

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

**БІОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ**

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

**Кваліфікаційна робота  
магістра**

на тему: ВПЛИВ ВОДНО-СОЛЬОВОГО ЕКСТРАКТУ З *HIRUDO VERBANA*  
НА КУЛЬТУРУ ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ

Виконала: студентка 2 курсу, групи 8.0919-1

спеціальності 091 Біологія  
(код і назва спеціальності)

освітньої програми Біологія  
(назва освітньої програми)

Драгулова Ю. О.  
(ініціали та прізвище)

Керівник проф., д. м. н. Фролов О. К.  
(посада, вчене звання, науковий ступінь, прізвище та ініціали)

Рецензент проф., д. м. н. Ещенко Ю. В.  
(посада, вчене звання, науковий ступінь, прізвище та ініціали)

Запоріжжя  
2020

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

Біологічний факультет

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

Рівень вищої освіти магістр

Спеціальність 091 Біологія

Освітня програма Біологія

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Завідувач кафедри В. Д. Бовт

«\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 року

**ЗАВДАННЯ**

**НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТЦІ**

Драгуловій Юлії Олегівні

1. Тема роботи Вплив водно-сольового екстракту з *Hirudo Verbana* на культуру лімфоцитів крові  
керівник роботи Фролов Олександр Кирилович, д.м.н., професор  
затверджені наказом ЗНУ від «13 липня» 2020 р. № 1028 - с
2. Строк подання студентом роботи грудень 2020 року
3. Вихідні дані до роботи Курсова робота на тему «Клітини імунної системи ссавців. Лімфоцити як клітини адаптивного імунітету», кваліфікаційна робота бакалавра на тему : «Вплив біологічно активних речовин медичної п'явки на мітоген-стимульовану культуру лімфоцитів».
4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити): 1) ознайомитися з біологією, екологією МП та її БАР ;  
2) приготувати водно-сольовий екстракт із тіл МП; 3) підготувати живильну суміш для реакції бластної трансформації лімфоцитів, мітогену ФГА і сольового екстракту з тіл МП; 4) Проаналізувати аналіз лейкоцитів та формулу крові донорів; 5) Поставити і проаналізувати мітоген-стимульовану культуру лімфоцитів з додаванням різних концентрацій сольового екстракту БАР МП.
5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень)  
5 таблиць, 1 додаток

## 6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
1-3	Фролов О. К., д. м. н., професор		
4	Костюченко Н. І., к. б. н., доцент		

7. Дата видачі завдання \_\_\_\_\_

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Аналіз літературних джерел за темою кваліфікаційної роботи	жовтень 2019-травень 2020	Виконано
2.	Оформлення розділу «Огляд літератури»	травень 2020	Виконано
3.	Підбір матеріалів та методів для дослідження, оформлення розділу «Матеріали та методи дослідження»	жовтень 2019-травень 2020	Виконано
4.	Формування розділу «Охорона праці та безпека в надзвичайних ситуаціях»	жовтень 2019-жовтень 2020	Виконано
5.	Поповнення експериментальних даних дослідження, аналіз мікропрепаратів	червень-жовтень 2020	Виконано
6.	Формування бази експериментальних даних та їх статистичний аналіз	вересень-жовтень 2020	Виконано
7.	Формування розділу «Експериментальна частина»	вересень-жовтень 2020	Виконано
8.	Оформлення кваліфікаційної роботи, підготовка доповіді та попередній захист кваліфікаційної роботи	листопад-грудень 2020	Виконано

Студент \_\_\_\_\_

Ю. О. Драгулова

Керівник роботи \_\_\_\_\_

О. К. Фролов

**Нормоконтроль пройдено**

Нормоконтролер \_\_\_\_\_

Н. І. Костюченко

## РЕФЕРАТ

Робота викладена на 73 сторінках друкованого тексту, містить 5 таблиць, 1 додаток. Список літератури включає 77 джерел.

Об'єкт дослідження – мітоген та антиген-стимульована культура лімфоцитів з різною концентрацією БАР МП. Предмет дослідження: БАР водно-сольового екстракту з тіл БАР МП *Hirudo verbana*.

Мета роботи – вивчити дозозалежну індукцію апоптозу біологічно активних речовин медичної п'явки на мітоген-стимульовану культуру лімфоцитів.

Методи дослідження: цитоморфометричні, імунологічні, біохімічні, статистичні методи.

В результаті дослідження встановлено, що загальний аналіз лейкоцитів крові обстежених донорів був у фізіологічних межах: лейкоцити  $5,1 \pm 0,5$ , формула крові без відхилень. Спонтанна і ФГА-стимульована РБТЛ були у фізіологічних межах потенційної проліферативної активності. Спонтанна:  $5,28 \pm 1,5$ ; ФГА:  $70,3 \pm 8,4$ . БАР МП здійснювали інгібіцію ФГА-стимульованої РБТЛ завдяки індукції апоптозу і некрозу з вираженим проявленням починаючи з 10 мкг/мл і максимальним 40 і 80 мкг/мл, при яких проявлявся вже повний некроз. Інгібіція реактивності лімфоцитів на мітогени та антигени лежить в основі протизапальної дії при гірудотерапії.

Робота представляє значний науковий інтерес – вивчення механізму протизапальної дії БАР МП по індукції інгібіції імуногенезу шляхом апоптозу і некрозу. Практичний інтерес полягає у визначенні дози БАР МП, при якій відбувається реакція баластної трансформації лімфоцитів.

**БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ РЕЧОВИНИ, ВОДНО-СОЛЬОВИЙ ЕКСТРАКТ, МЕДИЧНА П'ЯВКА, МІТОГЕНИ, ЛІМФОЦИТИ, АПОПТОЗ, НЕКРОЗ**

## ABSTRACT

The work is presented on 73 pages printed pages, contains 5 tables, 1 edition. List of references includes 77 sources.

Object of research – mitogen and antigen-stimulated culture of lymphocytes with different concentrations of BAS ML.

Research subject: BAS of water-salt extract from BAS ML *Hirudo verbana*.

The purpose of the work is to study the dose-dependent induction of apoptosis in apoptosis of biologically active substances of medical leeches on mytogen-stimulated lymphocyte culture.

Methods of research: cytomorphometric, immunological, biochemical, statistical.

As a result of the research, it was found that the general analysis of blood white blood cells of the examined donors was within the physiological limits: leukocytes  $5,1 \pm 0,5$ , blood formula without deviations. Spontaneous and phage-stimulated RBTLs were within the physiological limits of potential proliferative activity. Spontaneous:  $5.28 \pm 1.5$ ; PGA:  $70.3 \pm 8.4$ . BAS ML performed the inhibition of FGA-stimulated RBTL due to the induction of apoptosis and necrosis with pronounced manifestations from 10 mcg/ml and a maximum of 40 and 80 mcg/ml, which revealed already complete necrosis. Inhibition of the reactivity of lymphocytes to mitogens and antigens is the basis of anti-inflammatory action in hirudotherapy.

The work represents a significant scientific interest – study of thr mechanism of anti-inflammatory action of BAS ML of the induction of inhibition of immunogenesis by apoptosis and necrosis. Practical interest is to determine of BAS ML at which the reaction of blast transformayion of lymphocytes.

**BIOLOGICAL ACTIVE SUBSTANCES, WATER-SALT EXTRACT,  
MEDICAL LEECH, MITOGEN, LYMPHOCYTE, APOPTOSIS, NECROSIS**

## ЗМІСТ

ВСТУП .....	8
1 ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	10
1.1 Вивчення біології та екології <i>Hirudo verbana</i> .....	10
1.2 Фактори та механізми дії гірудотерапії .....	15
1.3 Біологічно активні речовини медичної п'явки, механізми їх дії .....	19
1.3.1 Загальна характеристика та класифікація біологічно активних речовин медичної п'явки.....	19
1.3.2 Механізми дії біологічно активних речовин медичної п'явки.....	25
1.4 Використання медичних п'явок при певних захворюваннях .....	31
1.4.1 Вплив гірудотерапії на серцево-судинну патологію .....	31
1.4.2 Вплив гірудотерапії на хворобу вен нижніх кінцівок (тромбофлебіт).....	35
2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ .....	37
2.1 Об'єкти і матеріали дослідження .....	37
2.2 Методи дослідження .....	38
2.2.1 Приготування водно-сольового екстракту .....	38
2.2.2 Метод Лоурі .....	39
2.2.3 Реакція бластної трансформації лімфоцитів .....	39
2.2.4 Підрахунок кількості лейкоцитів у камері Горяєва.....	41
2.2.4 Мікроскопія мазків крові. Складання лейкоцитарної формули.....	43
2.3 Статистична обробка даних .....	45
3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА .....	48
4 ОХОРОНА ПРАЦІ ТА БЕЗПЕКА В НАДЗВИЧАЙНИХ СИТУАЦІЯХ .....	56
ВИСНОВКИ.....	63
РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	64
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ .....	65
ДОДАТКИ.....	73

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ,  
СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

ССЗ – секрет слинних залоз

МП – медична п'явка

БАР – біологічно активні речовини

ФГА – фітогемагглютенін

РБТЛ – реакція бластної трансформації лімфоцитів

ЕТС – ембріональна теляча сироватка

ОЦК – об'єм циркулюючої крові

## ВСТУП

В останні роки гірудотерапія показала свою ефективність, їй належить одне з провідних місць серед методів традиційної медицини. Використання медичних п'явок (МП) при гірудотерапії (ГТ) обумовлено широким спектром терапевтичної дії їх біологічно активних речовин (БАР): регуляцією гемостазу та судинного тонуусу, протизапальним, регенераційним, нейротропним, бактеріостатичним, імуномодуляторним ефектами [1-5]. Однак механізм позитивного ефекту недостатньо з'ясований.

Вважається, що більшість із зазначених ефектів опосередковується через імунну систему, тому метою моєї роботи було вивчити дозозалежну індукцію апоптозу біологічно активних речовин медичної п'явки на мітоген-стимульовану культуру лімфоцитів. Поставлена мета реалізовувалась через вирішення наступних завдань:

1. Ознайомитися з біологією, екологією медичної п'явки та її біологічно активними речовинами.
2. Приготувати водно-сольовий екстракт з тіл МП.
3. Підготувати живильну суміш для реакції бластної трансформації лімфоцитів, мітогену ФГА і сольового екстракту з тіл МП.
4. Проаналізувати аналіз лейкоцитів та формулу крові донорів.
5. Поставити і проаналізувати мітоген-стимульовану культуру лімфоцитів з додаванням різних концентрацій сольового екстракту БАР МП та визначити дози БАР сольового екстракту з тіл МП, при яких оптимально відбувається інгібіція імуногенезу лімфоцитів крові.

Предмет дослідження: БАР водно-сольового екстракту з тіл БАР МП *Hirudo verbana*.

Об'єкт дослідження: мітоген та антиген-стимульована культура лімфоцитів з різною концентрацією БАР МП.



Наукове значення: в роботі вперше показано дозозалежний вплив БАР МП на мітоген-стимульовану культуру лімфоцитів, обумовлений індукцією апоптозу і некрозу лімфоцитів, що полягає в механізмі протизапальної дії медичної п'явки при гірудовпливі.

Практичне значення: полягає у визначенні оптимальних доз БАР МП для пригнічення проліферативної активності лімфоцитів в культурі, яка є в діапазонах 1,0 – 10,0 мкг/мл, які обумовлюють середнє значення інгібіції лімфогенезу. Окрім того практичний інтерес полягає в аналізі залежності інгібуючої дози БАР МП від вихідних відносних і кількісних показників лейкограми. Кореляційним аналізом було встановлено, що на властивість БАР МП до пригнічення реакції баластної трансформації лімфоцитів не впливають вихідні абсолютні та відносні значення лейкограми донорів.

## 1 ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1 Вивчення біології та екології *Hirudo verbana*

П'явки, які використовуються в медичній практиці, відносяться до безхребетних тварин: тип *Annelida* (кільчасті черви); підтип *Clitellata* (пояскові); клас *Hirudinea* (п'явки); Підклас *Euhirudinea* (справжні п'явки); Ряд *Gnathobdellida* (щелепні п'явки); рід *Hirudo* (гіруди); вид *Hirudo verbana* (п'явка аптечна) [6].

Медичну п'явку відповідно до її типу харчування відносять до екзопаразитів. Однак за біотичними стосунками в системі, медична п'явка – хазяїн-годувальник, яка еволюціонувала до мутуалізму – взаємовигідних стосунків. Так медична п'явка отримує поживні речовини від хазяїна, а хазяїну вводить більш 100 БАР, які відновлюють його гомеостаз. Вона веде вільний спосіб життя, лише періодично нападаючи в основному на теплокровних тварин. Харчуючись, п'явка не приводить свою жертву до загибелі. Здавна вона застосовувалась як лікувальний засіб і зараз гірудотерапія завдяки широкому терапевтичному спектру активно застосовується в медицині, ветеринарії та фармакології [7].

У світі відомо понад 600 видів п'явок, але лише три види МП частіше використовують із профілактично-лікувальною метою: аптечну (*H. Verbana Carena*, 1820), медичну/українську (*H. medicinalis Linnaeus*, 1758) [1, 5, 7, 8], рідше – східну п'явку (*H. orientalis S. Utevsky et Trontelj*, 2005) [1, 7]. До 2004 р. переважала думка серед науковців про те, що всі підвиди МП в Європі є представниками одного і того ж виду *Hirudo medicinalis* [1, 6], але останні дослідження підтверджують, що всі підвиди МП – це один вид [5, 9], а саме: *H. medicinalis*, *H. verbana* та *H. orientalis* [5, 10-13]. Зі змінами в класифікації виявляється, що більшість п'явок, які використовуються з профілактично-лікувальною метою є не медичними (*H. medicinalis*), а аптечними (*H. verbana*) [5, 12, 13]. Однак, законодавчо захищеним є вид *H. medicinalis*, тому, відповідна

таксономічна корекція в міжнародних природоохоронних конвенціях та законодавстві є суттєвою [5, 10].

Звичайним місцем проживання п'явок є ставки, неглибокі озера болота, заплави річок з низькою швидкістю течії, тобто водойми, в яких вода добре прогрівається, з мулистим і кам'янистим дном [1]. П'явки, обов'язкові гематофаги, тобто харчуються виключно кров'ю. Вони можуть присмоктуватись до риб, жаб, равликів, водоплавної птиці, однак улюблена їх їжа – кров великих теплокровних тварин.

