейтрофіл; 4) еозинофіл; 5) базофіл; 6) лімфоцит; 7) моноцит [33].

Характеристика лейкоцитарної формули крові 220-денних лабораторних щурів у нормі зазначена у табл. 1.9 [7, 21, 22].

Таблиця 1.9 – Характеристика лейкоцитарної формули крові 220-денних лабораторних щурів у нормі [7, 21, 22]

Гематологічний показник	Референтні значення
Загальна кількість лейкоцитів, $\times 10^9/\text{л}$	$5,93 \pm 1,165$
Лейкоцитарна формула:	
Сегментоядерні нейтрофіли, %	$17,7 \pm 4,91$
Паличкоядерні нейтрофіли, %	$6,6 \pm 1,65$
Еозинофіли, %	$0,4 \pm 0,12$
Лімфоцити, %	$72,4 \pm 3,84$
Моноцити, %	$4,2 \pm 4,04$

Згідно з табл. 1.9, лейкоцитарна формула крові лабораторних щурів так само, як і загальна кількість лейкоцитів, характеризується певними референтними значеннями, вихід за межі яких охарактеризовує ту чи іншу патологію. Наприклад, вміст у крові щура сегментоядерних нейтрофілів у значенні менше за 12,78% відносно всіх лейкоцитів (або  $<0,6 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $4,77 \times 10^9/\text{л}$  чи  $<0,9 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $7,1 \times 10^9/\text{л}$ ) охарактеризовує сегментоядерну нейтропенію, а вміст у крові щура подібних нейтрофілів у значенні більше за 22,6% відносно всіх лейкоцитів (або  $>1,08 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $4,77 \times 10^9/\text{л}$  чи  $>1,6 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $7,1 \times 10^9/\text{л}$ ), відповідно, охарактеризовує нейтрофіліоз за цим типом нейтрофілів [7, 21, 22].

Відповідно до цього при вмісті у крові щура паличкоядерних нейтрофілів, меншому за 5% відносно всіх лейкоцитів (або  $<0,2 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $4,77 \times 10^9/\text{л}$  чи  $<0,3 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $7,1 \times 10^9/\text{л}$ ), спостерігається паличкоядерна нейтропенія,

а при вмісті у крові щура подібних нейтрофілів, більшому за 8,3% відносно всіх лейкоцитів (або  $>0,4 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $4,77 \times 10^9/\text{л}$  чи  $>0,6 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $7,1 \times 10^9/\text{л}$ ), спостерігається паличкоядерний нейтрофіліоз.

У випадку вмісту у крові щура еозинофілів, меншого за 0,28% відносно всіх лейкоцитів (або  $<0,013 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $4,77 \times 10^9/\text{л}$  чи  $<0,019 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $7,1 \times 10^9/\text{л}$ ), відмічається еозинопенія, а при вмісті у крові щура подібних формених елементів, більшому за 0,52% відносно всіх лейкоцитів (або  $>0,4 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $4,77 \times 10^9/\text{л}$  чи  $>0,6 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $7,1 \times 10^9/\text{л}$ ), відмічається еозинофілія [7, 21, 22].

Стосовно вмісту у крові щура лімфоцитів, меншому за 68,61% відносно всіх лейкоцитів (або  $<3,2 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $4,77 \times 10^9/\text{л}$  чи  $<4,8 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $7,1 \times 10^9/\text{л}$ ), у цьому випадку спостерігається лімфопенія, а при вмісті у крові щура подібних клітин, більшому за 76,3% відносно всіх лейкоцитів (або  $>3,6 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $4,77 \times 10^9/\text{л}$  чи  $>5,4 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $7,1 \times 10^9/\text{л}$ ), спостерігається лімфоцитоз. Вміст у крові щура моноцитів у значенні менше за 0,2% відносно всіх лейкоцитів (або  $<0,009 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $4,77 \times 10^9/\text{л}$  чи  $<0,01 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $7,1 \times 10^9/\text{л}$ ) вказує на монопенію, а вміст у крові щура подібних формених елементів у значенні більше за 8,28% відносно всіх лейкоцитів (або  $>0,4 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $4,77 \times 10^9/\text{л}$  чи  $>0,6 \times 10^9/\text{л}$  при загальній кількості лейкоцитів  $7,1 \times 10^9/\text{л}$ ), відповідно, вказує на моноцитоз [7, 21, 22].

Таким чином, у людини і лабораторних щурів дещо відрізняються показники загальної кількості лейкоцитів у певній об'ємній одиниці крові і значно відрізняється лейкоцитарна формула. У табл. 1.10 на основі даних у табл. 1.8-1.9 продемонстровано відмінності між лейкоцитарними формулами крові людини і щура у нормі [7, 21, 22, 32].

Таблиця 1.10 – Відмінності між лейкоцитарними формулами крові людини і щура у нормі [7, 21, 22, 32]

Гематологічний показник	Референтні значення	
	Людина	Лабораторні щури
Загальна кількість лейкоцитів, $\times 10^9/\text{л}$	$7 \pm 3$	$5,93 \pm 1,165$
Лейкоцитарна формула		
Сегментоядерні нейтрофіли, %	$59,5 \pm 12,5$	$17,7 \pm 4,91$
Паличкоядерні нейтрофіли, %	$3,5 \pm 2,5$	$6,6 \pm 1,65$
Еозинофіли, %	$2,75 \pm 2,25$	$0,4 \pm 0,12$
Лімфоцити, %	$28 \pm 9$	$72,4 \pm 3,84$
Моноцити, %	$7 \pm 4$	$4,2 \pm 4,04$
Базофіли, %	0-1	0

Таким чином, у людини лейкоцитарна формула більше зсунута у бік сегментоядерних нейтрофілів, тоді як у 220-денного щура подібна формула більше зсунута у бік лімфоцитів.

Стосовно загальної кількості лейкоцитів в 1 л крові, у людини цей показник зазвичай є більшим, ніж у щура [7, 21, 22, 32]. Отже, існують певні референтні значення стосовно загальної кількості лейкоцитів і складників лейкоцитарної формули крові людини і щура у нормі, вихід за межі яких охарактеризовує ту чи іншу патологію, пов'язану зі зменшенням чи збільшенням тих чи інших типів лейкоцитів.

#### 1.4. Лейкоцитарні індекси та їх інформативність

Існує багато інтегральних лейкоцитарних індексів, що виражені у відношенні певного типу лейкоцитів до іншого типу лейкоцитів і відображають різні сторони відповіді організму на різні патологічні процеси. У табл. 1.11 продемонстровано лейкоцитарні індекси та їхнє діагностичне значення [5, 34, 37].

