

**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: **ВЗАЄМОДІЯ КЛІТИН КРОВІ ЛАБОРАТОРНОГО ЩУРА ТА  
МІКРООТОЧЕННЯ ТРАВНОЇ СИСТЕМИ *HIRUDO VERBANA***

Виконала: студентка 2\_курсу, групи 8.0912-б  
спеціальності 091 Біологія  
освітньої програми Біологія

О. А. Круть

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

Рецензент к.б.н., доцент Є.Ю.Гороховський

**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

**З А В Д А Н Н Я**  
**НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТЦІ**

Олександрі Андріївні Круть

1 Тема роботи: Взаємодія клітин крові лабораторного щура та мікрооточення травної системи *Hirudo verbana*

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: огляд наукової літератури щодо проблеми дослідження

4 Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити): 1. Проаналізувати життєздатність медичної п'явки після годування на тілі лабораторних щурів. 2. Проаналізувати загальну кількість лейкоцитів, лейкоцитарну формулу інтактної крові (з хвоста) лабораторних щурів та з шлункової кишки медичної п'явки після гірудовпливу. 3. Проаналізувати динаміку загальної кількості лейкоцитів та лейкоцитарної формули крові лабораторного щура в мікрооточенні травної системи медичної п'явки *Hirudo verbana*.

5 Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень): Рис. 3.1, табл. 3.1 - Життєздатність *Hirudo verbana* після годування кров'ю лабораторних щурів. Табл. 3.2 - Динаміка загальної кількості лейкоцитів та лейкоцитарної формули лабораторних щурів у мікрооточенні травної системи *Hirudo verbana*.

## 6. Консультанти розділів роботи

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

7 Дата видачі завдання \_\_\_\_\_

### КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Огляд літературних джерел. Написання розділу «Огляд наукової літератури»	Жовтень – грудень 2022	Виконано
2	Вивчення, розробка методик дослідження. Написання відповідного розділу роботи	Грудень 2022 – січень 2023	Виконано
3	Засвоєння правил техніки безпеки під час виконання експериментальної частини. Написання розділу «Охорона праці»	Січень – лютий 2023	Виконано
4	Проведення експериментальних досліджень.	Березень – травень 2023	Виконано
5	Оформлення результатів експерименту (таблиці, рисунки). Написання відповідного розділу роботи	Вересень – жовтень 2023	Виконано
6	Оформлення кваліфікаційної роботи.	Листопад 2023	Виконано
7	Передзахист кваліфікаційної роботи	Листопад 2023	Виконано
8	Захист кваліфікаційної роботи	Грудень 2023	Виконано

Студент \_\_\_\_\_

О.А. Круть

Керівник роботи \_\_\_\_\_

Р.О. Литвиненко

**Нормоконтроль пройдено**

Нормоконтролер \_\_\_\_\_

Є.Ю. Гороховський

## РЕФЕРАТ

Робота викладена на 62 сторінках друкованого тексту, містить 2 таблиці та 6 рисунків. Список літератури включає 50 джерел, зокрема 17 іноземних.

Об'єкт дослідження – медичні п'явки виду *Hirudo verbana* після годування кров'ю лабораторних щурів. Предмет дослідження – життєздатність *Hirudo verbana* після годування кров'ю лабораторних щурів та лейкоцитарні показники крові лабораторних щурів під дією мікрооточення травної системи *Hirudo verbana*. Метою роботи є дослідити взаємодію клітин крові лабораторного щура та мікрооточення травної системи *Hirudo verbana*.

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

Після годування медичної п'явки кров'ю лабораторних щурів, можливий нормальний перебіг посттрофічного періоду і патологічний, який спостерігається на 10-14 добу, супроводжується зригуванням крові, формуванням перетяжок на тілі, та завершується смертю частини тварин. У зразках крові, отриманих зі шлункової кишки медичної п'явки при спостереженні впродовж 30 днів, виявлено зниження кількості лейкоцитів, зокрема паличко- і сегментоядерних нейтрофілів, моноцитів та більш тривале збереження еозинофілів та лімфоцитів, більшість лейкоцитів мали ознаки апоптозу чи некрозу; на 35 добу виявлявся лише детрит на гемолітичному фоні.

Теоретичне значення: доповнено дані щодо взаємодії клітин крові ссавців та мікрооточення травної системи *Hirudo verbana*.

Практичне значення: результати роботи можуть бути корисними для лабораторій, які спеціалізуються на біотехнології медичної п'явки.

**БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ РЕЧОВИНИ, МЕДИЧНА П'ЯВКА, ПІРУДОТЕРАПІЯ, ЛЕЙКОЦИТИ, ЛАБОРАТОРНІ ЩУРИ**

## ABSTRACT

The work is presented on 62 pages of printed text, contains 2 tables and 6 figures. The bibliography includes 50 sources, including 17 foreign ones.

The object of the study is medicinal leeches of the species *Hirudo verbana* after feeding on the blood of laboratory rats. The subject of the research is the viability of *Hirudo verbana* after feeding with the blood of laboratory rats and the leukocyte parameters of the blood of laboratory rats under the influence of the microenvironment of the digestive system of *Hirudo verbana*. The aim of the work is to investigate the interaction between the blood cells of a laboratory rat and the microenvironment of the digestive system of *Hirudo verbana*.

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

After feeding a medicinal leech with the blood of laboratory rats, a normal course of the posttrophic period is possible and a pathological one, which is observed on 10-14 days, is accompanied by vomiting of blood, the formation of constriction on the body, and ends with the death of some animals. In blood samples obtained from the stomach of a medicinal leech during observation for 30 days, a decrease in the number of leukocytes, in particular, rod- and segmentonuclear neutrophils, monocytes, and a longer preservation of eosinophils and lymphocytes, most of the leukocytes had signs of apoptosis or necrosis; on the 35th day, only detritus was detected on a hemolytic background.

Theoretical significance: the data on the interaction of mammalian blood cells and the microenvironment of the digestive system of *Hirudo verbana* have been supplemented.

Practical significance: the results of the work may be useful for laboratories specializing in medicinal leech biotechnology.

BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES, MEDICINAL LEECH, HYRUDOTHERAPY, LEUCOCYTES, LABORATORY RATS

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ.....	7
ВСТУП.....	8
1 ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ .....	10
1.1 Загальна характеристика класу п'явки .....	10
1.1.1 Систематичне положення .....	10
1.1.2 Будова п'явок .....	12
1.2 Практичне значення медичної п'явки .....	18
1.3 Біологічно активні речовини медичної п'явки .....	19
1.4 Мікробіом медичної п'явки .....	26
1.5 Гірудотерапія .....	28
1.6 Біотехнологія медичної п'явки виду <i>Hirudo verbana</i> .....	28
2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ .....	31
2.1 Матеріали та об'єкт дослідження .....	32
2.2 Методи дослідження .....	32
2.2.1 Визначення кількості лейкоцитів .....	32
2.2.2 Визначення лейкоцитарної формули крові .....	33
2.2.3 Статистична обробка експериментальних даних .....	34
3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА .....	38
3.1 Морфофункціональні стани медичної п'явки виду <i>Hirudo verbana</i> після годування кров'ю лабораторних щурів .....	38
3.2 Динаміка життєздатності формених елементів крові лабораторних щурів у кишковому мікрооточенні медичної п'явки після гірудотерапевтичної процедури .....	41
4 ОХОРОНА ПРАЦІ .....	46
ВИСНОВКИ.....	55
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	56
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ.....	57

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ  
І ТЕРМІНІВ

БАР – біологічно активні речовини

ГТ - гірудотерапія

МП – медична п'явка

ССЗ – секрет слинних залоз

## ВСТУП

Медична п'явка (МП) використовувалася в лікувальних цілях протягом тисячоліть, і продовжує використовуватися сьогодні в сучасних умовах. Її корисність забезпечується надзвичайно потужними антикоагулянтними факторами, які п'явка виділяє в різану рану під час годування, і, хоча кілька досліджень були націлені на певні антикоагулянти, повний спектр антикоагулянтних факторів, продукованих цим видом, залишається невідомим.

Незважаючи на значення МП, як медичного інструменту з давніх-давен через сучасну науково обґрунтовану медицину, примітно, що репертуар антикоагулянтів та інших біологічно активних білків слини цього виду уникнув глибокого дослідження. Для того, щоб підтримувати кровотік у тканинах, що оточують різані рани, протягом тривалих періодів живлення і, що важливо, утримувати кров від згортання всередині травної системи в період травлення, п'явки, що споживають кров, виділяють різноманітні біологічно активні сполуки зі своїх слинних залоз. Зі слини п'явок було виділено понад 20 різних сполук, пов'язаних з антигемостазом, включаючи, наприклад, прямі інгібітори тромбіну, інгібітори фактора Ха, інгібітори трипсину, ендоглюкуронідази та антитромбоцитарні білки. Корисність п'явок у сучасній медицині зосереджена на післяопераційних процедурах, головним чином після реплантації пальців або операції з пересадки шкіри для уникнення застою крові в кінцівках. На противагу цьому, середньовічні медичні практики, вершиною яких є флеботомія за допомогою п'явки, зосереджувалися на відновленні балансу між тілесними гуморами для лікування або профілактики різноманітних захворювань. Надзвичайно часте використання п'явок призвело до надмірного вилову. У 18 -19 столітті був рівень збирання МП був таким великим, що наразі види *Hirudo medicinalis* і *H. verbana* все ще охороняються Конвенцією про міжнародну торгівлю видами дикої флори і фауни, що перебувають під загрозою зникнення [1]. Тому актуальним є вивчення



біотехнологічних прийомів розведення медичної п'явки в лабораторних умовах та з'ясування причин смертності частини з них в найближчий посттродічний період.

Мета роботи: дослідити взаємодію клітин крові лабораторного щура та мікрооточення травної системи *Hirudo verbana*.

Для досягнення даної мети були висунуті наступні завдання:

1. Проаналізувати життєздатність медичної п'явки після годування на тілі лабораторних щурів.

2. Проаналізувати загальну кількість лейкоцитів, лейкоцитарну формулу інтактної крові (з хвоста) лабораторних щурів та з шлункової кишки медичної п'явки після гірудовпливу.

3. Проаналізувати динаміку загальної кількості лейкоцитів та лейкоцитарної формули крові лабораторного щура в мікрооточенні травної системи медичної п'явки *Hirudo verbana*.

Об'єктом дослідження – медичні п'явки виду *Hirudo verbana* після годування кров'ю лабораторних щурів.

Предмет дослідження – життєздатність *Hirudo verbana* після годування кров'ю лабораторних щурів та лейкоцитарні показники крові лабораторних щурів під дією мікрооточення травної системи *Hirudo verbana*.

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

Теоретичне значення отриманих даних. Доповнено дані щодо взаємодії клітин крові ссавців (лабораторних щурів) та мікрооточення травної системи *Hirudo verbana*.

Практичне значення: результати роботи можуть бути впроваджені в навчальний процес при підготовці бакалаврів та магістрів за спеціальністю 091 Біологія та біохімія. Результати роботи також можуть бути корисними для лабораторій, які спеціалізуються на біотехнології медичної п'явки.

## 1 ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1 Загальна характеристика класу п'явки

#### 1.1.1 Систематичне положення

Домен: Еукаріоти (Eucaryota)

Царство: Тварини (Animalia)

Тип: Кільчасті черви (Annelida)

Клас: П'явки (Hirudinida)

Підклас: П'явки (Hirudinea)

Ряд: Безхоботні п'явки (Arhynchobdellida)

Родина: Hirudidae

Рід: *Hirudo*

Вид: П'явка медична

МП належить до типу кільчастих червів (Annelida), класу Hirudina, відділу Gnathobdellida.

Медичний вид п'явок успішно використовується в лікуванні пацієнтів на території Європи, України. В Азії, Африці, Америці використовують й інші види п'явок. У дикій природі зустрічається до 600 різновидів п'явок. При такому розмаїтті п'явок для лікування в Європі, є три різні європейські види п'явок, які використовуються в медицині: *H. verbana*, *H. medicinalis*, *H. orientalis*, (рисунок 1.1) [2, 3].

Аптечна МП (*H. verbana*), батьківщиною якої є Угорщина. Тому іноді можна почути, що його називають угорською. Найбільш широко поширений в Вірменії, в окремих районах Закавказзя. Аптечний вид забарвлений в темно-зелений колір. Черево жовтого кольору, на якому чітко видно гладкі кільця. По спині проходять смуги в кількості шести штук, точки відсутні.

Лікувальна МП (*H. medicinalis*), яку ще називають лікарською, поширена на території України. Ця п'явка вже більш темного забарвлення. У неї

переважає оливковий колір, з бурим відтінком. По спині проходять червоно-жовті смуги. Точки присутні по всьому тілу.

Східний вид (*H. orientalis*) – поширений на Закавказзі і в Азербайджані. Найбільш яскравий представник лікувальних видів. Спинка покрита помаранчевими смугами насиченого кольору і чорними плямами. Черво чорне, покрите зеленими плямами [4].