Тіло п'явки розділене на 33 сегмента, що характерно майже для всіх представників класу *Hirudinea*. Передні 4 сегменти утворюють передню присоску, 7 останніх – задню, і 22 сегмента утворюють тіло. Сегменти, в свою чергу, розділені на кілька кілець – від 3 до 5 для різних сегментів. На середньому кільці кожного сегмента розташовані чутливі сосочки (папілли). У звичайних умовах їх не видно, але при скороченні розташованих в глибині сосочків м'язових клітин піднімаються над поверхнею шкіри, утворюючи кілька рядів. Оскільки п'явки здатні розтягуватися і скорочуватися, точно вказати їх довжину складно. У звичайному стані дорослі особини мають середню довжину від 5 до 8 см, хоча в окремих випадках зустрічаються досить великі екземпляри. В середньому маса дорослої статевозрілої голодної п'явки, яка зустрічається в природних умовах, становить від 1,3-1,5 до 2-3 г. [14]. Подовжене тіло медичної п'явки сплюснене в спинно-черевному напрямку і забезпечено передньою і задньою присосками. Передню (головну) присоску добре видно лише при присмоктуванні. У центрі вентральної поверхні передньої присоски розташований ротовий отвір, обмежений трьома губами. Задня присоска більша по діаметру, служить п'явці для пересування і прикріплення. Забарвлення спинки і черевця у тварини значно відрізняється. Спинка пофарбована в коричневі і темно-зелені кольори з чорними плямами краплень, що утворюють у різних форм свій тип малюнка. У межах цих особливостей забарвлення, її відтінок може дещо варіювати. Шкірні покриви утворені шаром досить великих епітеліальних клітин, між якими відкриваються

протоки глибше розташованих слизових і білкових залоз. Зовні тіло п'явки покрите тонкою плівкою (кутикулою), яку вона періодично скидає. Інтенсивність "линьки" дозволяє зробити висновки про стан тварини: чим частіше вона линяє, тим більш інтенсивні у неї обмінні процеси [1]. Шкірні покриви, пронизані мережею лакунарних капілярів, беруть участь в диханні і забезпеченні організму необхідним йому киснем, який п'явки отримують з води або повітря. Тіло п'явки щільне, м'язисте, досить міцне на розрив. Безпосередньо під епітелієм розташований зовнішній шар циркулярних м'язів. Крім участі в русі, послідовне скорочення в процесі харчування циркулярних м'язів забезпечує розподіл заковтуючої крові по численних мішках середньої кишки п'явки [2]. Глибше розташовані волокна шару діагональних (косих м'язів), які утворюють своєрідний перехрест, забезпечують високу рухливість і дозволяють здійснювати хвилеподібні рухи. Ще глибше лежить потужний шар поздовжніх м'язових волокон, які є антагоністами циркулярних м'язів і забезпечують скорочення тіла тварини. Добре розвинені спинно-черевні м'язи, які забезпечують сплющення тіла, і мускулатуру передньої і задньої присосок. Пучки м'язових волокон занурені в надзвичайно щільну сполучну тканину. Вона представлена колагеновими волокнами, клітинними елементами і основною речовиною. Сполучна тканина добре виражена під покривним епітелієм, де утворює цілий шар, далі вона оточує органи, судини, заповнює простір між кишечником і поздовжніми м'язовими волокнами і забезпечує значну механічну міцність тканин тварини.

Нервова система характеризується наявністю електричних та хімічних синапсів. На верхній губі знаходиться 5 пар очей, проте мало відомо як сприймається візуальна інформація. Око складається з очного яблука і 50 фоторецепторних клітин, кришталика не має [15] .

Кровоносна система п'явок заміщена залишком целома, який утворює чотири поздовжні трубки (синуси), з'єднані кільцеподібними комісурами, і безліч розгалужених проміжних лакун. Добре розвинена шкірна мережа капілярів. Гемолімфа, що заповнює судинну систему п'явки, містить гемоглобін

і тому має червоний колір. Рух гемолімфи забезпечується скороченням бічних лакунарних каналів.

Видільна система п'явки представлена 17 парами нефридій, розташованих на черевній стороні VI–XXII сегментів. Утворена в них сеча виділяється в екскреторний канал, збирається в сечових міхурах і через нефропори виводиться з організму тварини [16].

П'явка – гермафродит. Розмножується статевим шляхом, але для спарювання необхідні як мінімум дві особини, бо п'явка не здатна до самоzapлiднення. Статева зрілість у п'явок настає при досягненні тваринами певного біологічного віку. Розмноження тварин відбувається в літній період. Перед спарюванням п'явки обвивають один одного, приймаючи зручне для спарювання положення. Відразу після запліднення п'явки відшукують місце для відкладання коконів. П'явки матки в штучних умовах відкладають до 4-5 коконів. Останні мають овальну форму і зовні покриті губчастою оболонкою. Кокон може містити до 20-30 зародків або взагалі виявитися порожнім. Усередині кокона знаходиться білкова маса, яку на певній стадії свого розвитку поглинають ембріони. Від моменту відкладання запліднених яєць до народження нитчатки проходить майже місяць. Новонароджені п'явки здатні харчуватися кров'ю вже в перші дні свого народження. Подальше зростання визначається лише здатністю тварини добути їжу.

Медична п'явка – гематофаг. Вона харчується виключно кров'ю, причому найбільш пристосована до пошуку теплокровних тварин, які служать основним джерелом живлення. Травна система складається з ротової порожнини, глотки, передньої, середньої, задньої кишки і анального отвору [1]. Ротовий отвір розташований в центрі передньої присоски і обмежений трьома губами. Три щелепи: верхня і дві нижньобокових – розташовані під кутом  $120^\circ$  один до одного. Кожна м'язова пластинка на своєму зовнішньому килевидному краї несе по 70-100 твердих хітинових зубчиків довжиною 12-33 мкм кожен. М'язові волокна вплітаються в її основу і при скороченні забезпечують рух щелепи вперед. Висуваючись, вони притискаються до покривів жертви і, здійснюючи

пиляючі рухи, руйнують їх. Після пошкодження залишається характерна трипроменева ранка. Між зубчиками відкриваються протоки численних слинних залоз, секрет яких виливається в ранку і, перешкоджаючи згортанню крові, забезпечуючи харчування тварини до повного насичення. Самі залози являють собою безліч колбовидних клітин, розташованих в сполучній тканині переднього кінця тіла п'явки (в основному навколо глотки, в VIII і IX сегментах) і складаються із протоплазми і ядра. Кожна залоза забезпечена вивідним каналом (протока), діаметр і довжина якого залежать від розташування і розвитку слинних залоз. Всі вивідні канали (протоки) направлені до щелеп п'явки і вже в VII сегменті тіла утворюють 3 великих пучка, що відповідає числу щелеп [15]. Глотка, як і ротова порожнина, вистелена кутикулою. Крім поздовжніх і циркулярних м'язів, глотка має радіально розбіжні волокна, їх другий кінець прикріплюється до покривів тіла. При скороченні радіальних м'язів відбувається розширення глотки. У момент присмоктання, при скороченні сфінктера, розташованого при переході глотки в шлункову кишку, створюється розрядження, що сприяє міцному прикріпленню п'явки і полегшує пошкодження покривів жертви. Шлунок – передній відділ середньої кишки – являє собою трубку з 11 парними мішками, в яких кров, насмоктана п'явкою зберігається в рідкому стані протягом багатьох місяців. Обсяг шлунка, розтягуючись, може значно збільшуватися. Шлунок переходить в трубчастий задній відділ середньої кишки, або кишечник. Між ними є м'язовий сфінктер. У кишечнику відбувається перетравлення і всмоктування поживних речовин. У початковій частині заднього відділу середньої кишки є пара маленьких залізистих придатків. Середня кишка переходить далі в ампуловидну задню кишку, що є місцем накопичення калу і закінчується анальним отвором, розташованим біля основи задньої присоски. Кал п'явок має вигляд густої, замазкоподібної темно-коричневої маси, яка виходить у вигляді циліндричних утворень з ануса і добре розчиняється у воді, фарбуючи її в темний колір.

## 1.2 Фактори та механізми дії гірудотерапії

Гірудотерапія являє собою лікувальний метод, заснований на використанні живих медичних п'явок (*Hirudo verbana*). Приставка п'явок до певних ділянок шкіри і слизових оболонок призводить до дозованої крововтрати в результаті вилучення тваринами 6-15 мл крові. При цьому через ранку в організм потрапляє комплекс біологічно активних речовин секрету слини п'явки, що містить гірудин, гіалуронідазу, ізопептидазу, бделіни, блокатор калікреїну і ряд інших [17]. Процедура супроводжується деякою крововтратою після відпадання п'явок.

Лікувальний ефект гірудотерапії обумовлений:

- 1) дією біологічно активних сполук, що потрапляють в організм.
- 2) дозованим крововиливом (крововтратою) в процесі і після приставки п'явок;
- 3) виникненням комплексу відповідних реакцій організму на нанесення ранки в проекції певних зон шкіри або слизових.

Аналіз механізмів реалізації лікувальних ефектів, що виникають в результаті приставок п'явок, надзвичайно складний. Це пов'язано з неоднозначністю реакцій, що розвиваються в процесі взаємодії двох живих істот – людини і п'явки. Характер цих взаємодій значною мірою визначається вихідним станом об'єктів.

Накопичені до теперішнього часу спостереження і результати досліджень дозволяють розглядати гірудотерапію як складну взаємодію, що включає в себе комплекс факторів:

1. Пошкодження цілісності шкірних покривів і виникаючі у зв'язку з цим відповідні реакції організму;
2. Обмежена крововтрата, пов'язана з витяганням крові в процесі живлення п'явки і подальшою кровотечею з нанесеної ранки;

3. Дія на організм біологічно активних речовин, що містяться в секреті слинних залоз, що вводиться п'явками у ранку;

4. Психологічний вплив, обумовлений ставленням пацієнта до п'явок і особливостями проведення процедури.

Кожен з факторів особливим чином впливає на організм.

#### 1. Пошкодження цілісності шкірних покривів

Присмоктуючись, п'явка наносить пошкодження шкірі, а щодо організму відбувається агресія. Відповідна реакція розвивається з моменту порушення цілісності шкірних покривів. Вона спрямована на протидію пошкодженню, а потім на ліквідацію його наслідків. Перш за все виникає біль, що спонукає жертву позбутися від п'явки. Біль не сильна і, як правило, швидко проходить. У відповідь на виділення зі зруйнованих клітин шкіри БАР розвивається локальний спазм судин. У зоні ураження активізуються шкірні макрофаги – клітини Лангерганса і мастоцити [18]. Більш того, згідно з новітніми дослідженнями, відбувається активізація епідермальних кератиноцитів, які здобувають деякі властивості макрофагів і поряд з клітинами Лангерганса та тучними клітинами починають виробляти цитокіни – речовини, за допомогою яких здійснюються міжклітинні взаємодії [19]. В осередку ураження активізуються лімфоцити, що там знаходяться, до яких приєднуються лімфоцити і лейкоцити, мігруючи з кровоносного русла. Зубчики щелеп п'явки наносять досить глибоку рану. Вона ще більше поглиблюється за рахунок розплавлення тканинних структур пептидазами і гіалуронідазами ССЗ п'явки. Відбувається руйнування капілярів, що супроводжується попаданням формених елементів і плазми крові в інтерстицій. Виникає і поступово наростає набряк, який поряд з виникаючим вже в перші хвилини спазмом артеріол зменшує приплив крові в капіляри. Починається боротьба організму з крововтратою. Розвивається каскадна реакція активації системи гемостазу [20].

Таким чином, у відповідь на нанесення п'явкою ранки в тканинах розвивається стандартна запальна реакція. Становище ускладнюється майже обов'язковим влученням в ранку мікроорганізмів з поверхні шкіри, з



пошкоджених сальних і потових залоз, а також мікроорганізмів з поверхні передньої присоски п'явки. Однак в звичайному випадку після одноразової приставки п'явки реакція не виходить за рамки фізіологічних проявів і не має будь-яких ознак реакції патологічної. Гіперемія, клінічно виражений набряк, місцеве підвищення температури відсутні. Не розвиваються інфекційні ускладнення. Враховуючи невелику ступінь руйнувань, а також завдяки ряду речовин, що вводяться п'явкою в ранку, здоровий організм успішно справляється з нанесеним пошкодженням без мобілізації додаткових ресурсів. Ранка досить швидко закривається і заживає [21].

Особливість гірудотерапії полягає в тому, що організм піддається ряду повторних дозованих пошкоджень. Це призводить до неспецифічної активації систем адаптації гіпоталамо – гіпофізарно, надниркової та імунної [6].

Ще один аспект пошкодження різних ділянок шкіри – виникнення відповідних рефлекторних реакцій організму. Як правило, значення цього аспекту в дії гірудотерапії не виправдано перебільшується. Дійсно, існує складна і не до кінця ще вивчена система зв'язків, реалізованих за посередництвом нервової, гуморальної, гормональної систем. Однак, щоб не нашкодити і, більш того, отримати лікувальний ефект за рахунок реалізації цих механізмів, необхідна спеціальна система діагностики стану біологічно активних ділянок шкіри і певні принципи вибору місць впливу [22].

## 2. Крововилив п'явки і подальша крововтрата

Один з найважливіших механізмів, що реалізується при проведенні гірудотерапії, – розвантаження венозного русла, а також лімфатичне дренажування тканин і зменшення внутрішньотканинної затримки рідини (тканинних набряків) [20].

У нормальних умовах в одиницю часу кількість крові, що надходить в тканини по артеріях, дорівнює її кількості, що відтікає по венозних і лімфатичних судинах. Це – обов'язкова умова нормального функціонування мікроциркуляторного русла і гістогематичного балансу рідин. Якщо з якихось причин відбувається порушення венозного відтоку, це веде до затримки рідини

у тканинах, стазу, набряку і в кінцевому підсумку значно зменшує приплив крові. Механізм такого зменшення, аж до повної блокади надходження крові в капіляри, легко обґрунтовується при аналізі основних механізмів транскапілярного обміну рідин і дії закону Старлінга [23]. Більш того, періодична блокада капілярів відбувається не тільки при патологічних умовах, але і в якості фізіологічного регулятора підтримання концентрації іонів водню в інтерстиціальній рідині. У функціональному відношенні на мікроциркуляторному рівні існує пріоритет процесів відтоку над процесами припливу. У разі розвитку в тканинах венозного (або лімфатичного) стазу спроби боротися з гіпоксією шляхом посилення припливу крові до проблемних зон (наприклад, шляхом призначення судинорозширювальних препаратів) не тільки не дають клінічного результату, але, збільшуючи застійні явища, ще більше погіршують стан тканин. В цих умовах поряд з ліквідацією причин порушення венозного відтоку необхідно розвантажити венозне русло, що в разі застосування п'явок може здійснюватися двома чином:

- шляхом крововиливу, тобто локальної крововтрати.
- шляхом крововідволікання, тобто перерозподілу об'єму циркулюючої крові.

П'явки як засіб місцевого крововиливу відомі здавна. З цією метою вони традиційно використовувалися в досить великих кількостях – 10-20 і більше на процедуру. П'явка масою 1,5–2 г зазвичай всмоктує не більше 10 мл крові, подальша кровотеча призводить до втрати ще 15-40 мл, що сумарно призводить до крововтрати 25-50 мл крові. Забезпечуючи локальний крововилив, п'явки сприяють розвантаженню венозного кровоносного русла на рівні венул, призводять до відновлення мікроциркуляції і знімають гіпоксію тканин [20].

Локальна крововтрата, що розвивається в результаті вилучення крові п'явкою, так і подальшою кровотечею, призводить до деякої анемізації тканин. В якості компенсаторної реакції виникає приплив крові в зону приставки. Не можна виключити також ефект деяких компонентів секрету слини п'явки, що володіють місцевою судинорозширювальною дією. У тих випадках, коли ця

зона має велику пасивну венозну ємність (крижово-куприкова і в меншій мірі – печінкова), відбувається депонування крові у венулах. Саме воно і обумовлює перерозподіл ОЦК. При наявності в організмі зон із застійним кровообігом перерозподіл ОЦК призводить до зменшення в них застійних явищ. Так, при наявності головного болю венозного генезу постановка 4-8 п'явок в область крижів призводить до зменшення внутрішньочерепної гіпертензії та болювого синдрому.

В дії медичних п'явок на організм людини є ще один цікавий аспект. Викликана ними крововтрата призводить до активація гемопоезу. Механізм активації кровотворення у відповідь на кровотечу добре відомий. Повною мірою він реалізується і при гірудотерапії: часто після проведення курсу гірудотерапії у хворих, що мали ознаки помірної анемії (рівень гемоглобіну не нижче 100 г/л), після лікування п'явками кількість еритроцитів і величина гемоглобіну відновлюються до нормального рівня [24].

### 1.3 Біологічно активні речовини медичної п'явки, механізми їх дії

#### 1.3.1 Загальна характеристика та класифікація біологічно активних речовин медичної п'явки

ССЗ МП містить понад 100 сполук білкової, ліпідної та вуглеводної природи: 80 компонентів фракцій із молекулярною масою понад 500 Да, 20 компонентів низькомолекулярної фракції (менше 500 Да) [17], які володіють широким спектром біологічної активності [1, 7, 25-32].