Таблиця 1.11 – Лейкоцитарні індекси та їхнє діагностичне значення [5, 34]

№	Назва індексу	Діагностичне значення
1	2	3
1	Індекс співвідношення еозинофілів до лімфоцитів (ІСЕЛ)	Маркери, що показують співвідношення процесів гіперчутливості негайного і сповільненого типу
2	Індекс співвідношення лімфоцитів до еозинофілів (ІСЛЕ)	Показує співвідношення афекторної та ефекторної ланок імунітету
3	Індекс співвідношення лімфоцитів до моноцитів (ІСЛМ)	Відображає відношення клітинного імунітету до його гуморальної ланки
4	Індекс співвідношення лімфоцитів до нейтрофілів (ІСЛН)	Відображає рівень реактивності й адаптаційного потенціалу організму
5	Індекс співвідношення лімфоцитів до сегментоядерних нейтрофілів (ІСЛНс)	Спрощений маркер інтоксикації, що показує співвідношення клітин неспецифічного і специфічного захисту
6	Індекс співвідношення нейтрофілів до лімфоцитів (ІСНЛ)	

## Продовження таблиці 1.11

1	2	3
7	Індекс співвідношення нейтрофілів до моноцитів (ІСНМ)	Показує співвідношення компонентів мікрофагально-макрофагальної системи
8	Індекс співвідношення паличкоядерних нейтрофілів до лімфоцитів (ІСНПЛ)	Показує стан неспецифічної резистентності організму
9	Індекс співвідношення сегментоядерних нейтрофілів до лімфоцитів (ІСНСЛ)	Спрощений маркер інтоксикації, що показує співвідношення клітин неспецифічного і специфічного захисту
10	Індекс співвідношення сегментоядерних нейтрофілів до моноцитів (ІСНСМ)	Показує співвідношення компонентів мікрофагально-макрофагальної системи
11	Індекс співвідношення сегментоядерних нейтрофілів до паличкоядерних нейтрофілів (ІСНСНп)	Маркер, що показує співвідношення зрілих форм нейтрофілів до їхніх «молодих» форм

Стосовно впливу БАР медичних п'явок на різні лейкоцитарні індекси, у джерелі [5] зазначається, що при гірудовпливі у людини змінюються наступні чотири показники: ІСЛМ, ІСЛЕ, ІСНЛ, ІСЕЛ.

Ці лейкоцитарні індекси характеризуються певними референтними значеннями. У табл. 1.12 відображено характеристику деяких лейкоцитарних індексів крові людини в нормі, які мають тенденцію до зміни при гірудовпливі [5].

Стосовно впливу ГТ на вищезазначені лейкоцитарні індекси, у дослідженні, яке проводилося із людьми, що мали хронічні серцево-судинні захворювання в періоді ремісії [5], було відмічено, що слина медичних п'явок знижує значення показників ІСЛМ та ІСЛЕ і підвищує значення показників ІСЕЛ та ІСНЛ, зважаючи на те, що у піддослідних осіб показники ІСЛМ та ІСЛЕ були значно вищими за норму.

Таблиця 1.12 – Характеристика деяких лейкоцитарних індексів крові людини у нормі, які мають тенденцію до зміни при гірудовпливі [5]

Лейкоцитарний індекс	Референтні значення, у. о.
ІСЛМ	$5,34 \pm 0,590$
ІСЛЕ	$8,73 \pm 1,260$
ІСЕЛ	$0,10 \pm 0,010$
ІСНЛ	$1,96 \pm 0,560$

У табл. 1.13 зазначено зміни лейкоцитарних індексів крові людей-добровольців із хронічними серцево-судинними захворюваннями в періоді ремісії за впливу ГТ.

Таблиця 1.13 – Зміни лейкоцитарних індексів крові людей-добровольців (n = 12) із хронічними серцево-судинними захворюваннями в періоді ремісії за впливу ГТ [5]

Лейкоцитарний індекс	Значення до ГТ, у. о.	Значення після ГТ, у. о.
ІСЛМ	$10,37 \pm 1,664$	$5,37 \pm 0,565$
ІСЛЕ	$24,67 \pm 7,923$	$14,08 \pm 2,738$
ІСЕЛ	$0,08 \pm 0,015$	$0,11 \pm 0,018$
ІСНЛ	$2,39 \pm 0,270$	$2,45 \pm 0,146$

Таким чином, при ГТ зниження показників ІСЛМ та ІСЛЕ відбувається, по-перше, за рахунок зниження відносної кількості лімфоцитів і, по-друге,



підвищення відносної кількості моноцитів та еозинофілів. Стосовно показників ІСЕЛ та ІСНЛ, їхнє значення підвищується при ГТ, так як при цьому підвищується відносна кількість еозинофілів і нейтрофілів загалом (враховуючи одночасно сегментоядерні і паличкоядерні нейтрофіли), а відносна кількість лімфоцитів, навпаки, знижується [5].

Отже, при імунологічному аналізі крові лейкоцитарні індекси так само є інформативними, як і загальна кількість лейкоцитів і лейкоцитарна формула. При проведенні ГТ значення таких показників, як ІСЛМ та ІСЛЕ, знижується за рахунок зменшення відносної кількості лімфоцитів і збільшення відносної кількості моноцитів та еозинофілів у той час, як значення ІСЕЛ та ІСНЛ, навпаки, підвищується через збільшення відносної кількості еозинофілів і нейтрофілів загалом, а також зменшення відносної кількості лімфоцитів.

## 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 2.1. Матеріали та об'єкти дослідження

Для проведення дослідження було обрано як біологічний об'єкт, що належить до класу ссавці – умовно здорових донорів будь-якої статі (12 осіб, вік 20-46 років), які дали згоду на проведення експериментальних досліджень. Ці біологічні об'єкти були віднесені одночасно до контрольної та основної групи, так як у них спочатку збирали кров звичайним методом, а потім – із використанням *Hirudo verbana*. Дослідження проведено на базі навчально-науково-дослідної лабораторії клітинної та організменної біотехнології Запорізького національного університету.

Схема дослідження включала обстеження умовно здорових донорів, яким здійснювали приставку товарних медичних п'явок виду *H. verbana* віком 7-8 місяців, вирощених на базі навчально-науково-дослідної лабораторії клітинної та організменної біотехнології Запорізького національного університету згідно з ТУ У 05.0-02125243-002:2009 «П'явка медична» (санітарно-епідеміологічний висновок МОЗ України № 05.03.02-06/49982, від 12.08.2009 р.) [38].