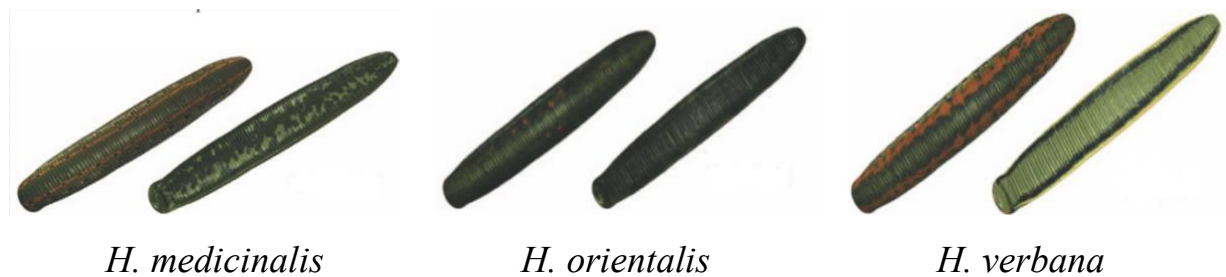


Рисунок 1.1 – Види медичної п'явки [3]

### 1.1.2 Будова п'явок

П'явки – це безхребетні тварини, кільчасті черви, які мають витягнуте або овальне тіло. Довжина тіла сягає до 3–6 см, яке сплюснене в спинно-черевному напрямку, яке чітко розділене на невеликі кільця. Шкіра містить численні залози, що виділяють слиз. На задньому і передньому кінцях тіла розташовані великі, добре розвинені, присоски; передня утворена зростанням 4-5 сегментів, задня – 7, тому вона міцніша. Задній прохід розташований над задньою присоскою. У центрі передньої частини присоски знаходиться ротовий отвір, а в ньому три гострі пластинки. На спинній стороні, над задньою присоскою є порошиця. Також на передньому кінці тіла є 1-5 пар очей, які розташовані дугою або попарно [5].

П'явки – своєрідна група кільчастих червів, що включає в себе близько 600 видів, організація яких продиктована пристосуванням до хижацького і

ектопаразитичного існування. Більшість п'явок є прісноводними мешканцями. Деякі з них ведуть земноводний спосіб життя і можуть деякий час перебувати у вологих місцях поза водою. Мало хто живе в морі, паразитуючи на шкірі морських риб. Більшість п'явок живуть вільно і полюють на дрібних тварин або тимчасово присмоктується до більших тварин і смочче кров. Деякі з них переходять від тимчасового і періодичного паразитизму до перманентного паразитизму.

Тіло п'явок помітно сплюснене в дорзовентральному напрямку. На передньому кінці є м'язова передня присоска, в центрі якої знаходиться ротовий отвір. На задньому кінці розташована друга, сильно розвинена задня присоска, над якою відкривається задній прохід зі спинного боку. Придатків і параподій у п'явок немає. Щетина збереглася лише у примітивного виду – щетинистої п'явки. П'явки – досить рухливі, повзаючі і плаваючі тварини.

Прикріплена задньою присоскою, п'явка тягне тіло вперед, потім прикріплюється за допомогою оральної присоски, в той час як задня присоска від'єднується від підкладки і тіло підтягується до головного кінця, згинаючись в петлю. Потім п'явка знову смочче задньою присоскою. Таким чином п'явки «гуляють». П'явки плавають, здійснюючи хвилеподібні рухи всім тілом, при яких тіло згинається в дорсовентральной стороні. Зовнішній дзвін п'явок вторинний, він не збігається з внутрішньою сегментацією. Кожному істинному сегменту у різних п'явок відповідає від 3 до 5 зовнішніх кілець. Зовнішній дзвін п'явок – пристосувальна ознака, що забезпечує гнучкість тіла при потужному розвитку шкірно-м'язового мішка. Тіло п'явок утворено 33 члениками. Основна частка слабо відокремлена, а чотири основні сегменти входять до складу передньої присоски. Область стовбура представлена 22 сегментами. Задня присоска утворена зрощенням останніх семи сегментів. М'язово-шкірний мішок п'явок утворений одношаровим епітелієм, в якому виділяють щільну шарувату кутикулу і сильно розвинену мускулатуру. Як і плоскі черви, п'явки мають суцільні шари м'язів шкірно-м'язового мішка: зовнішній кільцеподібний, діагональний, поздовжній. Дорсовентральні м'язи,

що не входять до складу шкірно-м'язового мішка, також сильно розвинені. Шкіра має безліч залізистих клітин, які виділяють слиз і пронизана мережею лакунарних капілярів. Під епітелієм розташовуються численні пігментні клітини, які визначають своєрідний малюнок на тілі. Практично у всіх п'явок весь простір між органами заповнено паренхімою. Тільки у п'явок паренхіма заповнює вторинну порожнину тіла, а у плоских червів – первинну [5, 6].

За будовою статевих органів і способом розмноження п'явки мають багато спільного з малощетинковими кільчаками.

Органи травлення МП беруть початок від рота, який озброєний трьома хітиновими зубчастими пластинками, розмір яких варіюється від 12 до 33 мкм, що служить для розрізання шкіри при всмоктуванні крові тварин, або здатний виступати хоботком. У ротову порожнину відкриваються численні слинні залози, які виділяють секрет. Позаду глотки, яка при всмоктуванні грає роль присоски, розташовується великий живіт (представлений еластичною трубкою з 11 парами кишень), забезпечений бічними мішечками (до 11 пар), з яких задні найдовші. Далі йде задня кишка – тонка і коротка. У кишечнику п'явок є бактерії-симбіонти (*Aeromonas hydrophila*), які допомагають перетравлювати поглинену кров і зберігати її в рідкому стані.

Травна система. Рот розміщується на дні передньої присоски. Вона веде в передній відділ травної системи, який вистелений ектодермою і складається з ротової порожнини і м'язового зіву. У медичної п'явки ротова порожнина містить три поздовжніх м'язових валики, що утворюють щелепи, які спрямовані гребенями один до одного. М'язові гребені покриті хітином, по краях зубчасті. Цими щелепами п'явки розрізають шкіру тварини або людини. У глотці кров'яних п'явок відкриваються залози, які виділяють особливу речовину – гірудин, що перешкоджає згортанню крові. Їжа надходить в середину ентодермічну кишку, яка складається зі шлунка і заднього відділу середньої кишки. Шлунок утворює парні бічні виступи, з яких остання пара, що тягнеться до заднього кінця тіла, зазвичай особливо розвинена. Шлунок є резервуаром, що дозволяє довго зберігати кров. Кров, яка наповнює його

кишені, не згортається тижнями і місяцями. Задня частина середньої кишки представлена відносно короткою прямою трубкою, в якій відбувається закінчення травлення і всмоктування їжі. Вона переходить в коротку, часто розширену задню ектодермічну ободову кишку, яка відкривається анальним отвором над задньою присоскою (рисунок 1.2, 1.3).

Нервова система п'явок складається з дволопатевого надглоткового ганглія або головного мозку, який з'єднаний з ним короткими спайками підглоткового вузла і власне черевного ланцюга, яка міститься в черевному кров'яному синусі і налічує близько 32 вузлів. Головний вузол іннервує органи чуття і глотку, від кожного вузла нервів, що іннервують сегменти тіла (відповідні їм). Нижня стінка кишечника має спеціальний поздовжній нерв, який дає гілки до сліпих мішечків кишечника [6, 7, 8].

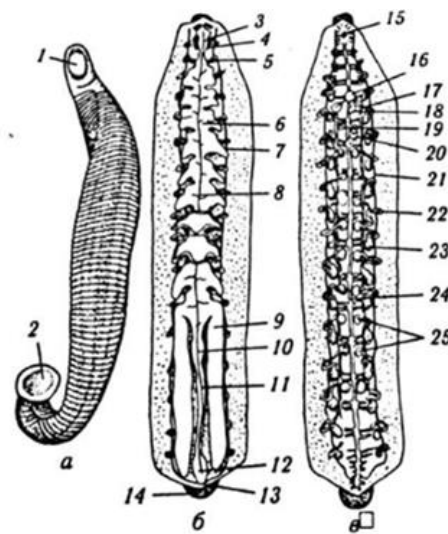


Рисунок 1.2 – Будова п'явки медичної: а – зовнішній вигляд: 1 – ротовий отвір; 2 – задній присосок; б – травна і лакуарна системи: 3 – глотка ; 4 – м'язи; 5 – нефридій; 6 – шлунок; 7 – бічний і спинний; 8 - лакуарні канали; 9 – задній виріст шлунка; 10 – залозистий придаток кишки; 11 – кишка; 12 – задня кишка; 13 – анальний отвір; 14 – задній присосок; в – нервова, лакуарна і статева системи; 15 – церебральні ганглії; 16 – простатична залоза; 17 – придаток сім'яника; 18 – чоловічий копулятивний орган; 19 – яєчники; 20 – піхва; 21 – бічний лакуарний канал; 22 – залозистий відділ нефридія; 23 –

видільний міхурець; 24 – черевний лакунарний канал з нервовим ланцюжком;  
25 – сім'яні мішки [7]

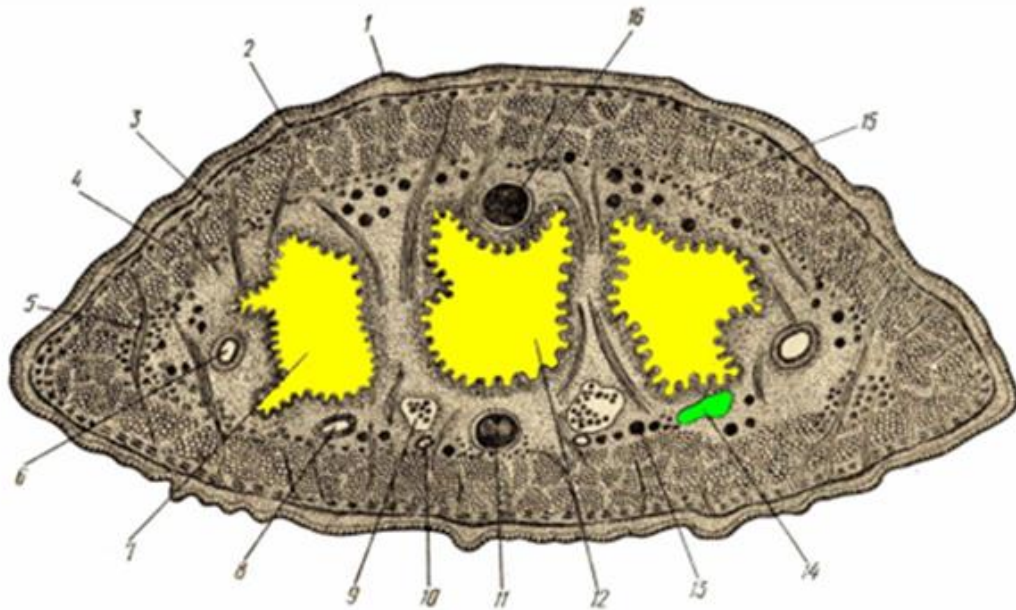


Рисунок 1.3 – Поперечний розріз медичної п'явки: 1 – шкірний епітелій; 2 – кільцева мускулатура; 3 – діагональна мускулатура; 4 – поздовжня мускулатура; 5 – дорзовентральний пучок м'язових волокон; 6 – бічний лакунарний канал; 7 – бічна кишенья шлунку; 8 – нефридій; 9 – сім'яний мішок; 10 – сім'япровід; 11 – черевний лакунарний канал з черевним нервовим ланцюгом; 12 – шлунок; 13 – лакунарний канал; 14 – сечовий міхур; 15 – ботріюїдна тканина; 16 – спинний лакунарний канал [7]

Нервова система п'явок складається з парного надглоткового ганглія, з'єднаного навкологлотковими зв'язками з підглотковим гангліозним масою, утвореним злиттям перших чотирьох пар гангліїв вентрального нервового ланцюга. Потім є 21 гангліїв вентрального нервового ланцюга і гангліозна маса (з восьми пар гангліїв), яка іннервує задню присоску.

Органи чуття п'явок представлені чутливими бруньками, або бокаловидними органами. Кожен такий орган складається з пучка веретеноподібних клітин, розташованих під епітелієм. Зовнішній кінець

чутливих клітин утворює чутливу волосину. До внутрішніх кінців цих клітин підходять нерви з вентрального нервового ланцюга. Деякі органи келихоподібної форми функціонують як хімічні органи чуття, а інші – як тактильні органи. Очі п'явок мають будову, схожу з бокалоподібними органами. Пар їх може бути кілька. Око складається з везикулоподібних світлочутливих клітин з великою вакуолею всередині, до яких підходять нерви, що складають основну частину ока. Око оточене темним пігментом.

Кровоносна система п'явки замкнутого типу, складається частково з істинних, пульсуючих, судин, частково з порожнин – синусів, що представляють собою залишок вторинної порожнини тіла, які з'єднані між собою кільцевими каналами. Кров хоботних п'явок безбарвна, у щелепних п'явок – червона, за рахунок розчиненого в лімфі гемоглобіну. Особливі органи дихання присутні тільки у роду *Branchellion*, вони мають форму листоподібних придатків з боків тіла. Кровоносні судини скорочуються. Функцію кровоносної системи виконує лакуарна система, яка бере свій початок від целома. Цей процес функціонального заміщення одного органу іншим органом походження називається заміщенням, або заміщенням органів.

Статева система та розмноження. П'явки – гермафродити, вони розмножуються тільки статевим шляхом. Статевий процес здійснюється у різних видів по-різному. Чоловічі статеві органи складаються переважно з пухирців (сім'яників), пари в 6-12 середніх сегментах тіла, які з'єднані з кожного боку тіла загальним вивідним протокою; протоки відкриваються назовні єдиним отвором, який лежить на вентральній стороні одного з передніх кілець тіла. Жіночий статевий отвір лежить на один сегмент позаду чоловічого і веде до двох окремих яйцеводів з мішкоподібними яєчниками. Під час відкладання яєць п'явка виділяє густий слиз через свої залози, в навколишнє середовище у вигляді чохла, в цей покрив відкладаються яйця, потім п'явка виповзає з нього. Краї отворів чохла зближуються і склеюються, утворюючи таким чином капсулу, всередині якої знаходяться яйця, прикріплені до нижньої поверхні розплавлених водоростей. Запліднені яйця відкладають в кокон,



виділений пояском. Кокон прикріплюється до водних рослин або знаходиться на дні водойми. Розвиток непрямий, тому що з яєць виходять личинки, які залишаються в коконі. У личинок є війки і протонефридії. У коконі личинки перетворюються, і вже сформовані п'явки виходять з кокона в воду (рисунок 1.4). Порівняно міцні кокони добре захищають яйця і личинки. Це призводить до малої кількості яєць – їх кількість вимірюється у різних п'явок одиницями, іноді десятками [6].

