

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Р. Ф. Амінов

**МЕДИЧНІ П'ЯВКИ В ШТУЧНИХ УМОВАХ:
ОТРИМАННЯ, ЗБЕРІГАННЯ ТА ВИКОРИСТАННЯ**

МОНОГРАФІЯ

Запоріжжя

2023

УДК 595.143 : 639.54] : 615.811

А 62

Рецензенти:

доктор біологічних наук, професор кафедри біологічної хімії
Запорізький державний медико-фармацевтичний університет
Швець В. М.,

кандидат біологічних наук, доцент кафедри загальної
та прикладної екології і зоології
Запорізький національний університет
Горбань В. В.

*Рекомендовано до друку Вченою радою
Запорізького національного університету
(протокол № 2 від.26.09.2023)
Матеріали подано в авторській редакції*

А 62 Амінов Р.Ф. Медичні п'явки в штучних умовах: отримання, зберігання та використання: монографія. – Запоріжжя : Запорізький національний університет, 2023. – 140 с.

ISBN 978-966-599-609-5

Монографія присвячена дослідженню проблем щодо отримання, зберігання та використання медичних п'явок *Hirudo verbana* Carena, 1820, *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758 та *Hirudo orientalis* Utevsky & Trontelj, 2005 у штучних умовах. У першому розділі детально описується загальна характеристика медичних п'явок: біологія, екологія, розповсюдження, утримання та розведення, використання в медицині та ветеринарії, побічні ефекти та протипоказання до застосування, їхні найвідоміші біологічно активні речовини. Наступні розділи експериментально відображають проблеми та вирішення стосовно отримання та зберігання медичних п'явок у штучних умовах, їхнього можливого використання у ветеринарії, сільському господарстві та медицині.

Монографія може зацікавити фахівців біологічного, фармацевтичного та медичного профілів, студентів, аспірантів, співробітників науково-дослідних інститутів, біофабрик та біолабораторій.

УДК 595.143 : 639.54] : 615.811

ISBN 978-966-599-609-5

© Запорізький національний університет, 2023

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ.....	7
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА МЕДИЧНИХ П'ЯВОК.....	10
Біологія та екологія п'явок.....	10
Відомі біологічно активні речовини медичних п'явок.....	14
Терапевтичні ефекти біологічно активних речовин медичних п'явок.....	15
Побічна дія та протипоказання до використання медичних п'явок.....	19
Огляд відомих фактів щодо утримання медичних п'явок у штучних умовах.....	20
Використання медичних п'явок у медицині.....	25
Використання медичних п'явок в тваринництві.....	28
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	31
Матеріал, що використовувався у роботі.....	31
Методи дослідження.....	32
Визначення прояву часткового канібалізму у медичних п'явок.....	32
Дослідження тривалості відпочинку та годування кров'ю на повторне розмноження медичних п'явок.....	33
Відбір оптимального типу крові для годування медичних п'явок.....	34
Дослідження впливу часу та умов посадки на репродуктивну здатність медичних п'явок.....	35
Визначення впливу перетяжок на тілі медичних п'явок на їх репродуктивну здатність.....	36
Вивчення впливу Coral-Mine» на життєздатність та розведення медичних п'явок.....	37
Визначення гострої токсичності у щурів на біологічно активні речовини медичних п'явок.....	37
Дослідження ембріотоксичності у щурів під впливом біологічно активних речовин медичних п'явок.....	38

Морфометричні методи аналізу тіла та основних лімфоїдних органів.....	41
Гематологічні, біохімічні, імунологічні, цитологічні та гістологічні методи аналізу.....	41
Оцінка загальної кількості лейкоцитів та еритроцитів, лейкоцитарна формула крові.....	41
Дослідження оксидативного метаболізму нейтрофілів.....	42
Визначення фагоцитарної активності нейтрофілів.....	42
Гістологічне дослідження.....	43
Аналіз репродуктивної функції.....	45
Виявлення розладів фізіологічного стану за допомогою медичних п'явок <i>Hirudo verbana</i> Carena, 1820.....	46
Статистична обробка даних.....	46
Розділ 3. ЧАСТКОВИЙ КАНІБАЛІЗМ У МЕДИЧНИХ П'ЯВОК.....	48
Прояв канібалізму <i>Hirudo verbana</i> Carena, 1820 у штучних умовах.....	48
Схема дослідження.....	48
Результати дослідження.....	51
Вживання медичних п'явок у лабораторних умовах після прояву часткового канібалізму.....	53
Схема дослідження.....	54
Результати дослідження.....	54
Розділ 4. ВПЛИВ РІЗНИХ ФАКТОРІВ ЩОДО ВИЖИВАННЯ МЕДИЧНИХ П'ЯВОК У ШТУЧНИХ УМОВАХ.....	57
Вплив крові людини, домашніх і дрібних лабораторних тварин на життєздатність та поведінку медичної п'явки.....	57
Схема дослідження.....	58
Результати дослідження.....	59
Своєчасний відпочинок та годування кров'ю значною мірою впливає на повторне розмноження ектопаразитів: <i>Hirudo verbana</i> , <i>Hirudo medicinalis</i> та <i>Hirudo orientalis</i>	65
Схема дослідження.....	66

Результати дослідження.....	68
Вплив часу та умов посадки на репродуктивні властивості <i>Hirudo verbana</i> та <i>Hirudo medicinalis</i>	73
Схема дослідження.....	74
Результати дослідження.....	75
Вплив перетяжок на тілі медичної п'явки на їхню репродуктивну здатність.....	81
Схема дослідження.....	82
Результати дослідження.....	82
Вплив «Coral-Mine» на життєздатність та розведення медичних п'явок: <i>Hirudo verbana</i> та <i>Hirudo orientalis</i>	85
Схема дослідження.....	87
Результати дослідження.....	87
Розділ 5. ТОКСИЧНІСТЬ МЕДИЧНИХ П'ЯВОК.....	91
Визначення гострої токсичності у щурів після дії комплексу речовин, отриманих з п'явки медичної <i>Hirudo verbana</i> Carena, 1820.....	91
Схема досліджу.....	92
Результати дослідження.....	93
Вплив водно-сольового екстракту п'явки медичної <i>Hirudo verbana</i> Carena, 1820 на загальний перебіг ембріогенезу у щурів після внутрішньоочеревинного введення.....	99
Схема дослідження.....	101
Результати дослідження.....	103
РОЗДІЛ 6. МОЖЛИВЕ ВИЯВЛЕННЯ РОЗЛАДІВ ФІЗІОЛОГІЧНОГО СТАНУ ЗА ДОПОМОГОЮ МЕДИЧНИХ П'ЯВОК <i>HIRUDO VERBANA</i> CARENA, 1820.....	107
Схема дослідження.....	107
Результати дослідження.....	108
ВИСНОВКИ.....	112
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	114



Амінов Руслан, кандидат біологічних наук (імунологія), завідуючий лабораторією клітинної та організменної біотехнології Запорізького національного університету

Автор монографії щиро висловлює свою вдячність колезі
доктору медичних наук, професору **Фролову О. К.**

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ

АДФ	аденозиндифосфат
БАР	біологічно активні речовини
ГВ	гірудологічний вплив
ГТ	гірудотерапія
МП	медична п'явка
П	п'явка
СЗ	слинна залоза
СП	слина п'явки
ССЗ	секрет слинних залоз
КК	коагуляційний каскад
ККС	кінін-калікрейнова система
ОМН	оксидативний метаболізм нейтрофілів
НСТ	нітросиній тетразол
ФІ	фагоцитарний індекс
ФЧ	фагоцитарне число

ВСТУП

Збільшення в останнє десятиліття кількості інфекційних та неінфекційних захворювань, особливо у новонароджених тварин і людей, які найбільше схильні до цих недуг, спонукає учених шукати різні методи та способи боротьби проти них. Застосовуються різні методи в профілактиці та лікуванні: дієтотерапія, вітамінотерапія, хіміотерапія, фізіотерапія, фармакотерапія, рефлексотерапія, бальнео- та кліматотерапія, мануальна та променева терапія, фітотерапія. Створюються нові синтетичні ліки, отримують різноманітні природні речовини з організму бактерій, грибів, рослин та тварин [1]. На сьогоднішній день перевага в більшості надається саме натуральним (природним) речовинам, які практично не мають протипоказань та не викликають побічних ефектів від їхнього застосування. До них належать і речовини, які отримують із організму та секрету слинних залоз (ССЗ) медичних п'явок (МП), які мають дуже широкий спектр терапевтичних ефектів [2-7]. Ці речовини показали ефективність у профілактиці та лікуванні значної кількості захворювань у тварин та людей [8-12]. Наприклад, у ветеринарії та сільському господарстві МП використовують: для лікування маститів, судинних захворювань, діабетичної нефропатії, загоєнні ран, гематом, запалень, лихоманки, атаксії, артритів, міозитів, екзем, абсцесів, фурункулів, невритів, остеоартритів та інших захворювань [2, 3, 5-7, 9, 13]. У медичній практиці МП використовують: при лейоміомах шкіри, псоріазі, серцевій недостатності, гіпертонічній хворобі, інфекційному міокардиті, стенокардії, глаукомі, гострій сенсоневральній приглухуватості, радикулопатіях, артритах, остеохондрозі, артрозах, цереброваскулярних захворюваннях, ендометріозі, міомі матки, хронічних запаленнях придатків, нефриті, діабетичній стопі, цукровому діабеті, при лікуванні тромбофлебіту, стоматиту, пульпіту та багатьох інших патологічних симптомах та захворюваннях [5-7, 10, 11, 14-16]. Є докази їх позитивного ефекту при лікуванні раку, туберкульозу та Covid-19 [5, 8, 17]. Самих же МП в основному відносять до ектопаразитарних тварин. Більшість з

яких розводять для медичного застосування на біологічних фабриках і в біолабораторіях [5-8, 9, 13, 16]. Найбільш розповсюджені види МП: *Hirudo verbana* Carena, 1820, *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758 та *Hirudo orientalis* Utevsky & Trontelj, 2005, які практично зникають із дикої природи, а їх глобальне географічне поширення з кожним роком зменшується. Вони занесені до Червоної книги, як зникаючі та чутливі види. Тому шукаються різні методи та оптимальні умови щодо підтримки цих тварин у штучних (лабораторних) умовах. Представлено значну кількість різних досліджень щодо виявлення оптимальних штучних умов для утримання та розведення МП: вологості ґрунту, температури та рН, впливу спокою, густоти посадки та віку, годування різними типами крові [20-23]. Наприклад, при посадці 1-2 вагітних МП виду *Hirudo verbana* Carena, 1820 на 2-літрову банку у торф'яне середовище, збільшується кількість відкладання фертильних, не дефектних коконів та потомства [22], чим молодша п'явка (П), тим більше вона може дати потомства, оптимальний вік тварин для приведення потомства - 1 рік [23]. В лабораторних умовах годування кров'ю овець МП виду *Hirudo orientalis* прискорює їх зростання та збільшує кількість тварин, які здатні відкладати нормальне повноцінне фертильне потомство. Інші дослідження щодо виду *Hirudo verbana*, які споживали кров ссавців та домашньої птиці, показали, що годування курячою кров'ю значно підвищує їхню репродуктивну здатність порівняно з годуванням кров'ю великої рогатої худоби [25], але слід зазначити, що на цей час отримання, зберігання та використання МП в штучних умовах ще досі викликає багато проблем чим відповідей для біофабрик, біолабораторій та наукових установ.