В обстежених брали кров із фаланги пальця перед приставкою медичної п'явки. Одразу після годування медичних п'явок на тілі людини отримували кров механічним шляхом зі шлункової кишки. Час годування медичних п'явок становив близько 35-60 хвилин [31]. Приставку медичних п'явок виконували на ділянку печінки, пупка та лона обстежених згідно з методичними рекомендаціями [39].

В отриманих зразках крові аналізували загальну кількість лейкоцитів, лейкоцитарну формулу і лейкоцитарні індекси.

## 2.2. Методи досліджень

### 2.2.1. Методи забору крові у біологічних об'єктів

#### 2.2.1.1. Звичайний спосіб (із використанням традиційного інструментарію)

Щодо звичайного способу забору крові, у донорів зразки капілярної крові отримували з фаланги пальця [40].

#### 2.2.1.2. Застосування п'явок виду *Hirudo verbana* (приставка до тіла)

Стосовно забору крові із використанням *Hirudo verbana*, спочатку місце приставки медичної п'явки (ділянка в області печінки, пупка та лона) протирали холодною кип'яченою водопровідною водою відповідно до методики, описаної в роботі [31, 39].

Потім кожному біологічному об'єкту прикладали по одній п'явці на відповідну ділянку тіла на час, який необхідний був для того, щоб п'явка після насичення кров'ю мимовільно відпала після смоктання.

Самі зразки «п'явочної» крові відбирали безпосередньо зі шлункової кишки п'явок механічним шляхом одразу після їх насичення та відпадіння від тіла годувальника (людини) [3].

## 2.2.2. Методи визначення лейкоцитарних показників крові

### 2.2.2.1. Визначення загальної кількості лейкоцитів за допомогою камери Горяєва

У камері Горяєва визначали загальну кількість лейкоцитів у зразках крові об'ємом 20 мкл, що були розведені у 20 разів підфарбованим краплею метиленового синього 3% розчином оцтової кислоти таким чином, що кінцева концентрація зразка крові у краплі виготовленого розчину (~20 мкл) становила 1 мкл. Після внесення 20 мкл виготовленого розчину у камеру Горяєва за малого збільшення мікроскопа (окуляр К7×, об'єктив ×10) рахували кількість лейкоцитів у 100 великих квадратах, які були як у межах квадрату, так і доторкалися до його лівої та верхньої межі. Кількість лейкоцитів в 1 мкл крові розраховували за наступною формулою [2.1]:

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

де:

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

З метою спрощення розрахунку у наведеній формулі робили ряд скорочень, і для знаходження показника загальної кількості лейкоцитів в 1 мкл крові результат, отриманий при підрахунку лейкоцитів у 100 великих квадратах Камери Горяєва, множили на 50. Стосовно знаходження показника загальної кількості лейкоцитів в 1 л крові отриманий результат кількості лейкоцитів в 1 мкл крові множили ще на  $1 \times 10^6$  [40].

### 2.2.2.2. Визначення лейкоцитарної формули крові

Для визначення лейкоцитарної формули із 20 мкл кожного зразка крові готували мазки, які фарбували за Романовським-Гімзою для виявлення різних типів лейкоцитів. Виготовлені мазки мікроскопіювали із застосуванням імерсійного об'єктиву, кінець якого занурювався у краплю імерсійної олії, нанесену на мазок. Аналізували не менше 200 різних лейкоцитів за допомогою 11-клавійного лічильника, диференціюючи їх кількість за видами. Далі рахували кількість тих чи інших лейкоцитів, а отриманий результат представляли у вигляді співвідношення кількості певних лейкоцитів до усіх прорахованих лейкоцитів у %. Враховуючи отримані дані загальної кількості лейкоцитів додатково визначали абсолютну кількість лімфоцитів, моноцитів, нейтрофілів паличко- та сегментоядерних, еозинофілів [40].

### 2.2.2.3. Визначення лейкоцитарних індексів

Лейкоцитарні індекси розраховували на основі результатів лейкоцитарної формули крові у програмі Excel. До цих індексів належали наступні:

- Індекс співвідношення еозинофілів до лімфоцитів (ІСЕЛ);
- Індекс співвідношення лімфоцитів до еозинофілів (ІСЛЕ);
- Індекс співвідношення лімфоцитів до моноцитів (ІСЛМ);
- Індекс співвідношення лімфоцитів до нейтрофілів (ІСЛН);
- Індекс співвідношення лімфоцитів до сегментоядерних нейтрофілів (ІСЛНс);
- Індекс співвідношення нейтрофілів до лімфоцитів (ІСНЛ);

- Індекс співвідношення нейтрофілів до моноцитів (ІСНМ);
- Індекс співвідношення паличкоядерних нейтрофілів до лімфоцитів (ІСНпЛ);
- Індекс співвідношення сегментоядерних нейтрофілів до лімфоцитів (ІСНсЛ);
- Індекс співвідношення сегментоядерних нейтрофілів до моноцитів (ІСНсМ);
- Індекс співвідношення сегментоядерних нейтрофілів до паличкоядерних нейтрофілів (ІСНсНп) [23, 37].

### 2.2.3. Статистична обробка даних

Статистичну обробку даних здійснювали із використанням пакету прикладних програм Microsoft XP «Exel» і IBM SPSS Statistics 20,0 (USA). Порівнювали результати даних, отриманих із використанням *H. verbana*, зі значеннями, отриманими зі здійсненням звичайного способу забору крові за допомогою Т-критерію Стьюдента [41-44].

Середнє арифметичне значення визначається за формулою [2.2]:

$$\bar{x} = \sum \frac{xi}{n} \quad (2.2)$$

де  $n$  – кількість випадків;

$\Sigma$  – сума варіантів.

Середнє квадратичне відхилення розраховується за формулою [2.3]:

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

Похибка середнього арифметичного значення обчислюється за формулою [2.4]:

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

Достовірність різниці визначається за формулою [2.5]:

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

Показник вірогідності (P) відшукується по таблиці Ст'юдента на підставі даних ( $t_d$ ) [41-44].

### 3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

#### 3.1 Загальна кількість лейкоцитів та лейкоцитарна формула капілярної крові донорів та при використанні *Hirudo verbana* для забору крові

При аналізі зразків капілярної крові донорів було виявлено, що у всіх зразках крові загальна кількість лейкоцитів і лейкоцитарна формула були в межах норми. У табл. 3.1 відображено лейкоцитарну формулу капілярної крові донорів та при використанні *Hirudo verbana* для забору крові.

Таблиця 3.1 – Загальна кількість лейкоцитів та лейкоцитарна формула капілярної крові донорів і при використанні *H. verbana* для забору крові,  $x_{cp} \pm m$  ( $n = 12$ ).