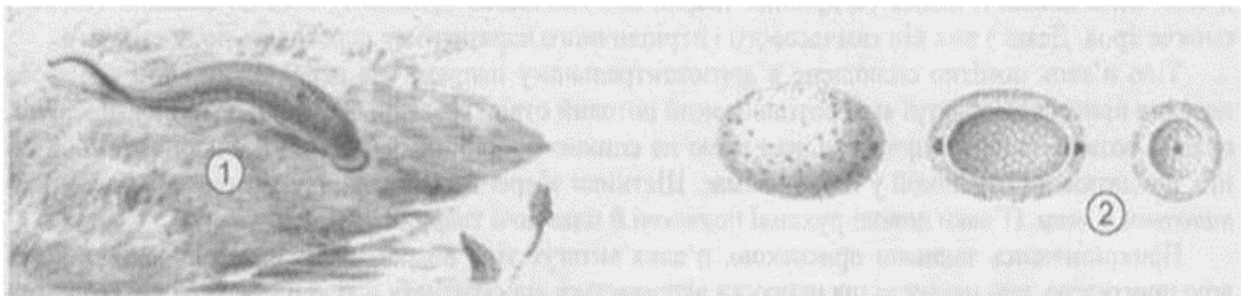


Рисунок 1.4 – Стадії розмноження медичної п'явки: 1 – п'явка, яка виповзла на берег для відкладання яєць; 2 – кокони медичної п'явки (ліворуч – цілий, у центрі – в поздовжньому, праворуч – у поперечному розрізі) [6].

Розмноження п'явок в природі відбувається один раз рік, коли тварини досягають статевої зрілості. Вона настає в чотирирічному віці. Для виведення потомства п'явки вибирають літній період. Процес спаровування у п'явок називається копуляція. Парування відбувається шляхом обвиття однієї особини іншою, вони як би приклеюються. Коли запліднення відбулося, після спарювання самка відкладає кокони. Зазвичай їх чисельність не перевищує 5 штук. Зародки п'явки харчуються білковою масою, яка знаходиться всередині кокона. Сам кокон зверху покритий щільною захисною оболонкою. Приблизно через два тижні вилуплюються маленькі п'явки, які вже можуть пити кров. Кількість малюків коливається від 20 до 40 штук.

Органи виділення п'явок представлені за типом метанефридій. У кожному з середніх сегментів тіла у більшості п'явок їх по парі. Видільна система МП представлена 17 парами нефридій на вентральній поверхні 6-22-х

сегментів. Новоутворена сеча накопичується в сечовому міхурі і виводиться через нефропори [6].

П'явки – гематофаги, вони харчуються кров'ю більшості теплокровних тварин або молюсків, черв'яків тощо; вони живуть переважно в прісній воді або у вологій траві, але зустрічаються морські (*Pontobdella*) і наземні форми (на Цейлоні). Завдяки гірудину та іншим речовинам, що виділяються слинними залозами, кров може місяцями зберігатися в шлунку п'явки в рідкому стані, без згортання і гниття. П'явки можуть прожити від годування до годування близько 2 років [8].

## 1.2 Практичне значення медичної п'явки

Практичне значення п'явок через неповне вивчення екологічних і фізіологічних особливостей окремих їхніх видів та ролі в біоценозах є недостатньо вивченим, а тому явно недооціненим і часто зводиться до лікувальної ролі при різних захворюваннях. Тим часом, їхнє значення досить різноманітне і може бути як позитивним, так і негативним. Наприклад, п'явки використовуються також у ветеринарії для лікування домашніх тварин, птахів. Також МП використовується в фармації для вироблення різних лікарських засобів та косметичних препаратів [9]. Крім того, п'явки взагалі, і МП зокрема, мають велике значення в раціоні харчування різних промислових риб (щук, окунів). Відомо, що про ступінь забруднення водойм можна судити за складом і частотою видів рослин і тварин, які в них зустрічаються. П'явки можуть бути використані для оцінки стану води як додаткові індикатори [10, 11].

У природних умовах МП, як і інші види, може бути небезпечною як для домашніх тварин, так і для людини. Наприклад, у водоймах, де вона зустрічається у великій кількості, п'явка може спричинити значну втрату крові, присмоктавшись до неї. Особливо небезпечними є випадки нападу п'явок на

маленьких дітей або дорослих, які з якихось причин ослаблені або змушені тривалий час перебувати у воді.

Таким чином, МП – справжня таємниця природи, багато загадок якої вже розгадані або потребують розгадки. Тому доречно наголосити на тому, що цей вид потребує охорони і не даремно МП внесена до Червоної книги України [10].

### 1.3 Біологічно активні речовини медичної п'явки

Секрет слинних залоз (ССЗ) МП містить понад 100 сполук білкової, ліпідної та вуглеводної природи: 80 компонентів фракцій з молекулярною масою понад 500 Да, 20 компонентів низькомолекулярної фракції (менше 500 Да), які мають широкий спектр біологічної активності. Наприкінці ХІХ ст. ДЖ.Б. Хейкрафт (1884) першим отримав речовину з МП, що перешкоджає згортанню крові, – гірудин. Ця подія поклала початок науковому етапу в розробці гірудотерапії, але тільки в 1955 р Ф. Марквардт отримав гірудин в чистому вигляді. ССЗ МП є складною комбінацією БАР, але ще не всі з них вивчені, що пов'язано з труднощами її отримання.

Відомі в даний час методи отримання ССЗ МП не дозволяють в повній мірі відобразити реальний склад секрету залістистих клітин, тому що містять домішки речовин, що виробляються травними залозами п'явки і її мікрофлорою.

Виділяють 4 групи БАР МП відповідно до рішення різних завдань і динамікою їх виділення при укусі: першими виділяються літичні сполуки (руйнування тканин і мікросудин потерпілого), антигемостатики (блокада механізмів гемостазу), блокатори захисних реакцій організму (проти дія захисним реакціям, що розвиваються в тканинах у відповідь на пошкодження) і допоміжні речовини.

1. Літичні сполуки забезпечують проникнення слинних речовин, руйнування тканин жертви, розширення рани, розплавлення мікросудин, впливають на проникність міжклітинного матриксу дерми. При дробовому зборі слини, в процесі годування МП, речовини цієї групи виявляються тільки в першій і середній порціях секрету, останні порції їх не містять. До цієї групи належать: пептидаза (дестабілаза), гіалуронідаза, колагеназа.

1) Пептидаза (дестабілаза) – фермент, який розриває певний тип зв'язку в білковій молекулі -  $\epsilon$ -( $\gamma$ -глутаміл)-лізин-ізопептидні зв'язки, що утворюють поперечні зв'язки («зшивання»), вони широко представлені в плазмі, мембранних і структурних білках. Цей вид зв'язків утворюється при стабілізації фібрину, а їх руйнування забезпечує фібринолітичну активність секрету. Пептидаза може впливати на функціональну активність різних клітин: ендотеліоцитів, лімфоцитів, тромбоцитів, макрофагів та ін. Багатофункціональний білок дестабілаза-лізоцим має не тільки дестабілізаційну активність, але і лізоцим і антимікробну активність, він є антибіотиком, що пригнічує розвиток багатьох бактерій, грибів і архей. Спектр його антимікробної дії збільшується з втратою активності мурамідази. Активність лізоциму спостерігається не тільки у *H. medicinalis*, але і у інших видів сімейства Hirudinea: *Herpobdella octoculata*, *Hemopsis sanguisuga*.

2) Гіалуронідаза – фермент, який каталізує реакції гідролітичного розщеплення та деполімеризації гіалуронової кислоти та споріднених сполук – кислих мукополісахаридів. Враховуючи, що глікозаміноглікани гіалуронової кислоти входять до складу базальної мембрани, позаклітинного матриксу, а також базальних мембран капілярів, вона відіграє важливу роль не тільки як фактор проникнення, але і у виникненні подальших фізіологічних реакцій. У складі слини МП виявлено 2 гіалуронідази, які відрізняються здатністю впливати на хондроїтину сульфат [12].

3) Колагеназа викликає гідроліз колагенових волокон I типу і подібна до колагенази людини. Можливо, бере участь у пригніченні колаген-індукованої агрегації тромбоцитів. Гіалуронідаза і колагеназа – ферменти, що підсилюють

проникнення різних речовин в організм, а також надають бактерицидну і бактериостатичну дію.

2. Антигемостатики – перешкоджають розвитку механізмів згортання крові, забезпечують вільний відтік крові з пошкоджених судин протягом усього періоду харчування МП. Антигемостатики починають виділятися з моменту руйнування мікросудин і появи крові в рані, тому виявляються в середній фракції слини. Потрапляючи в кишечник з кров'ю, МП підтримують її в рідкому стані. У складі ССЗ МП виявлені речовини, які блокують всі основні механізми активації системи згортання крові (первинні і вторинні). До них відносяться: калина, апіраза, антагоніст ПАФ, інгібітор Ха-фактора, гірудин [13].

1) Калін є інгібітором адгезії та агрегації тромбоцитів, активації фактора Віллебранда, молекулярна маса – 65 кДа.

2) Апіраза, інгібітор агрегації тромбоцитів, ініційований АДФ, викликає гідроліз аденозиннуклеотидів (АТФ і АДФ), причому майже з однаковою початковою швидкістю. Апіраза обумовлює антисклеротичну дію ССЗ МП, підвищує активність ліпопротеїнази, і, як наслідок, знижує рівень загального холестерину і  $\beta$ -ліпопротеїдів низької щільності.

3) Антагоніст РАФ (фактор активації тромбоцитів) – запобігає адгезії та активації тромбоцитів, міграції тромбоцитів та нейтрофілів до вогнища ураження, а також скороченню гладком'язових клітин. ПАФ - фосфогліцерид, що виділяється в процесі імунологічних реакцій нейтрофілами, базофілами і макрофагами, а також в процесі специфічної активації тромбоцитів. ПАФ є потужним медіатором запалення і, вивільняючись в області нанесення рани, ініціює гемостаз і запальну реакцію.

4) Інгібітор Ха фактора (FXaI) – у каскаді білків плазмового гемостазу фактор Ха – фермент, який каталізує перетворення протромбіну в тромбін у присутності іонів  $Ca^{2+}$ , фактора згортання V на поверхні мембран активованих тромбоцитів або фрагментів зруйнованих ендотеліальних та/або гладком'язових клітин (іноді фактор Ха називають протромбіназою).

Синтезується рекомбінантний FXaI, який має захисну дію проти венозного тромбозу. Він відіграє важливу роль в лікуванні остеоартрозу і ревматоїдного артриту.

5) Гірудин – унікальний високоспецифічний інгібітор ферменту тромбіну, він блокує всі відомі реакції, активатором яких є тромбін: активація фібриногену і перетворення його в нерозчинний згусток фібрину; регуляція V, VIII, XIII факторів згортання крові; регуляція компонентів системи комплементу; зміни функціонального стану клітин крові (моноцитів, нейтрофілів), в тому числі агрегації тромбоцитів; зміни стану ендотеліальних і гладком'язових клітин судин. Методи генної інженерії були використані для отримання рекомбінантного гірудину і фармацевтичного препарату на його основі.

3. Блокаторами захисних реакцій організму є ряд речовин поліпептидної природи, які служать інгібіторами ферментів, що виробляються різними клітинами організму в процесі реакції-реакції на пошкодження шкіри.

У літературі роль цих речовин пов'язана з пригніченням процесів перетравлення білків в кишечнику МП. Передбачається, що речовини цієї групи виконують захисну функцію, запобігаючи пошкодженню внутрішніх структур п'явки ферментами, що виділяються в осередку ураження і потрапляють в кишечник з з'їденою кров'ю. Вважається, що в процесі видобутку крові вони блокують прояви захисної запальної реакції організму (розвиток спазму, набрякості, болю тощо), Щоб забезпечити харчування тварини. Речовини цієї групи знаходяться в середніх і особливо останніх фракціях слини, де вони присутні в максимальних концентраціях. Деякі з них (наприклад, гірустазин) також важливі для блокування системи гемостазу.

1. Бделіни – група поліпептидів з малою молекулярною масою, серед яких є бделіни А з молекулярною масою 7 кДа і бделіни В з молекулярною масою 5 кДа. Методом рівноважної хроматографії розрізняли численні форми бделінів А і В; які маркуються від А1 до А6 і від В1 до В6. Вони є сильними інгібіторами трипсину, плазміну, арозину сперматозоїдів. Вони не блокують

активність хімотрипсину, тканинних і плазмових калікреїнів, субтилізину. Отримано рекомбінантну форму бделастазину.

2. Гірустазин – належить до того ж сімейства антистазин-інгібіторів серинової протеази, молекулярна маса 5,9 кДа, пригнічує тканинні калікреїн, трипсин, хімотрипсин, катепсин G-нейтрофіли. Здатність блокувати тканинний калікреїн важлива, оскільки останній каталізує вивільнення високоактивних кінінів, які через специфічні рецептори на клітинах-мішенях модулюють широкий спектр біологічних активностей, у тому числі тих, що беруть участь у підтримці нормального артеріального тиску. Отримано рекомбінантну форму.

3. LDTI (leech derived tryptase inhibitor) – інгібітор триптази, отриманий з екстракту МП. Триптаза є основним компонентом секреторних цитоплазматичних гранул тучних клітин і призводить до руйнування білків позаклітинного матриксу. Відома роль триптази в алергічних і запальних реакціях. Отримано рекомбінантну форму.

4. LCI (leech carboxypeptidase inhibitor) – інгібітор карбоксипептидази А, існує 2 ізоформи з молекулярною масою 7,3 і 7,2 кДа. Стабільний у широкому діапазоні рН і температур. LCI є частиною ССЗ МР, і вважається, що він здатний блокувати гідроліз кінінів металопротеїназами в місці укусу шкіри МП, посилюючи кінін-ін-індуковане збільшення кровотоку. Створено рекомбінантну форму.