Дана робота ілюструє різні підходи, методи та результати експериментальних досліджень, які сконцентровані на отриманні оптимальних умов, щодо отримання, зберігання та подальшого використання МП у профілактичних та лікувальних цілях.

РОЗДІЛ 1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА МЕДИЧНИХ П'ЯВОК

Біологія та екологія п'явок

П є одними із кровосисних зовнішніх паразитарних тварин, їх можна віднести до типу *Annelida*, класу *Clitellata*, порядку *Arhynchobdellidae*, родини *Hirudinae* і роду *Hirudo*, які географічно поширені у всьому світу [26, 27].

П мають тонке тіло, яке нагадує форму листка, сплюснене та видовжене, що і відрізняє їхній вид від інших. Їхнє тіло складається із сегментів в середньому до 33, зовні їхнє тіло щільно вкрите кутикулою. Вони переважно мають 2 м'які присоски: першу велику задню, яка в більшості допомагає рухатися та закріплюватися їй на жертві і передню малу присоску, яка призначена для фіксації та смоктання крові, їхні очі зазвичай варіюються від однієї до п'яти пар взалежності від виду [28, 29]. П можуть мати різний розмір тіла від 10 до 35 см, але ектопаразитарні П можуть бути від 5 мм до 45 см. Самі МП в більшості мають довжину тіла до 12 см, ширину до 10 мм, але можуть мати й більші розміри. П мають у більшості яскраве забарвлення тіла, але їхня поверхня спинки може мати оливково-зелений, коричнево-зелений, сіро-чорний, зеленувато-сірий кольори та ін., їхнє тіло може бути усіяне крапками різного кольору, або смугами [30, 31]. Ділянка клітелума простягається від 10 до 12 сегментів, містять як чоловічі, так і жіночі статеві отвори, через які виділяються піна та надалі з якої формуються кокони, їх видно переважно влітку і їхнє виділення нефридіями виявлено в спеціальних сегментах тіла. Вони переважно дихають через все своє тіло [32], їхня кров має червоний колір, тому що гемоглобін, який розчинений в крові допомагає їм транспортувати кисень через капілярні мережі до всіх частин тіла. Вони є гермафродитами, а це означає те, що кожна тварина має обидва статеві органи: яєчники та сім'яники, їхні сперматозоїди переходять від П до іншої П за допомогою сперматофор, які виникають під час копуляції, а сам клітелум виділяє кокон під час розмноження, тип запліднення у них називається

Х-заплідненням. Кожна П стріляє сперматофором у пори клітелума свого партнера, а сам кокон візуально виглядає вмоченим у ґрунт рис. 1.1.

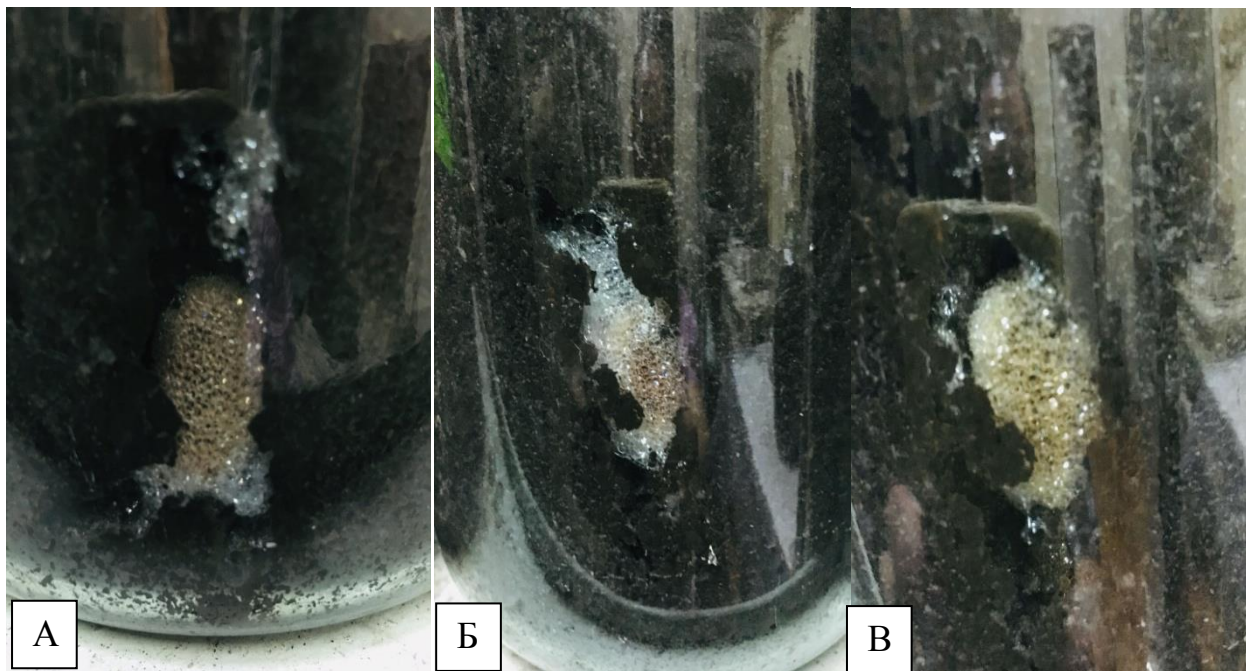


Рис. 1.1. Авторські фото утворення кокона: А – *Hirudo verbana* Carena, 1820, Б – *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758 та В – *Hirudo orientalis* Utevsky & Trontelj, 2005. Зроблені в лабораторії клітинної та організмової біотехнології ЗНУ.

Молоді П вилуплюються з кокона рис. 1.2 після годування протягом кількох днів, кожен кокон містить різну кількість запліднених яєць залежно від виду дорослої особини, П загалом може жити до 18-27 років [30].

Травна система та харчування п'явок: починається ротом, який розташований на передній присосці, де також розташована їхня щелепа у вигляді трьох лез із крихітними зубами, які встановлені під кутом один до одного. У П від 60 до 100 гострих зубів у кожній щелепі, які розрізають шкіру своїх господарів і залишають на їхньому тілі відмітки у вигляді Y або V-подібної форми. Щелепи м'язисті, вкриті кутикулою, навколо трьох м'язових щелеп рівномірно розташована глотка [33].

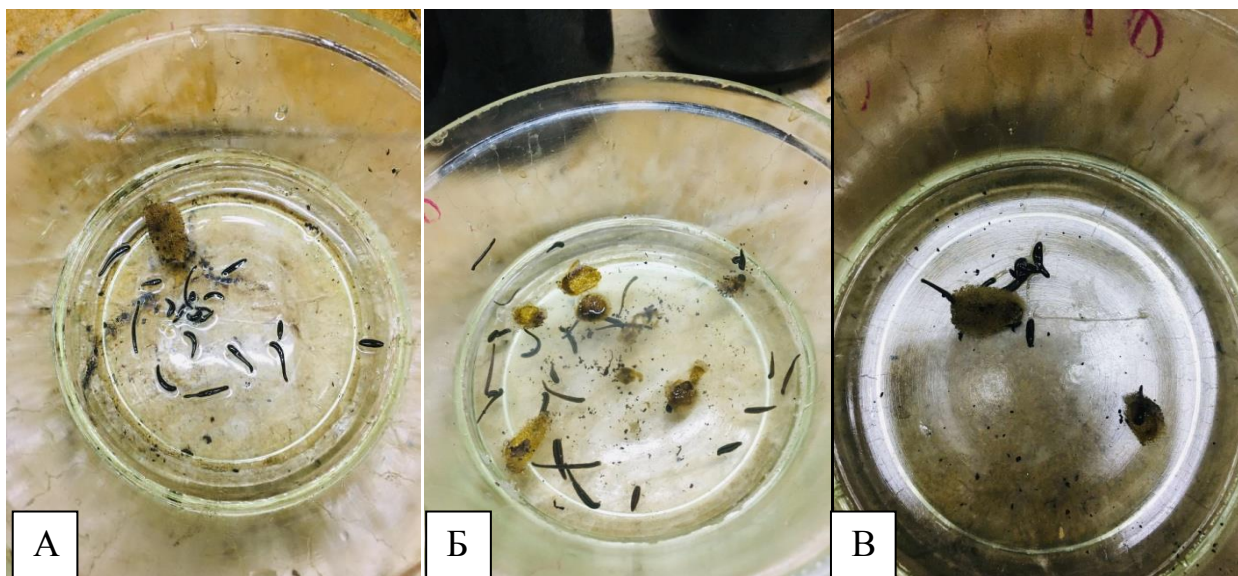


Рис. 1.2. Авторські фото вилуплення нитчаток із кокона: А – *Hirudo verbana* Carena, 1820, Б – *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758 та В – *Hirudo orientalis* Utevsky & Trontelj, 2005. Зроблені в лабораторії клітинної та організмової біотехнології ЗНУ.

У ротову порожнину відкриваються протоки слинних залоз (СЗ), до складу яких входить велика кількість біологічно активних речовин (БАР), потім ротова порожнина переходить у глотку, короткий стравохід, шлунок, і нарешті у кишківник, який закінчується анальним отвором. У їхньому шлунку зберігається поглинута кров за рахунок антикоагулянтів, які запобігають її згортанню на протязі тривалого часу. У хижої П замість щелеп присутній хоботок, який наносить рани жертвам та висмоктує їхню кров або інші рідини [29, 34]. Більшість хижих П харчуються хробаками, равликами і личинками комах. В травному тракті П є багато різних типів бактерій, які живуть колоніями, вони допомагають синтезувати основні поживні речовини для перетравлення їжі та вбивають шкідливих тварин. До них відносять *Aeromonas veronii*, *Pseudomonas aeromonas*, *P. hirudinicola*, *Klebsiella spp* та *Bacterium hirudinicolum*. Всі ці бактерії виробляють багато вітамінів, наприклад (комплекс вітамінів В) для участі під час травлення їжі бактерії. Вони передаються потомству в коконі у міру його формування [35]. П мають багато сенсорних рецепторів на своєму тілі, які допомагають їм знайти хороший кровотік у здобичі. Прокусуючи шкіру жертви П виділяють в рану слину з широким комплексом БАР, в той час як її зуби проникають ще глибше в шкіру господаря, через 20-60 хвилин вони звільняють жертву, в середньому П випивають 5-15 мл рідини організму жертви [36].