О. Ю. Каменев виділяє 4 групи БАР МП у відповідності до вирішення різних завдань та динаміки їх виділення при укусі: першими секретуються літичні сполуки (руйнування тканин і мікросудин жертви), антигемостатики (блокада механізмів гемостазу), блокатори захисних реакцій організму

(проти дія захисним реакціям, що розвиваються в тканинах у відповідь на пошкодження) та допоміжні речовини [1, 8].

1. Літичні сполуки забезпечують проникнення речовин слини, руйнування тканин жертви, розширення рани, розплавлення мікросудин, впливають на проникність міжклітинного матриксу дерми. При фракційному зборі слини, в процесі харчування МП, речовини даної групи виявляють лише в перших і середніх порціях секрету, останні порції їх не містять. Дана група включає: пептидазу (дестабілазу), гіалуронідазу, колагеназу [1].

Пептидаза (дестабілаза) – це фермент, що руйнує певний тип зв'язків у молекулі білка –  $\epsilon$ -( $\gamma$ -глутаміл)-лізинові-ізопептидні зв'язки, які утворюють поперечні зшивки («крос-лінкінги») [33-34], вони широко представлені в плазмових, мембранних і структурних білках. Даний тип зв'язків утворюється при стабілізації фібрину, а їх руйнування забезпечує фібринолітичну активність секрету. Пептидаза здатна впливати на функціональну активність різних клітин: ендотеліоцитів, лімфоцитів, тромбоцитів, макрофагів та ін. Поліфункціональний білок дестабілаза-лізоцим володіє не лише активністю дестабілази, а й лізоцимною та антимікробною активністю, він є антибіотиком, який пригнічує розвиток багатьох бактерій, грибів та архей. Спектр його антимікробної дії зростає при втраті мурамідазної активності [1].

Гіалуронідаза – фермент, що каталізує реакції гідролітичного розщеплення і деполімеризації гіалуронової кислоти і споріднених із нею сполук – кислих мукополісахаридів [8, 1, 31]. Враховуючи, що глікозоаміноглікани гіалуронової кислоти входять до складу базальної мембрани, міжклітинного матриксу, а також базальних мембран капілярів, вона відіграє велику роль не лише як фактор проникнення, а й у виникненні наступних фізіологічних реакцій [1, 36]. У складі слини МП виявлені 2 гіалуронідази, які відрізняються за здатністю впливати на хондроїтинсульфат [1].

Колагеназа викликає гідроліз волокон колагену I типу і подібна до колагенази людини. Можливо, бере участь у інгібіції колаген-індукованої

агрегації тромбоцитів [1]. Гіалуронідаза та колагеназа – ферменти, які збільшують проникнення до організму різних речовин, також виконують бактерицидну та бактеріостатичну дію [8].

2. Антигемостатики – перешкоджають розвитку механізмів згортання крові, забезпечують вільний відтік крові з пошкоджених судин протягом всього періоду харчування МП. Антигемостатики починають виділятися із моменту руйнування мікросудин і появи крові в ранці, тому виявляються в середній фракції слини. Потрапляючи з кров'ю в кишечник МП підтримують її в рідкому стані. У складі ССЗ МП виявлені речовини, що блокують всі основні механізми активації системи згортання крові (первинний і вторинний). До них відносять: калін, апіраза, антагоніст PAF, інгібітор Ха фактора, гірудин.

Калін – інгібітор адгезії та агрегації тромбоцитів, активації фактора Вілебранда, молекулярна маса – 65 кДа.

Апіраза – інгібітор агрегації тромбоцитів ініційований АДФ [1, 36], викликає гідроліз аденозинових нуклеотидів (АТФ і АДФ), причому майже з однаковою початковою швидкістю [1]. Апіраза визначає протисклеротичний вплив ССЗ МП, підвищує активність ліпопротеїдліпази, і як наслідок – знижує рівень загального холестерину і  $\beta$ -ліпопротеїдів низької щільності [8].

Антагоніст PAF (фактору активації тромбоцитів) – перешкоджає адгезії та активації тромбоцитів, міграції тромбоцитів і нейтрофілів до вогнища ураження [1, 36], а також скороченню гладенько-м'язових клітин.

PAF – фосфогліцерид, що виділяється в процесі імунологічних реакцій нейтрофілами, базофілами та макрофагами, а також у процесі специфічної активації тромбоцитів. PAF є потужним медіатором запалення і, виділяючись у ділянці нанесення ранки, ініціює гемостаз та запальну реакцію.

Інгібітор Ха фактора (FXaI – factor Ха inhibitor) – у каскаді білків плазменного гемостазу фактор Ха є ферментом, що каталізує перетворення протромбіну в тромбін у присутності іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , фактора згортання крові V на поверхні мембран активованих тромбоцитів чи фрагментів зруйнованих ендотеліальних і/або гладенько-м'язових клітин (інколи фактор Ха називають

протромбіназою). Синтезований рекомбінантний FXaI, який здійснює захисний вплив проти венозного тромбоутворення [1]. Відіграє важливу роль при лікуванні остеоартриту і ревматоїдного артрити [37].

Гірудин – унікальний високоспецифічний інгібітор ферменту тромбіну, він блокує всі відомі реакції, активатором яких виступає тромбін [8, 25, 31, 36, 37]: активацію фібриногену і перетворення його в нерозчинний фібриновий згусток; регуляцію V, VIII, XIII факторів згортання; регуляцію компонентів системи комплементу; зміни функціонального стану клітин крові (моноцитів, нейтрофілів), у тому числі і агрегацію тромбоцитів; зміни стану ендотеліальних та гладенько-м'язових клітин кровоносних судин. Методами генної інженерії отриманий рекомбінантний гірудин і фармацевтичний препарат на його основі [8, 36].

3. Блокатори захисних реакцій організму – це ряд речовин поліпептидної природи, що слугують інгібіторами ферментів, продукуються різними клітинами організму в ході реакції-відповіді на пошкодження шкіри [1]. В літературі роль цих речовин пов'язують з інгібуванням процесів перетравлення білків у кишечнику МП. Припускають, що речовини даної групи виконують захисну функцію, перешкоджаючи пошкодженню внутрішніх структур п'явки ферментами, що виділяються у вогнищі пошкодження і потрапляють у кишечник зі з'їденою кров'ю. Вважають, що в процесі вилучення крові вони блокують прояви захисної запальної реакції організму (розвиток спазму, набряку, болю та ін.) із метою забезпечення харчування тварини. Речовини даної групи виявлені в середніх та особливо останніх фракціях слини, де вони присутні в максимальних концентраціях. Деякі з них (наприклад, гірустазин) мають значення і для блокування системи гемостазу.

1. Бделіни – група поліпептидів із невеликою молекулярною масою, серед яких виділяють бделіни А з молекулярною масою 7 кДа і бделіни В із молекулярною масою 5 кДа. Методом рівновагової хроматографії виділені численні форми бделінів А і В; які позначені від А1 до А6 і від В1 до В6. Вони є сильними інгібіторами трипсину, плазміну [8, 1, 31], акрозину сперми [1, 36].

Вони не блокують активність хімотрипсину, тканинного та плазменного калікреїнів, субтилізину. Отримана рекомбінантна форма бделастазину.

2. Гірустазин – належить до тієї ж родини антистазинових інгібіторів серинових протеаз [25, 36], молекулярна маса становить 5,9 кДа, він інгібує тканинний калікреїн, трипсин, хімотрипсин, катепсин G нейтрофілів. Здатність блокувати тканинний калікреїн важлива, бо останній каталізує вивільнення високоактивних кінінів, які через специфічні рецептори на клітинахмішенях модулюють широкий спектр біологічних активностей, зокрема беруть участь у підтримці нормального кров'яного тиску. Отримана рекомбінантна форма.

3. LDTI (leech derived tryptase inhibitor) – інгібітор триптази, отриманий із екстракту МП. Триптаза є основним компонентом секреторних цитоплазматичних гранул мастоцитів і приводить до руйнування білків екстраклітинного матриксу. Відома роль триптази при алергічних та запальних реакціях.

4. LCI (leech carboxypeptidase inhibitor) – інгібітор карбоксипептидази А, існує 2 ізоформи з молекулярною масою 7,3 та 7,2 кДа. Стійкий у широкому діапазоні рН та температур. LCI знаходиться в складі ССЗ МП, припускають, що він здатен блокувати гідроліз кінінів металопротеїназами у місці укусу шкіри МП, посилюючи індуковане кінінами збільшення кровотоку.

5. Егліни – низькомолекулярні білки з екстрактів МП із молекулярними масами 8,073 та 8,099 кДа («b» і «c» форми відповідно). Інгібують активність αхімотрипсину, хімази мастоцитів, субтилізину та нейтральних протеїназ нейтрофілів: еластази і катепсину G [8, 36, 37]. Мають високу стійкість до денатурації та прогрівання. Інгібіторний спектр егліну «c» дозволяє вважати його одним із найважливіших протизапальних агентів. Але є підстави вважати, що егліни, які виділені з МП, не присутні в ССЗ, а продукуються шлунковою залозою.

Біологічна цінність еглінів залежить від їх здатності блокувати активність лейкоцитарних протеаз, що вивільняються при запальних реакціях [8].

4. Допоміжні речовини – сприяють стабілізації, захисту, транспортуванню, посиленню дії інших компонентів ССЗ МП [1].

Наявність у ССЗ великої кількості ліпідів дозволяє зробити припущення про можливість формування ліпідно-ферментних комплексів, в яких молекули білка чи їх активні ділянки можуть «екрануватися» ліпідами [8, 1]. В результаті клітини-макрофаги організму не розпізнають чужих білків і не реагують на них. Введені речовини тривало зберігаються в тканинах і, не дивлячись на надзвичайно малу кількість, виявляють значний і тривалий біологічний ефект. Певно, з маскуванням чужорідних білків ліпідами пов'язана майже повна відсутність алергічних реакцій на ССЗ МП. Про можливість утворення складних комплексів у слині п'явки вперше повідомив Г. І. Ніконов. Він припустив, що в ССЗ МП наявні ліпосоми. Ця проблема потребує подальших досліджень [1]. Ліпосома п'явок – перший приклад такої структури природного походження. Її компоненти – дестабілаза, стабільний аналог простагландину, інгібітор калікреїну плазми крові та гірудин. Ліпосома може змінювати свою просторову орієнтацію, що залежить від полярності розчинника, – це забезпечує її безперешкодне проникнення через мембрану клітини [8]. А. Ю. Барановський та О. Ю. Каменев не виявили в нативній слині ліпосоми. Але ліпіди слини мають велику молекулярну масу і являють собою незвично довгі для ліпідів ланцюги, що утворюють спіраль із активними групами на кінцях, що підтверджує можливість формування складних просторових утворень [1]. Окрім вищевказаних БАР, МП продукують велику кількість інших сполук: колагеназа, кініназа, кініногеназа, ліпази, простагландини [8], ацетилхолін, гістаміноподібні судинорозширювальні сполуки, які подовжують час кровотечі, ферменти, які знижують утворення рубцевої тканини і спайок (фібіриназа, колагеназа) [36] антибіотики (хлороміцетин), анальгетикоподібні речовини [37, 38]. Оригінальні дослідження І. П. Баскової та ін. доводять наявність у ССЗ МП стероїдних гормонів (прогестерон, тестостерон, естрадіол, дегідроепіандростерон, кортизол) та важливих нейромедіаторів (гістамін, серотонін). Так, серотонін – регулятор харчової поведінки МП, а гістамін



викликає вазодилатацію судин мікроциркуляції. Можливо, він із серотоніном викликає місцеву алергічну реакцію поблизу ранки, після укусу МП [37]. Однак, очевидно, що спектр БАР ССЗ МП все ще залишається недостатньо вивченим.

### 1.3.2 Механізми дії біологічно активних речовин медичної п'явки

У літературі з гірудотерапії прийнято пояснювати більшість ефектів, що спостерігаються при цьому методі лікування, прямою дією тих чи інших компонентів секрету слинних залоз п'явки. Сама тварина є своєрідним біологічним шприцом, що містить корисний для людини препарат, що володіє судинорозширювальною, імунотропною, протизапальною, репаративною психотерапевтичною, знеболюючою дією [3, 39-42].

1. Протизапальна дія гірудотерапії. Запалення – це універсальна реакція, що виникає в результаті дії на організм не тільки бактерій, вірусів і грибів, але і безлічі інших чинників: механічних (різного роду травми, забиті місця, поранення), фізичних (опіки, відмороження, пошкодження струмом), хімічних (ураження кислотами, лугами, токсинами). Ендогенні причинні фактори за своєю різноманітністю не поступаються екзогенним. Це інфаркти та крововилив в тканинах, імунні комплекси, різні метаболіти і катаболіти (наприклад, відкладення порфіринів, жовчних кислот тощо), токсичні продукти тканинного розпаду, біологічно активні речовини (ацетилхолін, гістамін, кініни, простагландини), порушення трофічної функції нервової системи. Запалення лежить в основі будь-якого патологічного процесу.

Накопичені до теперішнього часу клінічні спостереження і результати ряду досліджень вказують на наявність у п'явок значної протизапальної дії. Причому чим ближче вогнище запалення до поверхні шкіри, тим простіше отримати клінічний ефект від застосування п'явок. У таких випадках, як

панариції, фурункули, мастити та інші запальні захворювання шкіри [43, 44] і підшкірної клітковини, запалення поверхневих вен (флебіти), зовнішніх гемороїдальних вузлів, гірудотерапія дозволяє в 1,5–2 рази скоротити тривалість лікування. Клінічно значущий ефект настає вже після першої процедури. Досить ефективно застосування п'явок і при лікуванні запальних захворювань м'язів, суглобів, навколосуглобових сумок і тканин (міозити, артрити, бурсити, періартрити) [45, 46].

На першому етапі запального процесу застосування п'явок забезпечує ряд найважливіших ефектів:

- зменшення набрякості інтерстиціальних просторів;
- відновлення мікроциркуляції крові і ліквідація гіпоксії;
- активація місцевих імунних процесів.

Досягається це за рахунок:

а) розвантаження венозного русла в результаті вилучення крові п'явкою і подальшої кровотечі з ранки;

б) зменшення агрегації формених елементів крові, поліпшення їх реологічних властивостей і ліквідації мікротромбів, що обумовлено дією всього комплексу протитромботичних і тромболітичних факторів ССЗ п'явки;

в) місцевої дії інгібіторів протеолітичних ферментів, виявлених у медичної п'явки [17]. Протеолітичні ферменти потрапляють в міжклітинний простір зі зруйнованих і гинуть в осередку запалення клітин, активованих макрофагів і мігруючих сюди мікрофагів, з агрегованих тромбоцитів. Саме ці ферменти в значній мірі і призводять до дезінтеграції проміжної тканини і виникнення набряку міжклітинних просторів, а отже, до підвищення інтерстиціального тиску і блокаді капілярів;

г) дії гіалуронідаз ССЗ п'явки. Здавалося б, гіалуронідаза, підвищуючи проникність базальних мембран капілярів, сприяє формуванню набряку інтерстиція. Але це лише в незмінених тканинах. Якщо ж набряк вже розвинувся, дія гіалуронідаз медичної п'явки насамперед реалізується на рівні основної речовини. Відбувається відщеплення гідроксилу глікозаміногліканів,

що призводить до відновлення агрегатного стану основної речовини і поліпшення процесів інтерстиціального транспорту, а також сприяє відновленню інтерстиціального тиску.

Таким чином, висока ефективність гірудотерапії запального процесу пояснюється тим, що лікування п'явками призводить до відновлення капілярного кровообігу і лімфатичного дренажу, поліпшенню інтерстиціального транспорту при одночасному поліпшенні реології крові та активізації місцевих імунних процесів у вогнищі запалення.

