

**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 ЕКСТРАКТУ З ТКАНИН МЕДИЧНОЇ П'ЯВКИ НА
ЛЕЙКОЦИТАРНІ ПОКАЗНИКИ КРОВІ ЛАБОРАТОРНИХ ЩУРІВ В
УМОВАХ IN VITRO**

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

спеціальності 091 Біологія

освітньої програми Біологія

Русєва М. І.

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

Рецензент д.б.н., професор, зав. кафедри Домніч В.І.

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет біологічний

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

Рівень вищої освіти магістр

Спеціальність 091 Біологія

Освітня програма біологія

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри О.Г. Куш

« » _____ 20 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТЦІ

Русевій Марині Іванівні

1. Тема роботи Вплив екстракту з тканин медичної п'явки на лейкоцитарні показники крові лабораторних щурів в умовах in vitro
керівник роботи Литвиненко Раїса Олександрівна, доцент, к.б.н
затверджені наказом ЗНУ від «12» липня 2022 року № 835-с
2. Строк подання студентом роботи грудень 2022 року
3. Вихідні дані до роботи: монографії, довідкова література, підручники, наукові статті, за темою роботи.
4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити):
1) Проаналізувати загальну кількість лейкоцитів та лейкоцитарну формулу у інтактних лабораторних щурів старого віку та після гірудовпливу.
2) Проаналізувати вплив екстракту з тканин медичної п'явки виду *Hirudo verbana* в умовах in vitro на кількість лейкоцитів та лейкоцитарну формулу крові інтактних лабораторних щурів старого віку та після гірудовпливу.
3) Порівняти лейкоцитарні показники крові лабораторних щурів старого віку при гірудовпливі in vivo та in vitro.
5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень):
Табл. 3.1 – Лейкоцитарні показники крові лабораторних щурів старого віку при гірудовпливі in vivo. Табл. 3.2 – Лейкоцитарні показники спонтанних та антиген-стимульованих зразків крові лабораторних щурів старого віку при гірудовпливі в експерименті in vitro. Табл. 3.3 – Лейкоцитарні показники крові лабораторних щурів старого віку при гірудовпливі в умовах in vivo та in vitro.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання _____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Підбір методів дослідження	жовтень-грудень 2021	Виконано
2	Написання розділу «Охорона праці»	листопад 2021 — лютий 2022	Виконано
3	Формування бази даних	січень 2022 березень 2022	Виконано
4	Написання літературного огляду	квітень 2022	Виконано
5	Написання розділу «Матеріали та методи дослідження»	травень 2022	Виконано
6	Складання списку літератури	червень 2022	Виконано
7	Проведення статистичної обробки результатів дослідження, аналіз отриманих результатів.	вересень-жовтень 2022	Виконано
8	Написання розділу «Експериментальна частина», висновків, рекомендацій.	жовтень-листопад 2022	Виконано
9	Підготовка доповіді і оформлення документів до захисту	листопад 2022	Виконано
10	Попередній захист кваліфікаційної роботи	листопад 2022	Виконано
11	Представлення роботи до захисту	грудень 2022	Виконано

Студент _____ Русева М. І.

Керівник роботи _____ Литвиненко Р. О.

Нормоконтроль пройдено

Нормоконтролер _____ Гороховський Є. Ю.

РЕФЕРАТ

Робота викладена на 59 сторінках друкованого тексту, містить 4 таблиці та 1 рисунок. Список літератури включає 52 джерела, з яких 15 іноземних.

Об'єктом дослідження була артеріовенозна кров лабораторних щурів старого віку під дією біологічно активних речовин (БАР) медичної п'явки (МП) в умовах *in vivo* та *in vitro*.

Мета роботи: дослідити вплив екстракту з тканин медичної п'явки на лейкоцитарні показники крові лабораторних щурів в умовах *in vitro*.

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

Загальна кількість лейкоцитів крові контрольних інтактних тварин та дослідної групи лабораторних щурів старого віку після гірудовпливу без статистично значимих змін, відмічається достовірне зменшення відносного вмісту еозинофілів, нейтрофілів, збільшення моноцитів та лімфоцитів. В лабораторних щурів старого віку до та після гірудовпливу в умовах *in vitro* як відмінних від організму, відбувається руйнування клітин як в спонтанних, так і антигенстимульованих зразках, але при додаванні антигенів МП в більшій мірі, переважно за рахунок нейтрофілів, лімфоцити більш стійкі, оскільки реагують повільніше. Після гірудовпливу - кількість клітин знижується порівняно з вихідними даними, а при інкубації лейкоцити більш стійкі, порівняно з інтактною групою тварин, імовірно як наслідок появи сенсibilізованих до антигенів МП клітин.

Новизна роботи: полягає у тому, що доповнено дані про вплив БАР МП на лейкоцитарні показники лабораторних щурів старого віку.

ЕКСТРАКТ ТКАНИН МЕДИЧНОЇ П'ЯВКИ, БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ РЕЧОВИНИ, ЛІМФОЦИТИ, ЛЕЙКОЦИТАРНА ФОРМУЛА КРОВІ

ABSTRACT

The work is presented on 59 pages of printed text, contains 4 tables and 1 figure. The list of references includes 52 sources, of which 15 are foreign.

The object of the study was the arteriovenous blood of old laboratory rats under the influence of biologically active substances (BAS) of medical leech (ML) in vivo and in vitro conditions.

The purpose of the work: to investigate the effect of an extract from the tissues of a ML on leukocyte blood parameters of laboratory rats in vitro.

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

The total number of leukocytes in the blood of the control intact animals and the experimental group of laboratory rats of old age after hirudoinfluence without statistically significant changes, a significant decrease in the relative content of eosinophils, neutrophils, an increase in monocytes and lymphocytes is noted. In laboratory rats of old age before and after hirudoinfluence in vitro conditions as different from the body, destruction of cells occurs in both spontaneous and antigen-stimulated samples, but with added ML antigens in greater extent, mainly due to neutrophils, lymphocytes are more stable, because they react more slowly. After hirudoinfluence, the number of cells decreases compared to the initial data, and during incubation, leukocytes are more stable, compared to the intact group of animals, presumably as a result of the appearance of sensitized cells to ML antigens.

The novelty of the work is that the data on the influence of BAS of ML on leukocyte indicators of old laboratory rats have been supplemented.

MEDICAL LEECH TISSUE EXTRACT, BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES, LYMPHOCYTES, LEUCOCYTE BLOOD FORMULA

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ.....	8
ВСТУП.....	9
1 ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	11
1.1 Історія гірудотерапії.....	11
1.2 Загальна характеристика медичної п'явки.....	13
1.2.1 Види п'явок.....	13
1.3 Загальна характеристика біологічно активних речовин медичної п'явки та їх механізм дії.....	16
1.3.1 Класифікація біологічно активних речовин медичної п'явки	16
1.3.2 Механізми дії біологічно активних речовин медичної п'явки	18
1.3.3 Застосування гірудотерапії в медичній, ветеринарній, сільськогосподарській практиці та її супутній вплив	20
1.4 Загальний біологічний ефект гірудотерапії	21
2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	25
2.1 Матеріали та схема дослідження	25
2.2 Методи дослідження	26
2.2.1 Методика приготування сольового екстракту з тканин медичної п'явки	26
2.2.2 Методика проведення гірудовпливу лабораторним щурам <i>in vivo</i> та <i>in vitro</i>	26
2.2.3 Методика підрахунку кількості лейкоцитів пробірочним методом.....	27
2.2.4 Визначення лейкоцитарної формули крові.....	29
2.2.5 Статистична обробка експериментальних даних.....	31
3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	33
3.1 Лейкоцитарні показники крові лабораторних щурів старого віку при гірудовпливі <i>in vivo</i>	33

3.2 Лейкоцитарні показники спонтанних та антиген-стимульованих зразків крові лабораторних щурів старого віку при гірудовпливі в експерименті <i>in vitro</i>	35
3.3 Порівняльна характеристика лейкоцитарних показників лабораторних щурів старого віку при гірудовпливі <i>in vivo</i> та <i>in vitro</i>	38
4 ОХОРОНА ПРАЦІ	42
ВИСНОВКИ	52
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	53
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ	54

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І
ТЕРМІНІВ

БАР – біологічно активні речовини

ГТ – гірудотерапія

МП – медична п'явка

ВСТУП

Лікуванню медичними п'явками (гірудотерапія – ГТ) як додатковому методу лікування, що майже не має побічних ефектів, належить одне з провідних місць серед методів нетрадиційної медицини. Організм медичної п'явки (МП) продукує комплекс унікальних природних біологічно активних речовин (БАР) [1–4], для яких не потрібно витрат на виділення, очистку та засоби введення, всі БАР самовільно надходять до організму людини або тварини при укусі. Це дозволяє розглядати п'явку як ідеальний інструмент для вирішення широкого кола проблем. При постановці п'явок терапевтичний вплив здійснюється на кількох рівнях: крім усунення конкретного захворювання, ГТ сприяє підвищенню загальної резистенції організму, активізації імунної системи, забезпечує профілактику тромбозів, поліпшенню мікроциркуляції, стимуляцію внутрішньоклітинного обміну, має знеболювальну, антибактеріальну, протизапальну, антиатерогенну дію [1, 2, 5, 6].

За біологічною сутністю МП – кровосисні ектопаразити, що ведуть активний спосіб життя в пошуках своїх жертв, мають відповідну спеціалізацію: добре розвинену нервову систему, органи чуття, мускулатуру.

Секрет слинних залоз МП надає на організм багатофакторну дію, яка реалізується як місцево – на рівні мікроциркуляторного русла, так і системно – на рівні цілісного організму. До найважливіших складових секрету слинних залоз МП відносяться гірудин, дестабілізаза, оргелаза, антистазин, векорзин, калін, еглін, лізоцим, а також інгібітори трипсину та хімотрипсину та ін. [7].

Екстракт цілісних МП, що є джерелом БАР, все активніше застосовується при створенні нових лікарських засобів лікування периферичних порушень кровообігу [7, 8]. Імунотропні ефекти БАР МП досліджені недостатньо, тому актуальним залишається питання впливу комплексу біологічно активних речовин на лейкоцитарні показники крові в умовах *in vivo* та *in vitro*.

Мета роботи: дослідити вплив екстракту з тканин медичної п'явки на лейкоцитарні показники крові лабораторних щурів в умовах *in vitro*.

Для досягнення даної мети були висунуті наступні завдання:

1) проаналізувати кількість лейкоцитів та лейкоцитарну формулу у інтактних лабораторних щурів старого віку та після гірудовпливу;

2) проаналізувати вплив екстракту з тканин медичної п'явки виду *Hirudo verbana* в умовах *in vitro* на кількість лейкоцитів та лейкоцитарну формулу крові інтактних лабораторних щурів старого віку та після гірудовпливу;

3) порівняти лейкоцитарні показники крові лабораторних щурів старого віку при гірудовпливі *in vivo* та *in vitro*.

Об'єктом дослідження була артеріовенозна кров лабораторних щурів старого віку під дією БАР МП в умовах *in vivo* та *in vitro*.