Нервова система: П містить велику кількість нервових клітин, тому дослідники часто використовують їхню нервову систему, як приклад у вивченні нервової системи різних безхребетних, головний їхній нервовий центр складається з церебрального ганглія, вентрального ганглія, заднього ганглію і різних сенсорних рецепторів [29, 37]. П мають 2-10 пігментних плям кожна з яких містить сенсорні клітини. Вони можуть виявляти рух дотику довколишніх предметів, вібрацію та різні хімічні речовини. У несприятливих і стресових умовах П виділяють на поверхні свого тіла слизовий шар, який може діяти як індикатор стресу. П періодично скидають свою шкіру. Молоді П переважно живляться кров'ю дрібних тварин, таких як жаби та риби. Вони стають готовими до використання в медицині, коли їм виповнюється приблизно кілька років [38].

Вплив факторів навколишнього середовища: П сильні біоіндикаторні тварини, які можуть реагувати на незначні зміни коливань навколишнього середовища, тому багато видів П із-за цього зникають або вимирають у природних умовах. Наприклад, було виявлено смертність П за рахунок наявності важких металів у миючих засобах, такими як Zn та Cu, які забруднювали водойми їхнього перебування [39-41]. Було виявлено, що різні концентрації цинку та міді при тривалому застосуванні здатні викликати у тварин гибель та не контрольовану дефекацію, інтенсивне виділення слизу, неконтрольоване плавання, зниження сили чіплення, згортання (скручування), блювоту з'їденою кров'ю, деформацію тіла, пролапс статевого члена, крововиливи та стирання стінки тіла у *Hirudo verbana* Carena, 1820. Мідь проявляє себе найбільш токсичніше порівняно з цинком [39-41].

П у більшості пойкилотермні тварини, які можуть жити при температурах від 0 C° до 30 C°, але коли температура навколишнього середовища швидко змінюється вони починають інтенсивно гинути [29]. Особливо це стосується штучних умов утримання, де потрібно постійно підтримувати температуру та інші умови навколишнього середовища.

Розповсюдження: П розповсюджені в більшості у прісноводних озерах, струмках, річках і в морських та наземних місцях [29]. Також було виявлено, що МП виду *Hirudo medicinalis* можуть зустрічатися у пташиних гніздах на рибальських ставках та водоймах [42].

Відомі біологічно активні речовини медичних п'явок

Секрети СЗ МП містить понад 100 БАР, які володіють бактеріостатичними, знеболювальними, розсмоктуючими, протинабряковими ефектами, а також здатні підвищувати імунітет, усувати порушення мікроциркуляції, відновлювати проникність тканин і органів, усувати гіпоксію, знижувати артеріальний тиск, детоксикувати організм [38].

Молекули, які знаходяться у слині п'явки (СП) і найбільш вивчені на сьогоднішній день, включають [26, 38, 43] значну кількість різних речовин вуглеводної, ліпідної та білкової структури табл. 1.1.

Таблиця 1.1. Відомі БАР МП

Речовини	Ефекти
Гіалуронідаза	Для проникнення та дифузії фармакологічно активних речовин в тканини, особливо при болях у суглобах і має антибіотичні властивості. Володіє протимікробною дією.
Гірудин	Дозволяє крові текти деякий час без її згортання. Він пригнічує згортання крові шляхом зв'язування з тромбіном.
Калін, сарацин, апіраза, декорсин	Пригнічують згортання крові, калін шляхом блокування зв'язування Фактору фон Віллебранда до колагену. Ефект може тривати до 12 годин.
Дестабілаза	Розчиняє фібрин і має тромболітичну дію.
Бделіни	Надають протизапальну дію і пригнічують трипсин, плазмін і акроцин.
Ацетилхолін	Судинорозширювальна дія.
Гістаміноподібні речовини	Судинорозширювальна дія, посилюють приплив крові до місця укусу.
Гірустазін	Інгібує калікреїн, трипсин, хімотрипсин і нейтрофільний катепсин G.
Егліні	Протизапальні. Вони пригнічують активність альфакімотрипсину, хімаза, субстилізину, еластаза та катепсину G.
Антистазин, гілантенс, гуамерин, пігуамерин, бделастазин	Протизапальні речовини.
Інгібітор фактора Ха	Пригнічує активність фактора згортання крові Ха.
Інгібітори карбоксипептидази-А	Посилюють приплив крові.
Колагеназа	Зменшує колаген.
Інгібітори комплементу	Замінюють природні інгібітори комплементу, якщо вони є дефіцитними.
Інгібітор триптази	Пригнічує протеолітичні ферменти тучних клітин господаря.
Гелін, вітманін, уайтід	Антикоагулянтна дія.
Хлороміцетин, теромацин, термізин	Антимікробний ефект.

Терапевтичні ефекти біологічно активних речовин медичних п'явок

Антикоагулянтний ефект.

Коагуляційний каскад (КК) - це ланцюгова реакція, яка пригнічує кровотечу, однак БАР в виділеннях із СП впливають на різні точки для пригнічення дії КК. БАР можуть пригнічувати коагуляцію шляхом порушення КК, лізису фібрину, інгібуванню тромбіну та інгібуванню коагуляції [34]. Найпотужніша антикоагуляційна хімічна речовина зі СП гірудин - це білок, який навпаки зв'язується з тромбіном [44, 45].

Гірудин, антистатин і гелін є БАР, які діють як інгібітори тромбіну та переривають ланцюгову реакцію інгібування фактора згортання крові Ха фактору [34,46]. Гірудин найпотужніший природний інгібітор тромбіну, який необхідний для лікування пацієнтів із дисемінованим синдромом внутрішньосудинної коагуляції та аномалії тромбоцитів, оскільки гірудин не має імунних ефектів на еритроцити крові [47].

Інгібітор фактора Ха має пряму антикоагулянтну дію, оскільки він порушує КК та відіграє вирішальну роль у лікуванні остеоартриту та ревматоїдного артрити людини [34, 48].

БАР, такі як гілантен, LDTI, інгібітор C1 та егліни відіграють велику роль у прямому чи опосередкованому інгібуванні коагуляції [46].

Дестабілаза – це фермент із глікозидазною активністю, який присутній у СП. Він має різні ізоформи з різними здатностями та деградаційною дією на стабілізований фібрин, тому його оцінюють як антикоагулянт [49]. Дестабілаза має здатність розчиняти стабілізований фібрин шляхом ізопептидолізу α і γ фібринових ланцюгів, пов'язаних ізопептидними зв'язками ϵ (γ Glu) Lys.

Протимікробний, знеболюючий та протизапальний ефекти

БАР (хлороміцетин і дестабілаза), які виділяються із СЗ П, мають протимікробну дію, оскільки вони можуть руйнувати клітинні компоненти бактерій [50]. Дестабілаза - це білкова сполука, яка міститься в СП, вона має

активність бета-глікозидази, яка безпосередньо порушує бета 1-4 зв'язки, які важливі в шарі пептидоглікану в клітинній стінці бактерій [51]. Як показало одне дослідження, денатурована форма дестабілази показала дозозалежний бактеріостатичний ефект на *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Escherichia coli* [52]. Кінін-калікрейнова система (ККС) пов'язана з КК, яка відіграє велику роль у запальній відповіді [53].

ККС - це складна система, що виробляється в різних органах, які включають кініноген (попередник кініну), калікреїни та брадикінін, які вважаються ще протизапальними речовинами [54]. ККС, КК і фібринолітична система взаємопов'язані і активується фактором згортання крові XII [53]. Функція брадикініну полягає у підвищенні проникності судин, що викликає розширення судин і зменшує біль [53, 54]. Таким чином, хімічна речовина зі СП має здатність надавати болезаспокійливу та протизапальну дію. Хімічна речовина кіназа та антистатини можуть пригнічувати кінін-калікрейновий механізм, який є основним у руйнуванні рецепторів [45]. Триптази тучних клітин є сериною протеазою в клітинних гранулах і їх вивільнення викликає запальні реакції у тварин ці ефекти тісно пов'язані з ККС, хемотаксисом, активацією лейкоцитів, вазоактивною дією та взаємодією, яка викликає біль [55]. Хімічні речовини, що виділяються з гранул тучних клітин можуть викликати алергічні та запальні захворювання, такі як астма, анафілаксія та артрит [55]. Однак БАР, яка виділяється зі СП може пригнічувати дію триптази. П похідний інгібітор триптази (LDTI) є інгібітором серинової протеази, який інгібує протеолітичний фермент тучних клітин [56]. Еглін С - БАР, яка міститься в СП викликає зниження рівня вільного радикалу кисню в нейтрофілах і запобігає запаленню та руйнуванню тканин. Комплемент С1 відіграє важливу роль у класичному шляху розвитку системи комплементу [57]. Секрет слинних залоз П містить інгібітор С1 комплементу, який пригнічує обидва каскади коагуляції та ККС [46]. Інгібітори комплементу (інгібітор С1) необхідний, коли пацієнти мають дефіцит натуральних інгібіторів, ці інгібітори можуть протидіяти небажаному комплементу, активація відбувається при анафілактичному шоці та хронічному запаленні. У розпаді кініну бере участь і фермент карбоксипептидаза,

який викликає пов'язану з брадикініном запальну реакцію, оскільки є агоністом до рецепторів брадикініну [53]. Рецептори брадикініну B1 та B2 пов'язані між собою [58]. БАР П діє шляхом пригнічення карбоксипептидази запобігання рецепторів B1, а після запобігання рецепторів B1 немає більше болю або запалення [58].

Полегшує загоєння ран і має судинорозширювальний ефект.

Загоєння ран на шкірі має три фази: запальну, фазу проліферації та дозрівання. У фазі запалення, лейкоцити мігрують (такі як нейтрофіли та макрофаги) у місце рани. У фазі проліферації відбувається міграція і проліферація кератиноцитів, фібробластів і ендотеліальних клітин, які призводять до реепітелізації та грануляції тканини. У фазі дозрівання, надлишок колагену в місці рани розкладається декількома протеолітичними ферментами, що призводить до завершення відновлення тканин. Під час загоєння перфузія рани є одним із факторів, що прискорює загоєння рани, тому БАР, яка міститься у СП може прискорити загоєння рани завдяки своїй здатності до перфузії [59]. СЗ П виділяє судинорозширювальну речовину, подібну до гістаміну, інгібітора карбоксипептидази-А, які збільшують приплив крові до області укусу та зменшують місцевий набряк [48, 60]. Тому БАР з СП можуть видалити накопичену кров (застійну кров) у рані, яка перешкоджає надходженню свіжої насиченої киснем артеріальної крові входячи в область і постачаючи рану киснем та поживними речовинами, потім тканини навколо рани забезпечуються насиченою киснем кров'ю та поживними речовинами [60]. Гіалуронідаза - це фермент, який міститься в СП, вона деградує або перетравлює тканини гіалуроновою кислотою, а також діє як антимікробна речовина, яка підвищує в'язкість інтерстиціальних стінок, що призводить до антибіотичної дії [61], таким чином полегшується інфільтрація та дифузія решти інгредієнтів П в глибокі тканини або застійні тканини [48, 51]. Ацетилхолін є одним із компонентів слинної секреції П, який має здатність до розслаблення ендотеліальних м'язів і розширенню судин, це призведе до мікроциркуляції свіжої насиченої киснем крові до ураженої ділянки (рани) та до відновлення нормального кровообігу [62]. Потім процес загоєння проходить швидко та без ускладнень.