Гематологічний показник	Од. вимір.	Капілярна кров	Кров, отримана за допомогою <i>H. verbana</i>	P
Кількість лейкоцитів	Г/л	6,31 ± 0,191	7,15 ± 0,260	0,004*
Сегментоядерні нейтрофіли	%	60,25 ± 1,330	56,21 ± 2,250	0,05*
	Г/л	3,78 ± 0,093	4,03 ± 0,245	0,24
Паличкоядерні нейтрофіли	%	2,50 ± 0,322	3,38 ± 0,210	0,08
	Г/л	0,16 ± 0,022	0,24 ± 0,015	0,02*
Нейтрофіли всього	%	62,75 ± 1,238	59,58 ± 2,262	0,122
	Г/л	3,94 ± 0,097	4,27 ± 0,25	0,14
Еозинофіли	%	2,29 ± 0,284	2,08 ± 0,330	0,68
	Г/л	0,15 ± 0,019	0,15 ± 0,025	0,91
Лімфоцити	%	28,96 ± 1,291	33,04 ± 1,910	0,03*
	Г/л	1,84 ± 0,114	2,35 ± 0,145	0,002*
Моноцити	%	6,00 ± 0,393	5,29 ± 0,47	0,21
	Г/л	0,37 ± 0,025	0,38 ± 0,034	0,96

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



При аналізі зразків крові донорів, отриманої з використанням *Hirudo verbana*, було виявлено, що у всіх зразках крові загальна кількість лейкоцитів і лейкоцитарна формула також були в межах норми (табл. 3.1).

При порівнянні лейкоцитарної формули крові донорів, отриманої з використанням *Hirudo verbana*, із лейкоцитарною формулою капілярної крові донорів (див. табл. 3.1) помітили, що за дії БАР у крові, яка потрапила у шлунок медичної п'явки, збільшується загальна кількість лейкоцитів, а також відносна кількість паличкоядерних нейтрофілів і лімфоцитів, і зменшується відносна кількість сегментоядерних нейтрофілів, еозинофілів і моноцитів.

Для порівняння результатів дослідження використовували парний Т-критерій Стюдента, при цьому результати, отримані при заборі крові із використанням *Hirudo verbana*, порівнювали із результатами, отриманими при заборі крові звичайним способом (з фаланги пальця) у людини. У табл. 3.1 наведено результати здійснення аналізу лейкоцитарної формули донорів за парним Т-критерієм Стюдента. Стосовно загальної кількості лейкоцитів у капілярній та «п'явочній» крові донорів, тут спостерігається достовірна різниця ( $p < 0,05$ ), що вказує на істотну зміну цих результатів при знаходженні крові у шлунку п'явки. Як повідомляють в літературних джерелах, зміни кількості лейкоцитів обумовлені частковою дегідратацією крові в умовах шлункового оточення п'явки [3]. Щодо аналізу лейкоцитарної формули звичайної капілярної та «п'явочної» крові донорів, тут відзначається різний зв'язок між окремими лейкоцитарними показниками. Щодо відносної кількості сегментоядерних нейтрофілів у звичайній капілярній та «п'явочній» крові донорів, тут так само спостерігається достовірна різниця ( $p = 0,05$ ), що вказує на істотну зміну цих результатів при знаходженні крові у шлунку п'явки. Така сама різниця ( $p < 0,05$ ) спостерігається також при порівнянні результатів щодо відносної кількості лімфоцитів у звичайній венозній та «п'явочній» крові донорів. Стосовно відносної кількості паличкоядерних нейтрофілів, еозинофілів та моноцитів,

тут спостерігається недостовірною різниця ( $p > 0,05$ ), що вказує на неістотну зміну цих результатів при знаходженні крові у шлунку п'явки.

Щодо дослідження абсолютних показників то тут ми бачимо трохи іншу картину стосовно загального вмісту сегментоядерних нейтрофілів, де спостерігається недостовірною різниця ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з відсотковим їхнім співвідношенням, а загальний абсолютний вміст паличкоядерних нейтрофілів навпаки достовірно різниться у порівнянні з відсотковим співвідношенням. Оскільки сегментоядерні нейтрофіли першочергово вступають у бій захищаючи організм, то можливо при попаданні крові в організм медичної п'явки зрілі нейтрофіли швидко реагують на їхні бактерії та частково гинуть, в результаті спостерігається зниження їх вмісту. Разом з тим спостерігається підвищення вмісту паличкоядерних нейтрофілів, але з іншого боку можлива і стимуляція клітин речовинами п'явки.

Встановлено також достовірне підвищення абсолютної кількості лімфоцитів. Інші абсолютні показники лейкоцитарної формули крові статистично значимо не відрізняються.

### 3.2 Лейкоцитарні індекси капілярної крові донорів та при використанні *Hirudo verbana* для забору крові

При аналізі розрахованих лейкоцитарних індексів капілярної крові донорів виявили, що у всіх донорів показники знаходяться в межах норми. У табл. 3.2 зазначено лейкоцитарні індекси капілярної крові донорів та при використанні *Hirudo verbana* для забору крові.

При аналізі розрахованих лейкоцитарних індексів крові донорів, отриманої з використанням *H. verbana*, виявили, що 64% показників збільшилися, тоді як інші 36% показників, навпаки, зменшилися. У табл. 3.2

зазначено лейкоцитарні індекси крові донорів, отриманої з використанням *H. verbana*.

Таблиця 3.2 – Лейкоцитарні індекси капілярної крові донорів та отриманої з використанням *Hirudo verbana*,  $x_{cp} \pm m$  (n = 12)

Лейкоцитарні індекси, у.о.	Капілярна кров	Кров, отримана за допомогою <i>H. verbana</i>	P
ІСЕЛ	0,08 ± 0,008	0,07 ± 0,011	0,47
ІСЛЕ	14,87 ± 1,971	21,98 ± 4,381	0,21
ІСЛМ	5,21 ± 0,580	6,62 ± 0,523	0,05*
ІСЛН	0,47 ± 0,033	0,58 ± 0,052	0,03*
ІСЛНс	0,49 ± 0,033	0,61 ± 0,060	0,02*
ІСНЛ	2,25 ± 0,180	1,93 ± 0,212	0,14
ІСНМ	10,99 ± 0,771	12,84 ± 1,783	0,28
ІСНпЛ	0,09 ± 0,010	0,11 ± 0,011	0,23
ІСНсЛ	2,16 ± 0,174	1,82 ± 0,202	0,11
ІСНсМ	10,54 ± 0,740	12,14 ± 1,700	0,31
ІСНсНп	28,46 ± 3,552	17,45 ± 1,440	0,02*

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

У табл. 3.2 наведено результати здійснення аналізу лейкоцитарних індексів крові донорів, отримані при заборі крові із використанням *Hirudo verbana*, які порівнювали із результатами, отриманими при заборі крові звичайним способом за парним Т-критерієм Стьюдента.