5. Егліни – низькомолекулярні білки з екстрактів МП з молекулярною масою 8,073 і 8,099 кДа (форми «b» і «c» відповідно). Вони пригнічують активність  $\alpha$ -хімотрипсину, хімази тучних клітин, субтилізину і нейтральних нейтрофільних протеїназ: еластази і катепсину G. Вони мають високу стійкість до денатурації і нагрівання. Інгібуючий спектр егліну «c» дозволяє вважати його одним з найважливіших протизапальних засобів. Але є підстави вважати, що егліни, які виділені з МП, в ССЗ не присутні, а виробляються шлунковою залозою. Біологічна цінність еглінів залежить від їх здатності блокувати активність лейкоцитарних протеаз, що виділяються при запальних реакціях.

4. Допоміжні речовини – сприяють стабілізації, захисту, транспортуванню, посиленню дії інших компонентів ССЗ МП. Наявність великої кількості ліпідів в ССЗ дозволяє припустити можливість утворення ліпідно-ферментних комплексів, в яких білкові молекули або їх активні центри можуть бути «екрановані» ліпідами. В результаті клітини-макрофаги організму не розпізнають чужорідні білки і не реагують на них. Введені речовини довго зберігаються в тканинах і, незважаючи на вкрай малу кількість, надають значний і тривалий біологічний ефект. Ймовірно, маскування чужорідних білків ліпідами пов'язане з практично повною відсутністю алергічних реакцій на ССЗ МП.

Ліпосома МП є першим прикладом такої будови природного походження. Його компонентами є дестабілаза, стабільний аналог простагландину, інгібітор калікреїну в плазмі крові, гірудин. Ліпосома може змінювати свою просторову орієнтацію, яка залежить від полярності розчинника, що забезпечує його безперешкодне проникнення через клітинну мембрану. Але ліпіди слини мають велику молекулярну масу і являють собою надзвичайно довгі ланцюжки для ліпідів, що утворюють спіраль з активними групами на кінцях, що підтверджує можливість утворення складних просторових утворень.

Крім перерахованих вище БАР, МП продукують велику кількість інших сполук: колагеназу, кініназу, кініногеназу, ліпази, простагландини, ацетилхолін, гістаміноподібні судинорозширювальні сполуки, що подовжують час кровотечі, ферменти, що зменшують утворення рубцевої тканини і спайок (фібриназу, колагеназу), антибіотики (хлороміцетин), знеболюючі речовини. Повідомляється про наявність стероїдних гормонів (прогестерону, тестостерону, естрадіолу, дегідроепіандростерону, кортизолу) і важливих нейромедіаторів (гістаміну, серотоніну) в ССЗ МП. Таким чином, серотонін є регулятором харчової поведінки МП, а гістамін викликає розширення судин мікроциркуляції. Не виключено, що він з серотоніном викликає місцеву



алергічну реакцію біля рани, після укусу МП. Однак очевидно, що спектр БАР ССЗ МР ще недостатньо вивчений.

Антигенна схожість БАР МП різних видів, які використовуються для ГТ. Так, порівняння складу білків і пептидів ССЗ видів *H. verbana*, *H. medicinalis* і *H. orientalis* показало, що 30-40% індивідуальних мас ССЗ кожного виду п'явок припадає на частку мас, що містяться в ССЗ принаймні одного з двох інших видів. Невелика частка загальної маси може вказувати на високий поліморфізм амінокислотних послідовностей або високу частоту посттрансляційних модифікацій білків і пептидів БАР. У той же час було встановлено, що *H. medicinalis* і *H. orientalis* найбільш близькі один до одного за складом ССЗ, що відповідає літературним даним про філогенетичну спорідненість цих видів п'явок.

Крім вищезгаданих БАР, він виділяє в навколишнє середовище, зокрема кондиціоноване середовище МП, разом з продуктами життєдіяльності (гуано, сечею, слизом, відшарованими залишками кутикули і т.д.). Серед важливих метаболітів, що продукуються МП у навколишньому середовищі, виявлено речовини з високою біологічною активністю, зокрема: білки сироватки крові годувальника – глобуліни, альбуміни, гірудин, гіалуронідаза, еластаза, апіраза, тригліцерідаза. Вода, оброблена МП, також містить комплекс БАР ССЗ до складу яких входять знеболюючі та протизапальні речовини. До складу метаболітів МП також входять біогенні елементи (калій, натрій, фосфор) і мікроелементи (селен, йод, бром, сірка) та амінокислоти. Така вода не представляє біологічної небезпеки, не містить патогенної мікрофлори, нетоксична, і за пропозицією окремих дослідників рекомендована до використання в лікувальних цілях (наприклад, для лікування запальних процесів, захворювань шлунково-кишкового тракту, дерматологічних хвороб) [4].

#### 1.4 Мікробіом медичної п'явки

МП має великий репертуар біологічно активних білків, які еволюціонували в результаті екстремальних умов життя та гематофагічного способу життя [14]. Мікробіом *H. medicinalis* відіграє вирішальну роль у фізіології та здоров'ї хазяїна і жорстко контролюється МП або самим мікробіомом [15]. Попередні дослідження показали, що антибіотики, навіть у концентраціях нижче клінічної межі, викликають значні зміни в мікробних популяціях і призводять до помітного збільшення кількості резистентних штамів [16]. Коменсальні бактерії захищають кишечник від мікробної колонізації і повинні бути стійкими до антимікробних препаратів МП, які зазвичай з'являються за відсутності запалення. Різноманітність мікробіоти забезпечує хазяїна унікальними сполуками імунного захисту, такими як антимікробні пептиди. Аналіз мікробіому *H. medicinalis* дозволяє краще зрозуміти механізм, що лежить в основі взаємодії між МП та симбіотичними мікробами. Серед мікроорганізмів симбіонтів МП відомі: *Aeromonas veronii*, *Aeromonas hydrophila* [17]. Повідомляють, що *A. hydrophila* — бактерія-ендосимбіонт кишечника МП, яка виконує ряд функцій в організмі п'явки, в тому числі бере участь у процесах травлення (продукує ендопептидази і гемолізину) [4]. Поперечний розріз медичної п'явки, що демонструє отриманий (комплемент) і вроджений (імунні клітини та АМП) імунітет. Симбіонти травного тракту, *Aeromonas* та *Rikenella*-подібні бактерії, показані. Антимікробні пептиди виділено курсивом замість жирного шрифту, щоб відрізнити припущення від доказів, як у випадку з комплементом та імунними клітинами (рисунок 1.5). [18, 19].

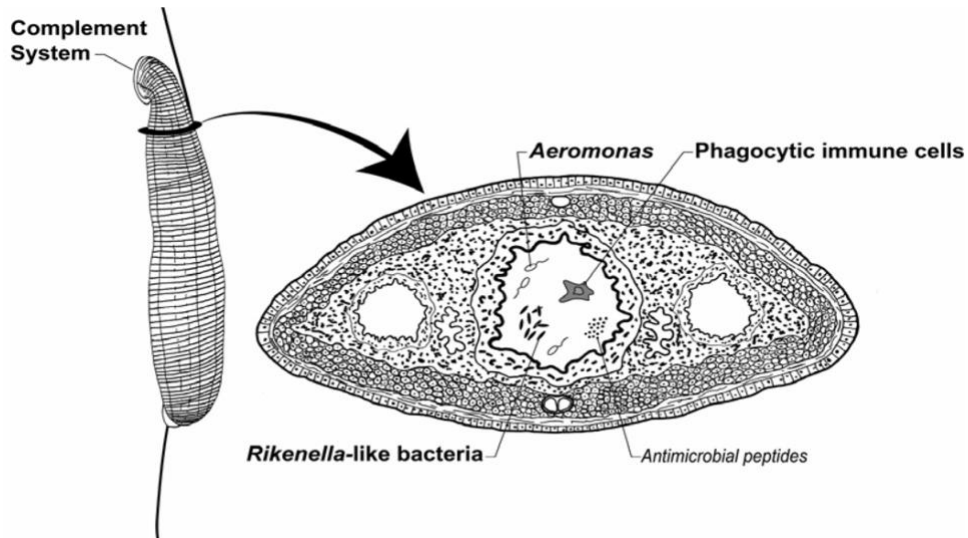


Рисунок 1.5 – Поперечний розріз лікарської п'явки (зображує набутий (комплементарний) і вроджений (імунні клітини і АМП) імунітет) [19]

Адаптивний імунітет МП представлений популяціями бактерій, таких як *Aeromonas veronii* *Rikenella*-подібної бактерії (рис. 1.5). Як і всі тварини, п'явка живе в тісному зв'язку з мікроорганізмами, які, як вважається, забезпечують важливу функцію п'явки. У МП травний тракт колонізований відносно простим мікробним співтовариством, що може мати вирішальне значення для запобігання передчасної деградації кров'яної маси. Ранні дослідження повідомили про наявність єдиного бактеріального симбіонту *Aeromonas veronii*. Згодом дослідження показало наявність другого числового домінантного бактеріального симбіонту – *Rikenella*-подібної бактерії. У кишечнику ці два види дуже численні, але існує більша різноманітність видів, наприклад, *Magnetos pirillum* і *Roseospira* [15]. Діагностика ембріонів показала, що бактерії передаються від батьків до потомства. Дуже цікаво, що мікрофлора кишечника – незвичайно проста [15, 20]. Фактори, що викликаються мікроорганізмами (рис. 1.4). Симбіонти в кишечнику п'явки, *A. veronii* і *Rikenella*-подібні бактерії, можуть перешкоджати колонізації патогенних бактерій, займаючи певну нішу (таким чином створюється конкуренція за поживні речовини) [21, 22].

## 1.5 Гірудотерапія

Гірудотерапія (ГТ) – це лікування за допомогою МП. *H. medicinalis*, використовувалися для лікування пацієнтів протягом століть. У минулому МП виявилися ефективним засобом для лікування ряду захворювань, включаючи лікування бойових ран. В даний час МП можуть використовуватися для надання допомоги при лікуванні абсцесів, артритів, глаукоми, міастенії, тромбозів і деяких венозних захворювань. МП також можуть використовуватися в пластичній хірургії і при деяких проблемах з кровообігом. Під час годування МП виділяють в ранку складну суміш різних біологічно і фармакологічно активних речовин. Гірудин є одним із компонентів слини МП. Іноді його використовують для опису всіх активних складових в слині МП [23, 24, 25]. Для гірудотерапії використовують МП, вирощених в умовах біотехнології, які є безпечними для використання.

## 1.6 Біотехнологія медичної п'явки виду *Hirudo verbana*

МП є досить простим біологічним об'єктом для утримання та розведення. Особливість раціону МП, які харчуються через відносно великі проміжки часу, здатність до тривалого голодування і невибагливість до умов утримування дозволяють одночасно вирощувати велику кількість тварин на невеликій площі. Згідно з літературними даними, МП вирощують на спеціальних біофабриках («Гірудо-Мед» та ін.) в оптимальних штучних умовах під наглядом лікарів-гірудологів. Однак для забезпечення максимально ефективного процесу культивування МП необхідно дотримуватися низки біотичних та абіотичних факторів [26]. Найважливішим з них є концентрація особин у резервуарах, що є біотичним фактором.

Молодих і голодних МП з досить невеликими розмірами можна висаджувати по 50 особин на 3-літрову посудину. Однак концентрація дорослих п'явок у ємностях повинна бути меншою. Якщо утримувати дорослих п'явок по 30 і більше особин в ємності з об'ємом, то можуть з'явитися ознаки пригнічення їх життєздатності: п'явки виділяють кров, слиз та інші продукти життєдіяльності у великих кількостях з невідомої причини. В результаті виникає ефект перенаселення, тобто отруєння особин власними метаболітами. При цьому вода в резервуарах набуває жовто-зеленого кольору. П'явки стають агресивними, виникає явище канібалізму. Тому рекомендується висаджувати дорослих п'явок по 20 особин на 3-літрову ємність, при цьому їх загальна вага не повинна перевищувати 91,4-100 г.

За одними даними, щільність посадки маток масою 1-15 г може становити 75-100 особин на 3-літрову ємність. Однак пізніше було встановлено, що найбільш продуктивною для спарювання є посадка маток у кількості 5 особин на 3-літрову ємність. Утримувати маток МП необхідно в скляній тарі з широким горлом. Також є дані, що найбільшу кількість коконів отримують від маток, яких саджають поодиночі в яйцекладні контейнери.

Існують наступні абіотичні фактори, які є важливими для життєдіяльності матки: вода (не можна використовувати водопровідну, кип'ячену та мінеральну воду) та температура, мінералізація, рН води, концентрація розчиненого кисню у воді, освітленість тощо. Вода для утримання п'явок повинна бути чистою, без хлору, перекисних сполук, солей важких металів, механічних домішок, кімнатної температури. Рекомендується замінювати весь об'єм води в контейнерах з п'явками щодня, а в спекотні дні – 2 рази на день; воду слід готувати заздалегідь, за два дні до використання. При виникненні захворювань МП воду також слід міняти 2 рази на день [27].

Температурний фактор є найбільш важливим для життєдіяльності МП. П'явки – теплолюбні тварини і коливання температури несприятливо впливає на них. Оптимальний температурний діапазон для п'явок у лабораторії становить +16-28°C. При дотриманні зазначених температурних параметрів

п'явка зберігає активність протягом тривалого періоду часу (близько року), незалежно від освітленості приміщення [28].

Що стосується рН води, то МП здатна тривалий час зберігати життєздатність при значеннях рН від 6,1 до 9,0. Однак у природних умовах МП зустрічається і у водоймах з нейтральною реакцією середовища – рН від 6,5 до 7,5. Але дослідження показали, що оптимальним середовищем для нормальної життєдіяльності МП є слабкокислое (рН 5,0-6,5) середовище.