Унікальність способу введення п'явкою БАР в осередок запалення – біологічно активні речовини вводяться тваринам безпосередньо в інтерстицій і капіляри зони ураження [47].

Завершеність запального процесу після застосування медичних п'явок становить унікальність цього лікувального методу.

П'явки ефективні не тільки в гострий період запального процесу. По його завершенні в осередку запалення відбувається лізис і елімінація зруйнованих тканин. Комплекс вищеназваних факторів забезпечує розсмоктуючу дію, яка особливо ефективна при ліквідації крововиливів і гематом. Надалі, при розвитку процесів рубцювання за рахунок протеолітичних ферментів, що містяться в слині п'явки [48], використання їх дозволяє зменшити надмірне утворення колагену, а при застосуванні їх на етапі сформованого рубця або наявності спайок призводить до значного зменшення останніх.

Також механізм протизапальної дії був вивчений Фроловим О. К. та Литвиненко Р. О. Одним з механізмів – індукція апоптозу імунокомпетентних клітин у місці введення БАР МП. Ранка і регіональний орган до якого приставляється п'явка індукують апоптоз, зайва запальна реакція нормалізується до фізіологічної. На рівні організму БАР МП активізують супресорну ланку лімфоцитів, які в сумі пригнічують зайву алергію і запальну реакцію як в шлунковій крові людини так і в культурі лімфоцитів [49].

2. Противотромбічна і тромболітична дія гірудотерапії. При пошкодженні судин відбувається оголення волокон колагену, що активує тромбоцитарно-судинний механізм (зовнішній і внутрішній): починається прилипання (адгезія) тромбоцитів до колагену. Дуже швидко, протягом декількох секунд, вони скупчуються у місці пошкодження, утворюючи пробку. Після агрегації на місці пошкодження тромбоцити служать ядрами, навколо яких формуються нитки фібрину; далі тромбоцити легко лізуються, вивільняючи фактор XIII, фосфогліцерини і вазоактивні медіатори.

Секрет слини містить такий комплекс факторів, який забезпечує блокування всіх основних реакцій гомеостазу [1]. Блокада тромбоцитарно-судинного механізму гемостазу здійснюється за рахунок наявності в ССЗ каліна – інгібітора адгезії і агрегації тромбоцитів, апірази – інгібітора агрегації тромбоцитів, а згодом і інгібітору фактора активації тромбоцитів – інгібітора PAF [17]. Для запуску каскаду реакцій внутрішнього механізму згортання XII фактор (фактор Хагемана) повинен увійти в контакт з поверхнею, що і призводить до активації даного механізму. Якщо внутрішній механізм здійснюється досить повільно, то швидке згортання відбувається за участю зовнішнього механізму. Ініціюється ж його запуск активацією тканинного фактора (так званого тромбопластину). Плазмовий тромбопластин в надлишку з'являється в лімфі і крові при м'язовій діяльності, глибокої гіпоксії та інших впливах, при яких зростає небезпека крововтрати. Тканинний тромбопластин знайдений в деяких клітинах, кровоносних судинах, плазматичних мембранах ендотеліальних клітин. Тромбопластини активуються цілою низкою факторів, але обов'язковою умовою є їх зіткнення зі зруйнованими частинами кровоносних судин. Як зовнішній, так і внутрішній механізми призводять до активації X фактора згортання (фактора Стюарта), активна форма якого призводить до активації протромбіну плазми крові і тому іноді називається протромбіназой [48]. Утворений в результаті тромбін володіє досить широким спектром дії, але перш за все він відомий своєю здатністю активувати полімеризацію молекул фібриногену плазми крові, що веде до утворення

м'якого згустку. В результаті спільної з тромбіном дії фібринстабілізуючого фактора (фактор XIII), що виділяється активованими тромбоцитами, відбувається утворення  $\epsilon$ - ( $\gamma$ - глутаміл – лізинових зшивок між нитками фібрину). Утворюється щільний нерозчинний твердий згусток.

Секрет слини п'явки містить як інгібітор Ха фактора (протромбінази), так і гірудин-високоспецифічний інгібітор тромбіну. Більш того, дестабілаза, руйнуючи  $\epsilon$  ( $\gamma$  глутаміл) - лізинові зшивання між нитками фібрину, забезпечує розчинення тромбу, який вже утворився. Дослідження стереохімічних особливостей дії дестабілази дозволяє стверджувати, що відбувається не руйнування тромбу з утворенням великих фрагментів, що загрожують тромбоемболічними ускладненнями, а саме розчиненням його шляхом поступового відщеплення окремих молекул з поверхні тромбу [35]. Таким чином, комплексна дія речовин секрету слини п'явки забезпечує блокаду основних механізмів гемостазу, лізис тромбу і сприяє тривалій кровотечі з ранки.

У зв'язку з цим, гірудотерапію традиційно розглядають як метод корекції стану системи згортання організму. Численні дослідження, присвячені вивченню впливу гірудотерапії на різні показники згортання крові, в цілому підтверджують зменшення гіперкоагуляції після проведення лікування п'явками, що традиційно пояснюється введенням в організм продуктів слинних залоз п'явок. Особливість п'явок як лікувального засобу полягає перш за все в тому, що вони дозволяють впливати на механізми формування порушень в системі згортання крові, а також ефективно впливають на її реологію [24, 41, 47].

3. Репаративна дія гірудотерапії. Найвища ефективність гірудотерапії в якості засобу активації репаративних процесів багато в чому заснована на механізмах поліпшення мікроциркуляції, реології крові, а також активації імунних процесів. Однак найважливіші механізми репаративної дії гірудотерапії стали зрозумілі в процесі досліджень зі створення омолоджуючої косметики Гірулайн [50-53]. Ці механізми пов'язані з дією компонентів ССЗ на

фібробласти – клітини, які відіграють найважливішу роль у розвитку ранового процесу, а також визначають стан міжклітинного матриксу. Дослідження процесів синтезу колагену, еластину і гіалурона фібробластами шкіри проводилися на експериментальних тваринах, яким щодня наносили невелику кількість крему, що містить екстракт медичних п'явок. До кінця місяця синтез фібробластами колагену зріс на 31 %, еластину – на 31 %, а гіалурона – на 51 % порівняно з показниками контрольної групи тварин.

4. Анастезуюча дія. Знеболюючий ефект гірудотерапії, ймовірно, в якійсь мірі пов'язаний з деконгестивною дією, внаслідок якого зменшується, наприклад, натяг фіброзної капсули нирки або передміхурової залози, або, знижується внутрішньочерепний тиск, а разом з цим зникають больові відчуття. Крім того, ССЗ п'явки впливає на рівень ендорфінів, що беруть участь у формуванні порога больових відчуттів у рецепторному апараті. Існує також думка, що кінінази, що містяться в п'явочному секреті, знижують активність брадикініну, стимулюючого біль [54].

5. Психотерапевтична дія. П'явки мають найсильнішу дію на психіку. Вона може стати як позитивною, так і негативною (психотравмуючою) і заснована на несвідомому (нерідко і усвідомленому) страху перед цими давніми хробаками, що харчуються кров'ю своїх жертв. Вміло використовуючи інформацію про реальні або міфічні аспектах дії п'явок, всіляко підкреслюючи їх еволюційну старовину, наявність потужної благодійної сили, здатності впливати на глибинні засади людського організму, досвідчений лікар може домогтися значних психотерапевтичних результатів.

Однак було б абсолютно неправильно спиратися тільки на психотерапевтичну дію гірудотерапії і бачити в цьому методі виключно психотерапевтичний засіб.

Імуностимулююча дія. Активація захисних функцій організму забезпечується впливом на рівні системи комплементу. Відмічено також і підвищення фагоцитарної активності крові після сеансу гірудотерапії, що забезпечує протизапальну дію п'явок поряд з інгібіторним (стосовно до

еластази, катепсину G та іншим нейтральним протеазам гранулоцитів) потенціалом [21, 54].

#### 1.4 Використання медичних п'явок при певних захворюваннях

##### 1.4.1 Вплив гірудотерапії на серцево-судинну патологію

Лікувальна дія медичної п'явки на організм людини здійснюється завдяки трьом основним випадкам:

- деконгестії – механічному локальному розвантаженню кровотока;
- рефлексогенній дії на біологічно активні точки акупунктури;
- дії біологічно активних речовин, що вприскуються у кров під час всмоктування п'явкою крові [55].

Результатом комплексної дії гірудотерапії є активація місцевого кровообігу (мікроциркуляції), покращення постачання тканин киснем та поживними речовинами, запобігання тромбоутворенню та розчинення вже існуючих тромбів у кровоносних судинах, підвищення імунітету, протизапальна дія, адаптогенний та анистресорний ефекти, знеболюючий та антибактеріальний ефект, поліпшення внутрішньоклітинного обміну, нейротрофічний ефект. Реалізація цих механізмів має як локальний, так і загальнорезорбтивний характер. Позитивні результати гірудотерапії при лікуванні захворювань серцево-судинної системи були отримані ще в минулому столітті. Так, співробітниками Єреванського медичного інституту (в 80-х роках минулого століття) було вивчено можливість застосування гірудотерапії при ішемічній хворобі серця. Під наглядом перебували 72 хворих (49 чоловіків і 23 жінки), з яких у 15 було діагностовано гострий інфаркт міокарда, а рубцеві зміни в серцевому м'язі після перенесеного інфаркту міокарда – у 17 хворих. Гірудотерапія на області серця (в кількості 4–8 штук на сеанс) проводилась у 57 хворих і у 15 хворих – на області печінки. В 31 випадку гірудотерапія була

використана одноразово, 41 хворий отримав повний курс. У результаті лікування у 33 хворих зменшилася або зникла біль в області серця, у 22 хворих – задишка. Було відмічено зменшення болю і відчуття важкості в області печінки, збільшені розміри якої скоротилися і наблизилися до нормальних. Зменшилася частота появи головного болю, запаморочення. Майже у всіх хворих покращився апетит. Також спостерігалось зменшення або зникнення набряків, поліпшення показників електрокардіографії. За результатами біохімічних аналізів у хворих відмічалось зниження вмісту холестерину і шкідливих ліпопротеїнів. Результати спеціальних досліджень свідчили про позитивний вплив гірудотерапії на коронарний кровообіг, скорочувальну здатність міокарда. Також бцла відмічена нормалізація артеріального тиску у хворих, у яких він початково був підвищений. В 50-х роках минулого століття професор Рязанського медичного інституту, видатний російський гірудолог Щоголев Г. Г. надав позитивні результати гірудотерапії при інфаркті міокарда, зокрема у випадках, що супроводжуються різким болем в області серця і за грудиною. Застосування п'явок призводило до купування болю і поліпшення загального стану хворих. У ці ж роки видатними радянськими терапевтами були показані позитивні результати при гірудотерапії застійних змін у печінці, пов'язаних з декомпенсацією серцевої діяльності. У теперішній час переконливо доведено, що напади стенокардії, які в гіршому випадку можуть призвести до розвитку інфаркту міокарда, добре лікуються п'явками. Досить часто лікування п'явками є профілактичним заходом для запобігання розвитку інфаркту міокарда. У сучасній науковій літературі докладно описані методики застосування гірудотерапії та гірудорефлексотерапії при гіпертонічній хворобі, лікуванні кардіалгії, стенокардії, інфаркту міокарда, що може бути корисним у комплексній терапії та медичній реабілітації хворих з найпоширенішою патологією серцево-судинної системи, особливо у зв'язку з відомим біоенергоінформаційним впливом цих методів лікування на організм хворих [56]. Є також свідчення про позитивні зміни імунітету у хворих на гіпертонічну хворобу під впливом біологічно активних речовин медичної



п'явки. Так, показано, що зниження рівня лейкоцитів і основних популяцій лімфоцитів (CD2 і CD3) у крові хворих до показників фізіологічної норми після гірудотерапії відбувалося за рахунок купування порушень структурного гомеостазу і тимчасового депонування активованих лімфоцитів в місцях, де ставилися медичні п'явки. В ізольованих у флаконі зразках венозної крові, взятої до застосування гірудотерапії, під впливом БАР слини медичної п'явки відбувалося різке зниження кількості лейкоцитів (на 33%) і лімфоцитів на (44,7%). Після проведення гірудотерапії ці показники значно знизились (на 21,3% і 7,8% відповідно). Зміни співвідношення регуляторних і ефекторних субпопуляцій лімфоцитів в ізольованих зразках венозної крові під впливом БАР слини медичної п'явки були подібними до змін в периферичній крові хворих після гірудотерапії: утримання надміру ініціюючих імуногенез субпопуляцій (CD4+ і CD25+) і помірна стимуляція кілерно-супресорних (CD8+ і CD16+) субпопуляцій [39]. Показано, що гірудотерапія у хворих з транзиторними ішемічними церебральними атаками сприяє нормалізації у тканинах рівня холестерину ліпопротеїдів високої щільності, який є основною складовою клітинних і судинних мембран та сприяє нормалізації церебрального кровообігу [57]. Вивчено позитивний вплив гірудотерапії на показники цитокінового профілю крові у хворих на рецидивуючу бешиху на тлі варикозної хвороби вен гомілки. Гірудотерапія здійснювалась повторними сеансами (від 2 до 4) на ділянках ураженої шкіри гомілок, безпосередньо над варикозними вузлами з інтервалами 5–7 діб між окремими сеансами. На один сеанс використовували від 5 до 15 медичних п'явок. Встановлено, що включення гірудотерапії до комплексу лікувальних заходів у хворих із рецидивуючою бешихою на тлі варикозної хвороби вен гомілок обумовлює в більшості випадків відновлення вмісту певних цитокінів у крові, тобто зниження рівня прозапальних ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-2 та ФНП- $\alpha$  та нормалізації рівня протизапального ІЛ-4, відповідно до цього нормалізації співвідношення між прозапальними та протизапальними цитокінами. У хворих групи зіставлення, які отримували лише загальноприйнятту терапію, також мала місце позитивна

динаміка з боку цитокінового профілю крові, але менш виражена, і тому в цій групі зберігалося помірне підвищення концентрації у крові IL-1 $\beta$  (в 1,65 разу вище норми; P0,05). Індекси, які відображають співвідношення прозапальних і протизапальних цитокінів у хворих, що отримували загальноприйнятту терапію, також зберігалися підвищеними – коефіцієнт IL-2/IL-4 в 1,27 разу, IL-1 $\beta$ /IL-4 – в 1,53 разу, ФНП- $\alpha$ /IL-4 – в 1,23 разу вище норми (P<0,01), що свідчить про збереження суттєвого домінування прозапальної активності у сироватці крові щодо протизапальних властивостей (IL-4), а в патогенетичному плані – про незавершеність загострення місцевого хронічного запального процесу (у варикозних вузлах вен), а отже проможливість попередження чергових рецидивів бешихи у хворих на варикозну хворобу вен гомілки. Зважаючи на отримані дані, можна говорити про патогенетично обґрунтоване та клінічно перспективне включення гірудотерапії до лікувального комплексу у хворих із рецидивуючою бешихою на тлі варикозної хвороби вен гомілки [58]. Досліджено значення гірудотерапії у профілактиці тромботичних ускладнень при атеросклерозі і гіпертонічній хворобі у хворих із хронічною церебральною ішемією. Результати проведених клінічних досліджень підтверджують існуючі уявлення про антитромботичну дію гірудотерапії і її патогенетичну спрямованість у хворих із хронічним ішемічним порушенням мозкового кровообігу, обумовлені атеросклерозом і гіпертонічною хворобою. У цій категорії обстежених гірудотерапія впливає на згортання крові і фібриноліз шляхом інгібування тромбоцитарного і коагуляційного гемостаза, тобто чинить антиагрегантну і антикоагулянтну дію. Висока клінічна ефективність, можливості самостійного і комплексного застосування дозволяють рекомендувати гірудотерапію для широкого використання у профілактиці тромботичних ускладнень при атеросклерозі і гіпертонічній хвороб [59].

