

**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: МІТОТИЧНА АКТИВНІСТЬ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ У  
КІНЦІ СТАТЕВОГО ДОЗРІВАННЯ НА ФОНІ ГІРУДОЛОГІЧНОГО ВПЛИВУ**

Виконала: студентка 2 курсу, групи 8.0911-б \_\_\_\_\_  
спеціальності \_\_\_\_\_ 091 Біологія \_\_\_\_\_

освітньої програми \_\_\_\_\_ Біологія \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Мірошніченко Н. В. \_\_\_\_\_

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

Рецензент \_\_\_\_\_ доцент, к.б.н., Малько М.М. \_\_\_\_\_



## 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 12.07.2022**КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН**

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Пошук наукової літератури за темою кваліфікаційної роботи	Грудень 2021	виконано
2	Оформлення першого розділу «Огляд наукової літератури»	Січень 2022	виконано
3	Формування другого розділу «Матеріали та методи дослідження»	Лютий-березень 2022	виконано
4	Формування розділу «Охорона праці»	Березень-травень 2022	виконано
5	Проведення експериментальних досліджень	Травень-вересень 2022	виконано
6	Статистична обробка експериментальних даних	Вересень 2022	виконано
7	Формування розділу «Експериментальна частина», оформлення кваліфікаційної роботи	Жовтень-листопад 2022	виконано
8	Оформлення матеріалів до захисту, попередній захист кваліфікаційної роботи	Грудень 2022	виконано

Студент \_\_\_\_\_ Н.В. МірошніченкоКерівник роботи \_\_\_\_\_ Р.О. Литвиненко**Нормоконтроль пройдено**Нормоконтролер \_\_\_\_\_ Є.Ю. Гороховський

## РЕФЕРАТ

Дипломна робота викладена на 55 сторінках, містить 5 таблиць, 3 рисунки, 79 літературних джерел.

Об'єкт дослідження – кров та кістковий мозок щурів у кінці статевого дозрівання на фоні гірудологічного впливу.

Метою наукової роботи було визначення особливостей гематологічних показників крові та мітотичного індексу кісткового мозку щурів у кінці статевого дозрівання на фоні гірудологічного впливу.

Показники крові та кісткового мозку аналізували у 9 умовно здорових тварин (контроль) та у 9 тварин на фоні гірудологічного впливу (дослід).

Методи дослідження: імунологічні (кількість лейкоцитів, лейкоцитарна формула крові, мітотичний індекс кісткового мозку), гематологічні (кількість еритроцитів), статистичні.

У результаті дослідження у щурів у кінці статевого дозрівання на фоні гірудологічного впливу було виявлено збільшення гематологічних показників: загальної кількості еритроцитів та лейкоцитів у межах фізіологічних норм даного віку у порівнянні з контрольною групою. Лейкоцитарна формула крові не зазнала змін. Значно підвищується мітотичний індекс у дослідній групі в порівнянні з контролем.

Новизна роботи. Доповнено наукові дані про дію гірудологічного впливу на гематологічні показники крові та мітотичний індекс кісткового мозку лабораторних щурів у кінці статевого дозрівання.

Практичне значення роботи: отримані результати можуть бути використані у сільському господарстві та ветеринарії.

**ГІРУДОТЕРАПІЯ, МЕДИЧНІ П'ЯВКИ, БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ РЕЧОВИНИ, КІСТКОВИЙ МОЗОК, МІТОТИЧНИЙ ІНДЕКС**

## ABSTRACT

This work is presented on 55 pages, 5 tables, 3 figures, 79 literary sources.

The object of research is the blood and bone marrow of rats at the end of puberty against the background of hirudological influence.

The aim of the scientific work was to determine the characteristics of the hematological parameters of the blood and the mitotic index of the bone marrow of rats at the end of puberty against the background of hirudological influence.

Blood and bone marrow indicators was analyzed in 9 conditionally healthy animals (control) and in 9 animals on the background of hirudological influence (experiment).

Research methods: immunological (number of leukocytes, leukocyte blood formula, bone marrow mitotic index), hematological (number of erythrocytes), statistical.

As a result of the study, in rats at the end of puberty against the background of hirudological influence, an increase in hematological indicators was found: the total number of erythrocytes and leukocytes within the physiological norms of a given age compared to the control group. The leukocyte formula of the blood did not change. The mitotic index in the experimental group is significantly increased compared to the control.

The novelty of the work. Scientific data on the effect of hirudological influence on hematological blood parameters and the mitotic index of the bone marrow of laboratory rats at the end of puberty have been supplemented.

Practical significance of work: the obtained results can be used in agriculture and veterinary medicine.

HIRUDOTHERAPY, MEDICAL LEECHES, BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES, BONE MARROW, MITOTIC INDEX

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ.....	8
ВСТУП.....	9
1 ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	12
1.1 Основні визначення п'явок .....	12
1.2 Історичний розвиток та загальна характеристика медичних п'явок.....	13
1.3 Розповсюдження видів <i>Hirudo</i> .....	15
1.4 Сучасне застосування медичних п'явок .....	15
1.5 Біологічно активні речовини медичних п'явок.....	19
1.6 Основні терапевтичні та біологічні ефекти від впливу медичних п'явок	19
1.7 Застосування медичних п'явок у ветеринарії та сільському господарстві	22
1.8. Медичні п'явки у медицині .....	23
1.9 Побічні ефекти від гірудотерапії та протипоказання .....	24
2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	26
2.1 Об'єкти та матеріали дослідження .....	26
2.2 Методи дослідження.....	27
2.2.1 Оцінка лейкоцитарного складу крові .....	27
2.2.1.1 Визначення загальної кількості лейкоцитів.....	27
2.2.1.2 Визначення лейкоцитарної формули.....	28
2.2.2 Оцінка загальної кількості еритроцитів.....	29
2.2.3 Визначення мітотичного індексу кісткового мозку .....	30
2.3 Статистична обробка експериментальних даних .....	30
3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	32
3.1 Оцінка загальної кількості еритроцитів крові у нелінійних лабораторних щурів у кінці статевого дозрівання на фоні гірудологічного впливу .....	32
3.2 Оцінка загальної кількості лейкоцитів крові у нелінійних лабораторних	

щурів у кінці статевого дозрівання на фоні гірудологічного впливу .....	33
3.3 Оцінка лейкоцитарної формули крові у нелінійних лабораторних щурів у кінці статевого дозрівання на фоні гірудологічного впливу .....	35
3.4. Зміни мітотичного індексу у нелінійних лабораторних щурів у кінці статевого дозрівання на фоні гірудологічного впливу .....	38
4 ОХОРОНА ПРАЦІ.....	40
ВИСНОВКИ.....	46
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	47
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ.....	48

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І  
ТЕРМІНІВ

АДФ – аденозиндифосфат

БАР – біологічно активні речовини

ГВ – гірудологічний вплив

ГТ – гірудотерапія

МІ – мітотичний індекс

МП – медична п'явка

П – п'явки

СП – слина п'явки

ССЗ – секрет слинних залоз



## ВСТУП

В теперішній час інтенсивно зростає відсоток інфекційних та не інфекційних захворювань, спричиненими переважно різними ксенобіотичними речовинами, які володіють дуже токсичними ефектами в малій або більшій концентрації. У більшості вони мають здатність спричиняти незворотні порушення клітин, тканин, органів та систем організму. Особливо це стосується периферичної крові та кісткового мозку, які в першу чергу реагують на негативні фактори, наприклад, різними видами анемій, лейкозами та ін.

Вказані вище причини зумовили підвищення інтересу до пошуку різних способів та методів, які здатні б були справитися із цими недугами та відновити гомеостатичний стан організму. До них відносяться натуротерапевтичні методи серед яких гірудотерапія (ГТ). ГТ використовує медичних п'явок (МП) із лікувальною метою, практично за відсутності протипоказань та побічних ефектів [1-2]. За рахунок комплексу природних біологічно активних речовин (БАР) відбувається: регуляція гемостазу та судинного тону, протизапальні, регенераційні, нейротропні, бактеріостатичні, імуномодуляторні ефекти [1-3]. БАР переважно не мають аналогів серед інших препаратів та можуть бути ефективними при використанні в сільському господарстві, ветеринарії та медицині — це гірудин, егліни, бделіни, ферменти: гіалуронідаза, дестабілаза, колагеназа, апіраза, еластаза та ін. [1-7]. Доведено, що БАР МП мають імуномодуляторний ефект, який відображається у зрушеннях клітин вродженого та адаптивного імунітету, проявляють антимікробну [1-3, 8-10] та протизапальну дію [1-3, 8], позитивно впливають на формотворчі регенераційні процеси [1-3], стимулюють ріст нервових волокон спінального ганглію ембріона курки [1-3]. БАР МП ефективно використовують із метою профілактики та лікування багатьох захворювань: для лікування хронічних дерматозів [11], серцевої недостатності, гіпертонічної хвороби, інфекційного міокардиту, стенокардії, лікування глаукоми [1-3, 12-15], геморагічно-

фібриноїдного синдрому, гострих та хронічних захворювань середнього та внутрішнього вуха [1-3], при радикулопатіях, артритих [1, 16], остеохондрозах, артрозах [1, 17], при цереброваскулярних захворюваннях [2, 3], міомі матки, хронічних запаленнях придатків [3], при нефритах [1], діабетичній стопі [18], діабеті [19], діабетичній нефропатії, лікуванні тромбофлебітів [2, 20, 21], варикозному розширенні вен та інших судинних розладах, при хронічних та дистрофічних захворюваннях слинних залоз, стоматитах, пульпітах [1, 22, 23]. В реконструктивній хірургії [1-3, 24, 25], для загоєння ран [1-3, 26, 27], чоловічому та жіночому безплідді [1-3, 28], чоловічому пріапізмі [1, 29]. ГТ також почали використовувати із метою профілактики онкологічних захворювань [1, 3]. Слід відмітити, що в більшості сеансів ГТ локально роблять приставки п'явок, для збільшення ефекту в місці патології. Але не локальні постановки МП можуть підвищити загальні ефекти, тому актуально було перевірити, як комбіновані приставки п'явок на різні ділянки тіла можуть впливати на імунну систему лабораторних щурів.

Метою роботи є визначення особливостей гематологічних показників крові та мітотичного індексу кісткового мозку лабораторних щурів у кінці статевого дозрівання на фоні гірудологічного впливу.

Відповідно до мети дослідження були поставлені такі завдання:

- 1) дослідити загальну кількість еритроцитів щурів у кінці статевого дозрівання на фоні гірудологічного впливу;
- 2) проаналізувати загальну кількість лейкоцитів щурів у кінці статевого дозрівання на фоні гірудологічного впливу;
- 3) оцінити лейкоцитарну формулу крові щурів у кінці статевого дозрівання на фоні гірудологічного впливу;
- 4) проаналізувати мітотичний індекс кісткового мозку щурів у кінці статевого дозрівання на фоні гірудологічного впливу.