Предмет дослідження — імунотропні ефекти БАР МП *in vivo* та *in vitro* у лабораторних щурів старого віку.

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

Теоретичне значення отриманих даних дає змогу в подальшій розробці теоретичних засад для фармацевтичних розробок імунологічних препаратів.

Практичне значення: отримані дані можуть бути використані при викладанні окремих тем із навчальних дисциплін «Загальна цитологія», «Великий практикум з імунології», «Лабораторні тварини», також моделювання результатів гірудотерапії.

1 ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Історія гірудотерапії

Лікування п'явками зародилось в глибокому минулому. Вірогідно, що доісторичні люди випадково помітили позитивний ефект, який слідує за укусом п'явки. Згадки о користі п'явок зустрічаються в персидських, давньоєврейських та давньо-індійських текстах. Оскільки протягом тисячоліть найбільш популярним засобом лікування багатьох захворювань був метод кровопускання, то гірудотерапія з початку сформувалася як одне з напрямлень цієї медичної методики [1, 9, 10].

Давньоримський вчений Пліній Старший (I століття до н.е.) перший з античних авторів звернув увагу на позитивні зміни в організмі людини, які виникають під впливом медичних п'явок.

Після Плінія можливості використання медичних п'явок вивчали Клавдій Гален (131 – 200 роки), Аеций (335 – 454 роки), Ібн Сина (Авіценна).

Спочатку кровопускання вважалось діючим методом лікування. Але коли медична практика, особливо в лікарнях, перейшла в руки монахів, цей вид лікування був заборонений.

В епоху Відродження медицині вернулися до прийомів гірудотерапії. Розквіт цього методу лікування приходить на кінець XVIII – початок XIX сторіччя, коли більшість вважала, що кровопускання може врятувати від неминучої смерті.

В першій половині XIX сторіччя виникає п'явководення. Це було пов'язано з майже повним зникненням п'явок в природних водоймах як наслідок перепромислу.

Ловля п'явок проводилася спеціалістами, які багато років присвятили цьому заняттю. Однак, незважаючи на професіоналізм ловців, з екологічної точки зору методи п'явководення залишалися нераціональними.

Нераціональна експлуатація даного ресурсу призвела до масового вимирання медичних п'явок в природному середовищі, а тому в цілях збереження виду та для того, щоб задовольнити зростаючий попит на них, деякі підприємці відкрили фабрики з розведення п'явок.

В ході медико-біологічних експериментів лікарям вдалося виявити, що людська кров в шлунку медичної п'явки протягом тривалого часу не згортається. Більше того, сама рана від укусу п'явки, змочена її слиною, кровоточить близько 6 годин, а іноді і до доби. Це навело на думку про надзвичайні властивості п'явочної слини.

Вперше о наявності в слині речовин, які протидіють згортанні крові, заявив професор К. Дьяконов в 1868 р.

В цьому ж році дослідник Дж. Хайкрафт отримав з тіла п'явки, а саме, з її головного кінця активний екстракт, з якого був виділений чистий антикоагулянт – гірудин.

Великий вклад в розвиток гірудотерапії внесли також і українські вчені. Співробітник Українського науково-дослідного інституту охорони материнства та дитинства В.В. Орлов в 1950 році провів вивчення позитивних результатів використання п'явок в акушерстві та гінекології.

У другій половині минулого століття в справі вивчення п'явок було досягнуто немало, хоча після 1950-х років науковий інтерес до гірудотерапії поступово угасав. Ця сумна подія мала свої об'єктивні причини. В той час медицина більше покладалася на хімічно синтезовані препарати, ніж на природні засоби [9 - 11].

В той же час довгострокове приймання антибіотиків та хіміотерапевтичних засобів викликає у багатьох серйозні порушення зі сторони різних органів та систем, зсуви в імунологічному статусі, ріст алергійних захворювань. Шкода тільки, що масштабне введення гірудотерапії в широку медичну практику йде повільно, так як потребує індивідуального підходу до хворого.

Завдяки науковим досягненням останнього часу вчені дали чітке наукове обґрунтування метода, виділили з слини МП цілий комплекс БАР, які здійснюють лікувальний ефект та корисні для організму людини. Ці речовини, потрапляючи до організму людини, проявляють не тільки знеболюючу, протизапальну дію та дію проти набряків, але й знижують вірогідність утворення тромбів, активують мікроциркуляторну динаміку крові та лімфи.

В самий останній час стало доведеним фактом, що гірудотерапія, проведена належним чином, стабілізує та укріплює імунну систему людини в цілому [5, 6, 11].

1.2 Загальна характеристика медичної п'явки

1.2.1 Види п'явок

Положення медичної п'явки в класифікації тварин:

Царство Тварини – *Animalia*.

Підцарство Багатоклітинні – *Metazoa*.

Надрозділ Справжні багатоклітинні – *Eumetazoa*.

Розділ Білатеральні або тришарові – *Bilateria seu Triploblastica*.

Підрозділ Целомічні – *Coelomata*.

Тип Кільчасті хробаки – *Annelida*.

Підтип Пояскові – *Clitellata*.

Клас П'явки – *Hirudinea*.

Підклас Справжні п'явки – *Euhirudinea*.

Ряд Щелепні п'явки – *Gnathobdellida*.

Рід П'явки – *Hirudo*.

Види:

П'явка медична – *Hirudo medicinalis*.

П'явка аптекарська - *Hirudo verbana*;

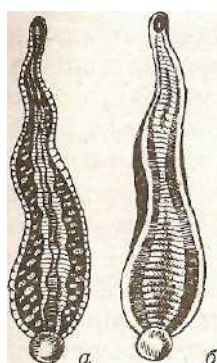
П'явка східна - *Hirudo orientalis*;

Усього на земній кулі існує близько 400 видів п'явок, в країнах СНД – близько 80 видів [12 - 15]. Для гірудотерапії в країнах СНД застосовують переважно п'явки медичні (*H. medicinalis*) і аптечні (*H. verbana*) [1, 12].

Найбільш поширені види:

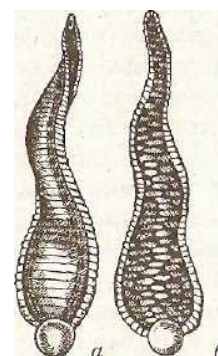
- аптечна медична п'явка (*H. verbana*), рис. 1.1. Її відмінні зовнішні ознаки: черевце позбавлене чорних плям, замість них - дві чорні смуги, розташовані по краях. На спині особливо ясно виділяються дві жовтогарячі смуги із правильно повторюваними розширеннями. Ця форма п'явки зустрічається в Молдавії та Вірменії [5, 11];

- лікувальна медична п'явка (*H. medicinalis*), рис. 1.2. Відмінні зовнішні ознаки: черевце в більшій або меншій мірі покрите чорними плямами неправильної форми; уздовж спини тягнуться вузькі жовтогарячі смуги з незначними правильно повторюваними розширеннями, на яких розташовуються чорні плями які мають форму каплі або булави. Раніше її виловлювали в більших кількостях на Україні, тому серед практиків вона відома під назвою «Українка» [5, 6, 9].



а - зі спини; б - із черевця

1



а - зі спини; б - із черевця

2

Рисунок 1.1 - Медична п'явка: 1 — аптечна, 2 — лікувальна [1]

Багаторічні спостереження довели, що в медицині обидві форми п'явки можуть застосовуватися однаково успішно.

Як було доведено на дослідах, лікувальні й аптекарська медичні п'явки легко схрещуються й дають потомство, що відрізняється більшою життєстійкістю. У природі обидві ці форми рідко зустрічаються разом, однак можливість їхнього схрещування в природних умовах не виключена.

Основне забарвлення медичних п'явок оливково-зелена. У різних форм вона має різні відтінки (більше сірого або більше зеленого кольору). Тіло медичної п'явки не гладке. По його поверхні проходять поперечні борозенки, які називаються кільцями. Усього в медичної п'явки нараховують 102 кільця.

Поверхня кілець на черевці й, головним чином, на спині покрита маленькими сосочками [9, 12, 13, 15].

Одна з характерних зовнішніх ознак всіх п'явок - наявність у них двох присосок. Одна називається ротовою, а інша - задньою присоскою, за допомогою якої п'явка може прикріплюватися або просуватися вперед. Задню присоску добре видно у будь-якому положенні й стані п'явки, передня позначається тільки тоді, коли п'явка ссе кров або прикріплюється переднім кінцем до якого-небудь предмета. У глибині передньої присоски розташований ротовий отвір із трьома розбіжними по радіусах щелепами у формі маленьких пилок з 90 зубчиками, якими п'явка прокушує шкіру. Задньопрохідний отвір, або порошиця, відкривається на спинній стороні тіла практично біля заднього присоска. На черевці, ближче до переднього кінця, розташовуються одне за іншим два статевих отвори - чоловіче й жіноче. П'явки є двостатевими істотами, або гермафродитами; це значить, що вони одночасно мають чоловічі й жіночі статеві органи. Крім цього на черевній стороні п'явки відкривається 17 пара надзвичайно малих сечових отворів [12, 14, 15].

1.3 Загальна характеристика біологічно активних речовин медичної п'явки та їх механізм дії

1.3.1 Класифікація біологічно активних речовин медичної п'явки

Позитивна дія гірудотерапії БАР, продукуючими МП й виділяючими ними в кров'яне русло при кровосмоктанні. До складу БАР слини МП входить понад 100 компонентів. Найбільш вивченими є наступні БАР.

Гіалуронідаза - фермент, каталізуючий реакції гідролітичного розщеплення й деполімеризації гіалуронової кислоти й родинних їй з'єднань - кислих глікоз-аміногліканів. Цей фермент широко розповсюджений в живій природі: в отрутах змій і павуків, екстрактах сім'яників людини, у деяких бактерій, в екстрактах п'явок. Гіалуронідаза визначає пристосувальну особливість п'явок до харчування кров'ю. Як відомо, гіалуронідаза слугує так званим фактором поширення, що змінює ступінь гідратації тканин, транспорт води й різних іонів. Вона полегшує проникнення в організм різних речовин, збільшуючи проникність тканин, стінок капілярів у результаті деполімеризації й розщеплення гіалуронової кислоти - одного з компонентів основної речовини сполучної тканини, що виконує роль цементуючого агента [11, 16].

Гірудин – це речовина, яка уповільнює згортання крові. До відкриття гепарину екстракти з головної частини п'явок широко використовувалися як антикоагулянт. Винятково висока специфічність гірудину стосовно тромбіну вигідно відрізняє його від інших природних інгібіторів цього ферменту: антитромбіну III й гепарину. У порівнянні з рядом синтетичних інгібіторів тромбіну гірудин являє собою ідеальний інгібітор цього ферменту.

Також у присутності гірудину сповільнюється реакція активації тромбіном факторів згортання V, VIII, XIII. Гірудин перешкоджає реакції вивільнення й агрегації тромбоцитів, інгібіруючи зв'язування тромбіну кров'яними пластинками. Гірудин викликає дисоціацію комплексу тромбіну зі специфічними білками - рецепторами на тромбоцитах, тому що у тромбіну

спорідненість до гірудину вище. Він позбавляє тромбін здатності підвищувати антикоагуляційний і фібринолітичний потенціали крові. Препарати гірудину не токсичні.