МП досить чутливі до забруднення водойм і навколишнього середовища (бактеріологічного, хімічного, радіоактивного тощо), тому мешкають лише в чистих місцях. Ця властивість МП дозволяє використовувати їх як біоіндикатор екологічної чистоти водойм [29]. МП добре переносить вплив сонячного світла в ранкові і вечірні години, не відчуваючи при цьому жодного дискомфорту. Є дані, що найбільш інтенсивний ріст МП відбувається в умовах цілодобової темряви. Вплив світла на статеву поведінку та відкладання коконів не встановлено. Тривалість світлового дня для МП не має суттєвого значення.

Годівля молодняку МП здійснюється свіжою кров'ю, отриманою на скотобійнях. Для повноцінної годівлі МП використовують тільки кров здорових тварин, переважно великої та дрібної рогатої худоби. Тип крові, якою годують п'явок, не має значного впливу на показники росту і виживання п'явок, але є дані, що п'явки, яких годують курячою кров'ю, мають у 2,5 рази вищі показники, ніж ті, яких годують кров'ю великої рогатої худоби, з точки зору репродуктивної ефективності. Кров птиці може бути використана для управління фертильністю з вищою репродуктивною ефективністю в аквакультурі МП. Після закінчення періоду вигодовування молоді п'явки передаються в цех готової продукції, де утримуються в голодному стані протягом 3 місяців, після чого п'явки можуть бути реалізовані в лікувальних і експериментальних цілях. З метою підтримки генофонду п'явок в умовах штучного розведення на біопереробних підприємствах маточне поголів'я підлягає щорічному оновленню за рахунок "диких особин" в обсязі 30% від загальної кількості [28].

## 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 2.1 Матеріали та об'єкт дослідження

Дослідження проведено на медичних п'явках виду *Hirudo verbana*, які годувалися на білих нелінійних лабораторних щурах при моделюванні їм курсу гірудовпливу (25 штук; вага – 180-250 г; вік – 7-8 місяців). Дослідження проведено на базі навчально-науково-дослідної лабораторії клітинної та організменної біотехнології Запорізького національного університету.

Здійснювали приставку товарних медичних п'явок виду *H. verbana* віком 6-8 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.) [30].

У лабораторних щурів також отримували кров шляхом відсікання кінчика хвоста [31], а потім – із використанням *Hirudo verbana*, після приставки МП на ділянку загривку, тазу або стегна. Приставку МП виконували при короткочасній фіксації тварини, голили хутро у відповідній області і виконували приставку МП. В шприц вносили 2 МП для певності результату, після присмоктування однієї, іншу знімали [4]. Одразу після годування МП на тілі лабораторного щура отримували кров механічним шляхом зі шлункової кишки. Час годування МП становив від 20 до 60 хвилин [32]. Дослідження проводили з дотриманням регламентованих правил і норм поводження з лабораторними тваринами.

Вивчали динаміку кількості формених елементів крові лабораторних щурів у шлунковій кишці МП в різні терміни після її годування. Досліджено кров із шлункової кишки 50 МП. Досліджували наступні зразки крові: інтактну кров (із хвоста); кров із шлункової кишки МП у перші 30 хв. після відпадання від тіла щура; кров із шлункової кишки МП через 1 добу; і в подальшому через

кожні 5 діб до 35 діб. Кров для дослідження отримували відповідно до способу [32]. Усі тварини після вказаних дій залишалися живими протягом часу спостереження (5 тижнів).

В отриманих зразках крові лабораторних щурів із МП аналізували загальну кількість лейкоцитів і лейкоцитарну формулу, морфологію еритроцитів, наявність бактерій.

Впродовж експерименту також спостерігали за станом МП. Всього досліджено 50 МП виду *H. verbana* віком 6-8 місяців після годування кров'ю лабораторних щурів. Контролем були 50 голодних МП, за якими також спостерігали впродовж 1 місяця. При цьому фіксували відсоток МП із патологічними морфологічними ознаками (поява перетяжок на тілі, зригування спожитої крові) та кількість загиблих МП. Здоровими вважали МП без видимих морфологічних змін із вираженим рефлексом скорочення [4].

## 2.2 Методи дослідження

### 2.2.1 Визначення кількості лейкоцитів

Визначення кількості лейкоцитів виконували пробірковим способом за П'ятницьким. Для цього у лунку серологічного планшета дозованою піпеткою вносили 0,38 мл 3% розчину оцтової кислоти. Взятую для тесту кров переносили на чисте, знежирене скло і дозованою мікропіпеткою відбирають 0,02 мл (20 мкл) крові, яку вносять у лунку з 0,38 мл 3% розчину оцтової кислоти. У цьому випадку розведення крові становить 1:20. Порцію крові перемішують піпетуванням тією ж піпеткою і залишають на 1-2 хвилини до повного лізису еритроцитів. Підрахунок лейкоцитів проводять у лічильній камері Горяєва після її заповнення суспензією лейкоцитів та експозиції 1 хвилини для їх рівномірного осідання клітин на поверхні камери. Для підрахунку лейкоцитів камеру розглядають під мікроскопом і підраховують формені елементи, що



лежать в сітці Горяєва. Лейкоцити підраховують у 100 великих порожніх квадратах ( $20 \times 5$ ) площею  $4 \text{ мм}^2$  (площа одного великого квадрата становить  $0,04 \text{ мм}^2$ ). Кількість лейкоцитів, підрахованих у 100 великих порожніх квадратах, ділять на 4 і множать на 200, щоб отримати кількість лейкоцитів в  $1 \text{ мм}^3$  крові. Розподіляємо на 4, виходячи з того, що загальна площа 100 великих порожніх квадратів дорівнює  $4 \text{ мм}^2$ . Множимо, виходячи з припущення, що ступінь розведення крові дорівнює 20 (0,38 мл 3% розчину оцтової кислоти і 0,02 мл крові), а глибина камери - 0,1 мм. Замість наведених вище розрахунків можна помножити кількість лейкоцитів, підрахованих у 100 великих квадратах, на 50 (з урахуванням попередніх розрахунків:  $200:4=50$ ). Щоб уникнути повторного підрахунку одного і того ж лейкоцита, необхідно строго дотримуватися певного порядку:

- рахувати ряди великих порожніх квадратів зліва направо і справа наліво, переміщуючи камеру на один ряд зверху вниз;
- у кожному квадраті потрібно рахувати елементи, що лежать в середині, а також на лівому та верхньому боці камери [30].

### 2.2.2 Визначення лейкоцитарної формули крові

Лейкоцитарну формулу крові визначали в мазках пофарбованих за Романовським-Гімзою. Мазок крові готували стандартним способом, висушували на повітрі до зникнення вологого блиску та фіксували етиловим спиртом та фарбували за Романовським-Гімзою.

Дослідження мазка починається з малого збільшення, при якому оцінюється якість мазка, але його аналіз виконується під імерсійним світлом. Для отримання достовірних даних при підрахунку лейкоцитарної формули підраховували лейкоцити в різних частинах мазка крові. Щоб уникнути повторного підрахунку одних і тих же лейкоцитів при аналізі препарату

рухалися зигзагами – лінією Меандра. Підраховували 200 лейкоцитів, відступивши 0,3-0,5 см від основи "вусиків", рухаючись зигзагами по всій ширині мазка через 2-3 поля зору на 1/2 мазка. Різні типи лейкоцитів, що зустрічаються під час аналізу препарату, записували в таблицю або підраховують за допомогою спеціалізованого одинацятиклавішного лічильника лейкоцитів. Після перегляду 200 лейкоцитів визначали відсоток кожного типу лейкоцитів. Крім відсоткового вмісту лейкоцитів, велике значення має абсолютна кількість окремих видів лейкоцитів. Вона визначається з урахуванням загальної кількості лейкоцитів. Абсолютна кількість будь-якого виду лейкоцитів характеризує їх фактичну участь в імунних реакціях. У клінічній практиці враховується відносна і абсолютна кількість лейкоцитів [30].

### 2.2.3 Статистична обробка експериментальних даних

Статистичну обробку експериментальних даних проводили за допомогою пакету прикладних програм MS Excel і IBM SPSS Statistic 20.0. Обробку даних виконували з використанням параметричної статистики. Визначали середнє арифметичне, похибку середнього арифметичного, середнє квадратичне відхилення. Достовірність відмінностей між досліджуваними показниками визначали за допомогою t-критерію Ст'юдента.

Середнє арифметичне – це узагальнююча величина, яка є одночасно абстрактною і конкретною. Її значення є середнім між найменшим і найбільшим значеннями вибірки. Розглянемо вибірку з  $n$  вимірів, кожен з яких позначимо  $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$ . Тоді середнє арифметичне значення  $\bar{X}$  - це значення для  $n$  вимірів:

$$\bar{X} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} \quad (2.1)$$

де  $n$  – кількість вимірів певної ознаки.

Різниця між будь-яким виміром з вибірки та середнім арифметичним тієї ж вибірки називається відхиленням варіанта  $x_i$  від  $\bar{X}$ :  $x_i - \bar{X}$ .

Якщо ви порахуєте відхилення для всіх варіантів, то отримаєте від'ємні та додатні значення, які в сумі дадуть 0, тобто вони взаємно компенсуються.

Це означає, що немає сенсу розраховувати середнє відхилення як середнє арифметичне відхилень. Існує кілька способів уникнути компенсації додатних і від'ємних значень. Найпоширеніший з них - звести в квадрат кожену різницю  $(x_i - \bar{X})$ . (Квадрати як від'ємних, так і додатних значень є додатними.) Додавання квадратів усіх різниць і ділення на кількість різниць дає значення, яке називається дисперсією.

Насправді він показує середнє арифметичне квадратів відхилень. Щоб позбутися квадрата значення, ми обчислюємо квадратний корінь з дисперсії. Отримане значення називається стандартним відхиленням. Існують формули для стандартного відхилення для генеральної сукупності та вибірки.

За наявними даними генеральної сукупності використовується наступна формула:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}{n}} \quad (2.2)$$

де  $X_i$  – значення  $i$ -тої варіанти,  $i=1, \dots, n$ ,

$\bar{X}$  – середнє арифметичне,  $n$  – об'єм генеральної сукупності.

Оскільки  $D(X) = \sigma^2$ , то  $D(X) = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}{n}$  – зміщена дисперсія. Якщо ж є тільки дані вибірки, то для визначення середнього квадратичного відхилення застосовується така формула:

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

А дисперсія, що називають незміщеною, відповідно:

$$D(X) = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}{n-1} \quad (2.4)$$

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

Помилка репрезентативності середньої арифметичної залежить від двох величин: від різноманітності ознаки у генеральній сукупності і від чисельності вибірки. Чим менша степінь різноманітності (на її величину вказує середнє квадратичне відхилення) і чим більша кількість вибраних для дослідження об'єктів, тим меншою є величина помилки репрезентативності вибіркового середнього арифметичного.

Для розрахунку величини помилки використовується формула:

$$\Delta = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad (2.5)$$

де  $\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}{n-1}}$ ,  $X_i$  – значення  $i$ -тої варіанти,  $i=1, \dots, n$ ,  $\bar{X}$  – середнє арифметичне вибірки,  $n$  – об'єм вибіркової сукупності.

Тепер будь-яку ознаку можна представити у формі:

$$x = \bar{X} \pm \Delta \quad (2.6)$$

Якщо аналізу піддаються дві (чи більше) групи тварин, виникає питання оцінки різниці між групами за аналізованим показником. Найбільш поширеною є оцінка достовірності різниць між групами за методом Стюдента. Для цього визначається критерій достовірності різниці за формулою:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\Delta_1^2 + \Delta_2^2}} \quad (2.7)$$

де  $\bar{X}_1$  і  $\bar{X}_2$  – середні значення в групах,  $\Delta_1$  і  $\Delta_2$  – помилки репрезентативності в групах.

Обчислений критерій  $t$  порівнюється зі стандартним (табличним) значенням критерія Стюдента  $t_{st}$  для  $n = n_1 + n_2 - 2$ , де  $n_1$  та  $n_2$  – кількість вимірів у групах. Якщо вирахований критерій  $t$  більший стандартного значення критерію Стюдента  $t_{st}$  для  $p < 0,05$ , це означає, що різниця між групами є достовірною з надійністю 95% (тобто різницю можна очікувати у 95 випадках із 100). Якщо  $t < t_{st}$  для  $p < 0,01$ , різниця достовірна з надійністю 99%, якщо  $t < t_{st}$  для  $p < 0,001$ , різниця достовірна з максимальною надійністю 99,9 %.

У випадку, якщо  $t > t_{st}$  – це означає, що за цією різницею між групами не можна зробити висновок про наявність чи відсутність достовірної різниці між групами (потрібні додаткові дослідження) [33, 34, 35].

### 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

#### 3.1 Морфофункціональні стани медичної п'явки виду *Hirudo verbana* після годування кров'ю лабораторних щурів

Дослідниками неодноразово повідомлялося про загибель частини МП після годування при біотехнології та ГТ. Окремі дослідники пов'язують загибель МП у найближчий посттрофічний період із ксеногенним імуноопосередкованим інгібуванням. Вважається, що кров ссавців як імунна тканина, містить низку клітинних і гуморальних факторів імунітету. МП, як гематофаг, має пригнітити імунні властивості з'їденої крові за рахунок різних молекулярно-клітинних механізмів [4]. При годуванні МП споживає значну кількість крові (2-7 мл і більше), тому її вага збільшується в 5-9 разів.

Оскільки, як при ГТ, так і в умовах біотехнології МП харчується до повного насичення, що не завжди відбувається в дикій природі, цікаво простежити взаємодію клітин крові годувальника (лабораторного щура) та мікрооточення травної системи *Hirudo verbana*. Вважають, що частина МП може не впоратися з пригніченням імунних властивостей спожитої крові, що веде до їх загибелі.

Для вивчення основних можливих морфофункціональних станів МП у найближчі терміни після ГТ процедури використовували п'явок, отриманих при годуванні на статевозрілих лабораторних щурах, яким моделювали курс ГТ (n=25). Досліджено морфофункціональний стан 50 МП після ГТ, за якими спостерігали впродовж 1 місяця.