Об'єкт дослідження – периферична кров та кістковий мозок лабораторних щурів у кінці статевого дозрівання на фоні гірудологічного впливу.

Предмет дослідження – мітотична активність, еритроцитарні та лейкоцитарні показники периферичної крові лабораторних щурів у кінці статевого дозрівання на фоні гірудологічного впливу.

Методи дослідження: імунологічні (кількість лейкоцитів, лейкоцитарна формула крові, мітотичний індекс кісткового мозку), гематологічні (кількість еритроцитів), статистичні.

Новизна роботи. Доповнено наукові дані про дію гірудологічного впливу (чергування приставок МП на холку та куприкову ділянки тіла батькам щурів у період злучки) на гематологічні показники крові та мітотичний індекс кісткового мозку лабораторних щурів у кінці статевого дозрівання.

Практичне значення роботи: отримані результати можуть бути використані у сільському господарстві та ветеринарії.

Апробацію результатів дослідження було проведено на Міжнародній науково-практичній конференції «Біологічні, медичні та науково-педагогічні аспекти здоров'я людини» (17-18 листопада 2022 року, Полтава) та X Регіональній науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Актуальні проблеми та перспективи розвитку природничих, медичних та фармацевтичних наук» (3 грудня 2022 року, Запоріжжя) з публікацією тез.

## 1. ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1 Основні визначення п'явок

П'явки (П) складають клас типу *Annelida*. Деякі види споживають равликів, личинок комах та інші організми, П в основному кровососні тварини і, як кліщі, мають схожі механізми регулювання для помірної споживання великих обсягів крові. Морфологічно П мають дві м'язові присоски, одну з переду біля ротової порожнини і одну на задній частині тіла (рис. 1) [30].

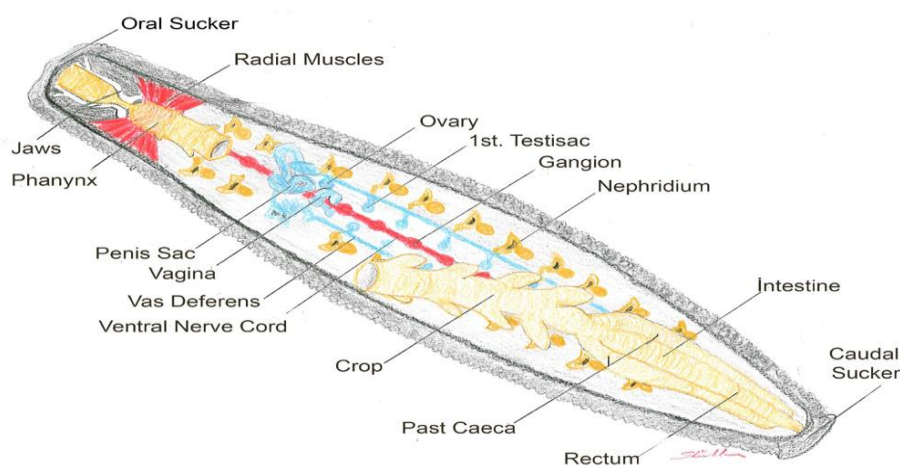


Рисунок 1.1 - Анатомія медичної п'явки: oral sucker - ротова присоска, jaws - щелепи, pharynx - глотка, radial muscles - радіальні м'язи, ovary - яєчник, vagina - піхва, 1 st. testisac - перша пара сем'яників, vas deferens - сім'явиносний протік, ventral nerve cord - черевний нервовий ланцюжок, ganglion - ганглій, nephridium - органи виділення (метанефрідії), intestine - кишка, caudal sucker - задня присоска, rectum - пряма кишка, crop - пара сліпих кишень кишечника, past caeca - остання їх пара [30]

Присоски допомагають їм прикріпитися і підтримуватися при годуванні. Тіло П має чудові властивості скорочуватися та розтягуватися. Воно прикрите тонкою, гладкою кутикулою, яка час від часу відкидається в різних областях тіла. Далі розташований епідерміс, що включає клиноподібні клітини, які розсіюються всередині кровоносних капілярів. Епідерміс створений безліччю

одноклітинними залозами, розташованими в підлеглій сполучній тканині, але відкривається на поверхню через довгі протоки [30].

## 1.2 Історичний розвиток та загальна характеристика медичних п'явок

Перше зареєстроване використання МП було відоме ще з Давнього Єгипту. Більш поширена згадка про їх використання була знайдена у першому столітті нашої ери. В китайських описах, які були знайдені, описувалися П, як цілющі засоби при багатьох хворобах. Схожі тексти про них знаходили перською, санскритською та арабською мовами цього періоду. Римляни теж використовували П, і саме вони дали їм назву «*Hirudo*». Прогресивна гірудологічна практика Галена (130-201 н. е.) кровопусканням завершується розвиток поняття хвороби. Це було засновано на першому визначенні Гіппократа (460-370 рр. до н. е.), який висунув теорію про те, що всі системи організму перебувають у гомеостазі, а хвороба виникає внаслідок дисбалансу. Авіцена (980-1037 рр. н. е.) покладався на ідею, що П черпають кров з більш глибоких джерел. У його відомій книзі «Канон медицини» багато сторінок було вказано про П [31]. Deganc та Zdravic вперше використовували П для підтримки клаптя, який підлягав венозному з'єднанню, і з тих пір використання П у пластичній хірургії стало широко поширеним [32]. У 1980-х роках французькі хірурги використовували П для підтримки венозного кровообігу в дистальних реплантатах пальців, які підлягали артеріальному анастомозу. Нині П використовують у ГТ, мікросудинній реплантації, реконструктивній хірургії та лікуванні венозного застою, що виникає при травматологічних операціях [30, 33] та багато інших.

Лише невелика кількість П використовується із лікувальною метою, хоча відомо близько 650 видів. *H. medicinalis* є одним із найбільш вивчених кільчастих черв'яків і найбільш часто використовуваних у сучасній медичній

практиці. Ронделе описав П у своїй публікації під назвою «Природна історія п'явок» у 1554 році. Пізніше Лінней використав термін *H. medicinalis* для визначення застосування П у медицині. В даний час вид, *H. medicinalis*, класифікується як член класу *Animalia*, типу *Annelida*, класу *Clitellata*, порядку *Arhynchobdella*, родини *Hirudinidae* і роду *Hirudo*. *Hirudo medicinalis* має розділене подовжене та дорсально-черевне згладжене тіло. Повністю зрілі дорослі особини можуть досягати 120 мм при розмірі 8-10 мм при повному розтягуванні, тоді як їх максимальне скорочення може становити 30-35 мм в довжину і 15-18 мм в ширину. Спинна поверхня *H. medicinalis* зазвичай зеленувато-коричневого кольору з коричнево-чорними плямами та подвійними крапковими коричневими смугами вздовж кожного боку. Крім того, черевна поверхня *H. medicinalis* зазвичай жовтувато-зелена з чорними плямами та має пару чорних прямих крайових смуг [30, 34]. П є гермафродитами і більшість з них живуть приблизно до року. З точки зору відкладки коконів, то П стають статевозрілими на наступний рік. Життєвий цикл П залежить від їх харчових звичок і місця проживання. *H. medicinalis* зазвичай живе довше за інші види. Хоча різноманітні П живуть у морському середовищі, більшість водних видів живуть на поверхневих рослинах у прісній воді, таких як басейни, струмки та ставки. Хоча П поширені по всьому світу (від Північного Льодовитого океану до води в пустелях), вони здебільшого знаходяться в більш помірних басейнах або озерах. Туреччина є одним із найбагатших місць у світі з точки зору поширення видів п'явок. *H. medicinalis* та *H. verbana* зустрічаються в значній мірі в Туреччині. Туреччина має найбільшу кількість експорту П у всьому світі [35]. Травний тракт *H. medicinalis* має симбіонтну бактеріальну флору, таку як *Aeromonas hydrophila*, для перетравлення абсорбованої крові [34, 35]. П часто вибирали замість ланцета для ефективного видалення невеликої кількості крові через їхню досить безболісну та організовану практику. Насправді П досліджували для лікування різноманітних хворобливих станів на основі анестезуючих і протизапальних речовин, що містяться в їх слині [30, 36, 37]. З кінця 19 століття кровопускання, а разом з ним і лікування П, нарешті стали

основою медичної практики. Крім того, протягом останніх 35 років ці практики були сприйняті як свого роду ренесанс [30, 37].

### 1.3 Розповсюдження видів *Hirudo*

Останнім часом таксономія залежала від нової інформації, отриманої в ході кампанії для деяких таких країн, як Узбекистан та Балкани, визнали чотири види *H. medicinalis*, *H. verbana*, *H. orientalis* та *H. troctina*. На їхнє розповсюдження найбільше впливають фактори зовнішнього середовища, в той час як людина має невеликий вплив на їх розподіл. Географічна карта присутності *Hirudo*, виду *H. medicinalis* часто зустрічається в Британії та південній Норвегії, Уралі, Швейцарії, Італії, Туреччині. Найпоширенішим місцем проживання *H. verbana* є Узбекистан. *H. orientalis* зазвичай зустрічається в кількох територіях, таких як Іран і Середня Азія. Батьківщиною *H. troctina* є Північна Африка, Західна Африка та Іспанія [38-47].

### 1.4 Сучасне застосування медичних п'явок

В даний час гірудотерапевти часто використовують штучно вирощених МП, виведених в гігієнічно-стерильних умовах в лабораторіях, на різних біофабриках або на культивованих біофермах, оскільки природне виробництво МП у багатьох країнах вичерпано. Нормативно-правові акти органів охорони здоров'я різних країн регламентують правові особливості застосування МП на людях. У Сполучених Штатах Америки (США) Управління з харчових продуктів і медикаментів (FDA) дозволило використання П у медичних цілях, головним чином для відновлення венозного стазу у випадках вільного клаптя та

повторно прикріплених частин тіла, таких як пальці, ніс і вуха, класифікувавши їх як медичний пристрій у 2004 році. Так само в Німеччині регулятори охорони здоров'я дозволили використовувати П на людях, описавши їх як лікарські засоби в тому ж році (2004) [30, 34]. Сучасна медицина зараз сприймає П, які з давніх часів використовуються для лікування різних захворювань, принаймні як фактор, що підтримує терапію, і їх застосування вважається абсолютно необхідним, коли є показання до лікування П. Відомо, що найбільш розвинені країни світу з найдосконалішою практикою медичної науки, а саме Німеччина, Ізраїль, Франція, Великобританія і США, найбільше використовують переваги П у методах лікування [30, 32, 34]. Переваги виділення надзвичайно ефективних БАР у слині П вважають частиною процесу кровосмоктання. ГТ успішно використовується при багатьох захворюваннях, пов'язаних з порушенням мікроциркуляції при пошкоджених порушеннях проникності судин, усуваючи проблеми з органами і тканинами при корекції різноманітних судинних проблем, і має багато інших позитивних ефектів, включаючи вазодилатацію, бактеріостатичну, беззаспокійливу, протизапальну та антикоагулянтну дію. Пластичні хірурги ефективно використовували П для зменшення венозного застою, який інакше ставив би під загрозу загоєння тканин після реконструктивних процедур [30, 37]. Нещодавно в Туреччині було представлено нове положення, яке регулює практики традиційної та додаткової медицини (ТДМ), які зазвичай називають «комплементарною» або «альтернативною» медициною. Певні практики стають все більш популярними в Туреччині, і тепер вони розглядаються в Регламенті про практику ТДМ, який набрав чинності в 2014 році. Регламент характеризується позитивною основою для встановлення правових інструментів і чітких правил щодо практик традиційної медицини, включаючи акупунктуру, ГТ, фітотерапію тощо. Крім того, цей регламент запровадив вимогу щодо схеми сертифікатів авторизації, що контролює, хто може практикувати традиційну медицину [30].