При виділенні гірудину із цільних медичних п'явок йому супроводжує неактивний компонент із тіл п'явок, названий псевдогірудином. На відміну від гірудину, що містить на N-кінці молекули ізoleyцину, псевдогірудин на N-кінці має валін. Молекулярна маса псевдогірудину 5000 D.

Бделіни - інгібітори трипсину й плазміну. Вони являють собою поліпептиди з молекулярною масою 7000 (група А) і 5600 (група В) D. Бделіни інгібірують амідолітичну активність трипсину, плазміну, а також акрозину. [14, 17, 18]

Егліни вперше виявлені в складі комерційних препаратів гірудину поряд із бделінами. Вони представляють групу поліпептидів з молекулярною масою 6600-6800 D. Егліни інгібірують α -хімотрипсин, субтілизин і нейтральні протеази гранулоцитів людини - еластазу й катепсин G - і утворюють із цими протеазами міцні комплекси. При деяких патологічних станах (ревматоїдний артрит, подагра, емфізема легені та ін.) спостерігається підвищення активності катепсинів у тканинах, що пов'язане з вивільненням ферментів з лізосом. Еластаза й катепсин G відносяться до групи серинових протеаз, активних у нейтральному середовищі. Еластаза, гідролізуюча еластин і катепсин G, виділені з поліморфно-ядерних лейкоцитів, макрофагів та ін. Вони розщеплюють протеоглікани, колаген і ряд інших білків. Інгібітори цих протеаз здатні знижувати запальну відповідь. Біологічна цінність цих інгібіторів залежить від їхньої здатності блокувати активність лейкоцитарних протеаз, виділюваних при запаленнях [1, 14, 16].

Егліни отримані в чистому виді, їхній склад і фізико-хімічні властивості досить добре вивчені. У первинній структурі егліна С налічується 70 амінокислотних залишків, їхня особливість полягає у відсутності дисульфідних зв'язків і залишків метіоніну, ізoleyцину та триптофану.

Дестабілаза вперше була виявлена в складі секрету слинних залоз *Hirudo medicinalis* в 1986 р. Фермент проявляє фібринолітичну (тромболітичну) активність за допомогою гідролізу ізопептидних зв'язків, утворених при стабілізації фібрину в присутності фактора XIII згортання крові, обумовлюючи нетрадиційний механізм фібринолізу. Дестабілаза, що представляє собою міцний білокліпідний комплекс, володіє високою агрегаційною здатністю [14, 16].

Для того щоб з'ясувати, яку роль секрет слинних залоз п'явок відіграє в забезпеченні лікувального ефекту ГТ, необхідно одержати чистий препарат речовини. В результаті проведених дослідів було виявлено, що секрет, крім антитромбінної, проявляє антитриптичну активність, тобто до складу секрету входять гірудин і бделіни. Активність еглінів виявлена в крові, що втримується в травному каналі п'явки [14, 16].

1.3.2 Механізми дії біологічно активних речовин медичної п'явки

БАР, які продукуються МП, забезпечують:

- протитромботичну дію. Блокують тромбоцитарно-судинні та плазмені ланки внутрішнього механізму згортання крові, а також плазмені ланки гемостатичного процесу на більше пізніх стадіях його розвитку й таким чином перешкоджають тромбоутворенню [19];

- тромболітичну дію. Цікавий механізм розчинення тромбів: БАР впливають тільки на сформовані («старі») фібринові згустки, у яких полімери фібрину прошиті ізопептидними зв'язками. Існує гіпотеза, що дестабілазний комплекс адсорбується і на новостворених («молодих») тромбах, стимулюючи їх міцне закріплення на судинній стінці й швидкій стабілізацію і лише згодом починаючи «плавне» розчинення сформованого тромбу [2, 6, 17];

- гіпотензивну дію. Вірніше, «нормотензивна» дія, обумовлене в першу чергу низькомолекулярними речовинами простагландинової природи. Парадоксальність подібного впливу визначається тим, що БАР, які продукуються медичними п'явками, нормалізують підвищений або знижений артеріальний тиск. Механізм дії в теперішній час вивчається, однак можна припустити, що зменшення тиску обумовлене стабільним аналогом простацикліну, а збільшення - речовинами, що володіють кіниназною активністю (природа цих речовин в теперішній час не ідентифікована);

- репаративний вплив на ушкоджену стінку кров'яного русла. Відновлення атромбогенової поверхні кров'яного русла;

- антиатерогенну дію. БАР активно втручаються в процеси обміну ліпідів, приводячи його до нормальних умов функціонування; знижують рівень холестерину й триглицеридів у крові, забезпечують регрес атероматозних бляшок [19];

- антигіпоксичну дію. Підвищення відсотку виживання в умовах зниженого вмісту кисню (гіпоксія), що є немаловажливим чинником для виношування плоду при вагітності, ускладненої рядом патологічних процесів;

- імуностимулюючу дію. 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 [13, 15, 17];

- анальгезивну дію. Знеболювання як у місці постановки п'явок, так і результату загальноорганного впливу.

- захисну дію. П'явки нейтралізують агресивну дію мутагенів (радіоактивні опромінювання, активні сонячні промені та ін.), стимулюючи ефект суперметилування ДНК [2, 6, 17].

1.3.3 Застосування гірудотерапії в медичній, ветеринарній, сільськогосподарській практиці та її супутній вплив

Використання МП при ГТ обумовлено широким спектром терапевтичної дії [1, 2, 6, 8, 11, 15, 16]. Так, ГТ та фармакологічні препарати на основі секрету слинних залоз МП ефективно використовують із метою лікування та профілактики в дерматології – для лікування хронічних дерматозів, лейоміоми шкіри, псоріазу, в кардіології – при комплексному лікуванні серцевої недостатності, гіпертонічної хвороби, інфекційного міокардиту, кардіалгії, стенокардії, в офтальмології – для лікування глаукоми, геморагічно-фібриноїдного синдрому, в оториноларингології – при гострій сенсоневральній приглухуватості, гострих та хронічних захворюваннях середнього та внутрішнього вуха, в травматології – при радикулопатіях, артритих, остеохондрозах, артрозах, у невропатології – при цереброваскулярних захворюваннях, у гінекології – при ендометріозі, міомі матки, хронічних запаленнях придатків, у терапії – при нефритах, діабетичній стопі, в ендокринології – при діабеті, в хірургії – при лікуванні тромбофлебітів, варикозу та інших судинних розладів, в стоматології – при хронічних та дистрофічних захворюваннях слинних залоз, при стоматитах, альвеолітах, пульпітах та ін. Також ефективно застосування ГТ у педіатрії, в психотерапії, для усунення проявів алергії [5, 15-18].

На даному етапі у ветеринарній практиці спостерігається гуманізація з приводу використання великої кількості хіміотерапевтичних та гормональних засобів і методів корекції. Це зумовлено тим, що будь-який лікувальний препарат, який використовують тваринам потрапляє в екологічну систему, включається в неї та впливає на її життєздатність, а потім впливає і на людину. Тому пошук екологічно чистих та ефективних методів корекції в ветеринарній практиці також є доволі актуальним. Біологи та екологи часто спостерігають як дикі водопійні тварини, зокрема копитні, ведуть активний пошук водоймищ, де

водяться МП, входять у них і стоять, даючи змогу МП їх кусати та харчуватись. Отримане при цьому полегшення фізіологічного стану інстинктивно закріпилося в них у наступній поведінці. Цьому сприяла позитивна сумісна еволюції МП та копитних. Але сучасний спосіб тваринництва з його стійловим утриманням порушив цей позитивний взаємозв'язок. Результатом чого є підвищення частоти вірусних, бактеріальних та паразитарних захворювань [6, 11, 19].

ГТ у ветеринарії застосовується при різних захворюваннях собак, котів, коней, наприклад, для лікування маститів і підвищення репродуктивної здатності корів, при лікуванні захворювань коней та інших сільськогосподарських та домашніх тварин [19].

Дослідження щодо ефективності ГТ при розведенні кіз показали її позитивний вплив на загальний стан (підвищення апетиту, покращення стану шерстяного покриву, зникнення тріщин на рогах та копитах), продуктивність (масу тіла, надої) та репродуктивну здатність (кількість та масу тіла приплоду) кіз. За даними О. К. Фролова та співавторів, ГТ у кіз супроводжувалась міграційним перерозподілом лімфоцитів крові з тимчасовим їх депонуванням у місцях приставки МП, підвищенням фагоцитарної активності нейтрофілів [21]. Гірудопунктура не має негативного впливу на фізіологічний стан організму здорових корів, вона викликає тимчасові зміни морфологічного та біохімічного складу крові тварин [5, 20].

1.4 Загальний біологічний ефект гірудотерапії

Слина п'явки, потрапляючи до організму, активує механізми інгібування тромбоцитарно-судинної і плазменної ланок гемостазу, блокує утворення гемостатичного тромбу [3, 14]. В пошкоджених шкіряних судинах вона викликає тимчасове незгортання крові. Порівняльний аналіз результатів

дослідження крові, взятої з ліктьової вени до використання п'явок і після їх відпадання, проведений Г. С. Ісаханяном із співавторами, дозволив виявити неоднотипові зміни властивостей крові, яка коагулюється: у одних хворих гірудинізація сприяє зниженню зсідання, в інших – його підвищенню. Більш того, деякі показники коагуляції у того самого хворого змінюються різноспрямовано. Проте, виявлена відповідна закономірність: при вихідному стані гіперкоагуляції використання п'явок сприяло активації системи протизгортання, а вихідна гіпокоагуляція супроводжувалася підвищенням згортання крові [16, 18].

Таким чином, при використанні п'явок створюється можливість впливу на згортання крові. Слина п'явки, блокуючи гемостаз у судинах ранки, сприяє рясній кровотечі. Набирають сили компенсаторні механізми, перешкоджаючи зменшенню циркулюючої кількості крові, та підвищуючі її активність до згортання. З іншого боку, частина слини потрапляє в циркулюючу кров і перешкоджає її згортанню. Відбувається корекція порушених властивостей згортання крові [16, 18].

Достовірне зниження в крові рівня холестерину і триглицеридів, є доказом наявності в слині тварини речовин противосклеротичної дії .

При гіпертонічній хворобі п'явок рекомендують ставити на соскоподібні відростки, з огляду на нервоворефлекторний шлях лікувального впливу [16, 17]. При цьому також відбувається часткове надходження гірудину в циркулюючу кров. На нормальний артеріальний тиск (АТ) гірудотерапія не впливає. Гіпотензивна дія при призначенні п'явок з області правого підребер'я виражена, якщо в хворих є хронічна серцева (або легенево-серцева) недостатність. При призначенні п'явок з передсердної зони хворим ІХС, діастолічний АТ не змінюється, тоді як сістолічний вірогідно знижується.