Щодо аналізу окремих лейкоцитарних індексів звичайної капілярної та «п'явочної» крові донорів, які, як встановлено раніше, здатні змінюватися при гірудовпливі, тут так само відзначається різний зв'язок між окремими лейкоцитарними індексами.

Стосовно такого показника, як ІСЕЛ, тут спостерігається недостовірною різниця ( $p > 0,05$ ), що вказує на неістотну зміну цих результатів при знаходженні крові у шлунку п'явки, а також може свідчити про нормальне співвідношення процесів гіперчутливості негайного та сповільненого типів.

Така сама різниця ( $p > 0,05$ ) спостерігається при порівнянні між собою таких показників, як ІСЛЕ, ІСНЛ, ІСНМ, ІСНпЛ, ІСНсЛ і ІСНсМ, що може вказувати на фізіологічну нормальність клітинного складу крові, а саме співвідношення афекторної та ефекторної ланок імунітету, відношення клітинного імунітету до його гуморальної ланки, співвідношення клітин неспецифічного і специфічного захисту; співвідношення компонентів мікрофагально-макрофагальної системи; стан неспецифічної резистентності організму; співвідношення компонентів мікрофагально-макрофагальної системи залишаються в межах фізіологічних норм у порівнянні з контрольними групами.

Щодо такого показника, як ІСНсНп його значення істотно зменшилося ( $p \leq 0,05$ ), тоді як значення показників ІСЛМ, ІСЛН та ІСЛНс істотно збільшилися ( $p \leq 0,05$ ). Дані зрушення можливо свідчать по-перше про стимулюючі та інші відомі ефекти речовин медичної п'явки, які першочергово впливають саме на дані групи клітин крові, по-друге про можливу першочергову реакцію зрілих клітин на умови забору крові.

Отже, кров, отримана зі шлункової кишки медичної п'явки виду *H. verba* одразу після її годування на тілі ссавців може бути використаною для попередньої оцінки стану їх організму, однак варто враховувати виявлені відмінності в лейкоцитарних показниках.

## 4 ОХОРОНА ПРАЦІ

Охорона праці при виконанні експериментальних досліджень є досить важливим етапом перед початком робіт, адже це запобігатиме виникненню різних нещасних випадків, починаючи травмами і професійними захворюваннями і закінчуючи більш серйозними випадками на кшталт смертельних отруєнь і навіть пожежі. Експериментальна частина кваліфікаційної роботи полягає у визначенні лейкоцитарних індексів при використанні медичної п'явки *Hirudo verbana* як неінвазивного інструменту для забору крові ссавців (людини). З цієї теми можна зрозуміти, що насамперед потрібно працювати з кров'ю ссавців і медичною п'явкою, що може бути небезпечним, тому є необхідним захист від різних біологічних рідин організму, які досліджуються. Також виконання експериментальної частини роботи передбачає використання різних хімічних речовин, скляного посуду та електроприладів, що так само можуть нести загрозу для здоров'я людини.

Дослідження проводили на базі навчально-науково-дослідної лабораторії клітинної та організменної біотехнології Запорізького національного університету. Перед початком робіт зі мною і моїм науковим керівником проводили інструктаж за інструкцією № 60 з охорони праці «При роботі з хімічними реактивами та скляним посудом» і за інструкцією № 62 «При роботі з електричними приладами» із подальшою реєстрацією у спеціальному журналі інструктажів при роботі в лабораторії. Інструктаж з охорони праці був завершений усною перевіркою набутих знань, а також вмінь і навичок безпечних прийомів роботи.

Обов'язковою умовою при проведенні експериментів є підтримка належного санітарно-гігієнічного режиму лабораторії. Такі фізичні параметри приміщення, як температура, вологість повітря, освітленість, атмосферний тиск і швидкість руху повітря, відповідали вимогам ДСН

3.36.042 99. Важливу роль при здійсненні експериментів має провітрювання приміщення, де проводяться експерименти, тобто лабораторії. Хімічний склад повітря в лабораторії має бути наступним: кисень – 20,93%; вуглекислий газ – 0,04%; азот – 78,08%; інертні гази – 0,94% [45]. Регулярне провітрювання приміщення є необхідним для відновлення концентрації кисню у повітрі, а також для зниження концентрації вуглекислого газу. Натомість для запобігання переохолодженню і пов'язаних із цим захворювань не слід при цьому влаштовувати надмірних протягів [45-49].

При роботі з електричним обладнанням потрібно чітко дотримуватися правил техніки безпеки. Працювати з електроприладами із ушкодженою ізоляцією так само, як і з незаземленим обладнанням, небезпечно [48, 50-56].

Власне робоче місце потрібно тримати в чистоті, а матеріали та обладнання, потрібні для експериментів, слід використовувати виключно при виконанні експериментів. У лабораторії категорично заборонено пити воду і вживати їжу для попередження серйозних отруень. Також задля попередження нещасних випадків заборонено працювати без наукового керівника чи лаборанта у лабораторії [49, 53, 56].

Хімічний посуд має бути абсолютно чистим задля попередження виникнення різних значних похибок в експерименті, тож без виконання цієї умови з брудним посудом працювати не можна. Для відмірювання об'єму кожного реактиву призначений спеціальний мірний посуд (піпетки, бюретки, мензурки, циліндр чи мірний стакан), і при цьому не слід виливати надлишок налитого в пробірку реактиву назад в ємність, з якої він був узятий, щоб не зіпсувати самий реактив. При проведенні різних дослідів у лабораторії використовується хімічний посуд двох типів: загального та спеціального призначення [46, 50, 51]. Досить часто при проведенні різних дослідів використовуються пробірки. При наповненні пробірки тією чи іншою хімічною рідиною потрібно слідкувати за тим, щоб пробірка не була наповненою до країв, аби уникнути розлиття цих рідин та їхнього потрапляння на шкіру експериментатора [46, 50, 51].

При проведенні мікроскопічних досліджень зазвичай використовують світловий мікроскоп. Для уникнення перенавантаження очей із подальшим погіршенням зору слід уникати тривалого контакту з мікроскопом. При роботі з мікроскопом потрібно влаштовувати короткочасні перерви для відпочинку, а також виконувати спеціальну гімнастику для очей [49, 51, 54].