Основне їх використання це тромбози усіх судин. Венозний тромбоз зустрічається частіше, ніж артеріальний, при вільному переміщенні або



трансплантації тканини. У тканинах, перенесених через порушення венозного кровообігу, можна побачити темно-фіолетовий колір. Можлива загибель клітин, якщо венозний потік не підтримується, і, отже, клапоть або трансплантована тканина можуть бути втрачені. При артеріальному застої тканина залишається життєздатною протягом 13 годин, тоді як при венозному застої можливий некроз протягом 3 годин [48]. У ситуаціях венозного застою необхідно вивчити та оцінити можливість венозного анастомозу. Навіть якщо венозний пасаж досягається, венозний застій може зберігатися внаслідок пошкодження мікроциркуляції. Хоча застосування П ефективно при венозному застої, воно марно при недостатності артеріального кровообігу. Щоб почати застосування П, необхідно виявити порушення венозного кровообігу. Якщо тканина фіолетова, напружена і злегка гаряча, то слід мати на увазі венозний застій, де тканина ніби бліда, набрякла, холодна, а при повільному наповненні капілярів варто мати на увазі артеріальну недостатність. П головою вперед наближається до цільової тканини і в результаті полегшується її укус. П, як правило, відривається від тканини, коли насититься, і необхідна тривалість становить від 20 до 120 хвилин. За кожне годування висмоктує 5-15 мл крові. Після видалення П кровотеча укушеної ділянки тканини продовжується у формі витоку, і щоб виключити ризик передачі через кров, П ніколи не можна використовувати від іншої людини [30, 49]. ГТ, як правило, може бути використана для утворення нових кровоносних судин і через 3-7 днів після початку зменшення венозного застою (рис. 1.2) [30].



Рисунок 1.2 - Використання гірудотерапії у мікросхірургії [30]

Під час лікування П слід оглядати кожні 15 хвилин і не допускати її переміщення в інше небажане місце. Якщо П прикріпилася до небажаного місця і не може бути видалена, не слід змушувати її це робити, оскільки вона може залишити свої зуби на зоні приставки, що може збільшити ризик інфікування. Змоченою в спирті або оцті марлею або ватою слід потерти голову П, щоб легше вивести її з місця укусу [50]. Людям з пригніченим імунітетом, попередньою терапією П (на підставі ризику анафілаксії чи алергічної реакції), які не погоджуються на переливання крові чи терапію п'явками ГТ протипоказана [30]. Під час ГТ може виникнути ряд ускладнень, таких як інфекція, необхідність переливання крові, рідше – рубці від укусів, психоз, біль [30, 51]. ГТ несе ризик захворювань, що передаються через кров, таких як ВІЛ і гепатит. Коли П кусає, щоб висмоктати кров, встановлюється зв'язок між паразитом і травною системою П. *Aeromonas hydrophila*, яка становить більшу частину флори травної системи П, як грамнегативна паличка, є найпоширенішим інфекційним агентом у ГТ. Показано, що *Pseudomonas spp.* і *Vibrio spp* також викликають інфекцію. Рівень інфікування під час терапії П у пацієнтів, які не отримували профілактичні антибіотики, коливається від 2,4% до 20%, і повідомлялося про появу целюліту, некрозу клаптя, загального некрозу м'язів і септичного шоку. Пеніцилін і цефалоспорин першого покоління неефективні, оскільки *A. hydrophila* є бактерією, що продукує лактамазу. Більш доцільними для лікування є цефалоспорини другого та третього покоління, аміноглікозиди, хлорамфенікол, фторхінолони та триметоприм. При кровотечі, яка виникає після того, як П припиняє смоктати кров, під час лікування П часто виникає необхідність у переливанні крові. Необхідно провести контрольне дослідження рівня гематокриту і, якщо необхідно, переливання крові під час і після лікування П. Слід відмітити, що більшість цих недуг виникає при неправильному використанні МП та догляду за ранками [30].

### 1.5 Біологічно активні речовини медичних п'явок

В організмі МП містяться понад 100 біологічно активних речовин (БАР) різної будови: білкової, ліпідної, вуглеводної, які володіють широким спектром терапевтичної дії: судинорозширювальним, тромболітичним, протизапальним, знеболюючим, можуть пригнічувати адгезію та агрегацію клітин, відновлювати пошкоджену судинну проникність тканин і органів, усувати гіпоксію, позбавляти від інфаркту та інсультів, детоксифікувати організм антиоксидантними шляхами, мають протинабряковий та антимікробний ефекти [1-3]. Із відомих БАР: гірудин, гіалуронідаза, калін, дестабілаза, апіраза, егліни (інгібітори еластази, катепсину G), бделіни, декорзин (антагоніст глікопротеїну, інгібітор агрегації тромбоцитів), гірустатин, пігуамерин (інгібітор плазмовео калікліреїну), тромбоцитарний антагоніст активації (антитромбічний ефект) інгібітора триптази, хлороміцентин (антибіотик), інгібітори карбоксипептидази А та ацетилхолін [3].

### 1.6 Основні терапевтичні та біологічні ефекти від впливу медичних п'явок

Антикоагулянтний ефект. БАР МП діють на різні точки пригнічення дії каскаду згортання крові. БАР можуть інгібувати згортання, лізис фібрину, пригнічення тромбіну та усіх процесів згортання крові [1]. Із комплексу БАР МП, який володіє даним антикоагулянтним ефектом є гірудин, що обернено зв'язується з тромбіном [52].

Гірудин, антистатін та гелін - це БАР МП, які пригнічують утворення тромбіну і розривають ланцюгову реакцію шляхом інгібування фактору згортання Ха. Сам же інгібітор фактора Ха проявляє прямий антикоагуляційний

ефект, оскільки він порушує каскади згортання крові [1]. БАР, такі як гілантен, LDTI, інгібітор комплементу (C1) та егліни відіграють велику роль безпосередньо у пригніченні згортання крові [1].

Дестабілаза – це БАР МП, яка володіє деградаційною дією на стабілізований фібрин. Дестабілаза має здатність розчиняти стабілізований фібрин за допомогою ізопептидолізу ланцюгів  $\alpha$  і  $\gamma$  фібрину, пов'язаних  $\epsilon$  ( $\gamma$  Glu).

Протимікробна, протизапальна та знеболююча дії. БАР МП, такі як хлороміцетин та дестабілаза, володіють протимікробною дією, оскільки вони знищують в більшості всі клітинні компоненти бактерій [2, 3]. Дестабілаза має бета-глікозидазну активність, яка безпосередньо порушує бета-1-4 зв'язки, що розташовані в пептидоглікановому шарі в бактеріальній клітинній стінці [1]. Денатурована форма дестабілази має дозозалежний бактеріостатичний ефект на золотистий стафілокок, синьогнійну паличку та ешерихію колі [1]. Калікреїн-кінінова система - це дуже складна протизапальна система, яка розташована в різних органах, які включають алкіноген, калікреїни та брадикініни. Основною функцією брадикінінів є збільшення проникності судин та зниження болю [53]. Хімічна кінназа та антистатин можуть інгібувати механізм калікреїн-кінінової системи [54]. Триптази є сериною протеазою в гранулах клітин і їхнє вивільнення викликає запальні реакції у тварин. Ці ефекти сильно пов'язані з калікреїн-кініною системою, хіміотаксисом, активацією лейкоцитів, вазоактивною дією, що викликають больовий ефект. Хімічні речовини виділяються з гранул тучних клітин можуть викликати алергічні та запальні захворювання, такі як астма, анафілаксія та артрит [1, 2]. У МП є БАР похідні інгібітору триптази (LDTI) – це інгібітор серинової протеази, який інгібує протеолітичний фермент тучних клітин. БАР МП егліни С викликають зниження рівня вільного радикалу кисню в нейтрофілах і запобігають запаленню та руйнуванню тканин [1]. Відіграють важливу роль у класичному шляху системи комплементу [2]. Секреція слинних залоз МП містить інгібітор комплементу (C1), який інгібує обидва каскади згортання та калікреїн-кінінову

систему [1]. С1 необхідний, коли пацієнти стикаються з дефіцитом природного інгібітора, ці інгібітори можуть протидіяти небажаній комплемент активації, яка відбувається при анафілактичному шоці та хронічному запаленні. Карбоксипептидаза – це фермент отриманий з комплексу БАР МП, який бере участь у деградації кініну, який викликає пов'язану з брадикініном запальну реакцію [53].

Вплив БАР МП на загоювання ран та судини. Під час загоєння ран, перфузія є одним з факторів, що прискорює загоєння, тому БАР, які присутні в слинні п'явки (СП) можуть прискорювати загоєння ран завдяки її здатності до перфузії [55]. СП виділяє судинорозширювальну, гістаміноподібну речовину та інгібітори карбоксипептидази-А, які збільшують приплив крові до місця укусу та зменшують місцевий набряк. Цим самим, БАР МП можуть спонукати видаленню накопиченої крові із рани, яка гальмує надходження свіжої артеріальної крові з киснем. Гіалуронідаза – це фермент, який має антимікробну дію, він збільшує в'язкість інтерстиціальних стінок, що призводить до антибіотичного впливу [3].

Здатність БАР МП пригнічувати функції тромбоцитів. Формування мосту є одним із механізмів кровотворення, який може зупиняти кровотечу, проте в організмі МП є БАР, які можуть реагувати проти різних частин мосту, такі як саратин, калін, декорин та апіраза [1]. Калін має здатність інгібувати опосередковану колагеном агрегацію тромбоцитів та адгезію, а також інгібувати залежну від фактора Віллебранда адгезію тромбоцитів до колагену в стінках судин. Аденозиндифосфат (АДФ) відіграє вирішальну роль в агрегації тромбоцитів шляхом активації рецепторів (GpIIb-IIIa) та підвищення афінності тромбоцитів до vWf. Фермент апіраза із СП може перетворити АДФ в аденозинмонофосфат (АМФ), а потім агрегація тромбоцитів блокується внаслідок непрямой інгібуючої дії рецептору колагену та зв'язок АДФ. Тромбін має сильний вплив на активацію тромбоцитів і вивільнення АДФ, проте інгібітор тромбіну виробляється із СП, який має непрямий негативний вплив на функції тромбоцитів. Інша БАР – це саратин, яка може впливати на початкову

стадію адгезії тромбоцитів і пригнічувати колаген vWf реакцію. Взагалі БАР, які секретуються з МП, можуть бути корисними для пригнічення агрегації тромбоцитів шляхом руйнування частинок колагену (ферменту колагенази) та інгібування рецептора тромбоцитів vWf [1].