#### 1.4.2 Вплив гірудотерапії на хворобу вен нижніх кінцівок (тромбофлебіт)

Гірудотерапія при тромбофлебіті нижніх кінцівок показала вражаючі результати. Застосування п'явки при тромбофлебіті не тільки сприяє розрідженню крові, але і поліпшенню прохідності судин, зміцнює судинну стінку [60]. Лікування п'явками тромбофлебіту нижніх кінцівок використовується людиною з найдавніших часів. Ферменти, що потрапляють в кров хворого людини в момент прокуса п'явкою шкірного покриву нижньої кінцівки, починають позитивно впливати на судинну стінку. Основним компонентом, що міститься в слині п'явки є гурдин, що перешкоджає формуванню тромбів та розвиток цього важкого ускладнення в організмі людини . Також дестабілаза впливає на сформований тромбоз, розчиняючи його. Наявність комплексів біологічно активних компонентів підвищує прохідність венозних судин і зміцнює їх стінки, сприяє відновленню зруйнованих ділянок. Біоактивні компоненти слизу сприяють насиченню крові киснем. Спостерігається зниження інтенсивності протікання запальних процесів, відбувається зменшення ступеня набрякості і виявляється місцева знеболювальна дія [61].

Велика кількість робіт по лікуванню методами деллотерапії тромбофлебіту було написано професором Зайцевим Г. П. , який розглядав як загальні, так і місцеві зміни в організмі своїх пацієнтів, яким ставили п'явки. Позитивний ефект від застосування п'явок в лікуванні тромбофлебіту доведений лікарем Орловим В. В. в ході спостереження за пацієнтами: після сеансів гірудотерапії у хворих зникали больові відчуття в області вен, зменшувалися набряки.

Зайцев Г. П. та інші гірудотерапевти відзначають активний тромболіз (руйнування тромбів), викликаний використанням п'явок [62]. По-перше, був відзначений видимий тромболіз, при якому не спостерігалися згустки в поверхневих венах. По-друге, помічений клінічний тромболіз (руйнування

кров'яних згустків при глибокому тромбофлебіті), про який свідчить відновлення нормального кровообігу у венах.

Постановка п'явок при тромбофлебіті проводиться в гострому, підгострому і хронічному періодах. Цікаво зауважити, що в гострих стадіях деллотерапія найбільш корисна, тоді як в інших випадках ефект від процедур спостерігається не відразу. Сеанси гірудотерапії в цьому випадку мають одну особливість: постановка п'явок здійснюється безпосередньо над ураженою судиною [63].

Найкраще ставити п'явок по обидві сторони від ураженої (тромбованої) вени, в 1-2 см від неї, так, щоб розташування п'явок набуло шаховий порядок. Відстань між кожними двома п'явками має становити близько 5-6 см. Оптимальним є розміщення п'явок на передній стороні гомілки, в нижній частині передньої сторони стегна (в межах 10- 15 см вище коліна), на задній стороні стегна (від сідниці і не доводячи до підколінної западини) і на литковому м'язі.

Безпосередньо під коліном п'явки не ставляться, оскільки там не тільки зосереджені важливі вени, але і знаходяться лімфатичні вузли [64].

В середньому за сеанс використовується від 6 до 15 п'явок.

Категорично протипоказано застосування п'явок і антикоагулянтів при розвиненому гнійному процесі. Професор Зайцев Г. П., вивчаючи випадки післяопераційних тромбозів і емболій, відзначає, що слина п'явок служить чинником, що розріджує тромб, але не розчиняє його повністю. Розм'якшений тромб перебуває ніби в розплавленому стані і легко відділяється від стінки судини, починаючи блукати в кровотоці. Таким чином, гірудотерапія при гнійному запаленні сприяє емболії [65].

## 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 2.1 Об'єкти і матеріали дослідження

Матеріалом для експерименту була кров 12 донорів (5 чоловічої статі, 7 жіночої, середній вік  $34,0 \pm 2,5$  років), із серцево-судинними захворюваннями та хворобою тромбофлебітом, обстежених в ході підготовки до гірудотерапії в профілактичній амбулаторії згідно ліцензійного договору № 1/19-1 з ФОП. Кров для дослідження брали з вени у кількості 5 мл, стабілізованою у 2% розчином кристалічного гепарина («Спофа»). Кінцева концентрація гепарину була 0,5 мг/мл. У крові визначали кількість лейкоцитів, формулу крові і ставили культуру лімфоцитів з цільної крові за методом (Х.Фримеля, 1979) [66].

До 0,5 мл крові додавалася поживна суміш в об'ємі 5 мл. З кожної крові донора приготовано мітоген-стимульовану культуру лімфоцитів з застосуванням ФГА-М (Sofia) в концентрації 10 мкг/мл поживної суміші. Готували наступні зразки культур лімфоцитів з цільної крові:

- 1) спонтанна без додавання мітогенів та антигенів БАР МП
- 2) ФГА без антигенів БАР МП
- 3) ФГА + 0,01 мкг /мл БАР МП
- 4) ФГА + 0,1 мкг /мл БАР МП
- 5) ФГА + 1 мкг /мл БАР МП
- 6) ФГА + 5 мкг /мл БАР МП
- 7) ФГА + 10 мкг /мл БАР МП
- 8) ФГА + 20 мкг /мл БАР МП
- 9) ФГА + 40 мкг /мл БАР МП
- 10) ФГА + 80 мкг /мл БАР МП

Культивування проводили в термостаті при +37 протягом 24 годин, після чого проводили аналіз РБТЛ у всіх культурах морфологічним методом. Забір крові, культура лімфоцитів проводилася стерильно в умовах боксу.

## 2.2 Методи дослідження

### 2.2.1 Приготування водно-сольового екстракту

Сольовий екстракт отримували за розробленим способом [67].

Відібрано 60 п'явок після останнього голодування 4 місяці. Їх помістили в окрему банку, в якій вони адаптувалися протягом тижня. Далі вони піддавалися фрагментації. Спочатку ножицями, а потім в подрібнювачі тканин. Залишкова кров в шлунково-кишковому тракті відмивалася забуференим (рН 7,2) фізрозчином (ЗФР) до прозорого стану. Фільтрувальним папером прибирали залишки фізичного розчину. Після цього зважували.

Отримана маса – 38 г ,на яку провели розрахунок фізрозчину для екстракції. Оптимальне співвідношення маси тканин і фіз. розчину 1: 10.

Подрібнення тканин МП проводили в порцеляновій ступці з битим склом. При подрібненні додавали порції фіз. розчину з розрахункової його кількості.

Отриману тканинну суспензію з порцелянкової ступки переносили в конічну колбу на 1 л, куди додали залишок розрахункового фізрозчину.

Колбу накрили кришкою і поставили в холодильник (+4) для екстракції БАР. Екстракцію проводили протягом доби з періодичним помішуванням суспензії клітин.

Надосад центрифугували в рефрижераторній центрифугі при 1500 об./хв. протягом 30 хв. Далі супернатант стерилізували шляхом пропускання через бактеріальний фільтр із діаметром пор 0,23 мкм (Synpor), ампулювали в мікропробірках «Eppendorf» та зберігали при температурі - 20 °С до використання.

В окремих зразках визначали кількість білку за методом Лоурі [68] для розрахунку дози БАР в культурі лімфоцитів.

### 2.2.2 Метод Лоурі

Метод заснований на утворенні забарвлених продуктів ароматичних амінокислот і цистеїну з реактивом Фоліна в поєднанні з біуретовою реакцією на пептидні зв'язки.

1 мл розчину препарату, що містить 0,025-0,250 мг випробуваного білка, поміщають в пробірку, додають 2 мл реактиву 1 і залишають при кімнатній температурі на 10 хв. Потім додають 0,5 мл реактиву Фоліна, перемішують і через 30-40 хв вимірюють оптичну густина на спектрофотометрі при довжині хвилі 750 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм. В якості розчину порівняння використовують суміш цих реактивів без препарату.

Калібрувальний графік будують в межах концентрацій від 0,025 до 0,250 мг стандартного зразка білка, вимірюючи оптичну щільність розчинів при 750 нм.

### 2.2.3 Реакція бластної трансформації лімфоцитів

Метод заснований на моделюванні в умовах ін вітро проліферативної реакції лімфоцитів при імуногенезі. Малий лімфоцит після стимуляції антигеном або мітогеном трансформується в бластну клітину з послідуною проліферацією.

Постановка культури лімфоцитів

Культуру лімфоцитів ставили із цільної крові у співвідношенні 0,5 мл крові на 5 мл поживної суміші за методом (Х.Фримеля, 1979) [66].

Поживна суміш складалась з середовища 199, 10% інактивованої ембріональної телячої сироватки, 0,2 мкг/мл глютаміна і 100 од/мл гентаміцину.

Культуру ставили в флаконах на 20 мл, закривали гумовими пробками та інкубували при 37°C 24 години. З кожного зразка крові донора ставили наступні види культур: 1) спонтанна – без додавання ФГА та антигенів БАВ МП; 2) стимульована тільки ФГА; 3) ФГА + 0,01 мкг/мл БАР МП; 4) ФГА + 0,1 мкг/мл БАР МП; 5) ФГА + 1 мкг/мл БАР МП; 6) ФГА + 5 мкг/мл БАР МП; 7) ФГА + 10 мкг/мл БАР МП; 8) ФГА + 20 мкг/мл БАР МП; 9) ФГА + 40 мкг/мл БАР МП; 10) ФГА + 80 мкг/мл БАР МП.

#### Приготування препаратів РБТЛ

Через 24 години культури зливали в центрифужні пробірки і центрифугували 1500 об./хв. 15 хвилин. Супернатант видаляли, а осад формених елементів фіксували по Корнуа. Фіксатор складається із 3 мл етилового спирту та 1 мл крижаної оцтової кислоти. Фіксатор заготовляли заздалегідь і зберігали в холодильнику. Додавання фіксатора проводили наступним чином: вміст піпетки, що містить 3 мл фіксатора різко вливали в осад формених елементів з подальшим перемішуванням.

#### Піпетування

До цього часу відбувалося руйнування еритроцитів і фіксація лейкоцитів. Для продовження фіксації суспензію поміщали в холодильник на 20 хвилин. Проводили 2-3 зміни фіксатора по 1 мл для отримання чистої надосадової рідини, для відмивання від гемоглобіну.

#### Приготування мікропрепаратів РБТЛ

Суспензію лейкоцитів центрифугували 100 оборотів 5 хвилин. Надосадок видаляли залишаючи близько 50-100 мкл суспензії. Суспензію наносили на охолоджені покривні скельця 5 -8 крапель з відстані 10 -15 см. Фільтрувальним папером прибирали зайву рідину. Препарати піддавали висушуванню ламінарним потоком теплого повітря. Після висихання препарати підписували і мікроскопували.



## Аналіз РБТЛ

Аналіз РБТЛ проводили на мікроскопі БЮЛАР (Польща) при збільшенні об'єктив 100×, окуляр 7×.

У мікропрепаратах з культури лімфоцитів аналізували реакцію РБТЛ морфологічним методом. При аналізі враховували 600 мононуклеарів. При цьому враховували малі, середні і великі бласти з нормальними морфологічними ознаками трансформації. Клітини з ознаками апоптозу і некрозу виключали з аналізу.

Малі бласти мали розмір 7-8 мкм з ознаками активації ядра, дисперсією хроматину, появою ядерця та наявністю вузького обідка цитоплазми з ознаками базofilії.

До середніх бластів відносили клітини 9-12 мкм з різко вираженою дисперсією хроматину і вираженим ядерцем з наявністю помітного обідка цитоплазми з середнім ступенем базofilії.

Великі бласти – клітини більше 12 мкм з різко вираженою дисперсією хроматину зі збільшеним ядром, з наявністю одного або більш виражених ядерців. Цитоплазма широка, різко виражена базofilія, періодично наявність вакуолей.

### 2.2.4 Підрахунок кількості лейкоцитів у камері Горяєва

У лунці планшета для серологічних досліджень дозованою варіпіпеткою відміряють 0,38 мл 3% розчину оцтової кислоти. Узятую для дослідження кров видувають з капіляра на чисті знежирені скельця і відміряють дозованою мікропіпеткою 0,02 мл (20 мкл) крові, яку вносять в лунку з 0,38 мл 3% розчину оцтової кислоти. В цьому випадку розведення крові виходить 1:20. Порцію крові перемішують піпетуванням тією ж піпеткою і залишають на 1-2 хв. до повного лізису еритроцитів. Підрахунок лейкоцитів проводять в рахунковій

камері Горяєва. Рахункова камера є скляною пластинкою, що має невелике поглиблення в центрі, куди поміщається розведена кров. На дні поглиблення вигравійовано дві сітки, розділені одна від одної подовжнім і двома поперечними жолобами. Перед підрахунком формених елементів крові на камеру обережно кладуть знежирене покривне скло і притирають його до країв камери шляхом притиснення великими пальцями обох рук і легкими зсувами покривного скла вгору і вниз. Доказом щільності прилягання покривного скла є поява веселкових ліній, так званих кілець Ньютона, по притертим його краям. Оскільки покривне скло накладають на бічні пластинки рахункової камери, цим створюється поглиблення, яке закрите з двох сторін (притертих) і відкрите з двох зовнішніх сторін у вигляді щілин. Через ці щілини рахункова камера заповнюється суспензією лейкоцитів. Для заповнення камери суспензію лейкоцитів в лунці з кислотою ретельно перемішують мікропіпеткою і невелику порцію суспензії піпеткою доставляють до щілини камери. Суспензія клітин, витікаючи з мікропіпетки заповнює камеру, надлишок рідини стече в жолоби. Іншу частину камери можна заповнити суспензією клітин наступного зразка лейкоцитів [69, 70].

Після того, як рахункова камера заповниться суспензією клітин, приступають до підрахунку лейкоцитів. Для цього камеру розглядають під мікроскопом і рахують формені елементи, що лежать в сітці Горяєва.

Сітка Горяєва складається з 225 великих квадратів (по 15 в кожному з рядів), 25 з них розділені на 16 маленьких квадратів (для підрахунку еритроцитів) і 100 великих порожніх квадратів зібрано в групи по 4 квадрати кожна (для підрахунку лейкоцитів). Сторони малого квадрата рівні 0,05 мм; отже площа його рівна  $0,0025 \text{ мм}^2$ ; глибина рахункової камери рівна 0,1 мм, тому об'єм малого квадрата рівний  $0,00025 \text{ мм}^3$ . Великий квадрат сітки Горяєва складається з 16 малих квадратів, отже має  $S=0,04 \text{ мм}^2$ , а  $V=0,004 \text{ мм}^3$  [69].

Лейкоцити підраховують у 100 великих порожніх квадратах (20x5), площа яких дорівнює  $4 \text{ мм}^2$  (площа одного великого квадрата дорівнює  $0,04 \text{ мм}^2$ ). Кількість лейкоцитів, підрахованих у 100 великих порожніх

квадратах, ділять на 4 і перемножують на 200, одержують кількість лейкоцитів в  $1\text{мм}^3$  крові. Ділять на 4 із розрахунку загальної площі 100 великих порожніх квадратів, рівної  $4\text{мм}^2$ . Перемножують з розрахунку, що ступінь розведення крові дорівнює 20 (0,38 мл 13% розчину оцтової кислоти і 0,02 мл крові), а глибина камери 0,1 мм. Замість вище приведених розрахунків можна кількість лейкоцитів, підрахованих у 100 великих квадратах, помножити на 50 (якщо врахувати попередні розрахунки:  $200:4=50$ ).

$$\text{Кількість лейкоцитів (тис/мм}^3\text{)} = \frac{n \times 20}{0,04 \times 100 \times 0,1} = n \times 50, \quad (2.1)$$

де  $n$  – кількість лейкоцитів, підрахована у 100 великих квадратах камери Горяєва;

20 – розведення;

0,04 – площа одного великого квадрата ( $\text{мм}^2$ );

0,1 – глибина камери.