Для запобігання виникненню нещасних випадків у навчальній лабораторії експерименти потрібно проводити акуратно та уважно. Потрібно, щоб площа, яка припадає на одного працюючого, була щонайменше 4,5 м<sup>2</sup>. При проведенні експериментів потрібно завжди бути у медичному халаті, а у випадку роботи з біологічними рідинами та хімічними реактивами потрібно ще одягати медичні рукавички та окуляри [49, 51, 56].

Перед початком робіт потрібно отримати дозвіл на виконання робіт, а також одягти спеціальний одяг, ознайомитися з правилами безпеки самих робіт та обладнанням, матеріалами й інструментами, які будуть використовуватися при проведенні робіт. Слід зазначити, що у лабораторії заборонено працювати одному, і наявність другої особи потрібна для надання першої допомоги при різних нещасних випадках [49, 55].

При митті скляного посуду йоржем потрібно стежити за тим, щоб йорж не вдарявся об дно і тонкі стінки посудини задля попередження розтріскування скла і травмування уламками скла. У раковину заборонено виливати концентровані розчини кислот і лугів, які сильно пахнуть, та інші отруйні речовини, адже при виливанні у раковину подібних речовин є можливим не тільки їхнє випаровування із подальшим отруєнням повітря лабораторії та прилеглих приміщень, а й руйнування каналізаційної мережі. Тому перед виливанням у раковину концентрованих кислот і лугів їх слід нейтралізувати чи сильно розбавити водою [50, 54].

При роботі з кислотами слід провести повторний інструктаж для запобігання виникненню нещасних випадків, а також надання знань щодо медичної допомоги у подібних випадках. У разі потрапляння кислот на шкіру із подальшим виникненням хімічних опіків уражену ділянку слід промити

сильним струменем проточної води, після чого ця ділянка обробляється 3%-им розчином гідрокарбонату натрію. При опіках їдкими лугами уражену ділянку слід так само промити сильним струменем проточної води, після чого ця ділянка обробляється 3%-им розчином оцтової чи борної кислоти, а потім знову промивається водою із подальшою обробкою етанолом та маззю від опіків [50-54].

У разі виникнення опіків очей внаслідок потрапляння в них кислоти очі слід промити великою кількістю води, потім обробити тампоном, змоченим у 3%-му розчині гідрокарбонату натрію, і знову промити водою. Після цього потрібно негайно звернутися до лікаря.

При порізах уламками скла слід попередньо обробленим етиловим спиртом пінцетом видалити з рани уламки скла у випадку їхньої наявності у рані, після чого рану промивають дистильованою водою, а потім змащують 5%-им спиртовим розчином йоду і забинтовують. Невеликі порізи можна заклеювати антисептичним пластиром [50-56].

При роботі на комп'ютері задля запобігання сильного навантаження на зір за участю високочастотних електромагнітних випромінювань потрібно, щоб відстань від очей до екрану монітору становила 50-70 см, а кут зору при цьому складав від 10-20° до 40°. Також для відпочинку очей і попередження надмірного впливу на організм позитивних та негативних іонів, які випромінюються комп'ютером, потрібно через кожну годину робити перерви на 20 хвилин, протягом яких слід провітрювати приміщення, а також виконувати спеціальні вправи для очей [51-53].

Крім того, при роботі на комп'ютері також йде сильне навантаження на опорно-руховий апарат через тривале перебування у фіксованій позі, у зв'язку з чим потрібно так само влаштовувати перерви на 20 хвилин після кожної години роботи за комп'ютером і протягом них виконувати різні фізичні вправи поряд із вправами для очей [51-53].

Потрібно також дотримуватися правил протипожежної безпеки. При виникненні пожежі у першу чергу потрібно евакуювати людей. При



виявленні пожежі слід вимкнути всі прилади та обладнання від енергопостачання, а потім приступити до гасіння пожежі первинними засобами пожежогасіння. За неможливості погасити пожежу самостійно слід вийти з приміщення, щільно зачинивши за собою двері та вікна для запобігання приливу свіжого повітря, яке з-за наявності великої кількості кисню сприятиме більш швидкому поширенню вогню, і негайно викликати пожежну охорону.

Після закінчення робіт слід вимкнути всі електроприлади і прибрати їх з робочого столу, а також вимкнути світло [54].

Дотримання правил безпеки при роботі з хімічними реактивами, скляним посудом та електричними приладами, а також власне роботи в лабораторії разом із підтримкою її правильного санітарно-гігієнічного режиму згідно вимог ДСН 3.36.042 99 дозволило уникнути таких ризиків, як переохолодження, виникнення різних професійних захворювань, отруєнь, травм, опіків, перенавантаження очей при роботі з мікроскопом та за комп'ютером, а також перенавантаження опорно-рухового апарату при роботі за комп'ютером. Крім того, вдалося також уникнути похибок в експерименті, псування реактивів, руйнування каналізаційної мережі та отруєння повітря лабораторії концентрованими розчинами кислот і лугів, а також пожеж. Отже, дотримання правил техніки безпеки дало можливість уникнути травмувань і нещасних випадків при виконанні кваліфікаційної роботи.

## ВИСНОВКИ

1. Загальна кількість лейкоцитів у зразках крові людини, отриманих із використанням *H. verbana*, була вищою ( $p \leq 0,05$ ) порівняно зі зразками крові, отриманими звичайним способом.

2. У зразках крові, отриманих із використанням *H. verbana* в лейкоцитарній формулі крові, виявлено зменшення відносного вмісту сегментоядерних нейтрофілів та збільшення відносного вмісту лімфоцитів ( $p \leq 0,05$ ), порівняно зі зразками крові, отриманими звичайним способом.

3. У зразках крові, отриманих із використанням *H. verbana*, відбулася зміна проаналізованих лейкоцитарних індексів порівняно зі зразками крові, отриманими звичайним способом. При цьому значення показників індексу співвідношення (ІС) еозинофілів до лімфоцитів, ІС нейтрофілів до лімфоцитів та ІС сегментоядерних нейтрофілів до лімфоцитів неістотно зменшилися ( $p > 0,05$ ), тоді як значення показників ІС лімфоцитів до еозинофілів, ІС нейтрофілів до моноцитів, ІС паличкоядерних нейтрофілів до лімфоцитів та ІС сегментоядерних нейтрофілів до моноцитів неістотно збільшилися ( $p > 0,05$ ), значення показника ІС сегментоядерних нейтрофілів до паличкоядерних нейтрофілів істотно зменшилося ( $p \leq 0,05$ ), тоді як значення показників ІС лімфоцитів до моноцитів, ІС лімфоцитів до нейтрофілів та ІС лімфоцитів до сегментоядерних нейтрофілів істотно збільшилися ( $p \leq 0,05$ ).

## ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Результати роботи можуть бути використані в навчальному процесі як показники норми загальної кількості лейкоцитів, лейкоцитарної формули і лейкоцитарних індексів крові людини при викладанні навчальних дисциплін за спеціальністю 091 Біологія та біохімія, зокрема «Великий практикум з імунології», «Імунологія», «Гематологія», «Імунологічні методи лабораторної діагностики», «Техніка біологічного експерименту», «Фізіологія людини і тварин» тощо.

Кров, отримана зі шлункової кишки медичної п'явки виду *H. verbana* одразу після її годування на тілі ссавців може бути використаною для попередньої оцінки стану організму.

## ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Лабінський А. Й. Ефективність немедикаментної терапії хворих із перенесеним ішемічним мозковим інсультом (гірудотерапія у поєднанні із нутріціологічною корекцією). *Acta medica Leopoliensia*. 2015. Т. 21, № 4. С. 16–19.
2. Горкун А. В., Цирульнікова В. В. Особливості впровадження альтернативного лікування при готельних комплексах в Карпатському регіоні. *Науковий погляд у майбутнє*. 2016. Т. 10, № 1. С. 134–140.
3. 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.
4. Validation of Medicinal Leeches (*Hirudo medicinalis*) as a Non-invasive Blood Sampling Tool for Hematology and Biochemistry Profiling in Mammals / P. Kvapil et al. *Front. Vet. Sci.* 2022. Vol. 9. P. 1–11.
5. Приходько Я. М., Литвиненко Р. О. Морфофункціональні показники нейтрофільних гранулоцитів крові людини при гірудовпливі. *Освітні та наукові виміри природничих наук* : матеріали II Всеукр. заоч. наук. конф., м. Суми, 8 груд. 2021 р. / ред.: А. О. Корнус та ін. Суми, 2021. С. 92–96.
6. Фролов О. К., Литвиненко Р. О. Морфофункціональні стани п'явки виду *Hirudo verbana* в найближчі проміжки часу після сеансів гірудотерапії. *Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки*. 2013. Т. 3. С. 127–133.
7. Амінов Р. Ф., Фролов О. К. Проліферативна активність клітин кісткового мозку щурів за впливу біологічно активних речовин медичної п'явки. *Regul. Mech. Biosyst.* 2017. Т. 8, № 4. С. 501–505.
8. Case Reports and Experts Opinions about Current Use of Leech Therapy in Dermatology and Cosmetology / E. Ząbkowska et al. *Cosmetics*. 2022. Vol. 9, no. 6. P. 1–11.

9. Unravelling the Extent of Diversity within the Iberian Medicinal Leeches (Hirudinea: Hirudo) Using Molecules and Morphology / A. Arias et al. *Biology (Basel)*. 2021. Vol. 10, no. 4. P. 1–22.

10. Патогенетичне обґрунтування гірудотерапії та її застосування в оториноларингології / Д. І. Заболотний та ін. *Otorhinolaryngology*. 2020. Т. 3. С. 83–93.

11. Pennington M. W., Czerwinski A., Norton R. S. Peptide therapeutics from venom: Current status and potential. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2018. Vol. 26. P. 2738–2758.

12. Deshmukh S. S., Bobdey A. D. Analysis of structure of hirudin and its mechanism of interaction with thrombin. *IJRBAT*. 2015. Vol. 2, no. 7. P. 400–403.

13. Noncoded amino acids in protein engineering: Structure–activity relationship studies of hirudin–thrombin interaction / V. De Filippis et al. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2018. Vol. 65, no. 1. P. 69–80.

14. RGD-hirudin-based low molecular weight peptide prevents blood coagulation via subcutaneous injection / Y.-R. Li et al. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2020. Vol. 41, no. 6. P. 753–762.

15. Бабінець Л. С., Кицай К. Ю. Дисбаланс калікреїн-кінінової системи при хронічному панкреатиті у поєднанні з ожирінням і результати його комплексної корекції. *Гастроентерологія*. 2017. Т. 51, № 4. С. 246–248.

16. Худякова М. Б., Соколова І. І., Бірюкова М. М. Місцева та загальна фармакотерапія запальних захворювань пародонту : навч.-метод. посіб. / Рецензент: В. І. Гризодуб, І. М. Ткаченко. Харків : ХНМУ, 2018. 85 с.

17. Ахтямова Д. В., Савіна Ю. С. Основні аспекти іммобілізації ферментів на прикладі ліпаз. *Наукові розробки молоді на сучасному етапі : матеріали XVII Всеукр. наук. конф. молодих уч. та студентів, м. Київ, 26–27 квіт. 2018 р. Київ, 2018. С. 515–516.*

18. Тимощук О. В., Лембрик І. С., Кочерга З. Р. Простагландини – універсальні біорегулятори в організмі людини (огляд літератури). *Запорізький медичний журнал*. 2018. Т. 20, № 1 (106). С. 121–127.

19. Аналгетична активність нової оригінальної сполуки, похідного карбонової кислоти / О. Ю. Кошова та ін. *Збірник праць Національного фармацевтичного університету*. 2017. С. 124.

20. Гадзевич О. В. Фактори патогенності збудника псевдомонозу (огляд літератури). *Ветеринарна медицина*. 2016. Т. 102. С. 75–78.

21. Амінов Р. Ф., Фролов О. К. Фагоцитарна та метаболічна активність нейтрофілів щурів на ранніх етапах постембріонального розвитку за впливу біологічно активних речовин сольового екстракту *Hirudo verbana*. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2016. Т. 2, № 7. С. 96–100.

22. Амінов Р. Ф. Гемопоетична активність кісткового мозку щура на фоні впливу сольового екстракту *Hirudo verbana* Carena, 1820. *Вісник Харківського національного університету імені ВН Каразіна. Серія «Біологія»*. 2018. Т. 30. С. 87–94.

23. Хоменко А. А. Модуль перфорації шкіри для забору крові в автоматизованій біометричній системі. *Погляд у майбутнє приладобудування*: матеріали XIII Всеукр. наук.-практ. конф. студентів, аспірантів та молодих вчен., м. Київ, 13–14 трав. 2020 р. Київ, 2020. С. 237–239.

24. Славопас В. А. Порівняльна характеристика способів забору венозної крові для лабораторної діагностики. *Медсестринство*. 2015. Т. 4. С. 55–57.

25. Колодій В. О., Штофель Д. Х. Особливості застосування пластикових пробірок для забору крові. 2021. С. 1–2.