Пригнічення функції тромбоцитів.

У здорових тварин, коли уражена стінка кровоносної судини пошкоджена (поріз), то пошкоджена стінка кровоносних судин викликає звільнення та поширення частинок колагену, які націлені на вільний vWf [63]. Після колагену частинки вивільняють комплексне зв'язування між vWf і глікопротеїном (GpIb) утворюється місток, потім після моста формується регуляторний механізм відбувається з аденозиндифосфатом (АДФ), GpIIb-IIIa та фібриногеном. Тромбоцитами, зв'язуються один з одним, щоб утворити пробку, щоб цим самим зупинити кровотечу [57, 64]. Далі ланцюг безперервний, утворюючи місток, вивільняючи такі речовини, як тромбоксан A2, активація тромбоцитів та каскаду коагуляції [64]. Утворення містка є одним із механізмів гемостазу, що може пригнічувати кровотечу, однак БАР, які містяться в СП, такі як саратин, калін, декорсин і апіраза, можуть реагувати проти різних частин мосту або ланцюгів [34, 48]. Калін має здатність до пригнічення опосередкованої колагеном агрегації та адгезії тромбоцитів і також пригнічує залежну від фактора фон Віллебранда адгезію тромбоцитів до колагену в стінках судин [61]. АДФ відіграє вирішальну роль у агрегації тромбоцитів шляхом активації колажних (GpIIb-IIIa) рецепторів та підвищення афінності тромбоцитів до vWf. Фермент апіраза зі СП може перетворювати АДФ в аденозинмонофосфат, а потім агрегація тромбоцитів блокується внаслідок непрямой інгібуючої дії взаємозв'язок рецептора колагену апіразеону та АДФ [51]. Тромбін має сильний вплив на активацію тромбоцитів і вивільнення АДФ, проте інгібітор тромбіну виробляється зі СП, яка має непрямий негативний вплив на функції тромбоцитів. Ще одна БАР – сарацин, яка може впливати на початкову стадію адгезії тромбоцитів і пригнічувати колаген [65]. Загалом, хімічні речовини які виділяються П, можуть бути корисними для інгібування тромбоцитів, агрегації шляхом руйнування частинок колагену (фермент колагеназа зі СП) та інгібування рецептора тромбоцитів vWf. Це механізм може лікувати утворення мікротромбів, які виникають під час післяопераційних операцій у тварин та людей [26].

Побічна дія та протипоказання до використання медичних п'явок

Найбільш розповсюджені та умовні протипоказання до використання медичних п'явок [48, 66]:

- Анемії.
- Екстремальний вік (діти та люди похилого віку).
- Слабкі хворі, стан гострого психічного збудження, стан після операцій на мозку та хребті.
- Алергічні хворі.
- Вагітність, через відсоток ризику кровотеч та інфекцій.
- Активні форми туберкульозу.
- Злоякісні гематологічні захворювання (наприклад, лейкемія), рак шкіри, грибкові захворювання.
- Гемофілія.
- Сепсис.
- Геморагічний діатез.
- Артеріальна недостатність.
- Алергія на п'явок.
- Гіпотонія.
- Гепатобіліарні захворювання.
- Кахексія.
- ВІЛ-інфекція.
- При деяких імуносупресивних станах.

Побічна дія:

Алергічна реакція часто спостерігаються внаслідок укусів П. Зазвичай уртикарні папули є поширеними, а також свербіж, який може тривати найчастіше менше 24 годин.

При укусі П може спостерігатися інфекція, яка спричинена бактеріальною флорою кишечника П, такою як *Aeromonas spp.*, і гістаміном із СП. Клінічно

може виникати запалення, набряк, біль та почервоніння. У деяких випадках високий ризик смерті внаслідок анафілактичного шоку та сепсису з ослабленим імунітетом [67]. Наступна це інфекція – яка вражає від 2 до 36% пацієнтів [68]. Збудник - грампозитивна паличка *Aeromonas* може призвести до септицемії, пневмонії, недостатності клаптя та м'язового некрозу. *Aeromonas spp.*, *Pseudomonas spp.* та *Vibrio spp.* усі залучені до виникнення даних патологічних станів [69].

Під час використання МП можуть виникати тривалі крововотечі, крововиливи та рубці на шкірі, викликані недостатнім загоєнням ран після укусу П та вмістом антикоагулятивних речовин [34, 70]. Найчастіше у тварин може виникати захворювання гірудиніоз викликане зараженням П. Частіше зустрічається в сільській місцевості, де вода в дефіциті, особливо характерно для сухого сезону. У хворих на дане захворювання переважно наявні рани ясен, слизової щік, кореня язика і під язиком рясні піністі виділення з кров'ю, респіраторний дистрес [71].

Під час лікування П також може розвинутися кератит [72], абсцеси, бешихове запалення, екхімози, шкірні псевдолімфоми, червоний плоский лишай, гемартроз, неоклюзійна мезентеральна ішемія, орбітальний та періорбітальний целюліт, синдром Коуніса. Слід відмітити, що більшість відмічених побічних ефектів під час застосування МП виникають із-за неправильного їхнього застосування та недотримання санітарно-епідемічних норм.

Огляд відомих фактів щодо утримання медичних п'явок у штучних умовах

Розведення МП:

Розведення та утримання МП у контрольованих середовищах є надзвичайно важливим для запобігання їх вимирання, як виду. Оскільки, в природі більшість МП віднесені до Червоної книги, як вимираючі види. Крім того, оскільки зараз МП в більшості утримують та розводять саме в штучних

(лабораторних) умовах для лікувальних цілей, то необхідно підтримувати суворі гігієнічні умови, щоб запобігти можливим інфекційним ускладненням під час їхнього використання [73], підібрати правильно штучні умови їхнього утримання та зберігання, схожими з природними умовами. Наприклад, оптимальний підбір торфу, гідрогелю та подрібнених губчастих матеріалів, що може значно підвищити кількість відкладання у МП коконів і потомства при розведенні [73].

Параметри якості води, такі як температура води, розчинений кисень, рН, деякі катіонні елементи (літій, натрій, амоній, калій, магній, кальцій) і аніонні елементи (фторид, хлорид, сульфат, нітрат, фосфат, бромід), можуть значно вплинути на життєздатність виду *Hirudo verbana* [24, 74]. Нещодавно вчені виявили позитивну кореляцію між вагою дорослих П і кількістю відкладених коконів, між вагою дорослої П та вагою відкладеного кокона, а також між вагою кокона та кількістю потомства. Відмічено, що слід вибирати більш важких особин і для використання в штучному виробництві, які здатні давати більше фертильних коконів та потомства. [75].

Наймолодші материнські П мають більшу репродуктивну здатність. Зі збільшенням віку П кількість коконів зменшується, збільшуються аномалії коконів та потомства. Смертність потомства зростає із віком і становить 10% та 40% у 1- та 3-річних П [23].

Годування двома різними типами крові: ссавців (великої рогатої худоби) та птиці (куряча кров), може значно вплинути на репродуктивну ефективність, продуктивність росту та виживання МП виду *Hirudo verbana*. Сам тип крові не має істотного значення на продуктивність росту і виживання П, але доведено, що годування кров'ю курки має в 2,5 рази більшу ефективність порівняно з тими, хто годується кров'ю великої рогатої худоби з точки зору процесу вагітності та репродуктивної ефективності. Остаточна вага та виживання МП для тварин, які годувалися кров'ю великої рогатої худоби становить $10,79 \pm 4,80$ г і 87 %, а для тварин, які годувалися кров'ю куриці становить $10,12 \pm 5,26$ г і 85 %. Вагітність розпочинається на 7-му місяці в обох групах. Ефективність отримання коконів у тварин, які споживають курячу кров становить $6,67 \pm 1,50$ та $2,67 \pm 3,37$ коконів,

які споживають кров великої рогатої худоби. При годуванні кров'ю курки кокони більші у порівнянні з коконами тварин, які споживають кров великої рогатої худоби. Ефективність потомства $12,59 \pm 4,17$ на кокон при годуванні кров'ю курей та $9,81 \pm 3,67$ потомства на кокон при годуванні кров'ю великої рогатої худоби. Згідно цих наукових фактів кров домашньої птиці найбільш ефективна для репродукції МП [25].

При підборі оптимальної крові для годування МП виду *Hirudo orientalis* типами крові кози та овці. Встановлено, що кількість коконів і нитчаток у МП була значно вищою при 6 кратному годуванні кров'ю кози порівняно з кров'ю овець. Виживаємість П, яких годують кров'ю кози також є вищою, ніж при годуванні овечою кров'ю. При годуванні МП кров тварин береться із бійні, а для запобігання її згортанню додається гепарин натрію. Кров під час годування нагрівають до $37-38\text{ }^{\circ}\text{C}$. Протягом перших 48 годин, воду в ємностях де знаходилися МП змінюють двічі на день [76].

Встановлено, що кут угла інкубації коконів значно впливає на отримання більшої кількості фізіологічно розвинутих нитчаток. Кокони інкубувалися окремо в банках під трьома різними кутами, горизонтально (0°), під кутом (45°) і вертикально (90°), протягом одного місяця. Гниль у коконах інкубованих горизонтально становила $17,5\%$, а у коконах інкубованих вертикально лише $2,5\%$. Середня кількість нащадків, отриманих від коконів, зростала в міру зростання кута угла інкубації. Оптимальні кути для найменшого гниття в коконах та найбільшою кількістю нащадків становить $78,73^{\circ}$ та $60,63^{\circ}$. Даний ефект пояснюється тим, що вентиляція повітря всередині коконів ефективніша при інкубації у вертикальному положенні, порівняно з коконами, які інкубуються в горизонтальному положенні. Тому для отримання більшої кількості нащадків потрібно інкубувати кокони під кутом, близьким до вертикального, більше 60° [77].

Розроблено удосконалений спосіб годування МП у штучних умовах для підтримання нормальної життєздатності МП та їхнього майбутнього повноцінного відтворення, який включає гомогенізацію свіжої коагульованої

крові сільськогосподарських тварин, заповнення нею ємності біологічної мембрани та годування МП. При цьому попередньо консервується кров шляхом її низькотемпературного заморожування; розморожується кров та повторно гомогенізується до однорідної маси, підігрівається заповнена кров'ю ємність біологічної мембрани до температури тіла природного годувальника. Запропонований спосіб годування МП дозволяє максимально знизити рівень смертності МП у посттрофічний період при мінімальних матеріальних витратах (відсутня необхідність використання реактивів для заготівлі крові; попереднє заморожування крові дозволяє виключити постійну залежність режиму годування від часу забою тварин). Запропонований спосіб дозволяє знизити рівень смертності МП після годування в умовах біотехнології в понад 10 разів, порівняно з іншими загальновідомими методами. Запропонований спосіб дозволяє максимально знизити рівень смертності (до 0,5 %) МП після годування при мінімальних матеріальних затратах [78].