---

### 1.7 Застосування медичних п'явок у ветеринарії та сільському господарстві

Гірудологічний вплив (ГВ) в теперішній час широко використовується у сільському господарстві, ветеринарії та тваринництві: при лікуванні різних інфекційних захворювань домашніх і сільськогосподарських тварин: котів, собак та коней [1-3, 56], для лікування маститів і відновлення репродуктивної здатності корів [2, 3], лікуванні судинних захворювань коней, діабетичній нефропатії та для загоєння ран у щурів [20, 27, 57].

Використання ГВ у кіз, покращує їх загальний стан (підвищується апетит, покращується стан шерстяного покриву, зменшуються тріщини на рогах та копитах), впливає на продуктивність (вагу тіла, надої) та репродуктивну здатність (кількість та вагу тіла приплоду) тварин. Після сеансів ГВ у кіз відбувається міграційний перерозподіл лімфоцитів крові з тимчасовим їх депонуванням у місцях приставки МП, підвищується фагоцитарна активність нейтрофілів (ФАН) крові [1-3].

Після ГВ зменшуються гематоми у собак [1, 57], зменшується тиск рідини в пошкоджених тканинах тварин [3], запалення, дисплазія стегна і ліктьових суглобів, лікуються захворювання сухожиль, зв'язок і фасцій, хребців та рубців та інші захворювання (табл. 1.1) [1].

---

Таблиця 1.1 - Лікування захворювань тварин за допомогою гірудологічного впливу [1]

Тварини	Коні	Коти	Собаки
Захворювання	лихоманка	дископатії	післяопераційні рани
	ламініт	післяопераційні рани	остеоартрит хребта
	тендініт	екзема	дископатії
	теносиновіт	абсцеси	синдром кінського хвоста
	атаксія	напруження зв'язків	дисплазія стегна та ліктів
	міозит	дисплазія коліна	неврит
	спінальний остеоартит	неврити	екзема вухів
	артрит плечового суглобу	мастит	погане загоєння ран, післяопераційні рубці, тендініт, теносиновіт, мастит

### 1.8. Медичні п'явки у медицині

Із-за наявності в організмі МП більш як 100 БАР, які володіють багатьма терапевтичними ефектами, ГТ та фармакологічні препарати на основі секрету слинних залоз (ССЗ) МП ефективно використовують із метою профілактики та лікуванні багатьох захворювань [1-18]: псоріазу; в кардіології — при лікуванні серцевої недостатності, гіпертонічної хвороби, інфекційного міокардиту, стенокардії; в офтальмології — для лікування глаукоми, проліферативної ретинопатії, геморагічно-фібриноїдного синдрому; в оториноларингології — при гострій сенсоневральній приглухуватості, гострих та хронічних захворюваннях середнього та внутрішнього вуха; в травматології — при

радикулопатіях, артритах, 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 розладах; в стоматології — при хронічних та дистрофічних захворюваннях слинних залоз, при стоматитах, пульпітах та ін. [1-3]. Також ефективно ГТ застосовується у психотерапії [3], для усунення проявів алергії [2]. В практиці зарубіжних країн МП широко використовують при трансплантаціях із метою усунення венозного застою, лікуванні захворювань нервової системи [2], до того ж із превентивною антибіотикотерапією, в реконструктивній хірургії [1], лікуванні інфекційних захворювань [3], чоловічому та жіночому безплідді [2, 3], чоловічому пріапізмі [2], діабеті, захворюванні передміхурової залози, бронхіальній астмі, еритематозному вовчаку, для профілактики онкологічних захворювань [1-3].

### 1.9 Побічні ефекти від гірудотерапії та протипоказання

Перед ГТ рекомендовано пройти консультацію лікаря фізіотерапевта, який має спеціальну підготовку з лікування МП. Тому, що перед початком лікування важливо оцінити не тільки показання до ГТ, але і виключити усі протипоказання.

До основних протипоказань до ГТ відносяться:

1. Лейкози.
2. Анемії.
3. Захворювання, що супроводжуються порушеннями згортання крові (гемофілія та геморагічні діатези).
4. Гострі лихоманкові захворювання з невідомою етіологією.
5. Ерозивно-виразкові ураження та пухлини шлунково-кишкового тракту.



6. Кахексія.
7. Стан алкогольного сп'яніння.
8. Активні форми туберкульозу.
9. Стан гострого психічного збудження.
10. Підгострий бактеріальний ендокардит.
11. Різде виснаження.
12. Вагітність.
13. Артеріальна гіпотонія.
14. Стан після операцій на мозку та хребті.
15. Індивідуальна непереносимість МП [1].

#### Можливі побічні ефекти після гірудотерапії

Вченими виявлено деякі негативні випадки після ГТ: описаний випадок розвитку червоного плоского лишая [58], випадок бешихового запалення, випадок гемартрозу [59], серія випадків виникнення шкірної псевдолімфоми [60], описано розвиток неоклюзійної мезентеріальної ішемії [61], орбітального целюліту [62], тривалі кровотечі, лімфоїдна гіперплазія, періорбітальний целюліт [1, 63] та формування шрамів на місці укусу, а також різні алергічні реакції [1].

У шлунково-кишковому тракті п'явок знаходиться кілька видів бактерій: *Aeromonas hydrophila* та *A. veronii biovar sobria*, які перетравлюють з'їдену кров та здатні інфікувати при ГТ. У США задля уникнення інфекцій рекомендують проводити курси антибіотикотерапії препаратами фторхінолонового ряду після сеансів ГТ [1].

Отже, найбільш дослідженими є питання стосовно прояву ефектів деяких БАР МП, але подальшого вивчення потребує їхня імуномодуляторна дія.

## 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 2.1 Об'єкти та матеріали дослідження

Усі експериментальні дослідження проводилися на базі навчально-науково-дослідної лабораторії клітинної та організменної біотехнології. Проведені з дотриманням усіх біоетичних норм, які відводяться до тварин. Згідно Закону України №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006 р.), Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Страсбург, 1986 р.). Самців та самиць щурів у дослідженні використовували умовно здорових, які не мали зовнішніх проявів захворювань і попередньо пройшли карантинний режим. Спочатку в досліді було задіяні статевозрілі 3 самця та 3 самиці віком 5-6 місяців (з розрахунку на 1 самця по 1 самиці), яким моделювали гірудологічний вплив.

МП відбирали віком від 7 місяців, вирощених на базі навчально-науково-дослідної лабораторії клітинної та організменної біотехнології Запорізького національного університету (ТУ У 05.0-02125243002:2009 «П'явка медична», санітарно-епідеміологічний висновок МОЗ України № 05.03.02-06/49982, від 12.08.2009 р.), у яких останнє годування кров'ю великої рогатої худоби було 4 місяців тому.

Приставки комбіновано виконували самицям нелінійних лабораторних щурів 6 разів (1 МП на кожну приставку), чергуючи куприкову ділянку з холкою для підвищення загального ефекту, а не локального. МП відпадали через 25-30 хв після повного насичування. Щура фіксували у фіксаторі, а місце приставки заздалегідь вистригали. На 1 добу самиць відсаджували від самців для загоєння ранок. Потім знову підсаджували для злучки. Після вагітності самиць відсаджували від самців. На 30 добу приплід відсаджували від самок. На 55 добу (кінець статевого дозрівання) відбирали приплід –самців по 9 особин в кожній групі: контроль (інтактні тварини) та дослід (на фоні ГВ).

Приплоду щурів додаткового гірудологічного впливу не здійснювали. Декапітували після швидкого здвигу шийних хребців. Відбирали у них кров після декапітації та кістковий мозок із стегнової кістки. Кров розводили гепарином 1:10. Кістковий мозок досліджували негайно після аналізу крові.

Аналізували загальну кількість еритроцитів та лейкоцитів стандартним методом, лейкоцитарну формулу крові [2] та мітотичний індекс кісткового мозку [1].

## 2.2 Методи дослідження

### 2.2.1 Оцінка лейкоцитарного складу крові

Дослідження лейкоцитарного складу крові щурів проводили згідно загальноприйнятим методам. З аналізом загальної кількості лейкоцитів та лейкоцитарної формули крові [1, 2, 64].

#### 2.2.1.1 Визначення загальної кількості лейкоцитів

Досліджували артеріовенозну кров стабілізовану антикоагулянтном. В лунку серологічного планшету вносили 0,38 мл 5% розчину оцтової кислоти, підфарбованою кількома краплями розчину метиленового синього (для підфарбовування ядер лейкоцитів), додавали 0,02 мл досліджуваної крові стабілізованою гепарином 1:10 [2]. Суміш ретельно перемішували піпеткою та залишали на 1-2 хв. до повного лізису еритроцитів, після чого знову ретельно перемішували та заповнювали нею камеру Горяєва, залишали її в горизонтальному положенні на 1 хв. для осідання лейкоцитів. Лейкоцити

підраховували під мікроскопом у 100 великих квадратах камери Горяєва при малому збільшенні (окуляр К7×, об'єктив 20×).

Розрахунок кількості лейкоцитів проводили за формулою (2.1):

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

де  $X$  — число лейкоцитів у 1 мкл крові;

$a$  — число лейкоцитів у 100 великих квадратах.

Результат виражали у вигляді  $\times 10^9/\text{л}$ .

Референтні значення для лабораторних щурів в середньому для тварин відповідного віку  $6,5-12,0 \times 10^9/\text{л}$  [1].

#### 2.2.1.2 Визначення лейкоцитарної формули

Мазки крові для морфологічного дослідження готували за стандартною методикою [64]. Висушені на повітрі мазки крові фіксували метиловим спиртом протягом 5 хв., потім проводили експозицію 4 хв. у фосфатно-сольовому розчині буферу. Мазки крові фарбували протягом 40 хв. 15% розчином фарби Романовського-Гімзи, приготованої на буфері, після чого ще раз ополіскували у дистильованій воді, диференціювали у 0,01% розчині соляної кислоти на дистильованій воді, для видалення надлишку фарби, ополіскували у кількох порціях дистильованої води, висушували на повітрі та проводили визначення клітин під мікроскопом [1, 64].