26. Макарова Т. Д., Яковенко І. О. Автоматизована система перфорації шкіри та забору крові. *Ефективність інженерних рішень у приладобудуванні*: матеріали XIV Всеукр. наук.-практ. конф. студентів, аспірантів та молодих вчен., м. Київ, 4–5 груд. 2018 р. Київ, 2018. С. 291–294.

27. Виведення тварин з експерименту. Забір крові, приготування та зберігання біологічного матеріалу. URL: <http://surl.li/nomag> (дата звернення: 08.10.2023).

28. Спосіб забору крові з латеральної хвостової вени у лабораторних щурів : пат. 120056 Україна : G01N 33/48. № у 2017 03057 ; заявл. 31.03.2017 ; опубл. 25.10.2017, Бюл. № 20. 1 с.

29. Взяття крові у корів з хвостової вени і яремної. *Світ тваринництва і рослинності* – *sksumykhimprom.com.ua*. URL: <https://sksumykhimprom.com.ua/?p=26086> (дата звернення: 08.10.2023).

30. Славопас В. А. Забір крові з вени: основні правила, способи, сучасні технології. *Медсестринство*. 2016. Т. 4. С. 44–46.

31. Спосіб дослідження крові : пат. 68769 Україна : А61В 5/00, G01N 33/49. № у 2011 11341 ; заявл. 26.09.2011 ; опубл. 10.04.2012, Бюл. № 7. 8 с.

32. Горбачова С. В. Лейкоцитарна формула. Абсолютна і відносна кількість лейкоцитів. Кількісні зміни лейкоцитів. URL: [http://dspace.zsmu.edu.ua/bitstream/123456789/8139/1/GorbachovaSV17\\_Lejk\\_form.pdf](http://dspace.zsmu.edu.ua/bitstream/123456789/8139/1/GorbachovaSV17_Lejk_form.pdf) (дата звернення: 08.10.2023).

33. Горбачова С. В. Поняття про клінічний аналіз крові. URL: [http://dspace.zsmu.edu.ua/bitstream/123456789/8141/1/GorbachovaSV17\\_Ponja\\_rkacr.pdf](http://dspace.zsmu.edu.ua/bitstream/123456789/8141/1/GorbachovaSV17_Ponja_rkacr.pdf) (дата звернення: 08.10.2023).

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

35. Lee G., Goosens K. A. Sampling Blood from the Lateral Tail Vein of the Rat. *JoVE*. 2015. Vol. 99. e52766. URL: <https://www.jove.com/t/52766/sampling-blood-from-the-lateral-tail-vein-of-the-rat> (date of access: 11.10.2023).

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

37. Lytvynenko R. O., Maquyeva L. V. Hematological leukocytes ratio indices: Predictors of acute purulent fecal peritonitis in nonlinear laboratory rats. *Journal of Advanced Biotechnology and Experimental Therapeutics*. 2021. Vol. 4(2). P. 120–132.

38. Фролов О. К. Методичні рекомендації до технологічного регламенту біотехнології медичної п'явки. Запоріжжя : Сору Art, 2012. 36 с.
39. Фролов О. К. Методичні рекомендації до проведення курсу гірудотерапії. Запоріжжя : Сору Art, 2012. 19 с.
40. Кайдашева І. П. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині. Полтава : Полімет, 2003. 320 с.
41. Приседський Ю.Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів. Донецьк : Юго-Восток, 1999. 210 с.
42. Мельниченко О.П., Якименко І.Л., Шевченко Р.Л. Статистична обробка експериментальних даних : навчальний посібник. Біла Церква, 2006. 34 с.
43. Бахрушин В. Є. Методи аналізу даних : навчальний посібник для студентів. Запоріжжя : КПУ, 2011. 268 с.
44. Василенко О. А., Сенча І. А. Математично-статистичні методи аналізу у прикладних дослідженнях : навч. посіб. Одеса : ОНАЗ ім. О. С. Попова, 2011. 166 с.
45. ДСН 3.3.6.042-99 Санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень. *БУДСТАНДАРТ Online - нормативні документи будівельної галузі України.* URL: [http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page?id\\_doc=14283](http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page?id_doc=14283) (дата звернення: 04.10.2023).
46. Інструкція з охорони праці при роботі зі скляним лабораторним посудом та іншими виробами зі скла | Інструкції для навчальних закладів України. *Інструкції для навчальних закладів України | Інструкції з охорони праці, техніки безпеки і пожежної безпеки.* URL: <https://osvita-docs.com/node/286> (дата звернення: 04.10.2023).
47. Інструкція з охорони праці при роботі з хімічними реактивами і спиртівками в кабінеті біології | Інструкції для навчальних закладів України. *Інструкції для навчальних закладів України | Інструкції з охорони праці, техніки безпеки і пожежної безпеки.* URL: <https://osvita-docs.com/node/71> (дата звернення: 04.10.2023).



48. Інструкція з охорони праці при користуванні електропобутовими приладами. *Календар бухгалтера.* URL:

<https://services.uteka.ua/ua/publication/zrazky-34-trudovi-vidnosyny-ta-oplata-pratsi-138-instrukciya-po-oxrane-truda-pri-polzovanii-elektrobytovykh-prigorov> (дата звернення: 04.10.2023).

49. ДСП 9.9.5.-080-02. Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю (3108). ДНАОП - *Нормативно-правова бібліотека інструкції документи.* URL: [https://dnaop.com/html/3108/doc-ДСП\\_9.9.5.-080-02](https://dnaop.com/html/3108/doc-ДСП_9.9.5.-080-02) (дата звернення: 04.10.2023).

50. Охорона праці та промислова безпека : навч. посіб. / К.Н. Ткачук та ін.; за ред. К.Н. Ткачука і В.В. Зацарного. Київ, 2009. 454 с.

51. Шевченко А.М. Яворівський О.П. Гігієна праці. Вінниця : Нова книга, 2005. 84с.

52. Основи охорони праці / В.В. Березуцький та ін.; за ред. В.В. Березуцького. Харьков: Факт, 2005. 480 с.

53. Серіков Я.О. Основи охорони праці : навчальний посібник для студентів вищих закладів освіти. Харків, ХНАМГ. 2007. 227 с.

54. Правила охорони праці у хімічних лабораторіях. К. : Основа, 2013.

55. Охорона праці / З.М. Яремко, С.В. Тимошук, О.І. Третяк, Р.М. Ковтун; за ред. З.М. Яремка. Львів : Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2010. 310 с.

56. Березуцького В. В. Основи охорони праці: навчальний посібник. Х. : Факт, 2005. 480 с.