При годуванні зрілих МП виду *Hirudo orientalis* різними типами крові жаби та верблюда, було виявлено, що кількість фертильних повноцінних коконів та самого потомства, значно вище отримують при годуванні верблюжою кров'ю, порівняно з годуванням кров'ю жаби. Смертність П найбільше спостерігається при годуванні кров'ю жаби, порівняно з годуванням верблюжою кров'ю [79].

Утримання МП:

Згідно проведеним дослідженням існують багато різних методів, щодо утримання П, із-зміною умов навколишнього середовища, але в більшості використовують саме три загальновідомі методи зберігання П [80]:

1. Класичний метод – додавання каміння та бруду, водних рослин, такі як яванський мох і *Microsorumpteropi* у глиняні ємкості.
2. Сучасний баночний метод – використання пластикових або скляних банок з отворами на кришках для вентиляції.
3. Акваріумний метод – використання акваріумів з водою, сухими гілками та водними рослинами.

Дані методи були експериментально перевірені. Де умови були однаковими для 3 методів: зміна водного середовища один раз в три дні, раз на сім днів та один раз в 15 днів. Оскільки існують різні часові рамки зміни води. Зберігання їх в приміщенні, позбавленій прямого сонячного світла. Оцінення фізико-хімічних властивостей води та мікробного навантаження, температури води, рухів П. В результаті показано ефективність усіх трьох методів при однакових оптимальних умовах, але акваріум можна використовувється для створення відповідного середовища з належною аерацією для П. Змінити воду в акваріумі легко не турбуючи П. Рекомендується для менших терапевтичних установок. Метод горщика, підходить, створює природне середовище для П, але турбуються п'явки, а також утомливо навіть один раз в 7 днів пересаджувати П в новий горщик та змінювати їм воду та обробляти горщики. Баночний спосіб хоч і простий, але для П не підходить оскільки він не створює природного середовища. Мікробне навантаження найменше було там де вода змінювалася кожні три доби.

Температура може впливати на поведінку П. Відомо, що максимальна активність при 26-34°C. Оскільки температури були у банках та акваріумах 30 і 31°C, а горщика 28°C, то активність не порушується при використанні будь-якого з цих трьох методів. Всі інші показники також в межах норм [80].

При підтриманні температури 28°C, світлового режиму 9,5Д:14,5л та щомісячного годування кров'ю овець можна значно пришвидшити першу копуляцію місячних П до 5,5 місяців, відкладання коконів через шість місяців, але найбільший відсоток П, які можуть відкладати кокони залишається у дев'ятимісячних тварин. Швидкість збільшення ваги зменшується з віком. Смертність відбувається в одно-, семи- та восьмимісячних вікових тварин на рівні 5,7%, 23,1% та 14,3% відповідно [24].

Використання медичних п'явок у медицині

Гірудотерапія (ГТ) використовувалася в багатьох країнах, у таких як: Німеччина Америка, Китай, Англія, Африка та стародавньому Єгипті ще з 1500 р. до н. ери. Гірудин – це перша відкрита речовина, яка досі вважається найпотужнішою природною речовиною, яка здатна інгібувати тромбін, вона має високу спорідненість з білковою структурою. Сучасне вивчення ефектів від ГТ розпочалося ще в 1960-х роках, коли терапія МП досягла міжнародного поширення, спочатку завдяки вражаючим результатам у пластичній та реконструктивній хірургії для лікування післяопераційного венозного застою та відторгнення трансплантата [36, 128].

В останні роки медична терапія П привернула все більший інтерес до реконструктивної хірургії та лікування болю та інших галузей медицини на рис. 1.3 відображено загальний приклад сеансу гірудотерапії [81].

Показання та корисність ГТ: [48, 82, 83, 128]:

- Ефективно використовується для лікування незагоєних виразкових уражень, таких як діабетична виразка, лепротична рана тощо. Так як сприяє поліпшенню місцевого кровообігу.



Рис. 1.3. Авторські фото: загальний приклад сеансів гірудотерапії.

- Знімає застій у судинах. Таким чином, може бути ефективно використана при таких станах, як тривалі варикозні виразки, філяріатоз, післяопераційні ураження та ураження шкіри [84].

- Використовується при артриті, розтягненні або спазмі для симптоматичного полегшення болю, запалення та дискомфорту.

- Використовується при абсцесі, целюліті, тромбофлебіті та варикозному розширенні вен.

- Корисно при тромбованих випадіннях третього ступеня.

- Корисний при атеросклерозі кінцівок, оскільки покращує кровообіг.

- Масло Jaloka Siddha використовується місцево для лікування гіперпігментації.

- Пародонтоз та інші захворювання зубів.

- Чоловіче безпліддя.

- Шкірні захворювання – нейродерміт, псоріаз, герпес, екзема.

- Гірудорелексотерапія, яка використовується шляхом стратегічного розміщення п'явок на рефлексогенних точках як «голки життя».

- Гінекологічні захворювання – жіноче безпліддя, ендометріоз, фібромастопатія.

- Пластична та реконструктивна хірургія [84].

- Захворювання очей, включаючи катаракту, глаукому, травматичні ушкодження та запалення.

- ШКТ – гепатит, холецистит, панкреатит, виразка шлунка.

- Респіраторні розлади - астма, гострий ринофарингіт і спазматична нежить.

- Тривають дослідження щодо вивчення ефективності МП у лікуванні інфаркту міокарда (де він використовується навколо перикарда) та інсульту, оскільки він має антикоагулянтну хімічну речовину під назвою гірудин, яка нагадує такі ліки, як гепарин та стрептокіназа.

- Онкологічні захворювання [85, 128].

При реконструктивних операціях, для зменшення венозного застою в тканинах клаптів, вільних і ніжкових клаптів [86-91]. Флебїт і тромбоз, для

відкачування крові з більш глибоких шарів при варикозному розширенні вен і для розчинення тромбу при постфлебітичному синдромі та екхімозі [92].

Периферичній артеріальній хворобі, для відновлення кровотоку в уражених областях (наприклад, оклюзія периферичних артерій) [93, 94].

Відновлені післяопераційному згортані крові, щоб допомогти прикріпити відрізані пальці (ампутовані пальці), пальці на ногах, вуха, кінчики носа та реплантацію пенісу [51, 90, 95, 96-100].

Коронарних тромбозах артерій та ішемічній хворобі серця, для зниження в'язкості крові [88, 101].

Загоєння ран за рахунок висмоктування надлишку крові, зменшення набряку тканин і сприяння загоєнню, надаючи збагачену киснем кров щоб досягти ділянки, доки не відновиться нормальний кровообіг [102].

Набряк і гематома, для зменшення набряку при надмірному периорбітальному та лінгвальному набряку, під'язиковій та масивній лінгвальній гематомах, макроглосії [88, 103-105].

Знеболювальний і протизапальний ефекти, для зняття болю та зменшення запалення при варикозному розширенні вен, виразках ніг, флебіті, тромбофлебіті, остеоартриті та епікондиліті, вертеброгенних больових синдромах у попереку, болі у поперековому відділі, нирково-клітинному раці і лейоміосаркомі [86, 92, 106-112].

Хронічні захворювання шкіри - псоріаз, екзематозний дерматит, хронічні виразки, епідермоїдні кісти, лейшманіоз шкіри [113, 114].

Захворювання органів дихання. Використовувати переважно, як муколітичні речовини при астмі, гострому ринофарингіті. Стоматологія, для зменшення росту бактерій і запалення при абсцесі, а також при лікуванні кореневих каналів [115].

Компартмент-синдром, для зменшення тиску на нервово-судинні структури [116].

Сіалоаденіт, для зменшення запалення та набряку. Ракові захворювання, для забезпечення антиметастатичної активності при раку легенів та

антипроліферативної активності проти дрібноклітинному раці легенів і для зменшення пеноскротального набряку простати, аденокарцином [117].

Інші рідше використовують - гіпертонія, мігрень, ускладнення цукрового діабету, проліферативна склоподібна ретинопатія, гострий та хронічний отит, шум у вухах, тимпанофонія, периферичні кохлеавестибулярні розлади судинного походження, поліп носа, спазматична стриктура уретри [14, 118].

Використання медичних п'явок в тваринництві

Гірудологічний вплив (ГВ) зараз успішно використовується у ветеринарії, особливо коли традиційне лікування неефективне, ефекти лікування надто повільні або після операції, коли тканинам загрожує венозний застій [119]. Слина МП містить понад 100 БАР, які мають широкий терапевтичний ефект, включаючи антикоагулянтну, судинорозширювальну, тромболітичну, протизапальну, болезаспокійливу та анестетичну дії [119], більш детально відображено в другому підрозділі першого розділу.

П також можуть негативно впливати на здоров'я домашніх тварин, заражаючи або висмоктуючи кров, а також іноді нападаючи на людей, що зменшує цим самим їхнє використання [120]. Зараження П серед домашніх тварин може статися, коли тварини вживають заражену воду з П з струмків, басейнів і джерел [121]. Зараження П може спричинити серйозні ускладнення, такі як летальна задишка, кровохаркання або блювота. П були знайдені в носі, заносовому просторі та ротоглотці, але рідко в підглотці або гортані домашніх тварин і людей [122]. Дослідження показали, що зараження тварин П може проявлятися у тварин з такими клінічними ознаками, як кашель, виділення крові з носа та рота, проблемами з диханням, сильним виснаженням та анемією, великою втратою ваги тіла, зниженням надоїв молока [123]. Застосування традиційних лікарських рослин (тютюн, зингер і часник), хімікатів (івермектин і левамизол),

ручне видалення паразитів і очищення води є одними з методів боротьби з зараженням П [120, 124-126].

Терапевтичне значення п'явки

П широко використовуються в медицині та ветеринарії для забору крові з набряклої області, а також для зменшення тиску рідини в пошкоджених тканинах [34]. Останнім часом все частіше П використовують, як терапію у лікуванні хвороб домашніх тварин [119, 127].

Найпоширеніші серед яких:

Захворювання, які стосуються запалення, дисплазії кульшових і ліктьових суглобів, захворювання сухожиль, зв'язок та фасцій, захворювання хребців та лікування рубців [119, 127], а також інші захворювання, які детально наведено в табл. 1.2.