Дослідження пофарбованого мазка крові здійснювали під імерсійним об'єктивом (100×) мікроскопа. Лейкоцити диференціювали за відповідними морфологічними ознаками [1, 2, 64], рахували 200 лейкоцитів. Після завершення аналізу 200 лейкоцитів визначали лейкоцитарну формулу — відносне співвідношення різних видів лейкоцитів розраховували за формулою (2.2):

$$100\% (200 \text{ клітин}) = П + С + Л + М + Е + Б \quad (2.2)$$

де 100% (200 клітин) – загальна кількість усіх видів лейкоцитів;

П – паличкоядерні нейтрофіли;

С - сегментоядерні нетрофіли;

Л – лімфоцити;

М – моноцити;

Е – еозинофіли;

Б – базофіли.

Референтні значення для лабораторних щурів (вік 55-60 тижнів) в середньому становлять: паличкоядерні нейтрофіли 1-4%, сегментоядерні нейтрофіли 6-17%, лімфоцити 75-94%, моноцити 0-3%, еозинофіли 0-3% [1].

### 2.2.2 Оцінка загальної кількості еритроцитів

Кількість еритроцитів визначали за стандартною методикою [1]. В суху чисту пробірку вносили 4 мл 0,9% розчину хлориду натрію, куди вносили 0,02 мл гепаринізованої крові лабораторного щура. Вміст пробірки старанно змішували. Одну краплю приготованої суспензії вносили в щілину камери Горяєва, що утворилася між склом і камерою. Камеру залишали на 1 хв. Для осідання формених елементів. Еритроцити підраховували під мікроскопом у 5 великих квадратах камери Горяєва по діагоналі ( $5 \times 16 = 80$  малих квадратів) при малому збільшенні (окуляр К7×, об'єктив 20×). Підрахунку підлягали еритроцити, що лежали в самому малому квадраті на лівій та верхній його межах. Результат отримували шляхом множення числа еритроцитів в 5 великих

квадратах (80 малих) на  $10^{10}$ , при цьому результат виражали в кількості клітин на 1 л крові ( $\times 10^{12}/\text{л}$ ) [1, 2, 64].

Референтні значення для лабораторних щурів відповідного віку в середньому становлять  $4,7-7,0 \times 10^{12}/\text{л}$  [1].

### 2.2.3 Визначення мітотичного індексу кісткового мозку

Прліферативну активність кісткового мозку оцінювали за мітотичним індексом (МІ). Кістковий мозок вилучали з стегнової кістки, розрізуючи її вздовж та вимиваючи 1 мл 0,9% цитрату натрію, далі інкубували на водяній бані 10 хв. при  $37^{\circ}\text{C}$ , після інкубації клітини осаджували центрифугуванням упродовж 5 хв. при 1000 об./хв., відбирали надосад, до осаду додавали 3 мл фіксатору Карнуа (3 частини метилового спирту та 1 частина концентрованої оцтової кислоти), перемішували і ставили у холодильник на 30 хв., центрифугували та замінювали фіксатор, залишали на добу у холодильнику. Після цього готували цитологічні препарати, висушували їх та фарбували упродовж 35 хв. за Романовським-Гімзи. Аналізували 1000 клітин, визначали ті клітини, що знаходяться у мітозі. МІ виражали в проміле — кількості мітозів на 1000 клітин [1].

### 2.3 Статистична обробка експериментальних даних

Статистичну обробку експериментальних досліджень проводили за допомогою пакету прикладних програм Microsoft XP «Excel» та за допомогою пакету прикладних програм IBM SPSS Statistics 20,0 (USA) з використанням методів непараметричної статистики. Для кожної вибірки обчислювали середнє

арифметичне – сума всіх фіксованих значень набору, поділена на кількість елементів набору, медіану – величину ознаки, що розташована по середині ранжованого ряду вибірки, перший (25%) і третій (75%) квантілі. Для оцінки достовірності відмінностей незалежних вибірок використовували ранговий критерій Манна-Уїтні. Критерій Манна-Уїтні призначений для порівняння двох вибірок за рівнем досліджуваної ознаки вимірної в порядковій або інтервальній шкалі. Критерій непараметричний. За об'єднаною вибіркою формується варіаційний ряд. Для кожного значення варіанти визначається її ранг — порядковий номер (або середнє арифметичне порядкових номерів) цієї варіанти у ряді. Для кожної вибірки обчислюється сума рангів значень, що до неї входять.

Статистичні гіпотези формулюються так:

$H_0$ : Рівні досліджуваної ознаки у вибірках статистично не відрізняються.

$H_1$ : У одній з вибірок рівень досліджуваної ознаки вищий, ніж в іншій.

Статистика Манна-Уїтні обчислюється за формулою (2.3):

$$U = n_1 n_2 + \frac{1}{2} n^* (n^* + 1) - T^* \quad (2.3)$$

де  $n_1, n_2$  — обсяги вибірок,  $T^*$  — більша рангова сума,  $n^*$  — обсяг вибірки з більшою ранговою сумою. Критерій має лівосторонню критичну область. Зауважимо, що для  $n_1 > 8, n_2 > 8$  статистика  $Z = \frac{U - n_1 n_2 / 2}{\sqrt{n_1 n_2 (n_1 + n_2 + 1) / 12}}$  має розподіл, близький до стандартного нормального. Він призначений для перевірки нульової гіпотези про однаковість розподілу досліджуваних сукупностей або для перевірки рівності окремих параметрів цих розподілів, наприклад, середніх значень. Спостереження мають бути непарними. Цей критерій є найпотужнішим непараметричним аналогом t-критерію Стюдента для незалежних вибірок. У деяких випадках його потужність може бути навіть більшою, ніж у t-критерію. Середні дані в таблицях двох груп контрольної та дослідної представлені у вигляді  $Me (Q1; Q3)$ , де  $Me$  – медіана,  $Q$  – квантілі. Відмінності вважали достовірними при рівні значимості  $p < 0,05$  [65-67].

### 3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1 Оцінка загальної кількості еритроцитів крові у нелінійних лабораторних щурів у кінці статевого дозрівання на фоні гірудологічного впливу

При аналізі загальної кількості еритроцитів показники, як контрольної, так і дослідної груп в межах референтних значень даного віку (55 днів), що свідчить про фізіологічно здоровий стан тварин [2], табл. 3.1.

При статистичному аналізі зміни показника не достовірні згідно критерію Манна-Уїтні  $p > 0,05$  табл. 3.1. Критерій не значно підвищений, а показник медіани загальної кількості еритроцитів дослідної групи збільшений у порівнянні з контрольною у середньому на 6%. Можливо, при збільшені вибірки достовірність даного показника могла б проявитися.

Таблиця 3.1 – Загальна кількість еритроцитів у нелінійних лабораторних щурів у кінці статевого дозрівання на фоні гірудологічного впливу

№	Еритроцити, $\times 10^{12}/\text{л}$	
	Контроль	Дослід
1	2	3
1	6,6	6,5
2	6,0	7,0
3	7,1	7,2
4	6,5	6,9
5	6,8	7,2
6	6,6	5,9
7	6,7	6,9
8	7,0	7,3



1	2	3
9	5,9	7,1
Me	6,6	7
Q1	6,5	6,9
Q3	6,8	7,2
T1	102	
T2		62
U	24	
p	p > 0,05	

Примітки: тут і далі

Me — медіана;

Q1, 3 — квартиль.

p – рівень значимості достовірності.

U – критерій Манна-Уїтні.

T1, T2 – сума рангів контрольної та дослідної групи відповідно.

3.2 Оцінка загальної кількості лейкоцитів крові у нелінійних лабораторних щурів у кінці статевого дозрівання на фоні гірудологічного впливу

Показники загальної кількості лейкоцитів контрольної та дослідної груп представлені в таблиці 3.2 відповідають референтним значенням [1].

Таблиця 3.2 – Загальна кількість лейкоцитів у нелінійних лабораторних щурів у кінці статевого дозрівання на фоні гірудологічного впливу

№	Лейкоцити, $\times 10^9/\text{л}$	
	Контроль	Дослід
1	7,3	8,3
2	6,9	8,6
3	7,1	7,9
4	5,9	8,0
5	7,4	8,5
6	6,5	7,7
7	7,1	8,9
8	7,4	8,4
9	6,0	7,9
Me	7,1	8,3
Q1	6,5	7,9
Q3	7,3	8,5
T1 контроль	124	
T2 дослід		44
U	2	
p	$p < 0,05$	

Загальна кількість лейкоцитів достовірно збільшується згідно статистичним показникам у дослідної групи у порівнянні з контрольною на 17,0% ( $p < 0,05$ ) табл. 3.2, і знаходиться в межах референтних значень, що відкидає розвиток патології, і свідчить про стимулюючі властивості БАР МП.

Слід відмітити, що інші дослідники при локальних приставках МП (на 1 ділянку тіла) отримували схожі результати, але з менш вираженим ефектом [1, 2] порівняно з нашим дослідженням. Це свідчить про те, що комбіновані приставки МП, наприклад, як в нашому досліді, можуть збільшувати загальні прояви відповіді організму.

Також слід відмітити, що при порівнянні індивідуальних показників загальної кількості лейкоцитів кожної тварини обох груп тварин із референтними значеннями, вони не виходять за межі норм.

### 3.3 Оцінка лейкоцитарної формули крові у нелінійних лабораторних щурів у кінці статевого дозрівання на фоні гірудологічного впливу

Досліджуючи лейкоцитарну формулу крові контрольних та дослідних груп лабораторних щурів, то вони відповідають фізіологічним нормам даного віку. Слід відмітити, що лейкоцитарна формула крові була збалансована, без статистично значимих відмінностей (табл. 3.3), що відкидає патологічні процеси. Згідно чого збільшення загальної кількості лейкоцитів, що ми отримали в досліді, може бути проявом загальної їх стимуляції під дією БАР слини МП.