Для того, щоб повторно не підраховувати один і той же лейкоцит, потрібно суворо 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 [69, 70].

#### 2.2.4 Мікроскопія мазків крові. Складання лейкоцитарної формули

Для приготування мазка крові на сухе знежирене предметне скло, ближче до короткого боку, наносять піпеткою невелику краплю крові. Предметне скло тримають на столі. Правою рукою приставляють шліфоване скло вузьким краєм до скла з кров'ю зліва від краплі під кутом  $45^\circ$  та продвигають його

вправо до з'єднання з краплею крові. Чекають до тих пір, поки кров розподілиться по всьому ребру шліфованого скла, а потім легким швидким рухом проводять його зправа наліво до тих пір, поки не була вичерпана вся крапля. Крапля крові повинна бути невеликою (5-10 мкл), щоб весь мазок поміщався на склі, не доходячи 1,0-1,5 см до його краю. Не можна сильно нажимати на скло, так як більшість клітин крові можуть бути ушкодженими. Добре зроблений мазок тонкий, має жовтуватий колір та закінчується «щіточкою». Після приготування мазки висушують на повітрі до зникнення вологого блиску. При повільному висушуванні може змінюватися морфологія клітин крові. Після правильного приготування мазка крові й якісного забарвлення приступають до його вивчення.

Огляд мазка починають з малого збільшення, при якому оцінюють якість мазка, але аналіз його проводять під імерсією. Слід мати на увазі, що не зважаючи на достатньо правильне технічне виконання мазка, клітини крові розподіляються не рівномірно по всьому препарату. Тому для отримання достовірних даних при підрахунку лейкоцитарної формули прийнято рахувати лейкоцити в різних ділянках мазка крові. Щоб уникнути повторного підрахунку одних і тих же лейкоцитів рекомендується рухатися по мазку крові зигзагами - лінією Меандра. Прийнято рахувати 200 лейкоцитів, відступаючи 0,3-0,5 см від основи "вусиків", рухаючись зигзагами на всю ширину мазка через 2-3 поля зору. Необхідно прагнути набрати дану кількість клітин на 1/2 мазка, де клітини розподілені найбільш оптимально без накладень. Різні види лейкоцитів, що зустрічаються при аналізі препарату, заносять в таблицю.

Після закінчення перегляду 200 лейкоцитів, визначають процентний вміст кожного з видів лейкоцитів. Це і є лейкоцитарна формула. Окрім процентного вмісту лейкоцитів велике значення має абсолютна кількість окремих видів лейкоцитів. Воно визначається з урахуванням загальної кількості лейкоцитів. Ми визначали абсолютний вміст лімфоцитів.

### 2.3 Статистична обробка даних

Статистичним критерієм правильності експериментальних даних є середнє арифметичне, яка дорівнює відношенню суми всіх даних до їх кількості, обчислюється за формулою:

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

де  $\bar{x}$  – середня арифметична;

$\sum x_i$  –сума варіант;

$n$  – число варіант у виборці.

Середнє квадратичне відхилення  $\delta$  – показник розмаїтості ознаки:

$$\delta = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}, \quad (2.3)$$

де  $n$  – число варіант у вибірці;

$(x_i - \bar{x})^2$  – відхилення кожного показника від середньої величини;

Похибка вибіркової середнього арифметичного ( $S_x$ ):

$$S_x = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}, \quad (2.4)$$

де  $n$  – кількість випадків;

$\delta$  – середнє квадратичне відхилення;

Довірливі межі розраховують за формулою:

$$\bar{x} \pm 1,96m_x, \quad (2.5)$$

де  $\bar{x}$  – середнє арифметичне;

$m_x$  – помилка середнього арифметичного;

1,96 – коефіцієнт достовірності 95% при  $n \geq 30$ .

Для визначення достовірності різниці результатів застосовують тест Стюдента для парних вибірок [71]. Його використовують для перевірки гіпотези про різницю для двох вибірок даних, коли присутня природна парність спостережень у вибірках. Достовірність ( $t_d$ ) обчислюють за формулою:

$$t_d = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\sqrt{m_x^2 + m_y^2}}, \quad (2.6)$$

де  $\bar{X}, \bar{Y}$  – середнє арифметичне результатів, які порівнюють;

$m_{x,y}$  – помилка середньої арифметичної.

Достовірною вважається відмінність при рівні значимостей  $p \geq 0,95$

Показник вірогідності ( $p$ ) встановлюють по таблиці Стюдента на підставі даних  $t_d$  [71].

Коефіцієнт кореляції – показник, який використовують для вимірювання щільності зв'язку між результативними і факторними ознаками у кореляційно-регресійній моделі за лінійної залежності.

$$r_{xy} = \frac{\sum dx dy}{\sqrt{\sum dx^2 \sum dy^2}}, \quad (2.7)$$

де  $x$  і  $y$  – змінні варіанти варіаційних рядів;

$dx$  і  $dy$  - відхилення кожної варіанти від своєї середньої арифметичної.

Оскільки коефіцієнт кореляції клінічних дослідженнях розраховується зазвичай для обмеженого числа спостережень, для визначення його достовірності обчислюють середню помилку коефіцієнта кореляції ( $m_r$ ).

(2.8)

$$m_r = \frac{1-r^2}{\sqrt{n}},$$

де  $r^2$  – коефіцієнт кореляції;

$n$  – число парних спостережень.

Величина коефіцієнта вважається достовірною, якщо не менш ніж в 3 рази перевищує свою середню помилку.

## 3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Аналіз лейкоцитів крові донорів представлено в таблиці 3.1. Мета даного аналізу полягала у вивченні відповідності показників фізіологічним межах норми реакції для подальшого аналізу впливу на ці показники БАР МП різних концентрацій. Як показують дані таблиці 3.1, кількість лейкоцитів крові відповідало їх фізіологічним показникам  $5,6 \pm 0,9$  при індивідуальних коливаннях від 4,1 до 8,0.

Формула крові також відповідала фізіологічним показниками. У межах норми була кількість еозинофілів  $2,6 \pm 0,8$ , сегментоядерних лейкоцитів з їх невисоким числом незрілих паличкоподібних форм  $3,7 \pm 0,8$ .

Нормальні рівні були у і мононуклеарів: моноцитів  $5,0 \pm 1,08$ , тоді як варіації лімфоцитів були в більш широких межах від 18,5 до 33,0 при середньому значенні 25,9. Ці варіації пов'язані з індивідуальною напругою адаптивного імунітету при морфогенетичних реакціях на підтримку гомеостазу в організмі. З периферичної крові донорів ставилась культура лімфоцитів стимульованої ФГА, навантажена різною концентрацією БАР МП. Ставилися такі види культур від кожного донора: спонтанна, де в культуральному середовищі була присутня тільки кров донора. Мета постановки даного зразка полягала у вивченні вихідних значень активованих лімфоцитів під впливом ендогенних мітогенних факторів, які могли б далі впливати на мітоген-стимульовані значення РБТЛ. Наступним зразком культури був флакон з цільною кров'ю донора з мітогеном ФГА з метою вивчення потенційної проліферативної активності Т-лімфоцитів на мітогенні сигнали. Наступні навантажені культури лімфоцитів включали цільну кров донора, мітоген ФГА і різну кількість антигенів БАР МП із зростаючою концентрацією від 0,01 до 80 мкг/мл. Всього 10 зразків культури на кожного донора. Всього 70 зразків культури.



Таблиця 3.1 – Кількість лейкоцитів та формула крові донорів

№	Кількість лейкоцитів, Г/л	Лейкоцитарна формула					
		Еозинофіли,%	Нейтрофіли,%		Моноцити,%	Л/ф	
			пал.	сегм.		%	Г/л
1	5,3	4,5	4,0	54,0	3,0	33	1,75
2	6,3	2,5	5,5	60,0	6,0	26	1,64
3	5,4	2,0	4,5	62,0	3,0	28,5	1,51
4	4,7	3,0	2,5	51,5	5,0	25,0	1,18
5	4,8	1,0	3,0	65,5	5,0	24,0	1,15
6	5,4	2,0	4,0	57,0	5,0	32,0	1,73
7	4,1	2,0	3,5	65,0	4,5	25,0	1,02
8	7,2	3,5	4,0	66,5	7,5	18,5	1,3
9	4,6	1,5	2,0	63,9	3,0	26,0	1,1
10	8,0	4,0	5,0	65,5	6,5	19,5	1,56
11	6,8	2,5	3,5	67,0	5,5	21,5	1,72
12	5,4	3,0	3	55,5	6,0	33,0	1,78
M±m	5,6	2,6	3,7	61,0	5,0	25,9	1,45
	±	±	±	±	±	±	±
	0,9	0,8	0,8	4,6	1,08	3,8	0,25

Аналіз РБТЛ кожного зразка культури лімфоцитів представлений в таблиці 3.2 та додатку А.

При аналізі її показників виявлено що в спонтанних зразках культури лімфоцитів кількість трансформованих лімфоцитів коливалася від 2,5 до 9,5 при середніх значеннях  $5,28 \pm 1,5$ , що збігається з даними літератури про спонтанні значення РБТЛ [72]. Значення РБТЛ для фітогемаглютенінової стимуляції також дорівнювали середнім значенням для популяції донорів  $70,3 \pm 8,4$  з варіаціями від 51 до 82. Широкі варіації РБТЛ на ФГА відображають індивідуальну проліферативну активність лімфоцитів в лімфоїдних органах у відповідності гомеостатичним завданням даного індивіда. Навантажувальні культури лімфоцитів під впливом БАР МП відповідали цілям наших досліджень. Їх показники ми порівнювали з такими значеннями РБТЛ на ФГА стимульованій культурі без додавання БАР МП, тобто дані зразки культур були позитивним контролем для навантажувальних БАР МП культур. Аналіз таблиці показав, що тенденція до зниження РБТЛ починалася з самих низьких концентрацій: 0,01 мкг/мл і прогресивно наростала при 0,1, 0,5, 1,0 мкг/мл і різко знижувалась РБТЛ при концентрації 10,0, 20,0 і особливо 40,0 мкг/мл, а вже при концентрації 80 мкг/мл РБТЛ була повністю блокована аж до некрозу лімфоцитів, які виглядали як азурофільні безструктурні плями. Інгібіція РБТЛ супроводжувалася появою значної кількості лімфоцитів з ознаками апоптозу: цейозиса цитоплазми, появою в ній вакуолей, різким зниженням до відсутності базофілії і деструктивними змінами в ядрі (впячування, каріорексис).

Таблиця 3.2 – Показники мітоген-стимульованої реакції баластної трансформації лімфоцитів крові донорів під впливом БАР МП різних концентрацій, %

Донори	Рівні стимуляції лімфоцитів ФГА під впливом БАР МП, мкг/мл									
	СП	ФГА інтакт.	0,01	0,1	0,5	1,0	10,0	20,0	40,0	80,0
1	3,5	59,0	62	55	40,0	46	44	21	8	0*
2	7,5	78	74	79	55,0	51	39	18	12	0*
3	4	51	68	66	54,0	55	42	19	5	0*
4	6	79	71	65	59,0	48	33	22	7	0*
5	2,5	70	66	67	70,0	61	54	31	8	0*
6	5,5	73	77	70	62,0	59	50	34	11	0*
7	8	82	71	74	66,0	58	56	30	14	0*
8	6,5	75,0	77,5	71,0	63,5	59,5	50,0	30,0	13,5	0*
9	8,0	68,5	66,0	64,5	56,5	52,5	43,5	23,5	7,5	0*
10	9,5	55	61,0	52,5	53,0	39,5	25,5	15,0	0*	0*
11	6,0	74,5	67,5	70,0	62,0	58,0	34,5	29,5	13,5	0*
12	3,5	62,0	59,5	59,5	59,5	46,5	47,0	17,5	0*	0*
M±m	5,28	70,3	69,8	68	58	54	45,4	25	9,29	0*
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	
	1,5	8,4	3,7	5,68	7,2	4,27	6,15	4,8	2,3	

Примітка: \* – некроз

Статистичний аналіз зниження мітоген-стимульованих культур БАР МП різних концентрацій представлений в таблиці 3.3. Її аналіз показує що тенденція до зниження РБТЛ початкової низької концентрації БАР МП 0,01 мкг/мл і до 0,1 мкг/мл концентрації не досягало статистично значущих відмінностей ( $p > 0,05$ ). Статистично значуща інгібіція РБТЛ під впливом БАР МП починалася з концентрації 1,0 мкг/мл і далі збільшувалася, підвищуючи ступінь репрезентативності менше ніж на 0,01 і 1,0 %. Цей аналіз переконливо виявив інгібуючий вплив на імуногенез лімфоцитів під впливом БАР МП.

Таблиця 3.3 – Ступінь зниження мітоген-стимульованої культури лімфоцитів під впливом БАР МП різної концентрації, мкг/мл

Показник	Концентрація БАР МП, мкг/мл							
	0,01	0,1	0,5	1,0	10	20	40	80
РБТЛ, %	0,5	2,3	12,3	16,3	24,9	45,3	61,01	100
$t_d$	0,01	0,4	2,2	3,4	4,7	6,9	13,7	27
P	>0,05	>0,05	>0,05	= 0,05	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001

Кореляційний аналіз між ступенем зменшення ФГА - стимульованої РБТЛ під впливом БАР МП різної концентрації, що представлено в таблиці 3.4 підтвердив вище зроблене припущення про інгібіцію імуногенетичних реакцій лімфоцитів антигенами БАР МП.

Коефіцієнт кореляції =  $0,977 \pm 0,017$  наближався до функціонального зв'язку між показниками : різна концентрація БАР МП в мкг/мл та ступень зниження міоген-стимульованої РБТЛ,  $P < 0,01$ .

Таблиця 3.4 – Кореляція між ступенем зниження мітоген-стимульованої РБТЛ під впливом БАР МП різних концентрацій, мкг/мл

№	Концентрація, мкг/мл	Ступінь зниження, %
1	0,01	0,5
2	0,1	2,3
3	0,5	12,3
4	1,0	16,3
5	10,0	24,9
6	20,0	45,3
7	40,0	61,01
8	80,0	100
$r_{xy}$		0,977
$m_r$		0,017
P		<0,01

Були проаналізовані всі значимі вихідні лейкоцитарні показники крові донорів з ступенню зниження міоген-стимульованої культури під впливом БАР МП різної концентрації. Кореляційний аналіз цих показників в своїй більшості не виявив стійких послідовних зв'язків з якимось показником. Відмічались лише тенденції до цих кореляцій, які набували значущих рівней при деяких концентраціях БАР МП. Так, виявлялась позитивна кореляція між наявністю нейтрофільних паличок в крові та БАР МП при низьких концентраціях 0,01, 0,1 мкг/мл. Виявлена також одинична середня позитивна кореляція між відносною кількістю лімфоцитів в навантажених БАР МП культурах при концентрації 10,0 мкг/мл. В інших випадках тенденції до позитивної кореляції не досягали статистично значущих рівней. Таким чином результат цих кореляційних дослідів свідчить про незалежну від вихідної концентрації лейкоцитів крові здатності БАР МП індукувати в клітинах крові апоптоз та

некроз, який підсилювався при підвищенні концентрації сполук МП в культурах клітин крові.