Впливом БАР та МП на рівень тиску у хворих проводили лікарі: Р.Б. Волк, С.Д. Заславська, Н.А. Куршаков, Г.Ф. Ланг, Є.М. Тарєєв, Л.І. Фогельсон та інші [21-23]. Найбільш це питання опрацьоване Р.Б. Волком, який виявив основні стани та форми хвороби, при яких потребується

крововилучення за допомогою п'явок. Відзначається поліпшення самопочуття хворих, коронарного кровотоку, крово- і лімфотоку, купіровання болю в області серця, зменшення задишки. Гірудотерапія поліпшує скорочувальну функцію міокарда, чинить гіпотензивну, антисклеротичну, нормалізуючу згортання крові дію.

Позитивні результати досягнуті в корекції системи згортання і фибринолізу при гірудотерапії інфекційного міокардиту. Позитивну дію п'явок на інфарктних та предінфарктних хворих вивчають до тепер [23, 24].

Відомий клініцист Г.А. Захар'їн рекомендував застосовувати п'явок при носових, горлових кровотечіях різної етіології, при кровохарканні туберкульозного та застоїного характеру, при геморої [1].

Критеріями ефективності гірудотерапії при лікуванні дерматозів є поліпшення загального стану, зникнення або зменшення запальних явищ, набрякості, сверблячки, печіння, хворобливості, розсмоктування інфільтратів і тромбів вен та венозних вузлів, зменшення пігментації на гомілках при варикозному симптомокомплексі, збільшення діурезу [22]. Медичних п'явок застосовували при псоріазі, вульгарній, тумідній та червоній вовчанці, склеродермії, хронічній формі екземи, фурункульозі.

Завдяки виключним властивостям секрету слинних залоз медичної п'явки у гінекологічних пацієнток відбувається нормалізація ШОЕ, розсмоктування інфільтратів, зниження температури, зрівняно швидке одужання. Позитивний ефект гірудотерапії виявлений при полових розладах та клімаксі [2, 22].

Застосування гірудотерапії сприяє поліпшенню результатів консервативного лікування післяопераційного інфільтрату у дітей: скорочує його тривалість у 2 рази, зменшує частоту розвитку нагноєння. Клінічні спостереження [24] показують, якщо на другу добу після застосування п'явок післяопераційний інфільтрат не зменшується, біль не слабшає, температура тіла не знижується, варто припускати розвиток нагноєння. Цю ознаку можна використовувати як додатковий симптом, що свідчить про абсцидування інфільтрату.

Гірудотерапію використовують також у травматології при трансплантації шкіри. Одразу після операції п'явки ставлять на критичні місця шкіряного лоскута та шви [25].

Позитивно оцінюють лікування п'явками глаукоми, катаракти, іриту, травматичних пошкоджень очей та ряду інших очних захворювань [14]. Непогані результати лікування цих захворювань вперше були отримані лікарем А.В. Глазек та її помічниками в кінці 1940-х - початку 1950-х рр. у лікарні «Медп'явка» [25].

При ряді захворювань нервової системи: паралічі різних нервів, атеросклерозі судин мозку, крововиливу у мозок, струсі мозку, контузії головного мозку, тромбозі головних судин, мігрені та інше, застосування гірудотерапії приводило до покращення загального самопочуття, сну, апетиту, зміни складу крові, зменшенню чи припиненню болю [16].

Препарат Піявіт, що містить БАР медичних п'явок – гіалуронідазу, ліпазу, дастабілазу, гірудин і простаноїди, застосовувався для корекції порушень коагуляційного потенціалу крові і тромбоцитарного гемостазу хворими нефритом. Зміни функціональних властивостей тромбоцитів і еритроцитів при нефритах є однією з ланок патогенезу гломерулонефриту, і відіграють важливу роль у процесах інтрагломерулярної коагуляції. Ступінь агрегації тромбоцитів збільшується при значному підвищенні АТ. Більш значна агрегаційна активність тромбоцитів при запальних захворюваннях нирок аутоімунного генезу грає негативну роль у інфільтративних процесах. При призначенні піявіту зменшується швидкість агрегації тромбоцитів, індекс агрегації тромбоцитів, знижується систолічний і діастолічний АТ, спостерігається протизапальний ефект [2, 18].

Таким чином, аналіз даних доступної літератури виявив, що гірудотерапія чинить позитивний фізіологічний ефект на організм людини [3 – 5].

2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Матеріали та схема дослідження

Експериментальні дослідження проведені на 16 нелінійних лабораторних щурах-самцях старого віку (20-24 місяці, середня вага 250-300 г), які утримувалися в стандартних умовах віварію біологічного факультету Запорізького національного університету. Схема дослідження включала вивчення дії БАР слини МП *in vivo* та тканинних екстрактів з тіл МП в умовах *in vitro*. Лабораторні щури були розподілені на 2 групи: 1) контрольна група – інтактні щури (n=8); 2) дослідна група щурів (n=8), яким здійснювали гірудовплив – триразову приставку по 1 голодній МП з інтервалом 2 доби. Показники імунної системи досліджували через 2 тижні після останнього сеансу гірудовпливу.

Дослідження виконували з дотриманням регламентованих норм і правил поводження з лабораторними тваринами [26–28].

Для проведення гірудовпливу та приготування тканинних екстрактів використовували голодних МП виду *Hirudo verbana* (термін голодування не менше 4 місяців), вирощених на базі навчально-науково-дослідної лабораторії клітинної та організменної біотехнології Запорізького національного університету [29].

Результат гірудовпливу *in vivo* у лабораторних щурів старого віку визначали через 2 тижні після останньої приставки МП.

Ефект гірудовпливу *in vitro* досліджували на ізольованих зразках крові лабораторних щурів інтактною групи (контроль) та дослідної (після гірудовпливу).

Тварин декапітували, збирали артеріовенозну кров, стабілізували гепарином (200 мкг/мл) [30], досліджували загальну кількість лейкоцитів та лейкоцитарну формулу крові у мазку.

2.2 Методи дослідження

2.2.1 Методика приготування сольового екстракту з тканин медичної п'явки

Готували сольовий екстракт із тіл кільцеців [31, 32]. Для приготування екстракту брали МП виду *H. verbana*, який використовували і для гірудовпливу. Сольовий екстракт отримували за запатентованою методикою [31]. Брали 40 МП віком 7-8 місяців, які голодували понад 4 місяці, їх тіла фрагментували ножицями та промивали забуференим (рН 7,2) фізрозчином (ЗФР) від залишків крові в органах системи травлення. Далі частки кільцеців фрагментували у фарфоровій ступці з кварцевим піском. В тканинний гомогенат додавали ЗФР у співвідношенні 1:10 і екстрагували в холодильнику протягом доби при 4 °С із періодичним струшуванням. 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, ампулювали в мікропробірках для зберігання при температурі -20 °С до використання [31].

2.2.2 Методика проведення гірудовпливу лабораторним щурам *in vivo* та *in vitro*

Дослід ставили в II етапи:

На I-му етапі моделювали гірудовплив тваринам дослідної групи *in vivo*.

Моделювання гірудовпливу здійснювали шляхом приставки МП в загривковій ділянці (голили хутро) при короткочасному фіксуванні тварини (до 5 хв.). В шприц вносили для постановки 2 МП, але після присмокування однієї з них, іншу знімали, таким чином годувалась 1 МП до 30 хв. Після відпадання

МП ранку присипали стерильною крейдою, тварин відсаджували в окремі клітки до загоєння рани.

Контрольна група тварин гірудовплив не оримувала.

В артеріовенозній крові визначали кількість лейкоцитів і підготовлювали мазки для визначення лейкоцитарної формули крові. Мазки маркували, як «контрольні» (К).

На II-му етапі вивчали вплив екстрактів із тканин медичної п'явки на ізольовані зразки крові (in vitro).

Після отримання гепаринізованої крові (200 мкг/мл), визначали кількість лейкоцитів і підготовлювали мазки для визначення лейкоцитарної формули крові. Вихідні мазки маркували як «інтактні».

Далі кров кожної тварини інтактною групи щурів старого віку (n=8) та після гірудовпливу (n=8) розливали в мікропробірки (V=1мл) по 200 мкл і ділили на 2 зразки: 1-й зразок культивували на протязі 2-х годин без додавання антигенів, його маркували як «спонтанний» (СП, слугував контролем); в 2-й зразок крові додавали по 60 мкг/мл сольового екстракту антигенів *Hirudo verbana*, які містили БАР. Такі зразки маркували як АГ МП. Зразки кожного виду (СП, АГ МП) повторяли тричі і культивували при t 37 °С впродовж 2 годин. По завершенню часу визначали кількість лейкоцитів і готували мазки для визначення лейкоцитарної формули крові.

На кожному етапі досліджено загальну кількість лейкоцитів та лейкоцитарну формулу крові за загальноприйнятою методикою [30].

2.2.3 Методика підрахунку кількості лейкоцитів пробірочним методом

Підрахунок лейкоцитів здійснювали під мікроскопом у певній кількості квадратів рахункової сітки і перерахунок на 1мкл крові (або 1 л по системі СІ), виходячи з обсягу квадратів і розведення крові [33, 34, 35].

Реактиви. 5% розчин оцтової кислоти, підфарбований декількома краплями розчину метиленового синього (для забарвлення ядер лейкоцитів). Розчин блакитного кольору, довгостроково придатний до використання.

Хід визначення. Розводять досліджувану кров у 20 раз, для цього в суху пробірку наливають 0,4 мл оцтової кислоти. Набирають з пальця (у людини) 0,02 мл крові (можна використовувати стабілізовану антикоагулянтном венозну кров; використовували артеріовенозну кров щурів після декапітації). Кінчик піпетки витирають фільтрувальним папером або марлею, стежачи за тим, щоб з піпетки кров не вилілася. Кров видувають з піпетки на дно пробірки, ретельно перемішують (повторно набираючи і видуваючи суміш крові з оцтовою кислотою). Маркують пробірку і залишають до моменту рахунку (допускається рахунок лейкоцитів не більше ніж через 2-4 год після взяття крові).

Готують лічильну камеру: протирають насухо камеру з сіткою та покривне скло, потім притирають скло до камери, злегка надавлюючи його таким чином, щоб по краях скла з'явилися райдужні кільця чи смуги (це свідчить про висоту камери - 0,1 мм). Заповнюють лічильну камеру розведеною кров'ю: попередньо струшують кілька разів вміст пробірки, потім пастерівською піпеткою або скляною паличкою відбирають краплю розведеної крові і підносять її до краю покривного скла, стежачи за тим, щоб кров без бульбашок повітря рівномірно заповнила всю поверхню сітки, не затікаючи в борозенки. Заповнену камеру залишають у горизонтальному положенні на 1 хв (для осідання лейкоцитів). Не змінюючи горизонтального положення камери, поміщають її на стіл і до мікроскопа і підраховують лейкоцити в 100 великих квадратах з малим збільшенням (окуляр 10×, об'єктив 8×). Для більшої точності рахунок лейкоцитів проводять по всій сітці у великих квадратах (не розділених на малі квадрати і смуги), починаючи з лівого верхнього кута сітки. Для кращого контрастування затемнюють поле зору, опускаючи конденсор і закриваючи діафрагму. Враховують клітини, розташовані всередині квадрата і лежать на будь-яких двох лініях (щоб двічі не підрахувати одну клітину).