Таблиця 1.2. Приклади захворювання при ГВ [26, 119]

Коні	Коти	Собаки
лихоманка	післяопераційна рана	післяопераційна рана
ламініт	дископатії	остеоартрит хребта
тендиніт	екзема	дископатії
теносиновіт	абсцеси	синдром кінського хвоста
атаксія	розтягнення зв'язок	стегно і лікоть дисплазія
міозіти	дисплазія коліна	неврит
остеоартроз	неврит хребта	екзема вуха
артрит в області плеча	мастит	погано загоюється рана
		післяопераційні рубці, тендиніт
		теносиновіт
		мастит

В наукових роботах учених було представлено колосальні результати стосовно загоєння ран у лабораторних щурів. Де автори використовували крем, який містив 5% екстракту отриманого з МП виду *Hirudo orientalis*. Він наносився *in vivo* на заздалегідь зроблені рани $1 \times 1 \text{ см}^2$, через день, на місце ураження накладалася стерильна серветка. В результаті крем проявив не тільки швидку здатність у загоєнні ран, але і сильний антикоагуляційний ефект [2, 59]. Підтверджено застосування ГВ при діабетичній нефропатії у щурів. БАР МП

підвищують захист від структурних ушкоджень і функціональних змін тканин, пригнічуючи окислювальний стрес, запалення та фіброз [13]. В експериментальних дослідженнях на лабораторних щурах доведено ефективність БАР МП при імуносупресивних станах, у підвищенні репродуктивної здатності обох статей, позитивному непрямому впливі на імунну систему [128]. Крім того, доведено ефективність ГВ при гематомах. Наприклад, гематома статевого члена при двох разовому ГВ з інтервалом у 5 днів та додаванням протизапальних препаратів, антибіотиків, призводить до повного одужання коня протягом 45 днів. Ерекційна функція пеніса відновлюється повністю [8]. При лікуванні обструкції верхніх дихальних шляхів у собаки в результаті набряку м'яких тканин розміром 10 см у правій вентральній шийній ділянці та синці навколо нижньої щелепи, ГВ ефективно себе зарекомендував. В результаті через 44 дні тварину виписали з лікарні повністю здоровою [9]. У домашнього кастрованого kota після чотирьох денному застосуванні МП швидко зникнув сильний набряк кінцівки після стиснутої травми та відновлювався повністю нормальний кровообіг [86].

ГВ ефективно корегує перебіг постпологових інволюційних процесів і підвищує репродуктивну здатність у корів. Використання ГВ у кіз, покращує їх загальний стан (підвищується апетит, покращується стан шерстяного покриву, зменшується тріщини на рогах та копитах), впливає на продуктивність (вагу тіла, надої) та репродуктивну здатність (кількість та вагу тіла приплоду) тварин [128].

Згідно представленим науковим фактам цього підрозділу МП та її БАР мають перспективу перевершити інші лікарські речовини при багатьох захворюваннях.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Матеріал, що використовувався у роботі

Медичні п'явки. В експерименті було задіяно МП: 700 шт. виду *Hirudo verbana* Carena, 1820, 120 шт. виду *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758 та 250 шт. *Hirudo orientalis* Utevsky & Trontelj, 2005 рис. 2.1., вирощених на базі навчально-науково-дослідної лабораторії клітинної та організменної біотехнології Запорізького національного університету (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.). МП утримували в 3-х літрових ємкостях із дехлорованою відстояною водогінною водою об'ємом 2 л (6-8 осіб) при температурі оточуючого середовища +22-24°C [128-130].

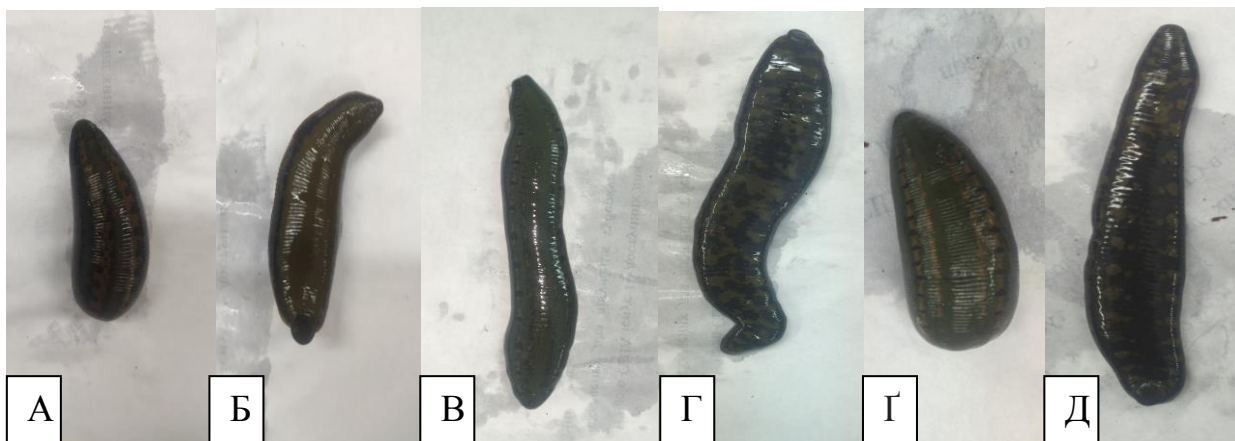


Рис. 2.1. Авторські фото зроблені в лабораторії клітинної та організменної біотехнології ЗНУ. Медичні п'явки: А, Б – *Hirudo verbana* Carena, 1820; В, Г – *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758; Г, Д – *Hirudo orientalis* Utevsky & Trontelj.

Кров людини, лабораторних та свійських тварин. З'їдену кров отримували з організму МП. З дотримання усіх санітарно-епідемічних норм щодо крові згідно наказу № 120 МОЗ України від 20.05.00.

Лабораторні щури. У дослідженнях використано 140 шт. нелінійних статевозрілих лабораторних білих щурів: 60 шт. самиць (віком 6 місяців, середньої ваги $209 \pm 13,4$ г), 80 шт. самців (віком 7 місяців, середньої ваги

258±14,3 г), плоду 240 шт. та приплоду 260 шт. Для дослідження використовували усіх тварин, які пройшли карантинний режим та не мали ніяких зовнішніх проявів захворювань.

Тварини утримувалися в спеціалізованому віварії біологічного факультету Запорізького національного університету, у стандартних пластмасових клітках при природному й додатковому штучному освітленні (з 8:00 до 19:00) при температурі 22-24 °С. Тварини годувалися збалансованим комбікормом, мали вільний доступ до питної води та до їжі [128, 129, 131, 132].

Усі маніпуляції з тваринами проводилися з дотриманням регламентованих норм і правил поводження з лабораторними тваринами: принципів біоетики, законодавчих норм та вимог згідно з положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (м. Страсбург, Франція, 1986) [128, 129, 133], Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» [134], Порядком проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах [129, 135], Положення про Комітет з питань етики (біоетики) [128, 136]. Тварин виводили з експерименту здвигом шийних хребців із подальшою декапітацією. Дослідження здійснювалися в один і той же час доби о 9 годині.

Методи дослідження

Визначення прояву часткового канібалізму в медичних п'явок

МП під час досліду зберігалися в кількості 5 негодованих і 5 годованих, у 3-літрових ємкостях здехлорованою стічною водою об'ємом 2 л, за температури навколишнього середовища + 22-24°C. До досліду і після нього не годованих та годованих П зважували на аптечних вагах. В досліді брали в середньому тварин із однаковою вагою П. Після посадки в один резервуар голодних та нагодованих

МП виду *Hirudo verbana*, проводилося цілодобове спостереження. В середньому через 20 хвилин голодні П починали атакувати нагодованих МП, намагаючись прикріпитися до їхнього тіла обома присосками: передньою і задньою. Ще через 20-40 хвилин голодні П відпадали з тіла жертви, а на тілі годуваних МП залишалися глибокі рани Y-подібної форми. Проводили оцінку смертності та пошкодження тіла П після повторних атак [137, 138].

Дослідження тривалості відпочинку та годування кров'ю на повторне розмноження медичних п'явок

МП із поясами плодючості після спаровування (6-8 шт. у одній ємкості) у водному середовищі годували кров'ю свині рис. 2.2.



Рис. 2.2. Авторські фото зроблені в лабораторії клітинної та організмальної біотехнології ЗНУ. Процес годування медичних п'явок.

Через два тижні після годування відправляли в торф'яно-грунтове середовище (співвідношення 1:1), для розмноження рис. 2.3.

Процес годування МП кров'ю тварин відбувався на тонкій кишці, яка заздалегідь була заповнена кров'ю домашньої тварини рис. 2.2. Кров і кишечник були взяті від однієї і тієї ж тварини (Рід: *Sus.*). Процес годування МП у штучних умовах був схожим на природні умови (температура крові та водного середовища +37-+39 °С та температура приміщення +20 °С, в якому вона перебувала під час годування; тонка кишка в процесі годування виконувала роль шкіри) [139].



Рис. 2.3. Авторські фото зроблені в лабораторії клітинної та організменної біотехнології ЗНУ. Процес підготовки торф'яно-грунтового середовища.

Відбір оптимального типу крові для годування медичних п'явок

Для отримання оптимальної крові для годування МП, відбирали її у лабораторних та свійських тварин, людини. Кров людини та щурів бралася із МП після гірудологічного впливу. Свиняча та куряча кров доставлялася із бійні. Усі тварини та люди були умовно здоровими.

Процес годування МП був схожий на природні умови (температура крові +37 та приміщення +20 °С, кров свиней та курей перебувала в заповненому тонкому кишечнику, який знаходився в тазах із відстояною водою) рис. 2.2. Всього тварин годували 3 рази, з перервою 1 місяць між годуванням. За цей час визначали смертність і поведінку МП. Їх утримували в 3-х літрових ємностях з водою (6-8 особин), при однаковому освітленні, температурі та вологості.

Контрольною групою для порівняння були тварини, яких годували кров'ю свиней. Оскільки, в більшості біолабораторій та біофабрик МП годують саме їхньою кров'ю. Усі умови створені та перевірені згідно з загальновідомими фактами та методами, які більш детально описані в попередньому розділі. До 1 місяця МП перебували в торф'яно-грунтовому середовищі (в кількості 2-4 шт. на 3 л ємність). При кімнатній температурі +25–26°C, розсіяному денному світлі, суворій тиші та частому провітрюванні примішені. Після появи коконів у ємностях та остаточного їхнього формування, дорослих МП видаляли, а тверді кокони залишали ще на 1-2 тижні в тому ж середовищі. Після чого досліджували смертність дорослих тварин, середню кількість коконів на тварину, дефектність коконів та молодняку.

Дослідження впливу часу та умов посадки на репродуктивну здатність медичних п'явок

МП поміщали в 4-літрові стерильні скляні пляшки з 2 л дехлорованою відстійною водою (4 тварини в кожній ємності) на 2–3 тижні для спаровування при температурі навколишнього середовища +22–24 °C. Тваринам контрольної та дослідної груп щодня змінювали водне середовище. Ця процедура дозволяла уникнути негативного фактору щодо забруднення метаболічними відходами п'явок, які на 4-й день можуть призвести до їх загибелі. П тримали в контейнері 4 шт. на ємність, що запобігало негативному впливу іншого фактору - щільності, яка також може негативно вплинути на життєдіяльність тварин. Показники дослідної групи тварин порівнювали з показниками контрольної групи. Контрольною групою слугували МП, яких відразу ж поміщали в торф'яно-грунтове середовище (співвідношення 1:1) для розмноження рис. 2.3. За обома групами після появи поясів плодючості спостерігали щоденно протягом місяця. Враховували смертність П із поясами плодючості перед посадкою протягом

місяця, а також їх виживання після посадки в торф'яно-грунтове середовище. Контрольні групи відразу на 2–3 добу після появи поясів плодючості були поміщені для розмноження у торф'яно-грунтове середовище. Потомство аналізували після вилуплення їх із коконів [21].