Таблиця 3.3 – Лейкоцитарна формула крові у нелінійних лабораторних щурів у кінці статевого дозрівання на фоні гірудологічного впливу

Група тварин		Лейкоцитарна формула крові, %				
		Нейтрофіли		Лімфоцити	Моноцити	Еозинофіли
		Паличкоядерні	Сегментоядерні			
1		2	3	4	5	6
1	Контроль	4	8	86	1	1
	Гірудовплив	4	12	82	1	1
2	Контроль	3	7	89	1	-
	Гірудовплив	4	9	85	1	1
3	Контроль	2	8	90	-	-
	Гірудовплив	3	13	84	-	-
4	Контроль	3	6	91	-	-
	Гірудовплив	4	7	87	1	1
5	Контроль	3	9	88	-	-
	Гірудовплив	3	14	82	-	1
6	Контроль	4	8	86	1	1
	Гірудовплив	3	10	85	1	1

Продовження таблиці 3.3

1		2	3	4	5	6
7	Контроль	2	9	88	1	-
	Гірудовплив	3	8	88	-	1
8	Контроль	4	10	84	1	1
	Гірудовплив	4	15	89	1	1
9	Контроль	2	5	92	1	-
	Гірудовплив	3	11	85	1	-
Me контроль		3	8	88	0	0
Me гірудовплив		4	11	85	1	1
Q1 контроль		2	7	86	0	0
Q1 гіруловплив		3	9	85	0	1
Q3 контроль		4	9	89	1	1
Q3 гірудовплив		4	13	87	1	1
T1 контроль		84	99	45	52	76
T2 дослід		58	48	88	61	49
U		42	27	38	65	50
p		p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05

### 3.4 Зміни мітотичного індексу у нелінійних лабораторних щурів у кінці статевого дозрівання на фоні гірудологічного впливу

Слід відмітити, що отриманий кістковий мозок нелінійних лабораторних щурів обох груп був морфологічно нормальним без значних дефектів, рис. 3.1

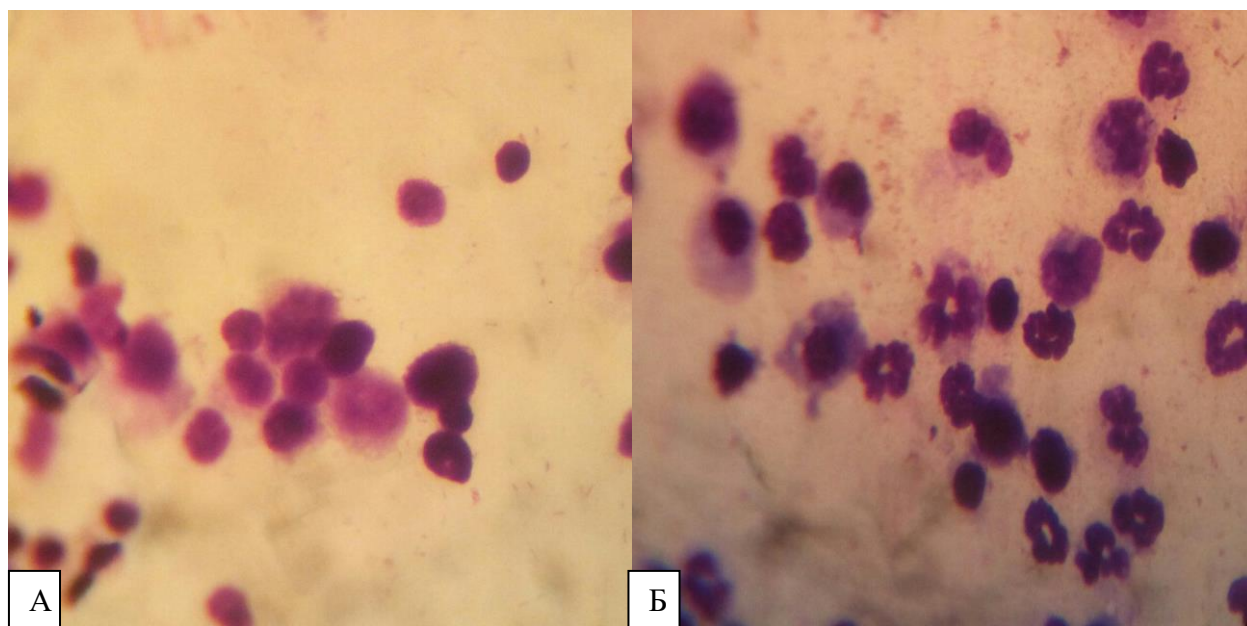


Рис. 3.1 — Проліферативна активність кісткового мозку лабораторних щурів віку 55 днів: А- контроль, Б – дослід (на фоні гірудологічного впливу)

Дослідження мітотичного індексу кісткового мозку дослідної групи (на фоні гірудологічного впливу) у порівнянні з контрольною групою при співставленні медіани зареєструвало статистичне його збільшення, майже на 42% при  $p < 0,05$  за критерієм Манна-Уїтні, табл. 3.4.

Збільшення мітотичного індексу, свідчить про те, що БАР МП мають здатність підвищувати фізіологічну проліферацію клітин кісткового мозку, що відмічалось іншими ученими, але в меншому прояві (в середньому 14,4 %) [1].

Таблиця 3.4 – Оцінка мітотичного індексу у нелінійних лабораторних щурів у кінці статевого дозрівання на фоні гірудологічного впливу

№	Мітотичний індекс, ‰	
	Контроль	Дослід
1	10,1	14,5
2	11,1	15,1
3	10,5	14,4
4	9,9	13,9
5	10,9	15,3
6	11,0	14,2
7	9,8	15,7
8	10,6	15,3
9	11,2	15,1
Me	10,6	15,1
Q1	10,1	14,4
Q3	11	15,3
T1	126	
T2		43
U	0	
p	p < 0,05	

Узагальнюючи отримані експериментальні дані, ми спостерігаємо сильний фізіологічний стимулюючий ефект БАР МП на імунні клітини крові нащадків лабораторних щурів у кінці статевого дозрівання при комбінованих приставках МП на холку та куприкову ділянку їх батькам у період злучки, як прояв загальних ефектів. Слід відмітити, що всі тварини з потомства лабораторних щурів були здорові та без тератогенних проявів.

## 4 ОХОРОНА ПРАЦІ

Метою даного розділу є набуття навичок та теоретичних знань стосовно охорони праці та безпеки, щодо виникнення та уникнення можливих надзвичайних станів при виконанні кваліфікаційної роботи на тему: «Мітотична активність клітин кісткового мозку у кінці статевого дозрівання на фоні гірудологічного впливу»

Перед початком виконання експериментальних дослідів своєї роботи, мені науковим керівником був проведений інструктаж з охорони праці за інструкціями № 2, № 10, № 60 та № 61 з Охорони праці та інструкцією № 2 з Пожежної безпеки.

При виконанні експериментальної частини моєї кваліфікаційної наукової роботи мені приходиться мати справу з тваринами, біологічними речовинами (кров та кістковий мозок щурів), різними хімічними реактивами, електроприладами та лабораторним посудом. Де основні небезпечні виробничі пошкодження які можуть статися при виконанні роботи – це термічні та хімічні опіки, укуси тварин, електротравми, потрапляння різних хімічних і біологічних рідин на одяг, шкіру та слизові оболонки. Мої дослідження згідно наукової роботи проводилися в навчально-науково-дослідній лабораторії клітинної та організменної біотехнології, де можна отримати травми різного характеру в результаті невмілого та недбалого використання приладів. Тому потрібно чітко дотримуватися усіх вимог з охорони праці. І заздалегідь до початку роботи ознайомитися із усіма правилами лабораторії та пройти інструктаж із охорони праці. У робочій зоні лабораторії параметри температури, вологості, освітлення, швидкості переміщення повітря повинні відповідати вимогам ДСН 3.3.6.042 99 [68].

Повітря робочої зони лабораторії повинно суворо дотримуватися ДСТУ 12.1.005-88 [69]. У лабораторії повинен бути постійний рух свіжого повітря, що забезпечується шляхом відкриття вікон, або включенням витяжної вентиляції,



особливо при роботі з отруйними та речовинами з неприємним запахом та відповідати СНІп 2.04.05-91 та ДСТУ 12.1.005-88 [69, 70].

Також, важливе значення для збереження нормального зору має освітленість робочого місця, що забезпечується за рахунок ламп накаливання, люмінесцентних ламп та потрапляння сонячного світла. Природне та штучне освітлення лабораторії повинне суворо дотримуватися вимогам ДБН В.2.5–28–2006 [71].

У лабораторії при виконанні експериментальних досліджень, наприклад при роботі з вібрційно-шумовим обладнанням, повинні притримуватися санітарним нормам вібрації та шуму з дотриманням ДНАОП 0.03-3.12-84 та ДНАОП 0.03-3.14-85 [72].

Швидкість руху повітря у приміщенні повинно бути 0,25-0,3 м/с. Відносна вологість повітря 60-70%. Атмосферний тиск таким як і в навколишньому середовищі. Оптимальним вважають атмосферний тиск 760 мм.рт.ст Температура повітря в лабораторії повинна бути в діапазоні від 18° до 20°С [73].

Важливо, щоб на всі види робіт, які будуть проводитися в лабораторії і можуть викликати небезпеку були підготовлені документи, які узгоджується з науковим керівником до початку проведення дослідів.

Для уникнення різних можливих нещасних випадків та пожеж слід чітко виконувати правила з техніки безпеки [74]. Допуск до лабораторії для виконання експериментальної частини кваліфікаційної роботи тільки після отримання дозволу. Після чого обов'язково одягається спеціальний одяг (халат, ковпак, змінне взуття, рукавички, маска, окуляри та ін.), ознайомитись із нормами правил та інструкціями, щодо уникнення небезпечних факторів, матеріалами, інструментами, реактивами, обладнанням, перевірити перед роботою цілісність дротів, наявність заземлення приладів. Також, перевірити наявність засобів гасіння вогню і та аптечки для надання першої долікарської допомоги [75].

При проведенні дослідів, оформлені роботи та документів моєї наукової роботи доводилося працювати із різними електроприладами (центрифуги, термостат, мікроскоп, комп'ютер та ін.). Тому для уникнення нещасних випадків я притримувалася вимог ДНАОП 0.00-1.21-98 «Правила безпечної експлуатації електроустановок споживачів» [75].

Із усіма приладами після ознайомлення інструкцій до обладнання я працювала у присутності лаборанта або наукового керівника. Після закінчення роботи прилади вимикалися із електромереж.

При роботі в лабораторії з хімічними реактивами обов'язково надався у лабораторії спецодяг і заздалегідь реактиви проходили перевірки згідно ст. 163 кодексу законів про працю України і ДНАОП 0.00-4.26-96 [73]. Після завершення дослідів реактиви зберігалися відповідно нормативним вимогам [72, 73].

В лабораторії у вільному доступі були розміщені усі справні первинні засоби пожежогасіння: вогнегасники пінні; ящик або відро з піском та совком; покривало з вогнетривкого матеріалу.

Обробка моїх експериментальних результатів наукової роботи проводилася з використанням комп'ютера. До роботи на комп'ютері я була допущена тільки після проходження навчання та інструктажу з охорони праці [75]. Вмикання комп'ютерів до електричної мережі здійснювалися тільки через спеціально встановлені електричні розетки або вилки із заземленням, заздалегідь перевірені. Площа, яка припадала на одного працюючого з дисплеєм відповідала нормам, і становила не менше 6,0 м<sup>2</sup>. Відстань між робочими місцями не менше 1,5 м в ряду, і не менше 1,25 м між рядками. Рівні температури повітря де знаходилися комп'ютерна техніка відповідала нормам і становила близько 22-24°C, швидкість руху повітря не менше 0,2 м/с. В приміщеннях лабораторії кожен день проводилося вологе прибирання та регулярне провітрювання. Освітлення робочих місць в горизонтальній площині на рівні 0,8 м від підлоги було не менше 400 лк, що відповідало стандартам [73].