Розрахунок числа лейкоцитів проводять, виходячи з розведення крові (20), числа з лічених квадратів (100) і обсягу одного великого квадрата.

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

де X – кількість лейкоцитів в 1мкл крові; a – кількість лейкоцитів у 100 великих квадратах.

Практично кількість полічених лейкоцитів множать на 50.

Загальна кількість лейкоцитів в нормі у крові лабораторних щурів складає має бути від $7,3-14,3 \times 10^9/\text{л}$ [36].

2.2.4 Визначення лейкоцитарної формули крові

В мазках крові, приготованих стандартним способом та забарвлених за методом Романовського-Гімза – фарбування різних елементів клітин в різні кольори і відтінки сумішшю основних (азур II) і кислих (водорозчинний жовтий еозин) фарб [35], аналізували не менше 200 лейкоцитів.

Підрахунок клітин здійснювали з урахуванням особливостей їхньої морфології. Відносний вміст клітин лейкограми визначали у мазках крові, які фарбували, та виражали у відсотках (за формулою 2.2), абсолютний вміст розраховували відповідно до відсотку їх вмісту в лейкограмі за формулою 2.3.

$$\text{Відносна кільк. лейкоцитів (\%)} = \frac{\text{кільк. кл. популяції (шт.)} \times 100\%}{200}, \quad (2.2)$$

$$\text{Абсол. кільк. лейкоцитів (Г / л)} = \frac{\text{загальна кільк. лейкоцитів} \times \% \text{ кільк. кл. популяції}}{100\%} \quad (2.3)$$

Характеристика лейкоцитів крові щурів представлена в табл. 2.1.

Таблиця 2.1 - Характеристика різних видів лейкоцитів здорових лабораторних щурів [36 – 38]

Вигляд	Нейтрофіли		Еозинофіли	Базофіли	Лімфоцити	Моноцити
	Паличкоядерні	Сегментоядерні				
Кількість в %	1 – 4	13 – 30	0,5 – 5	0 – 1	55 – 75	1 – 2
В 1 мкл	40 – 300	1460 – 2550	80 – 450	0 – 20	1200 – 3000	80 – 450
Г/л						
Розмір клітини	10 – 15	10 – 15	12 – 15	8 – 12	8 – 10	15 – 20
Ядро: форма	Вузьке, у вигляді палички або кільця	Вузьке, з 3 – 5 сегментів	Ширше, 2 – 3 сегмента	У вигляді листка рослини	Кругле або бобоподібне	Поліморфне: кругле, бобовидне
Структура	Нерівномірна, крупно глибока					Рівномірна сітчаста
Колір	темно-фіолетова		фіолетова		темно-фіолетова	світло-фіолетова
Цитоплазма	Рожева	Рожева	Блідо-рожева	Блідо-рожева з розмитими ділянками	У вигляді вузького обідка інколи блакитна	Блідо-блакитна або сірувата

2.2.5 Статистична обробка експериментальних даних

Статистичну обробку результатів проводили методом обчислення середньої арифметичної, помилки середньої арифметичної середнього квадратичного відхилення за допомогою комп'ютерних програм SPSS v. 23.0 та Microsoft Office Excel 2022 [39, 40].

Результати експерименту обраховані методами варіаційної статистики.

Середнє арифметичне знаходили за формулою:

$$\bar{X} = \frac{\sum x}{n}, \quad (2.4)$$

де x – результат вимірювання признаку у кожного об'єкту;

n – об'єм групи.

Помилка середнього арифметичного встановлюється за формулою:

$$m = \frac{\sigma}{n}, \quad (2.5)$$

де σ – середнє квадратичне відхилення;

n – загальна кількість варіантів.

Середнє квадратичне відхилення обчислюється за формулою:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{X})^2}{n - 1}}, \quad (2.6)$$

де $(x - \bar{X})^2$ – квадрати відхилень;

$n - 1$ – кількість варіантів.

Достовірні межі знаходили за формулою:

$$\bar{X} \pm 1,96 \times m, \quad (2.7)$$

де \bar{X} – середнє арифметичне;

m – помилка середнього арифметичного;

1,96 – коефіцієнт при достовірності 95%.

Різниця між двома середніми значеннями:

$$d = \bar{X}_1 - \bar{X}_2, \quad (2.8)$$

Середня помилка значущості:

$$md = \sqrt{m_1^2 - m_2^2}, \quad (2.9)$$

Нормоване відхилення різниці:

$$td = \frac{d}{md}, \quad (2.10)$$

Перевірка достовірності і відмінності між досліджуваними показниками проводилась за t-критерієм Ст'юдента.

У біологічних дослідженнях із застосуванням методів статистичної обробки даних завжди застосовують поняття ймовірності і значимості.

Вимагання надійності (ймовірності безпомилкових прогнозів) у біологічних дослідженнях відповідають імовірності 0,95 (рівень значимості $p < 0,05$), підвищені вимоги надійності при перевірочних дослідах – імовірності 0,99 (рівень значимості $p < 0,01$), високі вимоги надійності при вирішенні спірних питань і при дослідженні шкідливих і отруйних речовин – 0,999 (рівень значимості $p < 0,001$) [40].

3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1 Лейкоцитарні показники крові лабораторних щурів старого віку при гірудовпливі *in vivo*

Середні показники загальної кількості лейкоцитів та лейкоцитарної формули крові контрольної (інтактні тварини) та дослідної (гірудовплив) групи лабораторних щурів старого віку представлені в таблиці 3.1.

Так, у контролі при дослідженні загальної кількості лейкоцитів крові виявлено середнє значення $8,00 \pm 0,25$ Г/л, у тварин через 2 тижні після гірудовпливу (дослідна група) виявлено середнє значення $8,58 \pm 0,21$ Г/л (таблиця 3.1), що є статистично середнім нормальним значенням [36, 38].

При дослідженні відносного вмісту показників лейкоцитарної формули крові виявлено наступні особливості: середнє значення еозинофілів у контрольній групі тварин становило $4,06 \pm 0,41\%$, у тварин дослідної групи $2,75 \pm 0,23\%$ і статистично значиме зменшення у 1,5 рази від контролю при $p < 0,05$; середнє значення нейтрофілів у контролі $41,81 \pm 1,24\%$, в досліді $35,81 \pm 1,79\%$ - статистично значиме зниження на 15% від контролю при $p < 0,05$; середнє значення моноцитів у контролі $3,81 \pm 0,28\%$, в досліді $7,94 \pm 0,58\%$ - статистично значимо збільшено у 2 рази від контролю при $p < 0,05$; середня кількість лімфоцитів у контролі $50,31 \pm 1,58\%$, в досліді $53,50 \pm 1,70\%$ – статистично значимо не відрізняється від контролю ($p > 0,05$).

Досліджуючи абсолютні значення показників лейкоцитарної формули, було виявлено середнє значення еозинофілів в контролі $0,33 \pm 0,04$ Г/л, в дослідної групи тварин $0,24 \pm 0,02$ Г/л – статистично не відрізнялось від контролю при $p > 0,05$; середнє значення нейтрофілів в контролі $3,35 \pm 0,14$ Г/л, в дослідної групи тварин $3,06 \pm 0,14$ Г/л – та також статистично не відрізнялось від контролю при $p > 0,05$; середнє значення моноцитів в контролі $0,30 \pm 0,02$ Г/л, в дослідної групи тварин $0,68 \pm 0,04$ Г/л – статистично значимо збільшення у 2,3 рази від контролю при $p < 0,05$; середнє значення лімфоцитів в контролі

4,02±0,17 Г/л, в дослідній групі тварин 4,60±0,17 – статистично значимо збільшення на 14% від контролю при $p < 0,05$.

Показники лейкоформули дослідної групи статистично не перевищували межі фізіологічної норми, але по деяким показникам статистично відрізнялися від контролю.

Таблиця 3.1 — Лейкоцитарні показники крові лабораторних щурів старого віку при гірудовпливі *in vivo*, $x_{cp} \pm m$

Показник, одиниці вимірювання		Контроль (інтактні тварини), n=8	Дослід (гірудовплив), n=8	p	
Лейкоцити, Г/л		8,00±0,25	8,58±0,21	0,09	
Лейко-формула крові	Еозинофіли	%	4,06±0,41	2,75±0,23*	0,02
		Г/л	0,33±0,04	0,24±0,02	0,06
	Нейтрофіли	%	41,81±1,24	35,81±1,79*	0,02
		Г/л	3,35±0,14	3,06±0,14	0,16
	Моноцити	%	3,81±0,28	7,94±0,58*	0,00
		Г/л	0,30±0,02	0,68±0,04*	0,00
	Лімфоцити	%	50,31±1,58	53,50±1,70	0,19
		Г/л	4,02±0,17	4,60±0,17*	0,03

Примітка. * - результати до та після гірудовпливу відрізняються при $p \leq 0,05$ за даними критерію Ст'юдента.

Еозинофіли, як і нейтрофіли – це клітини фагоцитарної системи, з більшою тривалістю життя. Їх зміни (зменшення відносного вмісту у досліді) можуть вказувати на участь в фагоцитуванні комплексу антиген – антитіло в досліді.

Достовірні зміни рівнів моноцитів (у досліді як відносного, так і абсолютного складу більше ніж у 2 рази) та лімфоцитів (абсолютного складу на

14%), виявлені через 2 тижні після останнього сеансу гірудовпливу можуть свідчити про прояв активації імунних механізмів регуляції гомеостазу у дослідних тварин старого віку.

3.2 Лейкоцитарні показники спонтанних та антиген-стимульованих зразків крові лабораторних щурів старого віку при гірудовпливі в експерименті *in vitro*

Показники загальної кількості лейкоцитів та лейкоформули крові в спонтанних та антиген-стимульованих зразках крові до та після гірудовпливу у лабораторних щурів старого віку представлені в таблиці 3.2.

У контрольної групи лабораторних щурів старого віку (контроль) після інкубації спонтанного зразку (без додавання антигенів) спостерігається зниження загальної кількості лейкоцитів на 25%, при порівнянні $6,03 \pm 0,21$ Г/л з вихідними значеннями $8,00 \pm 0,25$ Г/л відповідно (таблиця 3.2). Зниження лейкоцитів в антиген-стимульованих зразках крові контрольної групи тварин складало близько 40% ($4,84 \pm 0,24$ Г/л).

При аналізі відносного вмісту лейкоцитарної формули контрольної групи тварин у спонтанних зразках крові виявлено такі особливості: середнє значення еозинофілів $3,94 \pm 0,3$ %; нейтрофілів – $34,19 \pm 1,36$ %; моноцитів – $5,06 \pm 0,43$ %; лімфоцитів – $56,81 \pm 1,45$ %.

Абсолютні значення показників лейкоцитарної формули у спонтанних зразках крові контрольної групи тварин становили: середнє значення еозинофілів – $0,24 \pm 0,02$ Г/л, нейтрофілів – $2,05 \pm 0,09$ Г/л; моноцитів – $0,30 \pm 0,02$ Г/л; лімфоцитів – $3,43 \pm 0,17$ Г/л.