Визначення впливу перетяжок на тілі медичних п'явок на їх репродуктивну здатність

Після годування П маточного віку висаджували їх для спаровування у кількості 6-8 шт. у трилітрову ємність з відстояною водою при температурі навколишнього середовища + 23-25 °С. Після появи поясів плодючості у МП висаджували їх у торф'яно-грунтове середовище (співвідношення 1:1) на місяць рис. 2.3. Порівняння проводили з контрольною групою МП, які не мали на своєму тілі дефектів у вигляді перетяжок та виглядали умовно здоровими. Перетяжки у П могли бути різної інтенсивності ураження, від пошкодження поверхневих шарів тканин, аж до розриву її глибших шарів. Їх готовність до розмноження підтверджувалася появою поясів плодючості на передній частині їхнього тілі, які свідчили про накопичення в їх організмі сперматозоїдів і їхню готовність до розмноження. За науковими даними штучні умови їхнього утримання були створені схожими з умовами дикої природи [20], більш детально розглянуто в попередньому розділі роботи.

Вивчення впливу Coral-Mine» на життєздатність та розведення медичних п'явок

У дослідженнях даного підрозділу використовувався пакетований кораловий порошок «Coral-Mine», Виробник: Japan. Проводилися 2 серії дослідів: 1 – з постійним знаходженням порошку «Coral-Mine» у водному середовищі де утримувалися МП, кожні 3-4 доби відбувалася заміна нової води та порошку; 2 – знаходження МП у водному середовищі після годинної очистки його порошком «Coral-Mine» зі зміною води кожні 3-4 доби. Один пакетик порошку «Coral-Mine» (вага 10 г) у обох серіях дослідів поміщали в 3 літрову ємність із відстояною проточною водою. МП утримували у кількості 4 особини на одну 3 літрову ємність. Умови утримання розроблені згідно з науково відомими методами, більш детально описано в попередньому розділі. Тварин обох груп порівнювали з контрольними групами. Контрольними групами слугували МП, які знаходилися у проточній відстояній воді, із заміною її кожні 3-4 доби. За тваринами спостерігали впродовж 2 років. Усі групи знаходилися в однакових оптимальних умовах. У тварин на протязі цього часу фіксували смертність, поведінкові реакції, репродуктивну здатність (появу поясів плодючості, процес копуляції, відкладання коконів, фертильність, дефекти коконів та нитчаток) [140].

Визначення гострої токсичності у щурів на біологічно активні речовини медичних п'явок

Використовували 2 офіційно стандартизовані методи введення речовин, з метою тестування нових речовин на гостру токсичність: внутрішньочеревинний та внутрішньошлунковий. Для дослідження використовували тварин, які пройшли карантинний режим і не мали ніяких зовнішніх проявів захворювань.

Перший метод: тваринам одноразово внутрішньочеревинно вводився 1 мл водно-сольового екстракту МП у максимальній дозі 3500 мг/кг.

Другий метод: тваринам вводився внутрішньошлунково 2 мл водно-сольового екстракту МП у максимальній дозі 5500 мг/кг.

За тваринами спостерігали протягом 14 днів. Для порівняння використовували контрольні групи тварин, яким тими ж методами вводився фізіологічний розчин. Протягом 14 днів спостерігали за загальним станом тварин усіх груп: реакцією на звукові та світлові подразники, станом шкіри та шерсті, наявністю судом і крововиливів на шкірі, руховою активністю та апетитом, що дають первинну загальну характеристику щодо прояву токсичності речовини. Тварин виводили з експерименту шляхом зміщення шийних хребців з наступною декапітацією. Дослідження проводили в один і той же час доби о 9 годині. Визначали смертність тварин; вагу: тіла, лімфоїдних органів (тимусу та селезінки), придатків яєчка; загальний стан: шкіри та шерсті, реакцію на звукові подразники, наявність судом і крововиливів, рухову активність, зовнішні зміни внутрішніх органів; гематологічні показники крові (загальну кількість еритроцитів, загальну кількість лейкоцитів, лейкоцитарну формулу крові), імунологічні (фагоцитарну та метаболічну активність нейтрофілів); репродуктивну функцію (фертильність, загальну кількість і дефекти сперматозоїдів), морфологію тимусу та селезінки [28, 141].

Дослідження ембріотоксичності у щурів під впливом біологічно активних речовин медичних п'явок

Було сформовано чотири групи тварин. Першим двом групам, які були контрольними вводився внутрішньочеревинно фізіологічний розчин об'ємом 0,5 мл, тричі перед спаровуванням і тричі під час вагітності, з відпочинком протягом трьох днів перед кожним введенням. Іншим двом групам, які були

дослідними вводився внутрішньочеревно в об'ємі 0,5 мл водно-сольовий екстракт МП, в концентрації (5 мкг/г тварини), тричі перед спаровуванням і тричі під час вагітності, з відпочинком протягом трьох днів перед кожним введенням.

Обрана концентрація речовини була попередньо експериментально перевірена *in vitro* в попередніх дослідженнях і була обрана як нетоксична терапевтична концентрація [128]. На підготовчому етапі проводилися дослідження щодо естрального циклу самиць методом вагінальних мазків, що дало змогу визначити тривалість циклу та окремих фаз, наявність усіх фаз циклу та ритмічність їх чергування у кожної самиці. Виявлено самиць із стабільним ритмом естрального циклу проеструсу та стадії тічки злучали з інтактними самцями за схемою 3:1. Перший день вагітності у самиць визначали за наявністю сперматозоїдів у вагінальних мазках. Вагітних самиць щурів утримували в окремих клітках, з розрахунку 1 самиця на клітку, забезпечуючи необхідною підстилкою для гніздування [1]. З першого дня вагітності за тваринами спостерігали: стежили за їхньою поведінкою та загальним станом; реєстрували динаміку зміни ваги тіла, терміни вагітності, перебіг пологів. Паралельно спостерігали за контрольними групами тварин. У подальшому одну з груп, як контрольних, так і дослідних самиць щурів умертвляли під легким ефірним наркозом шляхом вивиху шийних хребців, на 20-й день вагітності (15 тварин у кожній групі). У цих самиць щурів розсікали черевну порожнину та роги матки; аналізували кількість жовтих тіл вагітності, кількість живих і мертвих плодів [1, 142-144]. Ембріотоксичну дію досліджуваних речовин оцінювали за такими показниками [1, 142-144]:

1. Загальна ембріональна смертність (ТЕС):

$$ТЕМ = \frac{В - А}{Б} \times 100,$$

де А - кількість живих плодів, В - кількість жовтих тіл вагітності.

2. Передімплантаційна смертність (PIM):

$$PIM = \frac{B - (A + C) \times 100}{B}$$

де А – кількість живих плодів,

Б - кількість загиблих плодів,

С - кількість жовтих тіл вагітності.

3. Постімплантаційна смертність (PostIM):

$$PostIM = \frac{B \times 100}{A + B}$$

де А – кількість живих плодів,

Б - кількість загиблих плодів.

У плодів проводили морфометричне дослідження параметрів їхнього тіла, визначали наявність гематом на шкірі, каліцтв, зовнішніх аномалій розвитку внутрішніх органів. Дві інші групи контрольних і дослідних самиць щурів (15 тварин у кожній групі) утримували до народження потомства. Після народження щуренят у самиць обох груп визначали вагу тіла, оцінювали загальний стан, реєстрували термін їхньої вагітності та загальну кількість живих і мертвих новонароджених. З обох груп щуренят аналізували всіх новонароджених у перший та 15-й день (130 щуренят з кожної групи). Визначали вагу тіла та довжину щуренят, реєстрували смертність від початку народження до 15-ї доби, наявність гематом на шкірі, каліцтв, зовнішніх аномалій розвитку внутрішніх органів. Тератогенну дію речовини відзначено візуально в кожній тварини [1].

Морфометричні методи аналізу тіла та основних лімфоїдних органів

Для визначення морфометричних показників тіла тварин вимірювали вагу тіла за допомогою аптечних вагів рис. 2.4.



Рис. 2.4. Авторські фото зроблені в лабораторії клітинної та організмальної біотехнології ЗНУ. Зважування тварин на аптечних вагах.

Розміри тіла вимірювали за допомогою штангенциркуля. Вагу органів вимірювали за допомогою торсійних та аналітичних вагів [128, 129].

Гематологічні, біохімічні, імунологічні, цитологічні та гістологічні методи аналізу

Оцінка загальної кількості лейкоцитів та еритроцитів, лейкоцитарна формула крові

Загальну кількість лейкоцитів та еритроцитів, лейкоцитарну формулу крові визначали та аналізували за стандартними загальноприйнятими методами [128-130].

Дослідження оксидативного метаболізму нейтрофілів

Оксидативний метаболізм нейтрофілів (ОМН) визначали за допомогою удосконаленого методу з додаванням нітросинього тетразолію (НСТ). Постановку реакції ОМН проводили таким чином: у лабораторних нелінійних білих щурів відбиралася цільна кров, стабілізувалася гепарином та наносилися 100 мкл крові кожної тварини на органічну білковану підкладку предметного скла (оброблену 20 % розчином пульвованої плазми крові щурів), додавали до крові 0,1 % розчин НСТ у співвідношенні 1:1, ресуспендували суміш, інкубували суміш у вологій камері при температурі 38,4-38,7 °С, що відповідає нормальній температурі клітин крові тіла щура впродовж 60 хв.

Після інкубації предметне скло обережно занурювали у порцію фосфатно-сольового розчину при рН 7,4, висушували його на повітрі при кімнатній температурі, фіксували протягом 15 хв. у метанолі, фарбували 1 % водним розчином сафраніну протягом 20 хв., промивали зразок у порції дистильованої води, диференціювали клітини у HCl, промивали зразок у 3 порціях дистильованої води, досліджували у 100 клітинах кисеньактивовані нейтрофіли [28, 29, 128, 145].

Визначення фагоцитарної активності нейтрофілів

Фагоцитрану активність нейтрофілів (ФАН) оцінювали в тесті з дріжджами (*Saccharomyces cerevisiae*) [28, 29, 128, 146]. Постановку ФАН проводили таким чином: наносили цільну кров нелінійних лабораторних білих щурів, стабілізовану гепарином в обсязі 200 мкл на пробілковані предметні скельця, попередньо оброблені 20 % розчином пульмованої плазми крові, додавали до неї приготовану 1 % суспензію дріжджів у співвідношенні 1:1, старанно перемішували

піпетуванням. Інкубували суміш у вологій камері в термостаті при температурі 38,4-38,7 °С, впродовж 90 хв. в умовах струшування кожні 5 хв., після інкубації предметні скельці обережно занурювали у 3 порції фосфатно-сольового розчину при рН 7,4, висушували їх на повітрі при кімнатній температурі, фіксували протягом 15 хв. у метанолі, фарбували предметні скельця 15 % розчином фарби Романовського-Гімзи протягом 45 хв., промивали зразки у 2 порціях дистильованої води, диференціювали клітини у HCl; промивали зразки у 3 порціях дистильованої води.