Контролем слугували голодні товарні МП *H. verbana* (n=50), у яких впродовж спостереження (35-40 діб) патологічних проявів не спостерігалось.

Серед МП аналізували відсоток п'явок, що мали патологічні морфологічні прояви: перетяжки на тілі, зригування крові і загибель (рис. 3.1).



Рисунок 3.1 – Зовнішній вигляд медичної п'явки після годування при гірудотерапевтичній процедурі у разі фізіологічного перебігу постстрофічного періоду (а) та у випадку патологічного протікання з появою перетяжок на тілі *H. verbana* та зригуванням спожитої крові (б)

В таблиці 3.1 представлено морфологічні та функціональні зміни *H. verbana* (n=50) після годування при гірудотерапевтичній процедурі у лабораторних щурів.

Так, серед 50 піддослідних МП виду *H. verbana* на 10-14 добу у 4 (8%) спостерігалось утворення одинієї або кількох перетяжок на тілі та зригування крові (рис. 3.1), що в подальшому завершилося загибеллю частини (2 МП або 4% із них).

Разом з тим, наприкінці експерименту (через місяць від початку спостереження) загинула ще одна МП (2%), що очевидно не було пов'язано з ксеногенним імуноопосередкованим інгібуванням, яке зазвичай спостерігається на 10-14 добу після годування в умовах ГТ [4, 36]. Деякі дослідники вважають, що смертність МП може бути викликана канібалізмом [37], однак в нашому випадку всі МП були ситі, і тому випадків канібалізму бути не могло.

Таблиця 3.1 – Морфологічні та функціональні зміни *H. verbana* (n=50) після годування при гірудотерапевтичній процедурі у лабораторних щурів

№	Досліджувана характеристика	Показники	Шт., n	%, X <sub>ср</sub>
1	Формування перетяжок зі зригуванням крові	Кількість п'явок з перетяжками на 10-14 добу після годування при ГТ процедури	4	8
2	Смертність п'явок	Всього	3	6
		Кількість загиблих п'явок на 10-14 добу після ГТ процедури	2	4
		Кількість загиблих п'явок через місяць після годування	1	2

Таким чином, після годування МП кров'ю лабораторних щурів, можливий нормальний перебіг посттрофічного періоду та патологічний, який супроводжується зригуванням крові та формуванням перетяжок на тілі МП, та в кінці завершується смертю. Як відомо, зригування спожитої крові сприяє зменшенню об'єму і маси тіла МП, що може слугувати реакцією для їх виживання. Лише 1/2 МП, що мали перетяжки на тілі помирають, а інші, імовірно, справляються з імунологічною агресією з'їденої крові через зменшення її кількості в організмі та за рахунок збільшення у перші дні після годування кількості *A. hydrophila* у травному тракті МП [4].



### 3.2 Динаміка життєздатності формених елементів крові лабораторних щурів у кишковому мікрооточенні медичної п'явки після гірудотерапевтичної процедури

Аналіз загальної кількості лейкоцитів, лейкоцитарної формули інтактної крові (з хвоста) лабораторних щурів та з шлункової кишки МП одразу після ГТ процедури та життєздатність формених елементів крові лабораторних щурів у кишковому мікрооточенні МП на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 добу при нормальному фізіологічному перебігу потрофічного періоду (температура утримання коливалася у межах +22-25 °С) представлений у таблиці 3.2.

Таблиця 3.2 – Динаміка змін загальної кількості лейкоцитів та лейкоцитарної формули крові лабораторних щурів у мікрооточенні системи травлення медичної п'явки

Зразок крові / термін спостереження, n	Кількість лейко- цитів, Г/л	Еозино- філи, %	Нейтро- філи паличко- ядерні, %	Нейтро- філи сегменто- ядерні, %	Моно- цити, %	Лімфо- цити, %
1	2	3	4	5	6	7
Інтактний зразок (хвіст), n=4	8,63 ± 0,617	3,63 ± 0,239	1,50 ± 0,204	23,75 ± 2,657	3,62 ± 0,375	67,5 ± 2,492
Кров із ШК МП, n=4	11,51 ± 0,496*	2,62 ± 0,239*	2,75 ± 0,479	19,13 ± 1,853	4,12 ± 0,427	71,38 ± 2,304
Кров із ШК МП, 1 доба, n=4	8,68 ± 0,541	3,25 ± 0,75	0,37 ± 0,239*	13,63 ± 1,675*	2,75 ± 0,323	80,00 ± 1,369*

Продовження таблиці 3.2

1	2	3	4	5	6	7
Кров із ШК МП, 5 діб, n=4	4,65 ± 0,450*, !	1,37 ±0,239*	0,25 ± 0,144*	9,13 ± 0,718*	2,12 ±0,427*	87,13 ±0,774*
Кров із ШК МП, 10 діб, n=4	-	2,00 ± 0,408*	0*	4,00 ± 0,707*	1,00 ± 0,408	93,00 ± 0,816*
Кров із ШК МП, 15 діб, n=4	-	1,25 ± 0,479*	0	1,75 ± 0,854*	0,25 ± 0,25	96,75 ± 1,315*
Кров із ШК МП, 20 діб, n=4	-	1,00 ± 0,577*	0*	0*	0*	99,00 ± 0,577*
Кров із ШК МП, 25 діб, n=4	-	0,5 ± 0,288*	0*	0*	0*	99,5 ± 0,288*
Кров із ШК МП, 30 діб, n=4	-	0*	0*	0*	0*	100*
	У 1/2 проаналізованих препаратів детрит					
Кров із ШК МП, 35 діб, n=4	детрит					

Примітки:

1. n – кількість проаналізованих зразків.
2. ШК – шлункова кишка.
3. \* –  $p \leq 0,05$ , що вказує на достовірну різницю за Т-критерієм Стьюдента порівняно з інтактним зразком.
4. ! – 1/2 зразків не вдалося проаналізувати через значну кількість детриту.

Кров, отримана із шлункової кишки одразу після відпадання МП від тіла лабораторного щура, відрізнялася від інактної крові (з хвоста), зокрема загальна кількість лейкоцитів була вищою ( $p \leq 0,05$ ) і становила  $11,51 \pm 0,496$  Г/л при  $8,63 \pm 0,617$  Г/л в інтактному зразку. Збільшення кількості лейкоцитів, як повідомлялося раніше, обумовлене реакцією «пітніння» МП при годуванні, тобто виділення назовні рідкої частини плазми крові годувальника [3], у нашому випадку лабораторного щура. В лейкоцитарній формулі крові зі шлункової кишки, порівняно з інтактною, спостерігалось зниження відносного вмісту еозинофілів ( $p \leq 0,05$ ) та тенденція до підвищення вмісту паличкоядерних нейтрофілів, лімфоцитів та моноцитів, а також тенденція до зниження вмісту сегментоядерних нейтрофілів (таблиця 3.2).

Через 1 добу в зразках крові, отриманих зі шлункової кишки МП, порівняно з інтактним зразком, спостерігалось зниження кількості паличкоядерних та сегментоядерних нейтрофілів ( $p \leq 0,05$ ), а також підвищення кількості лімфоцитів ( $p \leq 0,05$ ), кількість лейкоцитів знижувалась порівняно зі зразком крові отриманим з шлункової кишки МП одразу після відпадання МП від тіла лабораторного щура при ГТ процедури, кількість лейкоцитів порівняно з інтактним зразком не відрізнялася (таблиця 3.2). Так як нейтрофіли є клітинами – першою лінією захисту, тому вони й першими реагують та знижується їх відносна кількість в лейкоформулі крові.

На 5 добу спостереження в зразках крові, отриманих зі шлункової кишки МП, порівняно з інтактним зразком, спостерігалось зниження в 2,5 рази загальної кількості лейкоцитів ( $p \leq 0,05$ ), в формулі крові спостерігалось зниження кількості паличко- та сегментоядерних нейтрофілів (в 2,6 разів), еозинофілів, моноцитів та підвищення кількості лімфоцитів ( $p \leq 0,05$ ).

На 10 добу спостереження в зразках крові, отриманих зі шлункової кишки МП, порівняно з інтактним зразком, не вдалося визначити загальну кількість лейкоцитів через наявність значної кількості детриту, в лейкоцитарній формулі крові спостерігалася відсутність паличкоядерних нейтрофілів, знижувалася кількість сегментоядерних нейтрофілів (в 5,9 разів),

моноцитів та еозинофілів, кількість лімфоцитів зростала до  $93,00 \pm 0,816\%$ , порівняно з  $67,5 \pm 2,492\%$  в інтактному зразку (таблиця 3.2).

На 15 добу спостереження в зразках крові, отриманих зі шлункової кишки МП, порівняно з інтактним зразком, спостерігалось зниження відносної кількості еозинофілів, сегментоядерних нейтрофілів, моноцитів, відсутність паличкоядерних нейтрофілів та підвищення кількості лімфоцитів (таблиця 3.2).

В подальші дні спостереження (20, 25 доба) в зразках крові, отриманих зі шлункової кишки МП, порівняно з інтактним зразком, спостерігалось зниження відносної кількості еозинофілів, відсутність паличко- та сегментоядерних нейтрофілів, моноцитів та підвищення кількості лімфоцитів (таблиця 3.2).

На 30 добу спостереження в 1/2 зразках крові, отриманих зі шлункової кишки МП, порівняно з інтактним зразком, спостерігалася відсутність лейкоцитів (виявлявся лише детрит), а в 1/2 зразків – зустрічалися лише поодинокі лімфоцити (таблиця 3.2).

На 35 добу спостереження в усіх проаналізованих зразках крові, отриманих зі шлункової кишки МП, спостерігалася відсутність лейкоцитів, виявлявся лише детрит (азурофільні гранули, що очевидно є залишками зруйнованих клітин) на гемолітичному фоні (таблиця 3.2).

Варто відмітити, що більшість лейкоцитів, які зустрічалися в мазках крові, отриманої зі шлункової кишки мали ознаки апоптозу або некрозу.

В усіх зразках крові, отриманих зі шлункової кишки виявлялися паличкоподібні, а також кокоподібні бактерії.

В усіх зразках крові з шлункової кишки МП на гемолітичному фоні виявлялися еритроцити різних морфологічних форм, зокрема нормоцити (переважна кількість у зразку крові одразу після годування МП), в подальшому кількість нормоцитів серед еритроцитів знижувалася, виявлялися й акантоцити, еритроцити овальної і серповидної форми та інші, частина еритроцитів реагувала гемолізом, зустрічалися й залишки зруйнованих

еритроцитів. З 10 доби дослідження виявлялися лише окремі еритроцити нормальної морфологічної форми. Гемоліз крові очевидно обумовлений гемолітичною дією бактерії-ендосимбіонта *A. hydrophila*, про що повідомляли і раніше [4].

Попередні дослідження щодо тривалості існування клітин крові людини в мікрооточенні системи травлення МП показало, що еозинофіли в препаратах можна зустріти впродовж 31 доби, нейтрофіли – 15, моноцити – 18, лімфоцити й еритроцити – 32 діб, при тривалості спостереження впродовж 40 діб. Разом з тим загальна кількість лейкоцитів впродовж спостереження знижувалася та морфологія лейкоцитів була відмінною від норми, переважно з ознаками апоптозу та/або некрозу. Про досить тривале збереження еозинофілів у мікрооточенні шлункової кишки повідомляли і раніше. Дослідження М. Nehili та ін. показали, що еритроцити і лейкоцити зберігаються в мікрооточенні травної системи до 6 тижнів, а окремі лейкоцити можуть виявлятися і кілька місяців [4]. Як відомо, лейкоформула крові людини та статевозрілих лабораторних щурів відрізняється: щури мають лімфоцитарний профіль крові, а людина – нейтрофільний.

## 4 ОХОРОНА ПРАЦІ

Охорона праці – це система правових, соціально-економічних, організаційно-технічних, санітарно-гігієнічних і лікувально-профілактичних заходів та засобів, спрямованих на збереження життя, здоров'я і працездатності працівника в процесі трудової діяльності в цій галузі [38].

Основними завданнями охороною праці є: опрацювання заходів щодо здійснення державної політики з охорони праці на регіональному і галузевому рівнях, а також підготовка, прийняття та реалізація заходів, спрямованих на забезпечення належних, безпечних і здорових умов праці, забезпечення утримання в належному стані виробничого устаткування, пропаганду охорони праці, облік, аналіз та оцінку стану умов і безпеки праці, забезпечення страхування працівників від нещасного випадку на виробництві та профзахворювання [39, 40, 41].

В ході проведення експериментальних досліджень необхідно бути досить обережним і уважним. Виконуючи експериментальні дослідження за темою кваліфікаційної роботи, я використовувала хімічні реактиви, БАР, працювала з біологічним матеріалом, електроприладами, лабораторним посудом та лабораторними тваринами. При неуважності і необережності при роботі з хімічними речовинами і приладами можна отримати серйозні травми.

Техніка безпека - це вид діяльності, що забезпечує безпеку будь-якої діяльності людини, в тому числі і трудової. Безпека в лабораторіях повинна забезпечуватися відповідно до вимог ДСТ 12.3.002-75 та інших діючих нормативних документів.

Експериментальну частину своєї кваліфікаційної роботи я виконувала у робочій зоні лабораторії, де дотримувалися певні параметри температури (20-22°C), вологості (40-60%), освітлення, швидкості руху повітря, і все відповідало вимогам ДНАОП 0.03-3.15-86 [42].

При роботі в хімічних, біохімічних і біологічних лабораторіях завжди слід пам'ятати про техніку безпеки. При дбайливому поводженні і знанні всіх правил безпеки ризик отримання травм або тілесних ушкоджень можна звести до мінімуму.