Відстань моїх очей від екрану дисплея становила приблизно 50 – 70 см, кут зору 10-20°. Для запобігання перенапруження загального стану організму я обмежувала сумарний час роботи за комп'ютером близько до 50% в продовж зміни, згідно нормам [72]. Відомо, що організовані перерви для кожного виду роботи різні. Тому я відпочивала 15 хв. через кожні 2 години. Під час відпочинку виконувала гімнастичні вправи для зняття зорової та загальної втоми [72, 73].

Напруга живлення до якої підключені усі електроприлади (220 В) є небезпечною для життя людини. Тому потрібно суворо дотримуватися інструкції з експлуатації комп'ютера, коректно завершувати роботу згідно вимогам СН 2.2.2.542-96 [75]. Екран дисплея комп'ютера є джерелом електромагнітного випромінювання, яке може руйнувати зір, інколи без можливого відновлення, викликати загальну втому. Тому треба, щоб очі знаходилися на відстані 60-70 см від дисплею згідно нормам [74].

Під час проведення експериментальних досліджень можуть виникати різні нещасні випадки, які в основному можуть з'явитися із-за недотримання правил техніки безпеки при використанні реактивів, лабораторного посуду та обладнання. Термічні опіки можуть виникнути при дії надвисокої температури. Тому обов'язково потрібно знати невідкладну допомогу при опіках. Перша допомога при термічних опіках полягає в швидкому припиненні дії негативного фактора. Якщо горить одяг, людину потрібно повалити на землю та накрити ковдрою, щоб припинився доступ повітря до полум'я, а потім облити його водою. Пошкоджені ділянки шкіри потрібно обробити аерозольним складом проти опіків, накласти асептичну пов'язку. Для знеболювання дають 1 – 2 таблетки «Кетанов», а пов'язку за потреби змочують розчином анестетика. Після цього потерпілого необхідно доставити в опікове відділення [75].

Хімічні опіки можуть виникнути при потраплянні на шкіру розчинів лугів, сильних кислот, солей деяких важких металів. Тому одяг, який промочений якоюсь хімічною речовиною, негайно потрібно видалити. Пошкоджену ділянку тіла полити великою кількістю проточної води,

нейтралізувати хімічний агент при опіках кислотою 4% потрібно розчином соди, а при опіках лугами – слабким розчином оцтової кислоти [72, 74].

При проведенні експериментальних дослідів, я працювала з біологічними рідинами тварини, які могли потрапити на шкіру, одяг чи слизові оболонки. Всі біологічні рідини згідно наказу МОЗ України №995 від 05.11.2013р. треба сприймати як потенційно заражені ВІЛ-інфекцією, тому потрібно обережно працювати з ними. Тому при потраплянні крові, чи кісткового мозку щурів на халат, потрібно його зняти і замочити у дезінфікуючому розчині на 1 годину. При потраплянні біологічного матеріалу на слизову оболонку очей потрібно промити великою кількістю води і закапати 30% розчином альбуциду, якщо рідина потрапила на слизові оболонки ротової порожнини, потрібно прополоскати 70% розчином спирту. Обов'язково при виникненні якоїсь небезпеки чи для уникнення її повідомляти керівництво лабораторії, наукового керівника та лаборанта.

При виникненні електротравми потерпілого потрібно впершу чергу звільнити від впливу струму. Для зупинення дії струму повернути вимикач, вимкнути рубильник, вивернути пробки на щітку. Звільнити від електричного проводу гумовими рукавички або обмотаною рукою шматком шовкової тканини та користуватися сухою дерев'яною палицею. Якщо є ознаки життя накласти асептичні пов'язки на «мітки струму», які є опіками, і відвезти потерпілого в лікарню. При відсутності ознак життя після звільнення потерпілого від дії електричного струму потрібно негайно почати проведення реанімаційних заходів [76].

Об'єктом дослідження моєї наукової роботи була кров та кістковий мозок щурів у кінці статевого дозрівання на фоні гірудологічного впливу, тому обов'язково потрібно знати умови утримання та догляд за тваринами.

Тварини для проведення експериментальних дослідів утримуються у віварію. Категорично забороняється приводити тварин, які не перевірені ветеринарним лікарем і тих, що не пройшли карантинний термін [77]. Для визнання їх умовно здоровими та тих, які можна використовувати у досліді.

Для віварію відводять окреме приміщення з окремим входом, відокремлене від лабораторії і робочих кімнат. Оснащений двома входами та виходами. Повітря, що викидається назовні, повинно очищуватися.

Вентиляція віварію повинна працювати цілодобово. Для знезараження повітря встановлюють бактерицидні опромінювачі.

Стіни приміщень, в яких містяться тварини від підлоги до стелі покривають глазурованою плиткою. Прибирання віварію проводять щодня.

Після закінчення прибирання все зібране у віварію сміття спалюють або утилізують [78].

Основною специфічною небезпекою для людини яка доглядає за лабораторними тваринами, є можливість зараження збудниками інфекцій, особливо через укуси.

Для попередження можливого появу травматизму усі маніпуляції з лабораторними тваринами виконують в рукавичках у спеціальних фіксаторах. Після кожного дослідження або догляду за тваринами варто ретельно вимити руки теплою водою з милом та протерти дезінфікуючим розчином.

При укусі щуром варто негайно промити ранку спиртовим розчином та обробити її розчином йоду. Обов'язково повідомити керівництво лабораторії, наукового керівника та лаборанта [78, 79].

Таким чином, завдяки отриманим теоретичним навичкам та знанням із охорони праці, проведених інструктажів з техніки безпеки, мені вдалося уникнути усіх можливих небезпечних факторів, які могли виникнути при виконанні моєї кваліфікаційної роботи.

## ВИСНОВКИ

1. Показники загальної кількості еритроцитів крові лабораторних щурів у кінці статевого дозрівання, як у контрольної (інтактні), так і у дослідної груп (на фоні гірудологічного впливу, що проводився їхнім батькам у період злучки) знаходяться в межах референтних значень даного віку, що свідчить про фізіологічно здоровий стан тварин. При статистичному аналізі зміни показника не достовірні ( $p > 0,05$ ) згідно непараметричного критерію Манна-Уїтні.

2. Загальна кількість лейкоцитів достовірно збільшується у дослідної групи лабораторних щурів у кінці статевого дозрівання на фоні гірудологічного впливу у порівнянні з контрольною на 17% ( $p < 0,05$ ), в межах референтних значень, що відкидає розвиток патології, і свідчить про стимулюючі властивості БАР МП.

3. Лейкоцитарна формула крові контрольної та дослідної групи лабораторних щурів відповідає фізіологічним нормам даного віку та статистично значимо не відрізняється.

4. Мітотичний індекс кісткового мозку дослідної групи лабораторних щурів у порівнянні з контролем статистично значимо збільшувався майже на 42% ( $p < 0,05$ ).

## ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Результати дослідження поширюють уявлення стосовно гірудологічного впливу на гематологічні показники крові та мітотичну активність кісткового мозку. Отримані дані можуть бути використані у сільському господарстві та ветеринарії для відновлення мітотичної активності кісткового мозку при різних патологіях.

Отримані в роботі результати можуть бути впроваджені в навчальний процес вищих навчальних закладів, а саме при викладанні окремих тем в таких дисциплінах, як «Загальна цитологія», «Імунологія», «Фізіологія крові».

## ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Амінов Р. Ф. Природний імуномодулятор із тіл медичних п'явок: отримання та застосування: монографія. Запоріжжя : Запорізький національний університет, 2022. 164 с.
2. Амінов Р. Ф. Вплив гірудопунктури та екстракту з тканин медичної п'явки на імунну реактивність самиць та приплоду щурів у постембріональному онтогенезі : дис. ... канд. біол. наук: 03.00.09. Київ, 2018. 149 с.
3. Литвиненко Р. О. Імуномодуляторні властивості біологічно активних речовин медичної п'явки в умовах гірудовпливу : дис. ... канд. біол. наук: 03.00.09. Київ, 2016. 169 с.
4. Wüstenhagen D. A., Lukas P., Müller C. Cell-free synthesis of the hirudin variant 1 of the blood-sucking leech *Hirudo medicinalis*. *Scientific Reports*. 2020. № 10. P. 19818.
5. Baranzini N., Weiss-Gayet M., Chazaud B. Recombinant *HvRNASET2* protein induces marked connective tissue remodelling in the invertebrate model *Hirudo verbana*. *Cell and Tissue Research*. 2020. Vol. 380. P. 565–579.
6. Kabeiseman E., Paulsen R., Burrell B. D. Characterization of a monoacylglycerol lipase in the medicinal leech, *Hirudo verbana*. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2020. Vol. 243–244. P. 110433.
7. Antimicrobial Role of RNASET2 Protein During Innate Immune Response in the Medicinal Leech *Hirudo verban* / N. Baranzini et al. *Front. Immunol*. 2020. № 11. P. 1-18.
8. Lee Y.C., Chiu C.J. Ocular leech infestation. *Clin Ophthalmol*. 2015. № 9. P. 419–421.
9. Zavalova L. L. Antibacterial nonglycosidase activity of invertebrate destabilase-lysozyme and of its helical. Amphipathic peptides. *Chemotherapy*. 2006. Vol. 52. P. 158-160.



10. Prakash A., Parikshit D., Arun G.R. A review on the role of jalaukavacharana (hirudotherapy) in the management of the venous ulcer. *Universal Journal of Pharmacy*. 2013. № 2. P. 38-43.
11. Karadag A.S., Calka O., Akdeniz N. A case of irritant contact dermatitis with leech. *Cecen I Cutan Ocul Toxicol*. 2011. Vol. 30. P. 234-235.
12. A peptide inhibitor of macrophage migration in atherosclerosis purified from the leech *Whitmania pigra* / B. Hu et al. *J Ethnopharmacol*. 2020. Vol. 254. P. 112723.
13. Hosseinirad S.A., Yaghoubi G., Haidari, B. Misdiagnosis of Ocular Leech Infestation. *Journal of surgery and trauma*. 2017. № 5, Issue 1-2. P. 36-38.
14. Surendranth D. Role of Leeches in Peri-orbital lacerations healed by primary intention. *International Journal of Ayurvedic Medicine*. 2016. № 7, Issue 1. P. 88-93.
15. Hirudo (Leech) for proliferative vitreous retinopathy A protocol for systemic review and meta-analysis / H. Huang et al. *Medicine*. 2021. Vol.100. P. 1-5.
16. Effectiveness of leech therapy in osteoarthritis of the knee: A randomized, controlled trial / A. Michalsen et al. *Ann. Intern. Med*. 2003. Vol. 139. P. 724-725.
17. Effectiveness of leech therapy in women with symptomatic arthrosis of the first carpometacarpal joint: a randomized controlled trial / A. Michalsen et al. *Pain*. 2008. Vol. 137, № 2. P. 452-459.
18. Rehman S. Management of Diabetic Foot Ulcer by *Hirudo medicinalis*, the “Healing Leech”. *Diabetic Foot Ulcer*. 2020. P. 315-330.
19. Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus / W. L. Li et al. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004. № 1. P.1– 21.
20. Hirudo lyophilized powder ameliorates renal injury in diabetic rats by suppressing oxidative stress and inflammation / F. Yang et al. *Evidence-based complementary and alternative medicine* 2021. P. 1-12.