Таблиця 3.5 – Кореляційна залежність між вихідними значеннями показників лейко грами та ступенем зниження мітоген-стимульованої РБТЛ у % під впливом БАР МП різної концентрації в мкг/ мл

№ донора	Ступінь зниження РБТЛ, %						
	0,01 мкг/мл	0,1 мкг/мл	0,5 мкг/мл	1,0 мкг/мл	10,0 мкг/мл	20,0 мкг/мл	40,0 мкг/мл
1	3	-4	-19	-13	-15	-38	-51
2	-4	1	-23	-27	-39	-60	-66
3	17	15	3	4	-9	-32	-46
4	-8	-14	-20	-31	-46	-57	-72
5	-4	-3	0	-9	-16	-39	-62
6	4	-3	-11	-14	-23	-39	-62
7	-11	-8	-16	-24	-26	-52	-68
8	2,5	-4	-11,5	-15,5	-25	-45	-61,5
9	-2,5	-4	-12	-16	-25	-45	-61
10	6	-2,5	-2	-15,5	-29,5	-40	-55
11	-7	-4,5	-12,5	-16,5	-40	-45	-61
12	-2,5	-2,5	-2,5	-15,5	-15	-44,5	-62
r, L, Г/л	0,33	0,17	0,15	0,07	-0,22	0,11	0,28
m <sub>r</sub> , L, Г/л	0,25	0,28	0,29	0,28	0,28	0,29	0,27
r, л/ф, %	0,17	0,19	-0,03	0,19	0,48*	0,22	0,21
m <sub>r</sub> , л/ф, %	0,28	0,28	0,29	0,28	0,22	0,28	0,28
r, л/ф, Г/л	0,37	0,33	0,04	0,21	0,11	0,27	0,42
m <sub>r</sub> , л/ф, Г/л	0,25	0,26	0,28	0,28	0,29	0,27	0,24

## Продовження таблиці 3.5

г, н, паличк.	0,46*	0,50*	-0,01	0,13	0,004	0,05	0,37
$m_r$ , н, паличк.	0,23	0,22	0,29	0,28	0,29	0,29	0,25
г, н, сегмент.	0,009	0,22	0,35	0,27	0,03	0,18	0,13
$m_r$ , н, сегмент.	0,29	0,28	0,25	0,27	0,29	0,28	0,28

Примітка: \* – відмічено статистично значимий рівень коефіцієнту кореляції

#### 4 ОХОРОНА ПРАЦІ ТА БЕЗПЕКА В НАДЗВИЧАЙНИХ СИТУАЦІЯХ

В процесі проведення біохімічних досліджень приходиться мати справу з біологічно активними речовинами, зразками крові, електроприладами і лабораторним посудом. Необережність у звертанні з хімікатами і приладами, неухважність і неправильне проведення роботи можуть мати важкі наслідки.

Тому, завдяки теоретичному курсі «Охорона праці», що проводилися на п'ятому та шостому курсі відповідно, я всі набуті теоретичні знання використала на практиці, тим самим звела до мінімуму ризик роботи проведення біохімічних досліджень, що необхідні для виконання моєї дипломної роботи.

Техніка безпеки поряд з виробничою санітарією є частиною охорони праці. Під технікою безпеки розуміють сукупність технічних засобів і прийомів виконання операції, що зводять до мінімуму ризик на роботі. Безпека проведення у лабораторіях повинна забезпечуватися відповідно до вимог ДСТ 12.3.002-75 та інших діючих нормативних актів.

Техніка безпеки при проведенні наукових досліджень.

Відповідність санітарно-гігієнічного режиму лабораторії встановленим нормам є запорукою безпечної роботи дослідника. У робочій зоні лабораторії повинні дотримуватися визначені параметри температури, вологості, освітлення, швидкість переміщення повітря усе повинно відповідати вимогам ДНАОП 0.03-3.15-86 [73]. Дуже важливо, щоб у приміщенні не створювався застій повітря. Повітря робочої зони повинно відповідати ДСТу 12.1.005-88 [74].

Необхідно забезпечувати постійний його рух, шляхом відкриття вікон, у випадку використання отруйних та неприємно пахучих речовин, приточно витяжної вентиляції, що повинна відповідати Сніп 2.04.05-99 і ДНАОП 0.03-3.15-89. Важливе значення має створення нормальної освітленості робочого місця. Освітленість створюється сонцем і за допомогою ламп накаливання або



люмінесцентних ламп. Природне і штучне освітлення лабораторії повинне відповідати вимогам Сніп 11-4-79 [76]. При роботі з хімічними реактивами обов'язковий спецодяг (халат з бавовняної тканини) згідно ст. 163 кодексу законів про працю України і ДНАОП 0.00-4.26-96. У тканині не повинно бути добавок синтетичних волокон, тому що у випадку займання оплавлені частини халату важко видалити з одягу [76].

При проведенні дослідів у лабораторії застосовується хімічний посуд: загального і спеціального призначення, і мірний. Дуже часто використовуються пробірки. Неприпустимо, щоб пробірка була наповнена до країв, щоб уникнути вихлюпування і попадання рідин на шкіру експериментатора. Зовсім неприпустимо закривати пробірку пальцем і струшувати її в такому виді, оскільки можна зашкодити шкіру пальця чи одержати опік. При нагріванні відкритий кінець пробірки повинен бути звернений у бік від працюючого і від сусідів по столу, щоб уникнути попадання на шкіру чи в очі випадково виплеснутої рідини. При митті посуду треба стежити за тим, щоб йорш не вдарявся об дно і стінки посуду тому, що так можна вибити дно чи проломити стінку і поранитися. У раковину не можна виливати і викидати концентровані розчини кислот і лугів, що дурно пахнуть, та отруйні речовини. При виливанні в раковину таких речовин можливе їхнє випаровування й отруєння повітря лабораторії. Концентровані кислоти і луги необхідно попередньо сильно розбавити чи нейтралізувати, щоб уникнути руйнування каналізаційної мережі.

Вимоги безпеки перед початком роботи в лабораторії:

- 1) отримати завдання від керівника робіт;
- 2) перевірити стан та одягти спецодяг, спецвзуття та засоби індивідуального захисту;
- 3) включити припливно-витяжну вентиляцію за 10 - 15 хв. до початку роботи;
- 4) перевірити справність приладів, обладнання; наявність необхідних реактивів;
- 5) при необхідності включити вентиляцію у витяжній шафі;

б) перед проведенням робіт із застосуванням вакууму випробувати установку на герметичність;

7) при виявленні несправностей обладнання та засобів захисту, сповістити керівника робіт та не приступати до роботи до усунення виявлених несправностей.

Вимоги безпеки під час роботи в лабораторії:

1) всі операції, пов'язані із застосуванням або можливим утворенням і виділенням отруйних, їдких речовин, які володіють запахом, виконувати тільки у витяжній шафі при працюючій загальнообмінній вентиляції із застосуванням засобів індивідуального захисту;

2) для нагрівання рідин не використовувати відкрите полум'я;

3) при нагріванні рідини у пробірці необхідно спрямовувати її у бік від себе й осіб, які знаходяться поруч;

4) при збовтуванні розчину у колбах і пробірках закривати їх тільки пробками;

5) не залишати запалені пальники та інші нагрівальні прилади без нагляду;

6) не зберігати будь-які речовини невідомого походження без напису й етикеток;

7) виливати відпрацьовані рідини, відходи тільки у спеціальну тару;

8) нагріваючи рідину в пробірці або колбі, необхідно закріплювати їх так, щоб отвір пробки або шийка колби були направлені в напрямі від себе і сусідів по роботі; при цьому посуд наповнюють рідиною не більше, ніж на третину об'єму. Протягом усього процесу нагрівання не дозволяється нахилитися над посудиною і заглядати в неї;

9) при нагріванні біологічних, хімічних речовин в пробірці або колбі не дозволяється тримати їх руками, треба закріплювати в тримачі для пробірок або в лапці штатива (зжим повинен бути біля отвору пробірки).

Вимоги безпеки після закінчення роботи:

- 1) вимкнути обладнання, газові пальники, електроприлади, закрити воду, вимкнути електроенергію;
- 2) хімікати, реактиви та інші речовини і матеріали покласти у відведене для них місце;
- 3) прибрати робоче місце;
- 4) спецодяг, спецвзуття та засоби індивідуального захисту покласти у відведене для них місце;
- 5) помити руки, лице теплою водою з милом; при можливості прийняти душ;
- 6) доповісти керівнику робіт про всі недоліки, які мали місце під час роботи [77].

Вимоги безпеки в надзвичайних ситуаціях.

До нещасних випадків, які можуть статися при виконанні моєї роботи, відносяться електротравми, попадання біологічних рідин, крові на одяг, шкіру і слизові оболонки.

Тому дуже важливо знати першу медичну допомогу при цих випадках, щоб зарадити їм і їхнім наслідкам.

При роботі з сироваткою крові можливе її потрапляння на шкіру, одяг, слизові оболонки. Всі біологічні рідини треба сприймати як потенційно заражені ВІЛ-інфекцією, тому згідно приказу № 120 МОЗ України від 20.05.00 розроблена перша допомога при цих випадках .

Так при потраплянні сироватки на халат, потрібно його зняти і замочити у дезінфікуючому розчині на 1 годину. Таким дез. розчином може бути 0,5% р-н хлорантоїну, 0,5% р-н дезактину, 0,05% р-н бактоліну.

Якщо ж сироватка потрапила на шкіру, потрібно обробити уражену ділянку одним із дезинфікатором – це може бути 700 спирт, 3 % р-н перекисі водню, 5 % р-н йоду. Потім промити шкіру двократно під проточною водою з милом, висушити стерильним рушником і знову обробити дезинфікатором.

При потраплянні сироватки на слизові оболонки очей потрібно промити очі великою кількістю води і закапати 30 % р-ном альбуциду, якщо ж сироватка потрапила на слизові оболонки ротової порожнини, потрібно прополоскати рот 700 спиртом. Про всі випадки аварії потрібно повідомляти курівництво підприємства.

Електротравми можуть виникати при доторканні за провід, який знаходиться під напругою. Із-за скорочення м'язів людина не може самостійно звільнитися. Електротравми можуть призвести до зупинки серця, дихання, ураження головного мозку.

Рятування потерпілого від електротравми повинно починатися з звільнення його від джерела струму. При цьому повинно пам'ятати і дотримуватися деяких правил техніки безпеки. По-перше, для зупинення дії струму краще всього повернути вимикач, вимкнути рубильник, вивернути пробки на щітку. Якщо це з яких то причин не можливо, треба звільнити потерпілого від електропроводу. Для цього потрібно одягти гумові рукавички або обмотати руки шматком шовкової тканини и користуватися сухою дерев'яною палкою. Ні в якому разі не можна доторкатися до потерпілого голими руками.

По-друге, при відсутності при знаків життя після звільнення потерпілого від дії електричного струму потрібно почати проведення реанімаційних заходів.

По-третє, якщо ваші дії виявилися успішними і потерпілий ожив, вам необхідно, не втрачаючи часу, накладити асептичні пов'язки на «мітки струму», які є опіками, і відвезти потерпілого в лікарню [77].

Пожежна безпека.

Пожежна безпека в лабораторії повинна забезпечуватися шляхом проведення організаційних, технічних та інших заходів відповідно до Правил пожежної безпеки в Україні.

Для попередження виникнення пожежі не допускається:

- курити у виробничих приміщеннях;

- залишати папір та інші легкозаймисті матеріали на шафах і за шафами, на радіаторах центрального опалення, близько до електропроводів і електроприладів;

- нагрівати легкозаймисті речовини на відкритому вогні, електроплитах тощо (нагрівати слід на піщаній (або водяній) бані);

- залишати без нагляду ввімкнені електроприлади, плити, електричне освітлення;

- порушувати електропроводку, заставляти шафами й завішувати плакатами, картинами, газетами тощо електропроводи, електровимикачі, розетки;

У коридорах або в добре доступних місцях повинні бути розташовані щити з набором протипожежного інвентарю, вогнегасники, ящики з піском та пожежний гідрант. Вогнегасники слід також розташовувати в приміщеннях, де проводяться роботи з вогненебезпечними або вибуховими реактивами і небезпечними в пожежному відношенні нагрівальними приладами.

У газовій мережі лабораторії повинен бути встановлений загальний аварійний кран.

При загорянні легкозаймистих речовин для їхнього гасіння слід використовувати вогнегасник, пісок, листовий азбест, азбестову тканину або вовняну ковдру.

При виникненні пожежі необхідно викликати пожежну охорону, зачинити вікна та квартирки, вимкнути вентиляцію та електроприлади, винести з приміщення горючі рідини, лужні метали й фосфор.

Техніка безпеки при роботі на комп'ютері.

До роботи на комп'ютері допускаються особи, що пройшли навчання та інструктаж з охорони праці. Усі особи, що працюють на комп'ютері, повинні знати міри захисту та прийоми надання першої долікарської допомоги при ураженні електричним струмом.

Вмикання комп'ютерів до електричної мережі здійснюється тільки через спеціально встановлені електричні розетки або вилки із заземленням. Підключення комп'ютера дротом без вилки забороняється.

Покриття стола повинно бути матовим з коефіцієнтом відбиття 0,25 – 0,4. Освітлення робочих місць в горизонтальній площині на рівні 0,8 м від підлоги повинно бути не менше 400 лк. Для штучного освітлення в дисплейних залах, як правило, слід застосовувати люмінесцентні лампи типу ЛБ.

Перед початком роботи видалити пил з екрану, установити захисний екран, перевірити захисне заземлення (занулення), упевнитись у наявності засобів гасіння вогню.

Відстань від очей користувача до екрану дисплея повинна становити 50 – 70 см, кут зору 10-200, але не більше 400. Переважним є розташування площі екрана перпендикулярно до лінії зору користувача. Руки користувача повинні розташовуватися на робочому столі в горизонтальному положенні, або злегка нахилені, кут ліктя повинен складати 70-90°, необхідна гарна опора для спини та сідниць.

Необхідно передбачити дотримання регламентованих перерв, активне їх проведення, регулярне заняття виробничою гімнастикою, рівномірне розподілення завдань.

При виникненні аварійної ситуації металоконструкції ЕОМ опинилася під напругою. При доторканні до неї відчувається проходження струму. При спалахуванні проводки в середині апаратури – необхідно вимкнути електроспоживання ЕОМ, вимкнувши вилку.

Після закінчення робіт необхідно від'єднати апаратуру від електромережі [77].

Таким чином, знання дисципліни охорони праці в галузі, допомогли мені уникнути небезпечних випадків та травмувань.

## ВИСНОВКИ

1. Аналіз екологічних, морфологічних особливостей роду *Hirudo* дозволили встановити причини філогенетичного переходу від ектопаразитизму до екомутуалізму в екосистемі «медична п'явка – ссавці», внаслідок спроможності до синтезу медичною п'явкою БАР МП для гомеостатичної регуляції фізіологічних систем у ссавців.

2. Фрагментація 60 МП дозволила отримати масу 38 г, з якої було отримано 380 мл сольового екстракту із вмістом пептидів БАР 6 мг/мл, який після бактеріальної стерилізації був придатний для експериментів в культурі крові щурів.

3. Оптимальною для постановки культури лімфоцитів з цільної крові донорів була поживна суміш зі складу середовища 199, 10% інактивованої ембріональної телячої сироватки, 0,2 мкг/мл глютаміну і 100 од/мл гентаміцину, приготовлена в стерильних умовах боксу.

4. Загальний аналіз лейкоцитів крові обстежених донорів був у фізіологічних межах: лейкоцити  $5,6 \pm 0,9$  Г/л, формула крові без відхилень, що сприяла цільовим установкам роботи.