Техніка безпеки перед початком роботи в лабораторії:

- 1) при вході в лабораторію працівники зобов'язані залишати верхній одяг, сумки тощо особисті речі у відведеному місці;
- 2) носити спеціальну форму, встановлену чинними стандартами. Одяг і перевірити наявність і справність засобів індивідуального захисту;
- 3) забороняється при роботі в лабораторії тримати в кишенях шпильки, скло, ріжучі, колючі предмети;
- 4) перед початком роботи необхідно переконатися в справності вентиляції, перевірити освітленість робочого місця. Припливно-витяжна вентиляція у всіх приміщеннях лабораторії повинна бути включена не пізніше, ніж за 5 хвилин. перед початком роботи;
- 5) отримати завдання від керівника експериментальної роботи;
- 6) перевірити справність приладів та обладнання лабораторії, наявність необхідних для проведення експерименту реактивів;
- 7) при виявленні несправності лабораторного обладнання та засобів захисту треба повідомити керівника роботи і не приступати до роботи до вирішення питання [43]

В ході експериментальної роботи були використані наступні індивідуальні і комплексні засоби захисту: гумові рукавички і білий халат. При роботі з хімічними реактивами у мене був обов'язковий спецодяг (халат бавовняний) відповідно до ст. 163 КЗпП України та ДНАОП 0.00-4.26-96.

Вимоги безпеки при роботі в лабораторії:

- 1) Категорично забороняється працювати в лабораторії одному, так як в екстреній ситуації не буде кому надати першу допомогу потерпілому і усунути наслідки невдалого експерименту. Працювати слід тільки у відведений час під наглядом викладача або інших співробітників;

2) У лабораторії необхідно бути в бавовняному халаті на гудзиках. Це забезпечує певний індивідуальний захист і дозволяє уникнути забруднення одягу;

3) забороняється проводити досліди в забрудненій тарі. Посуд слід мити відразу після закінчення експерименту;

4) Категорично забороняється пробувати на смак хімікати. Забороняється набирати рідкі органічні речовини і їх розчини в піпетки ротом, для цього необхідно використовувати гумові груші та інші пристосування;

5) в процесі роботи необхідно стежити за тим, щоб речовини не стикалися зі шкірою, так як багато хто з них викликають роздратування і опіки шкіри і слизових оболонок;

6) Реактиви, необхідні для проведення дослідів, слід брати тільки в кількостях, зазначених у методиці проведення експерименту. Сухі реактиви слід брати шпателем, розчини - піпеткою, для кожного реактиву необхідно мати окремий шпатель або піпетку. Збирають отруйні і їдкі рідини в піпетки за допомогою гумової груші;

7) всі операції, пов'язані з використанням і виділенням отруйних, їдких речовин з різким запахом, повинні виконуватися тільки у витяжній шафі з працюючою вентиляцією із застосуванням засобів індивідуального захисту;

8) всі глечики, в яких зберігаються речовини, повинні бути забезпечені етикетками з відповідними назвами;

9) Забороняється виливати в раковину залишки кислот і лугів, легкозаймистих і вибухонебезпечних, а також речовин з різким запахом.

9) При нагріванні рідин учень повинен тримати трубку отвором подалі від себе і людей, що знаходяться поруч. Не нахилийтеся над посудом, який містить хімічні речовини та рідини, оскільки бризки можуть потрапити в очі;

10) при збовтуванні хімічних розчинів у колбах і пробірках закривати їх тільки гумовими пробками;

11) категорично забороняється нагрівати або охолоджувати будь-які розчини в герметично закритій тарі, а також закривати колби гарячою рідиною;



12) Обережно поведіться зі скляним лабораторним посудом, що легко б'ється;

13) В експериментах з використанням електроприладів необхідно переконатися в їх справності, правильності підключення до електромережі і контуру заземлення.

Вимоги безпеки після закінчення роботи в лабораторії:

- 1) організувати своє робоче місце;
- 2) вимкнути все електрообладнання, перекрити воду та вимкнути електроенергію, прибрати з приміщень промислові та побутові відходи, закрити вікна, кватирки, двері;
- 3) після роботи з кров'ю брудний посуд замочують у дезінфікуючих розчинах;
- 4) поверхня робочих столів повинна бути оброблена дезінфікуючим розчином;
- 5) хімічні речовини, реактиви та інші речовини, які використовувалися в процесі роботи, повинні бути розміщені у відведеному для них місці;
- 6) учень повинен розмістити спецодяг і взуття у відведеному для нього місці;
- 7) При виявленні недоліків лабораторного обладнання в процесі роботи студент зобов'язаний повідомити про це наукового керівника роботи.

Заходи безпеки при витокі газу і гасінні локальної пожежі і палаючого одягу:

- 1) при виникненні пожежі необхідно швидко прибрати всі горючі речовини подалі від місця загоряння, відключити газову мережу, всіх споживачів електричного струму і припинити активний доступ повітря в лабораторію;
- 2) Полум'я слід гасити піском або протипожежною ковдрою. Гасіння полум'я водою може призвести до розширення вогню. У разі більшої площі займання слід використовувати вогнегасник;

3) Якщо у кого-небудь загорівся одяг, необхідно щільно накрити палаючу тканину протипожежною ковдрою. При загорянні одягу бігти не варто, так як це сприяє поширенню полум'я.

Щоб запобігти виникненню пожежі, в лабораторії не допускається:

- 1) палити в лабораторних приміщеннях;
- 2) залишати легкозаймисті матеріали на шафах і за ними, на радіаторах центрального опалення, поблизу електричних проводів і електроприладів;
- 3) не дозволяється залишати без нагляду електроприлади, плити або електроосвітлення;
- 4) Забороняється порушувати електропроводку, заповнювати нею шафи і закривати плакатами, картинами або газетами.

У важкодоступних місцях обов'язково повинні бути щити з набором протипожежного інвентарю: вогнегасники, ящики з піском і пожежний гідрант. При загорянні легкозаймистих речовин для їх гасіння використовують: вогнегасник, пісок, листовий азбест, азбестове полотно або вовняну ковдру.

При виникненні пожежі слід своєчасно викликати пожежну команду, закрити вікна і кватирки, відключити вентиляцію і електроприлади, видалити з приміщення легкозаймисті рідини, лужні метали, фосфор.[32]

Перша допомога при опіках і отруєнні хімічними речовинами:

1) При термічних опіках першого ступеня (почервоніння і набряклість) обпечене місце слід обробити спиртовим розчином таніну, 96% етиловим спиртом або розчином марганцівки. При опіках другого і третього ступеня (пухирі і виразки) допустимі тільки дезінфікуючі примочки з розчину марганцівки, після чого необхідно звернутися до лікаря;

2) при опіках кислотою необхідно промити уражену ділянку великою кількістю проточної води, а потім 3% розчином бікарбонату натрію, а потім знову водою;

3) при попаданні кислоти в очі необхідно промити їх проточною водою (3-5 хвилин), а потім розчином борної кислоти (у разі лугу) або бікарбонату натрію (у разі кислоти), після чого звернутися до лікаря;

4) При попаданні їдких органічних речовин на шкіру, що не розчиняються у воді, їх необхідно змити великою кількістю відповідного розчинника. Після надання першої допомоги потерпілого слід відправити в медичний пункт.

У робочій зоні лабораторії ми дотримувалися певних параметрів мікроклімату: температури, вологості, освітлення, швидкості руху повітря. Всі ці фактори відповідали нормам, зазначеним в ДНАОП 0.03-3.15-86. Дуже важливо, щоб в приміщенні не створювався застій повітря [44, 45]. Повітря на робочому місці повинен відповідати ДСТУ 12.1.005-88 [45].

При роботі в лабораторії ми забезпечили постійний рух повітря, не повинно бути застою, відкриваючи вікна. Важливе значення надавалося також створенню нормальної освітленості робочого місця. Освітлення створюється сонцем або за допомогою ламп розжарювання, люмінесцентних ламп. Природне і штучне освітлення лабораторії відповідало вимогам СНиП 11-4-79 [46].

Під час роботи з хімічними реактивами використовувала обов'язковий спецодяг (халат бавовняний) відповідно до ст. 163 Кодексу законів про працю України та ДНАОП 0.00-4.26-96 [47].

При проведенні дослідів в лабораторії ми використовували хімічний посуд. При митті лабораторного посуду потрібно стежити, щоб йорж не вдарявся об дно або стінки скляного посуду, так можна пошкодити її і травмувати шкіру. Не рекомендується заливати в проточні раковини їдкі і отруйні речовини, що мають неприємний, різкий запах, для цього в лабораторії повинні бути присутніми спеціальні ємності. Коли такі шкідливі речовини виливаються в раковину, вони можуть випаровуватися і отруювати повітря лабораторії. Концентровані речовини необхідно попередньо сильно розбавити або нейтралізувати [47].

При роботі з сироваткою крові можливий контакт зі шкірою, одягом і слизовими оболонками. Всі біологічні рідини повинні сприйматися як потенційно інфіковані ВІЛ-інфекцією, тому відповідно до наказу МОЗ України

від 20.05.00 № 120 розроблено інструкцію з надання першої медичної допомоги при виникненні таких випадків.

Якщо сироватка крові потрапила на халат, її потрібно негайно зняти і замочити в дезінфікуючому розчині не менше 1 години. При попаданні сироватки на шкіру необхідно обробити уражену ділянку одним з дезінфікуючих засобів: 70% спирту, 3% рН йоду, 5% рН перекису водню. Потім двічі промийте шкіру під проточною водою з милом. Якщо сироватка потрапила на слизові оболонки очей, то необхідно накласти промивання великою кількістю води, а потім слід закапати очі розчином альбуциду (30%).

Так, за допомогою знання елементарних правил безпеки, я уникнула небезпечних нещасних випадків і травм.

Під час експериментальної частини моєї кваліфікаційної роботи можливі нещасні випадки, до них відносяться: травми від електроприладів, попадання БАР, крові на одяг, шкіру чи в очі. Дуже важливо вміти надавати першу медичну допомогу при виникненні цих нещасних випадків, щоб забезпечити своєчасне позбавлення від таких випадків та їх наслідків.

Електротравми можуть виникнути, коли учень торкається дроту під напругою. Електротравми можуть призвести до таких наслідків: зупинка серця, дихання, пошкодження головного мозку. Перша допомога при електротравмах повинна починатися з звільнення потерпілого від джерела живлення.

Правила безпеки під час порятунку потерпілого від електротравми:

1) Щоб зупинити струм, найкраще спочатку вимкнути вимикач. Якщо це зробити неможливо, необхідно звільнити потерпілого від електричного проводу за допомогою гумових рукавичок. Ні в якому разі не можна торкатися потерпілого голими руками;

2) при відсутності ознак життя у потерпілого слід розпочати реанімаційні заходи;

3) Якщо спроби увінчалися успіхом і потерпілий подає ознаки життя, необхідно, не гаючи часу, накласти на рану асептичну пов'язку і доставити потерпілого до найближчої лікарні [48, 49].

В ході експериментальної частини кваліфікаційної роботи, а саме статистичної обробки результатів, я використовував комп'ютер. Статистична обробка результатів проводилася за допомогою 2-х програм: MS Excel і IBM SPSS Statistic 20.0, які були попередньо встановлені на комп'ютері.

Техніка безпеки при роботі за комп'ютером:

1) підключати комп'ютер до електромережі можна тільки через спеціально встановлені електричні розетки або штепсельні вилки із заземленням;

2) Освітлення робочих місць в горизонтальній площині на рівні 80 см від підлоги повинно бути не менше 400 лк. Для штучного освітлення у виставкових залах слід застосовувати люмінесцентні лампи типу ЛБ;

3) Відстань від очей користувача до екрана дисплея комп'ютера має бути не менше 50-70 см, кут огляду – не менше 10-200 і не більше 400. Вам потрібна хороша і зручна підтримка спини і сідниць;

4) Після закінчення роботи з комп'ютером необхідно відключити обладнання від електроживлення[49].

Тварини для проведення дослідів надходити повинні тільки до віварію. Категорично забороняється приводити на кафедру тварин не перевірених ветеринарним лікарем і тих, що не пройшли покладений карантинний термін.

Щури повинні знаходитися замкненими в клітках до досліду.

Категорично забороняється: тримати тварин поза клітками, залишаючи їх на кафедрі на ніч. Наприкінці робочого дня тварини повинні бути здані у віварій. У випадку крайньої необхідності тривалого спостереження по ходу досліду вони можуть бути залишені на кафедрі лише з дозволу зав.кафедрою.

При фіксації щурів варто попередньо міцно захопити шкіру в потиличній області між вухами, після чого, тримаючи тварину у вертикальному положенні, накинути лямки на задні і передні кінцівки і закріпити їх. Після такої

попередньої підготовки тварину можна фіксувати у верстаті. Там, де це можливо, тварину перед фіксацією краще наркотизувати.

По закінченні досліду тварина звільняється з верстата в порядку, зворотній фіксації, і переноситься в клітку.

Після кожного досліду варто ретельно вимити руки теплою водою з милом, або протерти дезрозчином.

При укусі щуром варто негайно промити рану спиртом, обробити розчином йоду і довести до відома завідуючому кафедрою або викладачеві.[50].

Таким чином, завдяки знанням основних правил техніки безпеки, я не зіткнулася з небезпечними для здоров'я наслідками.

## ВИСНОВКИ

1. Після годування медичної п'явки ( $n=50$ ) кров'ю лабораторних щурів, можливий нормальний перебіг посттрофічного періоду (92%) і патологічний (8%), який спостерігається на 10-14 добу, супроводжується зривуванням крові, формуванням перетяжок на тілі, та завершується смертю частини тварин (4%).

2. У крові, отриманій із шлункової кишки медичної п'явки одразу після годування на тілі лабораторного щура, порівняно з інтактним зразком (з хвоста), виявлено підвищення ( $p \leq 0,05$ ) кількості лейкоцитів із  $8,63 \pm 0,617$  Г/л до  $11,51 \pm 0,496$  Г/л, зниження відносного вмісту еозинофілів ( $p \leq 0,05$ ) і тенденція до підвищення вмісту паличкоядерних нейтрофілів, лімфоцитів та моноцитів, тенденція до зниження вмісту сегментоядерних нейтрофілів.