21. Free flap salvage after recurrent venous thrombosis by means of large-scale treatment with medical leeches / Tashiro K. et al. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2016. № 4. P.e1157.
22. Зубкова Л. П. Применение гирудотерапии в стоматологии. *Український стоматологічний альманах*. 2007. № 1. P. 13–15.
23. Herlin C. Leech therapy in flap salvage: systematic review and practical recommendations. *Ann Chir Plast Esthet*. 2017. Vol. 62. P. 1–13.
24. Nanoencapsulation of *Hirudo medicinalis* proteins in liposomes as a nanocarrier for inhibiting angiogenesis through targeting VEGFA in the Breast cancer cell line (MCF-7) / Shakouri A. et al. *BioImpact*. 2021. № 11, Is. 5. P. x-x.
25. Houshyar K. S., Momeni A., Maan Z. N. Medical leech therapy in plastic reconstructive surgery. *Wien Med Wochenschr*. 2015. Vol. 165, № 19-20. P. 419-425.
26. Zulhisyam A. K. Local (Malaysian) leech as alternative healing treatment and an islamic perspective. *International Journal of Islamic Thought*. 2016. № 10. P. 68-77.
27. Semi-Solid Product of Medicinal Leech Enhances Wound Healing in Rats / L. Amani et al. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*. 2021. Vol. 16, № 4. P. e113910.
28. Stokoz K.Yu., Bystritskaya T. S. Leech therapy in women with a history of primary oligomenorrhea. *Амурский медицинский журнал*. 2016. № 3 – 4, (15 - 16). P. 106-108.
29. Sayed A. A., Sadeq R., Mojtaba T. Leech Therapy for Treating Priapism: Case Report Iran. *J Public Health*. 2017. Vol. 46, № 7. P. 985-988.
30. *Hirudo medicinalis* - historical and biological background and their role in microsurgery: Review article / A. K.Yapici et al. *Hand Microsurg*. 2017. № 6, Issue 1. P. 34-38
31. Historical Article: *Hirudo medicinalis*: ancient origins of, and trends in the use of medicinal leeches throughout history / I. S.Whitaker et al. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2004. Vol. 42. P. 133-137.

32. Mumcuoglu K. Y. Recommendations for the use of leeches in reconstructive plastic surgery. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014. P. 205929.
33. Singh A. P. Medicinal leech therapy (hirudotherapy): a brief overview. *Complement Ther Clin Pract.* 2010. Vol.16. P. 213-215.
34. Gileva O. S., Mumcuoglu K. Y. Biotherapy - History, Principles and Practice: A Practical Guide to the Diagnosis and Treatment of Disease using Living Organisms. *Springer.* 2013. P. 31-76
35. Medicinal leeches and hirudotherapy / A.Gödekmerdan et al. *Turk Parazitol Derg.* 2011. Vol. 35. P. 234-239.
36. Effectiveness of leech therapy in chronic lateral epicondylitis: a randomized controlled trial / M. Bäcker et al. *Clin J Pain.* 2011. Vol. 27. P. 442-447.
37. Glickman-Simon R., Ehrlich A. Leeches, creatine, xylitol, spinal manipulation, acupuncture. *Explore (NY).* 2012. № 8. P. 206-209.
38. AL-Mozan H. D. K., Alrikabi N. J. A. Review: Hirudo and its Medical Role. *International Journal of Pharmaceutical Research.* 2020. Vol. 12, Issue 2. P. 1843-1844.
39. Distribution and status of medicinal leeches (genes *Hirudo*) in the western palaeartic; anthropogenic, ecological, or historical effects / S. Utevsky et al. *Aquatic Conservation Marine and Freshwater Ecosystems.* 2010. Vol. 20, № 2. P. 198-210.
40. New distributional data for the Mediterranean medicinal leech *Hirudo verbana* Carena, 1820 (Hirudinea, Hirudinidae) in Italy, with a note on its feeding on amphibians / F. Marrone et al. *The Journal of Integrative Biogeography.* 2021. Vol. 36. P. a007.
41. Ceylan M., Çetinkaya O. Size and structure of the Mediterranean medicinal leech, *Hirudo verbana* populations inhabiting wetlands around Lake Eğirdir, Turkey. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.* 2021. Vol. 38, № 4. P. 437-447.

42. Ceylan M., Çetinkaya O. Investigation on the collection and economy of medicinal leeches from wetlands around lake Eğirdir, Turkey (in Turkish with English abstract). *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 2017. Vol. 41, №2. P. 96101.
43. Ceylan M., Küçükpara R., Akçimen U. Effects of broodstock density on reproduction efficiency and survival of southern medicinal leech, *Hirudo verbana* Carena, 1820. *Aquaculture*. 2019. Vol. 498. P. 279–284.
44. Ceylan M., Çetinkaya O., Kvist S. Function of the waterfowl nests as reproduction and living areas for leeches (Annelida: Hirudinea). *Animal Reproduction Science*. 2021. Vol. 232. P. 106816.
45. Growth, survival and reproduction of the Turkish medicinal leech, *Hirudo sulukii* / M.Ceylan et al. *Invertebrate Reproduction & Development*. 2021. Vol. 6581, № 1. P. 57-68.
46. Effect of water quality on monthly density variation of the endangered southern medicinal leech *Hirudo verbana* Carena, 1820 (Hirudinea: Arhynchobdellida: Hirudinidae) / N.Sağlam et al. *Acta Zoologica Bulgarica*. 2018. Vol. 70, № 3. P. 433–441.
47. Uğural B., Serezli, R. Effects of various environments on number of cocoon and offspring in breeding of southern medicinal leech, *Hirudo verbana* Carena, 1820. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2020. Vol. 37, № 3. P. 207-211.
48. Talbi M., Stussi J. D., Meley M. Microsurgical replantation of a totally amputated ear without venous repair. *J Reconstr Microsurg*. 2001. Vol. 17. P. 417-420.
49. The efficacy of medicinal leeches in plastic and reconstructive surgery: a systematic review of 277 reported clinical cases / I. S.Whitaker et al. *Microsurgery*. 2012. Vol. 32. P. 240–250.
50. Yantis M. A., O’Toole K. N., Ring P. Leech therapy. *Am J Nurs*. 2009. Vol. 109. P. 36-42.
51. Leech therapy: Applications and Indications in Surgery / S. Abdullah et al. *Arch Clin Exp Surg*. 2012. № 1. P. 172-180.

52. Herlin C., Bertheuil N., Bekara F. Leech therapy in flap salvage: systematic review and practical recommendations. *In Annales de Chirurgie Plastique Esthétique. Elsevier Masson*. 2017. Vol. 62, Issue 2. P. 1–13.
53. Kashuba E., Bailey J., Allsup D. The kinin-kallikrein system: physiological roles, pathophysiology and its relationship to cancer biomarkers. *Biomarkers*. 2013. Vol. 18, № 2. P. 279–296.
54. Clarke C. E. Medical therapeutics derived from leeches (Phy. Annelida; Cl. Hirudinea). *MacEwan University Student Journal*. 2017. № 3, Issue 1. P. 211-223.
55. Darestani K. D., Mirghazanfari S. M., Moghaddam K. G. Leech therapy for linear incisional skin-wound healing in rats. *Journal of acupuncture and meridian studie.*, 2014. № 7, Issue 4. P. 194–201.
56. Trenholme H. N., Masseur I., Reiner C. R., Hirudotherapy (medicinal leeches) for treatment of upper airway obstruction in a dog. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 2021. Vol. 31, № 5. P. 661-667.
57. Abdisa T. Therapeutic importance of leech and impact of leech in domestic animals. *MOJ Drug Design Development & Therapy*. 2018. № 2, Issue 6. P. 235-242.
58. Daye M., Işık B., Kılınc F. Lichen planus due to hirudotherapy. *Turkiye parazitolojii dergisi*. 2021. Vol. 45, № 2. P. 149–152.
59. Curcio A., Lloyd C. M. Leech me alone! Atraumatic hemarthrosis after hirudotherapy. *Cureus*. 2020. № 12, Is. 2. P. e6915.
60. Hanner S., Stroh H., Enk A., Hoffmann J. Cutaneous pseudolymphoma after hirudotherapy : Case report and review. *Der Hautarzt; Zeitschrift Fur Dermatologie, Venerologie, Und Verwandte Gebiete*. 2021. Vol. 73, № 2. P. 152-155.
61. Akalin Ç., Ekmen N. Non-occlusive mesenteric ischemia due to hirudotherapy: a case report. *Cureus*. 2020. № 12, Issue 7. P. e9467.
62. Kılıç M., Ak R. Orbital cellulitis due to leech therapy. *Bulletin of emergency and trauma*. 2019. № 7, Issue 3. P. 335–336.

63. Cutaneous lymphoid hyperplasia induced by *Hirudo medicinalis* (leeches) / M. S. Sadati et al. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*. 2019. Vol.16, № 4. P. 20160056.

64. Кайдашева І. П. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині. Полтава : Полімет, 2003. 320 с.

65. Василенко О. А., Сенча І. А. Математично-статистичні методи аналізу у прикладних дослідженнях: навч. посіб. Одеса : ОНАЗ ім. О. С. Попова, 2011. 166 с.

66. Бахрушин В. Є. Методи аналізу даних : навчальний посібник для студентів. Запоріжжя : КПУ, 2011. 268 с.

67. Гаркавий В. К. Статистика. Київ : Алерта, 2012. 608 с.

68. ДСН 3.3.6.042 99. Санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень: [Чинний від 1999–12–01]. Вид. офіц. Київ : МОЗ України 1999. 10с.

69. 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.

70. СНП 2.04.05–91. Опалення, вентиляція і кондиціонування : [Чинний від 1996–06–27]. Вид. офіц. Київ : Киев ЗНІП, 1996. 89 с.

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

72. Протоєрейський О.С. Охорона праці в галузі: навч. посіб / О. С. Протоєрейський, О. І. Запорожець. Київ : Книжкове вид–во НАУ, 2005. 268 с.

73. Охорона праці та промислова безпека: навч. посіб. / К. Н. Ткачук, В. В. Зацарний, Р. В. Сабарно, С.Ф. Каштанов та ін.; за ред. К. Н. Ткачука і В. В. Зацарного. Київ, 2009. 454 с.

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

75. Основи охорони праці / В. В. Березуцький, Т. С. Бондаренко, Г. Г. Валенко та ін.; за ред. В.В. Березуцького. Харків: Факт, 2005. 480 с.

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

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

78. Правила охорони праці у хімічних лабораторіях. Київ : Основа, 2013. 22 с.

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