5. Спонтанна і ФГА-стимульована РБТЛ були у фізіологічних межах потенційної проліферативної активності. Спонтанна:  $5,28 \pm 1,5$ ; ФГА:  $70,3 \pm 8,4$ . БАР МП здійснювали інгібіцію ФГА-стимульованої РБТЛ завдяки індукції апоптозу і некрозу з вираженим проявленням починаючи з 1-10 мкг/мл і максимальним 40 і 80 мкг/мл, при яких проявлявся вже повний некроз і не залежало від вихідних відносних і абсолютних значень лейкограм донорів. Інгібіція реактивності лімфоцитів на мітогени та антигени лежить в основі місцевої протизапальної дії при гірудотерапії.

## РЕКОМЕНДАЦІЇ

Результати дослідів магістерської роботи підтвердили здатність БАР МП індукувати апоптоз клітин в оточуючому середовищі, що є одним з основних механізмів звісної протизапальної дії гірудотерапії. Останній терапевтичний ефект гірудотерапії обумовлює її широке застосування в профілактичній і лікувальній медицині та ветеринарії.



## ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Каменев О. Ю. , Барановский А. Ю. Лечение пиявками : теория и практика гирудотерапии : руководство для врачей. СПб : Весь, 2006. 304 с.
2. Баскова И. А., Исаханян И. П. Гирудотерапия. Наука и практика : учебное пособие. Москва : Высшая школа, 2004. 508 с.
3. А. К. Фролов, А. С. Прилуцкий, В. В. Копейка, Е. Р. Федотов, Р. А. Литвиненко. К механизму иммуотропного действия гирудотерапии. *Імунологія та алергологія* : наука і практика, 2010. № 3-4. С. 32–34.
4. Baskova I. P. Hirudotherapy scientific basements. Humoral link. Tula : Akvarius, 2015. 228 с.
5. Литвиненко Р. О. Імуномодуляторні властивості біологічно активних речовин медичної п'явки в умовах гірудовпливу : автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.09. Київ : КНУ, 2016. 169 с.
6. Червона книга України. Тваринний світ / за ред. І. А. Акімова. К. : Глобалконсалтинг, 2009. 600 с.
7. Геращенко Л. Всё о пиявке. Гирудотерапия для разных типов людей : учебное пособие. Питер : СПб, 2007. 256 с
8. Коритнюк Р., Борисенко Т. Пиявочка–козявочка. *Фармацевт–практик*, 2009. № 1. С. 34-37.
9. Abdulkader A.M, et all. Leech Therapeutic Applications. *Indian J Pharm Sci.*, 2013 Mar-Apr.Vol.75, № 2. С. 127–137.
10. Trontelj P, Sotler M, Verovnik R. Genetic differentiation between two species of the medicinal leech, *Hirudo medicinalis* and the neglected *H. verbana*, based on randomamplified polymorphic DNA. *Parasitol. Res.*, 2004. Vol. 94, № 2. P. 118–124.
11. Utevsky S., Kovalenko N., Doroshenko K., Petrauskiene L., Klymenko V. Chromosome numbers for three species of medicinal leeches (*Hirudo* spp.). *Syst.Parasitol.*, 2009. № 74. P. 95-102.

12. Trontelj P., Utevsky S. Y. Phylogeny and phylogeography of medicinal leeches (genus *Hirudo*) : Fast dispersal and shallow genetic structure. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2012. Vol. 63. P. 475-485.
13. Siddall M. E, Trontelj P., Utevsky S. Y, Nkamany M., Macdonald K. S. Diverse molecular data demonstrate that commercially available medicinal leeches are not *Hirudo medicinalis*. *Proc. R. Soc. B.*, 2007. Vol. 274. P. 1481-1487.
14. Никонов Г. И. Медицинская пиявка. Основы гирудотерапии : учебное пособие. Санкт-Петербург : Питер, 1998. 320 с.
15. Догель В. А. Зоология беспозвоночных : учебное пособие. Москва : СИНТЕГ, 2015. 620 с.
16. Дауда, Т. А., Коццаев А. Г. Зоология беспозвоночных : учебное пособие. Москва : Лань, 2015. 208 с.
17. Баскова И. П., Завалова Л. Л., Ингибиторы протеолитических ферментов медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis*) (обзор). *Биохимия*. 2001. Т.66, № 7. С. 869-883.
18. Сбойчаков В. Б, и др. Основы микробиологии и иммунологии : учебник. Москва : КноРус, 2017. 273 с.
19. Лесова С. Д., Орадова А. Ш., Садуакасова К. З., Лабораторная диагностика цитокинов. Київ : КНМУ им. С.Д. Асфендиярова, 2017. № 2. С. 210-213.
20. Стояновский Д. Н. Медицинская пиявка. Кровопускание : учебное пособие. Москва : АСТ, 2006. 125 с.
21. Костикова Л. И. Гирудотерапия : энциклопедия лечения медицинскими пиявками. Москва : Высшая школа, 2018. 512 с.
22. Сухов К. В. Клиническая гирудотерапия : практическое руководство. Минск : Accent Graphics Communications, 2018. 160 с.
23. Шевчук В. Г. , Мороз В. М. , Белан С. М. . Фізіологія : підручник для студ. вищ. мед. навч. закладів./ за редакцією В. Г. Шевчука. Вінниця : Нова Книга, 2012. 448 с.

24. Круковер В. Лечит пиявка : монография. Москва : АСТ, 2006. 94 с.
25. Хаитова Р. М., Атауллаханова Р. И. Иммуноterapia : руководство. / под ред. Р. М. Хаитова. Москва : ГЕОТАР-Медиа, 2012. 672с.
26. Афиногенова В. П., Лукачев И. В., Костинов М. П. Иммуноterapia : механизм действия и клиническое применение иммунокорректирующих препаратов. *Лечащий Врач*. 2010. № 4. С. 9-13.
27. Чоп'як В. В. Доказова імунопрофілактика та імунотропна терапія : монографія. Львів : Апріорі, 2013. 334 с.
28. Фещенко Ю. И., Рекалова Е. М. Особенности современной иммуномодулирующей терапии. *Астма та алергія*, 2013. № 1. С. 12-14.
29. Сепиашвили Р. И. Иммунотропные препараты : классификация, проблемы и перспективы. *Аллергология и иммунология*. 2015. Т. 16, № 1. С. 64–69.
30. Жаров Д. Г. Секреты гирудотерапии или как лечиться пиявками : учебное пособие. Ростов на Дону : Феникс, 2003. 320 с.
31. Савинова В. А. Гирудотерапия : руководство / под ред. В. А. Савинова. М.: Медицина, 2004. 432 с.
32. Каменев О. Ю. Новая технология получения биологически активной добавки из тканей медицинской пиявки для косметических и лечебных средств. *Труды Кубанского государственного аграрного университета*. 2008. № 10. С. 114-117.
33. Л. Л. Завалова, Г. И. Никонов, Е. В. Кузина и др. Димер фрагмента D стабилизированного фибрина – субстрат фермента дестабилазы ( $\gamma$ -глутамил- $\epsilon$ -лизил-изопептидазы). *Биохимия*. 1991. Т. 56, № 1. С. 115-124.
34. Баскова И. П., Завалова Л. Л. Полифункциональность дестабилазы-лизоцима из медицинской пиявки. *Биоорганическая химия*. 2008. Т. 34, № 3. С. 337-343.
35. Завалова Л. Л., Антипова Н. В., Фадеева Ю. И., и др. Каталитические центры фермента дестабилазы-лизоцима медицинской пиявки (mDL).

Структурно-функциональная взаимосвязь. *Биоорганическая химия*, 2012. Т. 38, № 2. С. 229-233.

36. Abbas Zaidi S. M., Jameel S. S., Zaman F. A systematic overview of the medicinal importance of sanguivorous leeches. *Altern. Med. Rev.* 2011. Vol. 16, № 1. P. 59-65.

37. Abdullah S., Dar L., Rashid A., Tewari A. Hirudotherapy. Leech therapy: applications and indications in surgery. *Arch. Clin. Exp. Surg.* 2015. Vol. 1, № 3. P. 172-180.

38. Коеппен D., Аурих M., Рампп Т. Medicinal leech therapy in pain syndromes: a narrative review. *Wien. Med. Wochenschr*, 2014. Vol. 164, № (5-6). P. 95-102

39. Фролов А. К, Токаренко А. И. Изменения иммунитета у больных гипертонической болезнью под влиянием биологически активных веществ медицинской пиявки. *Запорожский медицинский журнал*. 2011. № 2. С. 23-26.

40. Фролов А. К. , Литвиненко Р. О. , Копейка В. В., Федотов Е. Р. Изучение иммуотропного действия биологически активных веществ медицинской пиявки в условиях гирудотерапии и *in vitro*. *X Міжнародна Конференція Асоціації гірудологів : матеріали X Міжнародної конференції*, м. Харків, 1-5 жовтня. 2012 р. Харків, 2012. С. 45-47.

41. Исаханян Г. С. Медицинские пиявки: их лечебное применение в терапевтической клинике. *Терапевт Архив*. 1991. Т. 63, № 8. С. 110-112.

42. Поспелова М. Л, Барнаулов О. Д. Влияние гирудотерапии на показатели тревоги и депрессии у пациентов с цереброваскулярной патологией. *Психофармакология и биологическая наркология*. 2015. № 6(4). С. 1370-1375.

43. Жулебина Н. Н. Гирудотерапия в дерматологии. *Bulletin of Medical Internet Conferences*. 2017. Vol.7, № 12 С.972-973.

44. Wollina U , Heinig B., Nowak A. Medical leech therapy (Hirudotherapy). *Our Dermatol Online*. 2016. № 7(1). P. 91-96.

45. Абдувалиев А. А, Дауреханов А. М. Гирудотерапия в комплексном лечении больных реактивным артритом. *Вестник КазНМУ*. 2017. № 1. С. 250-252.

46. Lauche R, Cramer H, Langhorst J, Dobos G. A systematic review and metaanalysis of medical leech therapy for osteoarthritis of the knee. *Clin J Pain*. 2015. № 30.Р. 63-72.

47. Фролов О. К., Литвиненко Р. О., Ребець О. Л., Юрчук І. С. Вплив екзогенних біологічно активних речовин медичної п'явки на біологічні властивості *Escherichia coli*. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2014. № 2(26), С. 94-100.

48. Baskova I. P., Kostjukova E. S., Vlasova M. A. Proteins and peptides of the salivary gland secretion of medicinal leeches *Hirudo verbena*. *Biochemistry*. 2008. Vol. 73, № 3. P. 315-320.

49. Фролов А. К., Литвиненко Р. А., Копейка В. В., Федотов Е. Р. Особенности реакции бластной трансформации лимфоцитов крови доноров стимулированной растительными лектинами и антигенами кольцецов. *Проблеми екології та медицини*. 2012. Т.16, № 5. С.37-40.

50. Шестаков В. В. Косметические средства на основе биологически активных соединений, продуцируемых медицинскими пиявками. *Гирудотерапия и гирудофармакотерапия*. 2002.Т. 4. № 2 С. 219-225.

51. Николаев В. Ю. Разработка лечебно-профилактических, косметических пластырей с экстрактом медицинской пиявки. *Достижения науки и образования*. 2017; 6 (19) : 92-94.

52. Жулебина Н. Н. Гирудотерапия в дерматологии. *Bulletin of Medical Internet Conferences*. 2017; 7 : 972.

53. Wollina U., Heinig B., Nowak A. Medical leech therapy (Hirudotherapy). *Our Dermatol Online*. 2016; 7(1) : 91-96.

54. Баскова И. П. и др. Стероиды, гистамин и серотонин в составе секрета слюнных желез медицинской пиявки. *Биомедицинская химия*. 2008. Vol. 54, № 2. С. 127-139.

55. Фролов В. М., Пересадин Н. А., Высоцкий А. А. Влияние гирудотерапии на показатели энергетического обмена у больных с синдромом психоэмоционального выгорания. *Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології*. Київ, Луганськ, Харків, 2007. Вип. 6. С. 22-28.

56. Кузнєцова Л. В., Фролов В. М., Пересадин М. О. Сучасні підходи до гірудорефлексотерапії при захворюваннях серцево-судинної системи. *Український морфологічний альманах*. 2010. Т.8. № 1. С. 101-104.

57. Лабіський А. Й. Клініко-біохімічні дослідження хворих з транзиторними ішемічними атаками при гірудотерапії. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. 2015. № 1. С. 101-104.

58. Пересадин М. О., Гарник Т. П., Фролов В. М. . Вплив гірудотерапії на концентрацію прозапальних цитокінів (IL-1 $\beta$ , ФНП) у крові хворих на варикозну хворобу вен гомілки у міжрецидивному періоді бешихи. *Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології*. Київ, Луганськ, Харків, 2007. Вип. 1-2(76-77) . С. 172-180.

59. Назарчук И. А. Гирудотерапия в профилактике тромботических осложнений при атеросклерозе и гипертонической болезни у больных с хроническими церебральными ишемиями. *Гематология і переливання крові*.,2006. № 33. С. 168-175.

60. Тюкин О. А. Гирудотерапия : медико-социальный аспект. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2016. № 9. С. 244-247.

61. Бондаревский Я. И., Бондаревский И. Я.: Медицинская практика врача : пособие для гирудотерапевтов. Челябинск, 2001. 66 с.

62. Савинов В. А. Гирудотерапия. Москва: Медицина, 2004. 432 с.

63. Джигоев И. А. Методика гирудотерапии при лечении венозных трофических язв нижних конечностей в условиях поликлиники. *Аспирант и соискатель*. 2006; 4: 221-224.

64. Tashiro K., Fujiki M., Arikawa M., Kagaya Y., Miyamoto S. Free Flap Salvage after Recurrent Venous Thrombosis by Means of Large-Scale Treatment

with Medical Leeches / T. Kensuke et al. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2016; 4: e1157

65. Махова Е. В. Особенности лечения варикозного расширения вен пиявками. *Научный альманах*. 2015; 11-4(13): 107-109.

66. Фримель Х., Ширгель Б. и др. Иммунологические методы : монографія / под ред. М. А. Фролова. Москва : Мир, 1979. 518 с.

67. Фролов О. К, Федотов Є. Р, Копійка В. В, Литвиненко Р. О, винахідники; Запорізький державний університет, патентовласник. Спосіб отримання антигенів із медичної п'явки. Патент Україна на корисну модель № u 201213751. 2013 червень 10.

68. Хиггинс К. Расшифровка клинических лабораторных анализов : руководство. М.: Бином.Лаборатория знаний, 2017. 592 с.

69. Фролов О. К., Копійка В. В., Федотов Є. Р., Литвиненко Р. О. Імунологія : навчально-методичний посібник до лабораторних занять для студентів освітньо-кваліфікаційного рівня «бакалавр» напряму підготовки «Біологія». Запоріжжя : ЗНУ, 2014. 83 с.

70. В. В. Меньшиков. Лабораторные методы исследования : справочник / под ред. В. В. Меньшикова. Москва : Медицина, 1987. 368 с.

71. Годин, А. М. Статистика : учебник. Москва : Дашков И. К , 2012. 451 с.

72. Фролов А. К., Арцимович Н. Г., Сохин А. А. Иммуноцитогенетика : учебное пособие. М.: Медицина, 1993. 240 с.

73. ДСТУ 2293-99. Охорона праці. Терміни та визначення. [Чинний від 2000-01-01]. К.: Держспоживстандарт України, 1999. 21 с.

74. ДСН 3.36.042 99. Стандартні норми мікроклімату виробничих приміщень. [Чинний від 1999-12-01]. Київ : МОЗ України, 1999. 10 с.

75. ДБН В.2.5-28-2006. 2006-10-01. Природне і штучне освітлення. Київ : МінБуд України, 2006. 128 с.

76. 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] : Держнагляд охорони праці України, 1996. 11 с.

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



## ДОДАТКИ

## Додаток А

Рівні РБТЛ стимульовані ФГА навантаженої БАР МП різної концентрації