В антиген-стимульованих зразках крові контрольної групи тварин відносний рівень лейкоцитарної формули складає: середнє значення

еозинофілів $4,63 \pm 0,40\%$; нейтрофілів – $36,50 \pm 1,32\%$; моноцитів – $2,63 \pm 0,25\%$; лімфоцитів – $56,25 \pm 1,71\%$.

Абсолютні рівні такі: середнє значення еозинофілів – $0,23 \pm 0,03$ Г/л, нейтрофілів – $1,78 \pm 0,14$ Г/л; моноцитів – $0,13 \pm 0,02$ Г/л; лімфоцитів – $2,70 \pm 0,09$ Г/л.

У лабораторних щурів старого віку, яким попередньо здійснювали гірудовплив, спостерігається незначне зниження загальної кількості лейкоцитів $7,13 \pm 0,21$ відносно контролю *in vivo* – 11% (таблиця 3.1) та збільшення відносно контролю СП *in vitro* – на 18%. Збільшення лейкоцитів в антиген-стимульованих зразках крові групи тварин під впливом гірудовпливу складало 62% ($7,84 \pm 0,16$ Г/л) відносно контрольного зразку ($4,84 \pm 0,24$ Г/л), що може свідчити про більшу їх резистентність.

Показники відносного складу лейкоцитарної формули у спонтанних зразках крові щурів, яким попередньо здійснювали гірудовплив: середнє значення еозинофілів – $4,88 \pm 0,25\%$; нейтрофілів – $30,25 \pm 2,67\%$; моноцитів – $6,00 \pm 0,88\%$; лімфоцитів – $58,88 \pm 3,04\%$.

Абсолютні значення показників лейкоцитарної формули в зразка СП після гірудовпливу становили: значення еозинофілів – $0,35 \pm 0,02$ Г/л, нейтрофілів – $2,18 \pm 0,24$ Г/л; моноцитів – $0,42 \pm 0,06$ Г/л; лімфоцитів – $4,17 \pm 0,19$ Г/л.

В антиген-стимульованих зразках крові під гірудовпливом спостерігається така картина відносного складу лейкоформули: середнє значення еозинофілів – $4,75 \pm 0,13\%$; нейтрофілів – $26,88 \pm 1,79\%$; моноцитів – $4,00 \pm 0,48\%$; лімфоцитів – $64,38 \pm 2,10\%$.

Абсолютні значення показників у зразках АГ МП після гірудовпливу: еозинофілів – $0,37 \pm 0,01$ Г/л, нейтрофілів – $2,10 \pm 0,12$ Г/л; моноцитів – $0,31 \pm 0,04$ Г/л; лімфоцитів – $5,06 \pm 0,24$ Г/л.

Таблиця 3.2 – Лейкоцитарні показники спонтанних та антиген-стимульованих зразків крові лабораторних щурів старого віку при гірудовпливі в експерименті *in vitro*, $x_{cp} \pm m$

Показник, одиниці вимірювання		Контроль (інтактні тварини), n=8		Дослід (гірудовплив), n=8	
		СП	АГ МП	СП	АГ МП
Лейкоцити, Г/л		6,03±0,21*	4,84±0,24*	7,13±0,21 [#]	7,84±0,16 ^{&}
Еозинофіли	%	3,94±0,32	4,63±0,40	4,88±0,25 [#]	4,75±0,13
	Г/л	0,24±0,02	0,23±0,03	0,35±0,02 [#]	0,37±0,01 ^{&}
Нейтрофіли	%	34,19±1,36	36,50±1,32	30,25±2,67	26,88±1,79 ^{&}
	Г/л	2,05±0,09	1,78±0,14	2,18±0,24	2,10±0,12
Моноцити	%	5,06±0,43	2,63±0,25	6,00±0,88	4,00±0,48 ^{&}
	Г/л	0,30±0,02	0,13±0,02	0,42±0,06	0,31±0,04 ^{&}
Лімфоцити	%	56,81±1,45	56,25±1,71	58,88±3,04	64,38±2,10 ^{&}
	Г/л	3,43±0,17	2,70±0,09	4,17±0,19 [#]	5,06±0,24 ^{&}

Примітки:

1. * - результати порівняння з вихідними даними (таблиця 3.1) відрізняються при $p \leq 0,05$ за даними критерію Ст'юдента.

2. # - результати у зразках СП відрізняються при $p \leq 0,05$ за даними критерію Ст'юдента.

3. & - результати у зразках АГ МП відрізняються при $p \leq 0,05$ за даними критерію Ст'юдента.

Очевидно, що зниження загальної кількості лейкоцитів у ізольованих зразках крові, порівняно з вихідними результатами, особливо у антиген-стимульованих, відбувається через реагування на додані антигени МП імунних клітин, в першу чергу нейтрофілів, які є першою лінією захисту. Лімфоцити є більш стійкими та реагують більш тривало, порівняно з часом постановки досліду. Також, імовірно, апоптоз клітин відбувається, як результат їх

вилучення з організму при подальшому інкубуванні *in vitro*. Варто відмітити, що при аналізі морфології лейкоцитів у мазках крові зі спонтанних та антиген-стимульованих зразків зустрічалися лейкоцити з ознаками апоптозу. Частина нейтрофілів, можливо, у відповідь на дію антигенів реагує реакцією нетозу. Менший відсоток зниження лейкоцитів у лабораторних тварин після гірудовпливу, імовірно, вказує на появу сенсibiliзованих до БАР МП циркулюючих клітин в периферійній крові. Попередні дослідження показали подібні результати, але без аналізу лейкоформули крові [41].

3.3 Порівняльна характеристика лейкоцитарних показників лабораторних щурів старого віку при гірудовпливі *in vivo* та *in vitro*

Згруповані дані експериментальних досліджень *in vivo* та *in vitro* в контрольній та дослідній групах тварин представлені у таблиці 3.3.

Серед змін рівня лейкоцитів в досліджуваних групах спостерігається тенденція до збільшення показників відносно контролю (інтактна група тварин) як в зразках *in vivo*, так *in vitro*. В антиген-стимульованих зразках крові лабораторних щурів старого віку відмічається достовірно зниження кількості лейкоцитів на 61%, але вже при гірудовпливі цей показник в даних зразках наближається до норми, хоча менший вихідних показників.

Вміст нейтрофілів (як відносний, так і абсолютний) в контрольних зразках та після гірудовпливу має тенденцію до зниження відносно контролю – від 18% у контролі до більш вираженого 34% в антиген-стимульованих зразках.

Рівень моноцитів у контролі зберігається в одних межах, а після гірудовпливу і відносний, і абсолютний вміст достовірно збільшуються у всіх контрольних зразках – *in vivo* на 108 %, *in vitro* – від 18% до 52%.

Достовірна зміна в відносній кількості лімфоцитів – в контрольних зразках складає в СП – на 6,3%, в АГ МП – на 11,8%. Але в абсолютних

значеннях спостерігається зворотна тенденція на зменшення показника: в СП – на 15%, а в АГ МП – на 33%. При гірудовпливі показники лімфоцитів наближаються до норми – в АГ МП рівень достовірно вищий, ніж у інтактних АГ МП та контрольної групи.

В антиген-стимульованих зразках крові лабораторних щурів старого віку при гірудовпливі спостерігається найбільш виразний та статистично значимий ефект – активація всіх ланок клітинного імунітету в порівнянні з контролем *in vitro* до гірудовпливу. Водночас, в контрольній групі тварин у спонтанних зразках крові відмічається стабілізація рівня еозинофілів до рівня контрольної групи та лімфоцитів на 89,5% відносно показників групи інтактних тварин.

Таблиця 3.3 – Лейкоцитарні показники крові лабораторних щурів старого віку при гірудовпливі в умовах *in vivo* та *in vitro* ($x_{cp} \pm m$)

Група тварин/ дослідний зразок	Лейкоцити, Г/л	Еозинофіли		Нейтрофіли		Моноцити		Лімфоцити	
		%	Г/л	%	Г/л	%	Г/л	%	Г/л
Інтактні, n=8	8,00±0,25	4,06±0,41	0,33±0,04	41,81±1,24	3,35±0,14	3,81±0,28	0,30±0,02	50,31±1,58	4,02±0,17
Інтактні, СП, n=8	6,03±0,21*	3,94±0,32	0,24±0,02	34,19±1,36*	2,05±0,09*	5,06±0,43*	0,30±0,02	56,81±1,45*	3,43±0,17*
Інтактні, АГ МП, n=8	4,84±0,24*	4,63±0,40	0,23±0,03	36,50±1,32*	1,78±0,14*	2,63±0,25*	0,13±0,02*	56,25±1,71*	2,70±0,09*
Гірудовплив, n=8	8,58±0,21	2,75±0,23*	0,24±0,02	35,81±1,79*	3,06±0,14	7,94±0,58*	0,68±0,04*	53,50±1,70*	4,60±0,17
Гірудовплив, СП, n=8	7,13±0,21 [#]	4,88±0,25 [#]	0,35±0,02 [#]	30,25±2,67	2,18±0,24	6,00±0,88	0,42±0,06	58,88±3,04	4,17±0,19 [#]
Гірудовплив, АГ МП, n=8	7,84±0,16 ^{&}	4,75±0,13	0,37±0,01 ^{&}	26,88±1,79 ^{&}	2,10±0,12	4,00±0,48 ^{&}	0,31±0,04 ^{&}	64,38±2,10 ^{&}	5,06±0,24 ^{&}

Примітки:

1. СП – спонтанний зразок артеріовенозної крові, що піддавався інкубації протягом 2 годин (+37°C);

2. АГ МП – антиген-стимульований (додаванням антигену медичної п'явки виду *Hirudo verbana* дозою 60 мкг/мл) зразок артеріовенозної крові, що піддавався інкубації протягом 2 годин (+37°C).
3. * – результати порівняння з контролем (інтактні тварини) без гірудовпливу відрізняються при $p \leq 0,05$ за критерієм Ст'юдента.
4. # - результати у ізольованих зразках СП, порівняно з вихідними даними у тварин після гірудовпливу відрізняються при $\leq 0,05$ за даними критерію Ст'юдента.
5. & - результати у ізольованих зразках АГ МП, порівняно з інтактними АГ МП у тварин після гірудовпливу відрізняються при $p \leq 0,05$ за даними критерію Ст'юдента

4 ОХОРОНА ПРАЦІ

Мета цього розділу — це отримання навичок та теоретичних знань з охорони праці і безпеки при виконанні кваліфікаційної роботи на тему: «Вплив екстракту з тканин медичної п'явки на лейкоцитарні показники крові лабораторних щурів в умовах *in vitro*».

Перед початком роботи науковим керівником зі мною був проведений інструктаж з охорони праці та пожежної безпеки.

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

Техніка безпеки поряд з виробничою санітарією є частиною охорони праці. Під технікою безпеки розуміють сукупність технічних засобів і прийомів виконання операцій, що зводять до мінімуму ризик на роботі. Безпека проведення у лабораторіях повинна забезпечуватися відповідно до вимог безпеки при виконанні навчальних та науково-дослідних робіт СТ ВНЗ 20.5-0:2013 та інших діючих нормативних актів [42].