3. В зразках крові, отриманих зі шлункової кишки медичної п'явки, порівняно з інтактним зразком: через 1 добу спостерігалось зниження кількості паличко- і сегментоядерних нейтрофілів, підвищення лімфоцитів ( $p \leq 0,05$ ), кількість лейкоцитів знижувалась порівняно зі зразком крові отриманим одразу після годування; на 5 добу – спостерігалось зниження загальної кількості лейкоцитів, паличко- і сегментоядерних нейтрофілів, еозинофілів, моноцитів і підвищення лімфоцитів ( $p \leq 0,05$ ); на 10 добу – кількість лейкоцитів не визначалася, спостерігалася відсутність паличкоядерних нейтрофілів, знижувалася кількість сегментоядерних нейтрофілів, моноцитів і еозинофілів, зростала кількість лімфоцитів; на 15 добу – спостерігалось зниження відносної кількості еозинофілів, сегментоядерних нейтрофілів, моноцитів, відсутність паличкоядерних нейтрофілів і підвищення лімфоцитів; на 20, 25 добу – спостерігалось зниження відносної кількості еозинофілів, відсутність паличко- і сегментоядерних нейтрофілів, моноцитів і підвищення лімфоцитів; на 30 добу – у частині зразків спостерігалася відсутність лейкоцитів, а в іншій зустрічалися поодинокі лімфоцити; на 35 добу – виявлявся лише детрит на гемолітичному фоні. Більшість лейкоцитів мали ознаки апоптозу або некрозу.

## ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Результати кваліфікаційної роботи можуть бути впроваджені в навчальний процес при підготовці бакалаврів та магістрів за спеціальністю 091 Біологія та біохімія, зокрема при викладанні навчальних дисциплін «Біотехнологія», «Техніка біологічного експерименту», «Імунологія» тощо.

Результати роботи також можуть бути корисними для лабораторій, які спеціалізуються на біотехнології медичної п'явки.



## ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Draft genome of the European medicinal leech *Hirudo medicinalis* (Annelida, Clitellata, Hirudiniformes) with emphasis on anticoagulants / S. Kvist et al. *Scientific Reports*. 2020. Vol.10, P. 9885. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66749-5>.
2. Литвиненко Р. О. Перспективи використання біологічно активних речовин медичної п'явки для підтримки гомеостазу екосистем. *Інтеграція освіти, науки та бізнесу в сучасному середовищі: літні диспути: тези доп. І Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції, 1-2 серпня 2019 р. Дніпро, 2019. 394 с.*
3. Whitaker I.S., Maltz M., Siddall M.E., Graf J. Characterization of the digestive tract microbiota of *Hirudo orientalis* (medicinal leech) and antibiotic resistance profile. *Plast Reconstr Surg*. 2014. №133(3). P. 408e-418e. DOI: 10.1097/01.prs.0000438461.06217.bb.
4. 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.
5. Кражан С. А. Природна кормова база рибогосподарських водойм : навчальний посібник. Київ : Аграрна освіта, 2014. 333 с.
6. Барна І. Біологія. Довідник школяра та абітурієнта. Тернопіль : ПП, 2016. 768 с.
7. Мотузний В.О. Біологія : навчальний посібник. Київ : Вища школа, 2009. 751 с.
8. Литвиненко Р. О. Життєздатність формених елементів крові людини в кишковому середовищі медичної п'явки. *Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки*. 2013. № 1. С. 84-92.
9. Сінельникова І.В., Гарбар О.В., Гарбар Д.А. Фауна п'явок Чуднівського Району Житомирської області. Видовий склад і біотопічний

розподіл. *Біологічні дослідження 2013*. Матеріали IV науково-практичної Всеукраїнської конференції молодих учених та студентів. Житомир : Вид-во ЖДУ ім. Івана Франка, 2013. С. 143–144.

10. Бажан А.Г., Бажан Є.А., Гордієнко О.В., Турчак А.І. До питання вивчення п'явки медичної *Hirudo medicinalis* L. в шкільному курсі біології. *Проблеми відтворення та охорони біорізноманіття України в світлі вчення про ноосферу*. Матеріали Всеукраїнської студентської науково-практичної конференції. Полтава : Астроя, 2009. С. 211-212.

11. *Hirudo verbana* as a freshwater invertebrate model to assess the effects of polypropylene micro and nanoplastics dispersion in freshwater / N. Baranzini et al. *Fish Shellfish Immunol.* 2022. Vol. 127. P. 492-507.

12. Бойко В. І. Аналіз та розробка компонентів інформаційної системи для підтримки лікування у гірудотерапії. Міжнародна наукова інтернет-конференція "Інформаційне суспільство: технологічні, економічні та технічні аспекти становлення (випуск 49)" / Збірник тез доповідей: випуск 49 (м. Тернопіль, 10 червня 2020 р.). Тернопіль, 2020. С. 5-7.

13. Амінов Р.Ф. Вплив гірудопунктури та екстракту з тканин медичної п'явки на імунну реактивність самиць та приплоду щурів у постембріональному онтогенезі : дис. канд. біол. наук : 03.00.09. Запоріжжя, 2018. 149 с.

14. Marden J.N., McClure E.A., Beka L., Graf J. Host Matters: Medicinal Leech Digestive-Tract Symbionts and Their Pathogenic Potential. *Front Microbiol.* 2016. Vol. 3 (7). P. 1569. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01569.

15. Indergand S., Graf J. Ingested blood contributes to the specificity of the symbiosis of *Aeromonas veronii* biovar *sobria* and *Hirudo medicinalis*, the medicinal leech. *Appl Environ Microbiol.* 2000. Vol. 66(11). P. 4735-4741. DOI: 10.1128/AEM.66.11.4735-4741.2000.

16. Low-level antimicrobials in the medicinal leech select for resistant pathogens that spread to patients / L. Beka et al. *MBio.* 2018. Vol. 9(4). P. e01328-01318. DOI: 10.1128/mBio.01328-18.

17. 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. № 3. С. 127-133.
18. Silver A. C., Graf J. Innate and procured immunity inside the digestive tract of the medicinal leech. *Invertebrate Surviv J*. 2011. Vol. 8, No 2. P. 173-178.
19. In vitro antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biotype *sobria* / J. Vila et al. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002. Vol. 49. P. 701-702. DOI: 10.1093/jac/49.4.701.
20. Whitaker I.S., Maltz M., Siddall M.E., Graf J. Characterization of the digestive tract microbiota of *Hirudo orientalis* (medicinal leech) and antibiotic resistance profile. *Plast Reconstr Surg*. 2014. Vol. 133. No 3. P. 408-418.
21. Reciprocal immune benefit based on complementary production of antibiotics by the leech *Hirudo verbana* and its gut symbiont *Aeromonas veronii* / A. Tasiemski et al. *Sci Rep*. 2015. Vol. 5. P. 17498. DOI: 10.1038/srep17498.
22. Bacterial symbiont and salivary peptide evolution in the context of leech phylogeny / M.E. Siddall et al. *Parasitology*. 2011. Vol. 138(13). P. 1815-1827. DOI: 10.1017/S0031182011000539.
23. Singh A.P. Medicinal leech therapy (hirudotherapy): a brief overview. *Complement Ther Clin Pract*. 2010. Vol. 16(4). P. 213-215. DOI: 10.1016/j.ctcp.2009.11.005.
24. Gödekmerdan A., Arusan S., Bayar B., Sağlam N. Tıbbi sülükler ve hirudoterapi (Medicinal leeches and hirudotherapy). *Turkiye Parazitol Derg*. 2011. Vol. 35(4). P. 234-239. DOI: 10.5152/tpd.2011.60.
25. Hildebrandt J.P., Lemke S. Small bite, large impact-saliva and salivary molecules in the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*. *Naturwissenschaften*. 2011. Vol. 98(12). P. 995-1008. DOI: 10.1007/s00114-011-0859-z.
26. Vetvicka V. Origins and functions of annelide immune cells : the concise survey. *ISJ*. 2009. Vol. 6. P. 138-143.

27. Гірудотерапія : навчальний посібник / Кузнецова Л. В. та ін. Вінниця, 2010. 236 с.
28. Фролов О. К. Методичні рекомендації до технологічного регламенту біотехнології медичної п'явки. Запоріжжя : СоруArt, 2012. 36с.
29. Effects of Carbon Nanotube Environmental Dispersion on an Aquatic Invertebrate, *Hirudo medicinalis* / R. Girardello Et al. *PLoS One*. 2015. Vol. 10(12). P. e0144361. DOI: 10.1371/journal.pone.0144361.
30. Фролов О. К., Копійка В. В., Федотов Є. Р. Великий практикум по імунології «Методологія імунної системи ссавців» : навчально-методичний посібник. Запоріжжя : Сору Art, 2012. 152 с.
31. Задорожна Г.О., Хоменко О.М. Методичний посібник для виконання експериментальних робіт із використанням щурів. Дніпро, 2019. 40 с.
32. Спосіб дослідження крові : пат. 68769 Україна : А61В 5/00, G01N 33/49. № u 2011 11341 ; заявл. 26.09.2011 ; опубл. 10.04.2012, Бюл. № 7. 8 с.
33. Мельниченко О.П., Якименко І.Л., Шевченко Р.Л. Статистична обробка експериментальних даних : навчальний посібник. Біла Церква, 2006. 34 с.
34. Ткачук А.І., Богомаз-Назарова С.М., Кононенко С.О. Охорона праці в галузі. Курс лекцій : навчальний посібник для студентів вищих педагогічних навчальних закладів всіх спеціальностей за освітнім рівнем "магістр". Перевидання, доповнене та перероблене. Кропивницький : ПП "Центр оперативної поліграфії "Авангард". 2018. 128 с.
35. Приседський Ю.Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів. Донецьк : Юго-Восток, 1999. 210 с.
36. Frolov A.K., Litvinenko R.A. Basic morphofunctional features of pharmaceutic leech (*Hirudo verbana* Carena, 1820) tissues in various forms of response after hirudotherapeutic procedures. *Ann Parasitol*. 2015. Vol. 61(1). P. 27-35.

37. Амінов Р. Ф. Природний імуномодулятор із тіл медичних п'явок: отримання та застосування: монографія. Запоріжжя : Запорізький національний університет, 2022. 164 с.
38. Державне управління у сфері цивільного захисту: наука, освіта, практика. Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції. 2016 р. НУЦЗУ, 2016. 308 с.
39. Безпека життєдіяльності та охорона праці : підручник / Сокурєнко В. В. та ін. Харків. нац. ун-т внутр. справ. Харків : ХНУВС, 2021. 308 с.
40. Основи охорони праці та охорона праці в галузі : навчальний посібник. Електронний навчальний посібник. Чернівці, БДМУ. 2015. URL: <http://surl.li/oixkq> (дата звернення : 22.06.2023)
41. Трахтенберг І. М., Коршун М. М. Гігієна праці і виробнича санітарія. Київ, 1997. 464 с.
42. ДСТУ 2293-99. Охорона праці. Терміни та визначення. [Чинний від 2000-01-01]. Вид. офіц. Київ : Держспоживстандарт України, 1999. 21 с. (Національні стандарти України).
43. ДСН 3.36.04299. Стандартні норми мікроклімату виробничих приміщень. [Чинний від 1999-12-01]. Вид. офіц. Київ/ МОЗ України, 1999. 10 с.
44. СНіП 2.04.05-9. Опалення, вентиляція і кондиціонування. [Чинний від 1996-06-27]. Вид. офіц. Київ : ЗНПЭП, 1996. 89с.
45. ДНАОП 0.00-4.26-96. Положення про порядок забезпечення працівників спеціальним одягом, спеціальним взуттям та іншими засобами індивідуального захисту. [Чинний від 1996-10-18]. Вид офіц. Київ : Держнагляд охорони праці України, 1996. 11 с.
46. Савчук О. М. Основи охорони праці : конспект лекцій в 2-х ч. Запоріжжя : Просвіта, 2000. 124 с.
47. ДНАОП 001-1.01-95. Правила пожежної безпеки в Україні. [Чинний від 1995-01-01]. Вид. офіц. Київ : МВС України, 1995. 167 с.

48. Правила пожежної безпеки в Україні. Державний реєстр нормативних актів з питань пожежної безпеки (Реєстр НАПБ). Київ Пожежінформтехніка, 2001. 238 с.

49. Голінько В.І., Безщасний О.В. Охорона праці при геологорозвідувальних роботах (навчальний посібник) Дніпро : НГУ., 2014. 218 с.

50. Коломієць І.А., Ковальчук І.І., Головач П.І. Камрацька О.І. Навчально-методичний посібник для лабораторних занять з «Фізіології сільськогосподарських тварин» для здобувачів вищої освіти першого (бакалаврського) рівня вищої освіти спеціальності 204 «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва». Львів: ЛНУВМБ ім. С.З. Гжицького, 2022. 80 с.

**ДЕКЛАРАЦІЯ**  
**про дотримання академічної доброчесності**  
**здобувача ступеня вищої освіти ЗНУ**

Я, Круть Олександра Андріївна, студентка 2 курсу, денної форми навчання, факультету біологічного, спеціальність 091 Біологія, освітня програма Біологія, адреса електронної пошти sashakrut1212@gmail.com, підтверджую, що написана мною кваліфікаційна робота на тему «Взаємодія клітин крові лабораторного щура та мікрооточення травної системи *Hirudo verbana*» відповідає вимогам академічної доброчесності та не містить порушень, що визначені у ст. 42 Закону України «Про освіту» зі змістом яких ознайомлена;

— заявляю, що надана мною для перевірки електронна версія роботи є ідентичною її друкованій версії;

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

Дата \_\_\_\_\_ Підпис \_\_\_\_\_ ПІБ (студент)

Круть О.А.

Дата \_\_\_\_\_ Підпис \_\_\_\_\_ ПІБ (науковий керівник)

Литвиненко Р.О.