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 ДСН 3.3.6.042 99 [43]. Дуже важливо, щоб у приміщенні не створювався застій повітря. Повітря робочої зони повинно відповідати ДСТУ 12.1.005-88 [44]. Необхідно забезпечувати постійний його рух, шляхом відкриття вікон, у випадку використання отруйних та неприємно пахучих речовин, приточно-втяжної вентиляції, що повинна відповідати СНіП 2.04.05-91 [45] і ДСН 3.3.6.037-99 [46]. 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 ДБН В.2.5–28–2006 [47].

При роботі з хімічними реактивами обов'язковий спецодяг (халат з бавовняної тканини) згідно ст. 163 кодексу законів про працю України і НПАОП 73.1-1.11-12 [48]. У тканині не повинно бути добавок синтетичних волокон, тому що у випадку займання оплавлені частини халату важко видалити з одягу.

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 пошкодити 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, і т.п. 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 [48].

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.

6. 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.

Лаборант повинен:

5. Не залишати запалені пальники та інші нагрівальні прилади без нагляду.

6. Не зберігати будь-які речовини невідомого походження без напису й етикеток.

7. Зливати 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 (зажим 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 [42].

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 кров'ю 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 [49].

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

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

При потраплянні сироватки або крові 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 керівництво підприємства [50].

Електротравми можуть виникати при доторканні за провід, який знаходиться під напругою. Через 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 потрібно 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, накласти асептичні пов'язки на „мітки струму”, які є опіками, і відвезти потерпілого в лікарню [51].

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 70-90⁰, 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.

Також слід зберігати техніку безпеки при роботі з медичними п'явками та щурами, як інфекційні вогнища з кров'ю та вірогідністю інфекційного захворювання.

П'явки слід використовувати з лабораторії, де вони утримуються на відповідних умовах та штучно харчуються кров'ю тварин. Крім того, п'явки, перед використанням зазнають достатнього голодування. П'явки, зібрані в природному середовищі, не повинні використовуватися для гірудотерапії [1, 12].

П'явки можуть прожити один рік або більше, не харчуючись кров'ю. Тому рекомендується тримати у лабораторії велику кількість п'явок, змінюючи воду

1–2 рази на тиждень. Для цього п'явок можна щотижня переносити в другу ємність, попередньо очищену і ретельно промиту від залишків засобів, що дезінфікують, і в якій вода витримувалася не менше доби для дехлорування. Місткість має бути заповнена на 3/4 водою і накрита рушником або сіткою, що дозволить п'явкам мати доступ до свіжого повітря, не маючи можливості вибратися назовні. У ємність слід додати камінь більшого розміру, який допоможе п'явкам у процесі скидання покривів. Контейнер з п'явками слід зберігати у прохолодному місці (бажано 4–15°C). Коли п'явки містяться за кімнатної температури, слід звернути увагу на те, щоб температура навколишнього середовища не перевищувала 25°C і щоб контейнер з п'явками не піддавався впливу прямих сонячних променів. При пересадці п'явок з однієї ємності в іншу вода для заміни має бути тієї ж температури, що й вихідна. У 1 літрі води повинно бути приблизно 8 п'явок [1, 9].

З п'явками слід поводитися обережно, одягнувши нітрилові або латексні рукавички, які також запобігають укусам п'явками медичного працівника під час обслуговування або лікування п'явками [1].

Об'єктом дослідження моєї кваліфікаційної роботи була периферична кров лабораторних щурів, тому у цьому розділі я розглянула особливості роботи у віварію; правила утримання лабораторних тварин, їх використання в експерименті.

Тварини для проведення дослідів повинні надходити тільки до віварію. Категорично забороняється приводити на кафедру тварин, які не були перевірені ветеринарним лікарем і тих, що не пройшли покладений карантинний термін [52].

Категорично забороняється: тримати тварин поза клітками, залишаючи їх на кафедрі на ніч. Наприкінці робочого дня тварини повинні бути здані у віварій.

Для віварію відводять окреме приміщення з окремим входом, відокремлене від лабораторії і робочих кімнат. Приміщення, де розміщуються

тварини, має бути обладнане шафами для кліток, від яких відходить витяжка. Повітря, що викидається назовні, повинно очищуватися.

Вентиляція віварію повинна працювати цілодобово без перерв на вихідні і святкові дні. Для знезараження повітря встановлюють бактерицидні опромінювачі. Підлогу роблять з щільного водонепроникного матеріалу з ухилом у бік водостоків-трапів, які доступні для миття і мають перфоровані кришки; плінтуси робити не слід.

Стіни приміщень, в яких містяться тварини, і кормокухні від підлоги до стелі покривають глазурованою плиткою.

Прибирання віварію проводять щодня в наступному порядку:

– столи, полиці, табурети, стіни і підлогу протирають вологою ганчіркою, змоченою дезінфікуючим розчином;

– чищення кліток з тваринами починають з контрольних банок (кліток), в яких містяться незаражені тварини;

– годівниці для очищення від залишків корму витягують банок (кліток) корнцангом, поміщають в бак із дезінфікуючим розчином, після чого ретельно промивають водою;

– у зв'язку з використанням дезінфікуючих розчинів, щоб уникнути псування, дерев'яні клітки мають бути покриті фарбою.

Після закінчення прибирання все зібране у віварію сміття (кал, залишки їжі, сіно, солома тощо) спалюють або утилізують [52].

Основною специфічною небезпекою для експериментатора, що працює з дрібними лабораторними тваринами, є можливість зараження збудниками інфекцій, небезпечних для людини. Особливо небезпечні в цьому випадку укуси тварин.

Для попередження травматизму (подряпин і укусів) усі маніпуляції з лабораторними тваринами виконують в спеціальних фіксаторах, а з дрібними тваринами працюють у рукавичках.

При фіксації щурів варто попередньо міцно захопити шкіру в потиличній області між вухами, після чого, тримаючи тварину у вертикальному положенні,

накинути лямки на задні і передні кінцівки і закріпити їх. Тільки після такої попередньої підготовки тварину можна остаточно фіксувати у верстаті. Там, де це можливо, краще перед фіксацією тварину наркотизувати. Після кожного дослідження варто ретельно вимити руки теплою водою з милом, або протерти дезрозчином.

При укусі щуром варто негайно промити рану спиртом, обробити розчином йоду і довести до відома завідуючому кафедрою або викладачеві [52].

Таким чином знання правил охорони праці та дотримання техніки безпеки при виконанні кваліфікаційної роботи дало можливість уникнути травмувань та нещасних випадків.

ВИСНОВКИ

1. Загальна кількість лейкоцитів крові контрольної (інтактні тварини) та дослідної групи лабораторних щурів старого віку після гірудовпливу без статистично значимих змін. Відмічається достовірне зменшення відносного вмісту еозинофілів у 1,5 рази, нейтрофілів – на 15%, збільшення моноцитів – у 2 рази, в тому числі абсолютної кількості, а також абсолютної кількості лімфоцитів на 14%.

2. Вплив екстракту з тканин медичної п'явки виду *Hirudo verbana* в умовах *in vitro* на кількість лейкоцитів та лейкоцитарну формулу крові лабораторних щурів старого віку після гірудовпливу як в спонтанних, так антиген-стимульованих зразках мав тенденцію на стабілізацію показників відносно контролю: рівень лейкоцитів наближався до рівня *in vivo*, але відмічалось зниження вмісту нейтрофілів та моноцитів (відносного та абсолютного складу), але при збереженні рівня лімфоцитів. У спонтанних та антиген-стимульованих зразках крові інтактних тварин спостерігалось більш виразне зниження вмісту лейкоцитів.

3. У лабораторних щурів старого віку до та після гірудовпливу в умовах *in vitro* як відмінних від організму, відбувається руйнування клітин як в спонтанних, так і АГ-стимульованих зразках, але при додаванні антигенів МП в більшій мірі, переважно за рахунок нейтрофілів, лімфоцити більш стійкі, оскільки реагують повільніше. Після гірудовпливу - кількість клітин знижується порівняно з вихідними даними, а при інкубації лейкоцити більш стійкі, порівняно з інтактною групою тварин, імовірно як наслідок появи сенсibilізованих до АГ МП клітин.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Отримані результати можна використовувати при викладанні окремих тем із навчальних дисциплін «Загальна цитологія», «Великий практикум з імунології», «Лабораторні тварини».

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Куплевська Л. А. Натуропатична медицина. Гірудотерапія і фізіологія здоров'я. Львів, 2019. 231 с.
2. Sig A. K., Guney M., Guclu A. U., Ozmen E. Medicinal Leech Therapy- An Overall Perspective. *Integr Med Res.* 2017 Dec. №6 (4). P. 337–343. DOI : 10.1016/j.imr.2017.08.001.
3. Lemke S., Vilcinskas A. European Medicinal Leeches – New Roles in Modern Medicine. *Biomedicines.* 2020. Apr. 27. №8 (5). P.99. DOI : 10.3390/biomedicines8050099.
4. Effectiveness of topical gel of medical leech (*Hirudo medicinalis*) saliva extract on patients with knee osteoarthritis : A Randomized Clinical Trial. / Shakouri A. et al. *Complement Ther. Clin. Pract.* 2018. №31. P. 352–359. DOI : 10.1016/j.ctcp.2017.12.001.
5. Амінов Р. Ф. Природний імуномодулятор із тіл медичних п'явок: отримання та застосування: монографія. Запоріжжя : Запорізький національний університет, 2022. 164 с.
6. Литвиненко Р. О. Імуномодуляторні властивості біологічно активних речовин медичної п'явки в умовах гірудовпливу: дис. канд. біол. наук 03.00.09. Запоріжжя, 2016. 169 с.
7. Nikonov G. I., Kryzhanovskii S. A., Lebedeva A. O. Medicinal leeches extract at complex treatment of experimental acute myocardial infarction in rats. *Cardiosomatics.* 2015. № 6 (4). P. 28–29.
8. Babayi H., Praise O. O., Ajoke L. F., Olayemi I. K, Baba E. Evaluation of the effects of Leech Salivary Extract (LSE) on Haematological parameters in Rats. *J. Hematol. Clin. Res.* 2018. № 2. P. 6–14. DOI : <https://doi.org/10.29328/journal.jhcr.1001006>.

9. Коритнюк Р., Борисенко Т. П'явочка–козявочка. *Фармацевт–практик*. 2009. № 1. С. 34–37.

10. Килівник В. С., Цвень П.В., Кузьмін І.В. Історія гірудотерапії з найдавніших часів до початку 18-го століття н.е. *Вісник соціальної гігієни та організації охорони здоров'я України*. 2012. № 4. С. 84-90.

11. Mumcuoglu K. Y. Recommendations for the use of leeches in reconstructive plastic surgery. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 2014. P.1–7. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/205929>

12. Стояновський Д. Н. Медична п'явка. Кровопускання. Донецьк: Сталкер, 2006. 125 с.

13. Фролов О. К., Федотов Є. Р., Копійка В. В. Стан і перспективи відновлення виду медичної п'явки (*Hirudo medicinalis*) у гідрофауні басейну Дніпра та о. Хортиця методами біотехнології. Тези доповідей першого Міжнародного конгресу «*Національна перлина Запоріжжя: впровадження інноваційно-інвестиційних технологій гармонізації біоекосистеми о. Велика Хортиця*». Запоріжжя, 2004. С. 234-236.

14. Yarıcı K., Durmus M., Tanyuksel M. *Hirudo medicinalis* - historical and biological background and their role in microsurgery : Review article. *Hand and Microsurgery*. 2016. №6 (1). P. 34 – 38. DOI: <http://10.5455/handmicrosurg.217838>.

15. Elliott J. M., Kutschera U. Medicinal leeches : Historical use, ecology, genetics and conservation. *Freshwater Reviews*. 2011. № 4. P. 21–41. URL : https://www.researchgate.net/publication/312940593_Medicinal_leeches_Historical_use_ecology_genetics_and_conservation. (дата звернення: 10.09.2022)

16. Jha K., Garg A., Narang R., Das S. Hirudotherapy in Medicine and Dentistry. *J. Clin. Diagn. Res.* 2015 №9(12) P. 5–7. DOI : 10.7860/JCDR/2015/16670.6918.

17. Pospelova M. L., Barnaulov O. D. Effects of hirudotherapy on intravascular thrombosis activation in different groups of patients with cerebrovascular pathologies. *Aktuelnosti nevol, psihijatrije granicnih podrucja*. 2010. No 18(3). P. 27–32.

18. Eldor A., Orevi M., Rigbi M. The role of the leech in medical therapeutics. *Blood Reviews*. 1996. No 10. P. 201–209.
19. Kvapil P., Tomášek O., Bártová E., Harej M. Validation of Medicinal Leeches (*Hirudo medicinalis*) as a Non-invasive Blood Sampling Tool for Hematology and Biochemistry Profiling in Mammals. *Front. Vet.* 2022. Vol. 9. P. 831–836. DOI: 10.3389/fvets.2022.831836.
20. Sobczak N., Kantyka M. Hirudotherapy in veterinary medicine. *Annals of Parasitology*. 2014. No 60 (2). P. 89–92.
21. Вплив гірудотерапії на фізіологічні показники у кіз / А.К. Фролов и др. *Тваринництво України*. 2010. № 7. С. 7–10.
22. Щетініна О. О. Лікування гострої та хронічної патології вуха із застосуванням медичної п'явки *Hirudo medicinalis* та лікарських засобів на її основі : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14.01.19 «Оториноларингологія». К., 2001. 19 с.
23. Лабінський А. Й. Ефективність немедикаментної терапії хворих із перенесеним ішемічним мозковим інсультом (гірудотерапія у поєднанні із нутріціологічною корекцією). *Acta medica Leopoliensia*. 2015. Т. 21, № 4. С. 16–19.
24. Кузнєцова Л. В., Фролов В. М., Пересадін М. О., Круглова О. В. Сучасні підходи до гірудорефлексотерапії при захворюваннях серцево–судинної системи. *Український морфологічний альманах*. 2010. Т. 8, №1. С. 32–35.
25. Hackenberger P. N., Janis J. E. A Comprehensive Review of Medicinal Leeches in Plastic and Reconstructive Surgery. *Plast. Reconst. Surg. Glob. Open*. 2019. №7 (12). P. 25–55. DOI : 10.1097/GOX.0000000000002555.
26. Резніков О. Г. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах. Перший національний конгрес з біоетики. *Ендокринологія*. 2003. Т. 8, № 1. С. 142–145.
27. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідницьких або інших наукових цілей від

18.03.1986 р.: Верховна Рада України, офіційний веб-портал: Міжнародні документи (Рада Європи). Конвенцію ратифіковано Законом N 578-VII (578-18) від 18.09.2013. URL: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/994_a15#Text

28. Апихтіна О. Л. Правові аспекти при роботі з експериментальними тваринами. Сьогодення і біоетика: Київ : ВД «Авіцена», 2011. С. 244–250.

29. ТУ У 05.0-02125243-002:2009 «П'явка медична», санітарно-епідеміологічний висновок МОЗ України № 05.03.02-06/49982, від 12.08.2009 р.

30. Основи імунології : навчально-методичний посібник. / Уклад.: О. К. Фролов, В. В. Копійка, Є. Р. Федотов. Запоріжжя, ЗНУ, 2007. 84 с.

31. Спосіб отримання антигенів із медичної п'явки: пат. 80665 Україна. МПК 2013.01, А61К 38/00 А61К 39/00. заявл. 03.12.2012 ; опубл. 10.06.2013; Бюл. № 1. URL: <https://iprop-ua.com/inv/pdf/j81jj7ad-pub-description.pdf>.

32. Hosseinpour D., Sajedianfard J., Nazifi S., Kavvoosi G., Fathi M. Effect of earthworm *Eisenia fetida* extract on blood and liver enzymes in Wistar rats. *Onl. J. Vet. Res.* 2015. №19(2). P. 116–123.

33. Клінічна лабораторна діагностика: підручник / Л. Є. Лаповець, Г. Б. Лебедь, О. О. Ястремська та ін.; 2-ге вид. Київ: Медицина, 2021. 472 с.

34. Клінічні лабораторні методи дослідження : навч. посіб. / І. А. Зупанець та ін. ; ред. І. А. Зупанець, В. Ф. Москаленко; 2. вид., перероб. та доп. Х. : НФАУ : Золоті сторінки, 2001. 178 с.

35. Дослідження крові тварин та клінічна інтерпретація отриманих результатів : методичні рекомендації для студентів факультету ветеринарної медицини керівників та слухачів Інституту післядипломного навчання керівників і спеціалістів ветеринарної медицини / В.І. Левченко та ін. Біла Церква, 2002. 56 с. URL: https://rep.btsau.edu.ua/bitstream/BNAU/513/1/Doslidzhennja_krovi_tvaryn_ta_klinichna_interpretacija_otrymanyh_rezul%27tativ.pdf. (дата звернення: 20.09.2022)

36. Морфологія клітин крові лабораторних тварин і людини : атлас / В. М. Запорожан та ін. Одеса : Одес. держ. мед. ун-т, 2002. 118 с. URL:

<https://repo.odmu.edu.ua/xmlui/bitstream/handle/123456789/1321/ZaporozhanMorfologiya.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (дата звернення: 20.09.2022).

37. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Кожем'якін Ю.М., Хромов О.С., Болдирева Н.Є., Добреля Н.В., Сайфетдінова Г.А. Київ: Інтерсервіс, 2017. С. 182 с.

38. Лабораторні тварини. Розведення, утримання, використання в експерименті / Даценко І. І. та ін.; за ред. І. І. Даценко. Львів : Світ, 2001. 472 с.

39. Василенко О. А., Сенча І. А. Математично-статистичні методи аналізу у прикладних дослідженнях : навч. посіб. Одеса: ОНАЗ ім. О. С. Попова, 2011. 166 с. https://dut.edu.ua/uploads/1_377_27629033.pdf (дата звернення: 20.09.2022)

40. Горбачик А. П., Сальнікова С. А. Аналіз даних соціологічних досліджень засобами SPSS : навчально-методичний посібник. Луцьк : «Вежа», 2008. 164 с.

41. Литвиненко Р. О., Сароз Ю. М., Лемешко Д. О., Сергієнко А. П. Вплив біологічно активних речовин кільчеців на кількісні показники крові щурів. *Студентські наукові студії. Збірник наукових праць студентів*. У 2 ч. Ч. 2. Херсон : ХДУ, 2011. С. 122–124.

42. СТВНЗ 20.5-0:2013: Вимоги безпеки при виконанні навчальних та науково-дослідних робіт. Харків, 2013. 59 с. URL: https://www.khadi.kharkov.ua/fileadmin/P_Tender/Admin_diyalnist/stvzn_20_5-0.pdf. (дата звернення: 20.09.2022)

43. ДСН 3.3.6.042 99. Санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень: [Чинний від 1999–12–01]. Вид. офіц. Київ: МОЗ України 1999. 10 с. URL: http://nbuviar.gov.ua/images/nub/Dmap/15_sanitar%20normy%20mikroklimatu.pdf (дата звернення: 20.09.2022)

44. ДСТУ 12.1.005–88. Загальні санітарно–гігієнічні вимоги до повітря робочої зони: [Чинний від 1989–01–01]. Затв. МЗ СРСР у 1988 р. 70 с.

45. СНіП 2.04.05–91. Опалення, вентиляція і кондиціонування. [Чинний від 1996–06–27]. Вид. офіц. Київ : Киев ЗНПП, 1996. 89 с.

46. ДСН 3.3.6.037-99. Санітарні норми виробничого шуму, ультразвуку та інфразвуку. Вид. офіц. Київ : МОЗ України 1999. 24 с.

47. ДБН В.2.5–28–2006. Природне і штучне освітлення. [Чинний від 2006–10–01]. Вид. офіц. Київ : МінБуд України, 2006. 128 с.

48. НПАОП 73.1-1.11-12. Правила охорони праці під час роботи в хімічних лабораторіях. [Чинний від 2012–10–26]. Вид. офіц. Київ : МНС України, 2012. 128 с.

49. Наказ «Інструкція з профілактики внутрішньолікарняного та професійного зараження ВІЛ-інфекцією» № 120 МОЗ України від 25.05.00. Київ : МОЗ України, 2000. 20 с. URL: <http://mozdocs.kiev.ua/view.php?id=5043>.

50. Закон України про забезпечення санітарного та епідеміологічного благополуччя населення. Відомості Верховної Ради України. 1994. № 27. 218 с.

51. Охорона праці та промислова безпека : навчальний посібник; під ред. К.Н. Ткачука і М.О. Халімовського. 2-е вид. доповнене. Київ : Основа, 2006. 448 с.

52. Новосад Н. В. Лабораторні тварини і техніка біологічного експерименту: навчально-методичний посібник для студентів біологічного факультету денного та заочного відділень. Запоріжжя: ЗНУ, 2011. 85 с.

**Декларація
академічної доброчесності
здобувача ступеня вищої освіти ЗНУ**

Я, Русєва Марина Іванівна, студентка 2 курсу магістратури, форми навчання заочної, факультету біологічного, спеціальність біологія, адреса електронної пошти m_ruseva@ukr.net, підтверджую, що написана мною кваліфікаційна робота на тему «Вплив екстракту з тканин медичної п'явки на лейкоцитарні показники крові лабораторних щурів в умовах in vitro» відповідає вимогам академічної доброчесності та не містить порушень, що визначені у ст. 42 Закону України «Про освіту», зі змістом яких ознайомлена; заявляю, що надана мною для перевірки електронна версія роботи є ідентичною її друкованій версії; згодна на перевірку моєї роботи на відповідність критеріям академічної доброчесності у будь-який спосіб, у тому числі за допомогою інтернет-системи а також на архівування моєї роботи в базі даних цієї системи.

Дата _____ Підпис _____ ПІБ (студент) Русєва М. І.

Дата _____ Підпис _____ ПІБ (науковий керівник) Литвиненко Р.О.