Підраховували 200 нейтрофілів за допомогою мікроскопу з використанням імерсійного об'єктиву (об'єктив 100×, окуляр К7×. Підраховували кількість фагоцитів із дріжджами та без них, також враховували кількість поглинутих дріжджів на 1 нейтрофіл. Вивчали наступні показники ФАН: фагоцитарний індекс (ФІ) — відсоток нейтрофілів, які беруть участь у фагоцитозі, від їх загальної кількості; фагоцитарне число (ФЧ) — середня кількість мікроорганізмів, яка була поглинута одним нейтрофілом [28, 29, 128, 146].

Гістологічне дослідження

Розкривали грудну клітку тварини за допомогою стерильних ножиць після декапітації рис. 2.5, видаляли селезінку і тимус, які фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну, шматочки органу закладали в парафінові блоки згідно загальноприйнятим методам.

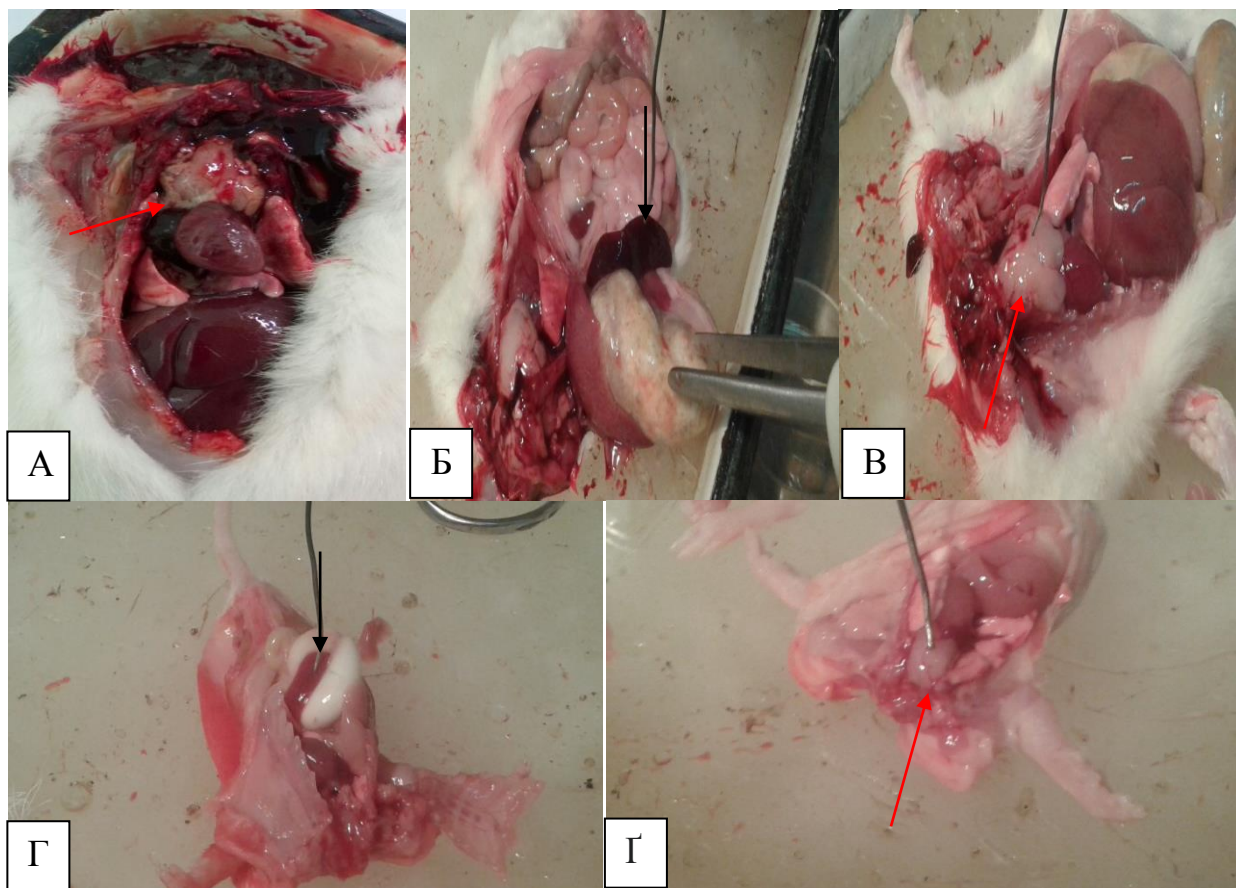


Рис. 2.5. Авторські фото зроблені в лабораторії клітинної та організмної біотехнології ЗНУ. Видалення селезінки та тимусу у дослідних щурів: А - доросла статевозріла тварина, при народженні Б – селезінка, В – тимус, на 15 добу Г- селезінка, Г - тимус. Чорними стрілками позначена селезінка, червоною тимус.

Серійні зрізи всього органу селезінки та тимуса виготовляли за допомогою мікротому Thermo Scientific HM 325, товщиною 4–6 мкм рис. 2.6.



Рис. 2.6. Авторське фото. Мікротом Thermo Scientific HM 325.

Для вивчення структурних компонентів селезінки та тимуса гістологічні зрізи фарбували гематоксиліном та еозином. Деталі гістологічної будови органів вивчали з використанням цитоморфологічного комплексу на основі цифрової камери Axioscam та мікроскопа Carl Zeiss Primo Star, на якому було зроблено чіткі цифрові фотознімання мікропрепаратів. Надалі визначали площу та діаметр лімфоїдних фолікулів у білій пульпі селезінки, площу, діаметр і товщину центральних артерій, кількість лімфоцитів у лімфоїдних фолікулах на одиницю площі (400 мкм²), кількість клітин на одиницю площі кортикальної та медулярної зон. Комп'ютерний програмний аналіз гістологічних препаратів проводився за допомогою програми Zeiss ZEN 2011 [28, 29] рис. 2.7.

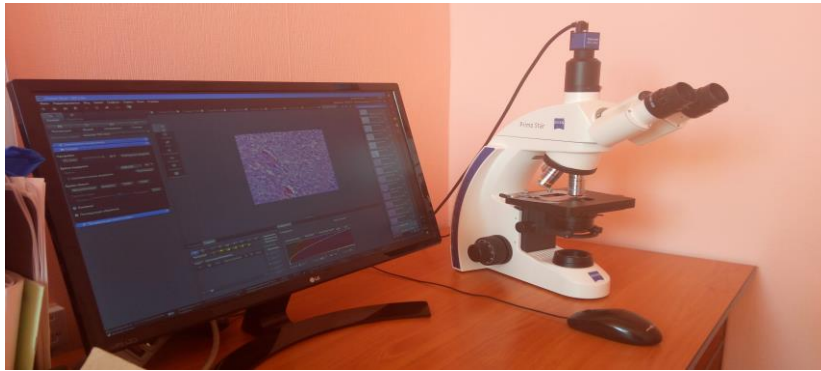


Рис. 2.7. Авторське фото. Аналіз гістологічних препаратів за допомогою мікроскопа Carl Zeiss Primo Star та програми Zeiss ZEN 2011.

Аналіз репродуктивної функції

Репродуктивну функцію самців аналізували в такій послідовності: визначали вагу надсім'яників на торсійних вагах, потім їх розрізали вздовж та вимивали з них еякулят у 5 мл 5% розчину глюкози, зробленому на фізіологічному розчині, попередньо нагрітому до температури тіла тварини. В отриманій суспензії еякуляту рахували загальну кількість сперматозоїдів за допомогою камери Горяєва. Еякулят до визначення фертильності перебував у термостаті за температури 38,4°C. Визначення фертильності сперматозоїдів проводилися в камері Горяєва (до фертильних відносили сперматозоїди, які в

камері Горяєва переміщувалися у просторі чи здійснювали рухи на одному місці). Морфологічні дослідження сперматозоїдів проводилися на мазках, які робили з нерозведеного еякуляту, їх фіксували в 96% спирті та фарбували 15 % розчином Романовського-Гімзи 30 хв [28, 128, 147].

Виявлення розладів фізіологічного стану за допомогою медичних п'явок

***Hirudo verbana* Carena, 1820**

Брали МП, які харчувалися кров'ю людини або тварини (умовно здорової та з патологією), не більше ніж добу тому. Згідно з загальновідомими фактами, з'їдена П кров господаря протягом цього часу не змінює свого фізіологічного складу. Протягом трьох тижнів спостерігали за їхнім загальним станом: реєстрували гибель (зі зміненою формою тіла та без змін), появу перетяжок на їхньому тілі, інтенсивне відхаркування з'їденою кров'ю господаря. Слід зазначити, що загибель відзначається у більшості тварин в перші дні після годування кров'ю. За допомогою пінцета кров господаря була охайно вичавлена з їхнього тіла в стерильну пробірку. Після чого визначали гематологічні та імунологічні показники з'їденої крові з додаванням 2% розчину гепарину («Спофа»). Порівнювали показники крові хворих з кров'ю умовно здорових тварин або людини.

Статистична обробка даних

Статистичну обробку даних проводили за допомогою комп'ютерних програм SPSS v.23,0. (IBM SPSS Statistics., США) та Microsoft XP «Exel».

Параметричними методами:

Вибрані параметри, зазначені в таблиці нижче, мають такі позначення: X – середнє значення вибірки, SE – стандартна похибка середнього значення

вибірки. Достовірність відмінностей середніх значень оцінювали за критерієм Стюдента після перевірки нормального розподілу. Відмінності вважалися достовірними при $p < 0,05$ [28, 29]. Розділ 3, 4 (підпункти 1-4), 5, 6.

Не параметричними методами:

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%) квантили. Для оцінки достовірності відмінностей незалежних вибірок використовували ранговий критерій Манна-Уїтні. Відмінності вважали достовірними при рівні значимості $p \leq 0,05$ [148]. Розділ 4 (пункт 5).

Розділ 3. ЧАСТКОВИЙ КАНІБАЛІЗМ У МЕДИЧНИХ П'ЯВОК

Прояв канібалізму *Hirudo verbana* Carena, 1820 у штучних умовах

Для МП різних видів існує конкуренція за харчові ресурси. Голодні особини МП стають більш активними і починають реагувати на різні подразники, які пов'язані з їжею, навіть, якщо перед ними знаходиться тварина з їхнього ж виду. Вони з неймовірною жадібністю накидаються на перше, що попадеться у воді, в надії хоч чимось поживитися, хоч гниллю, мертвиною (присмоктуються і до трупів) або насиченим П (особливо, якщо ситі та голодні П знаходяться у одному середовищі) [137, 149, 150]. І це при тому, що висмоктана П кров в її організмі змінюється і набуває особливого неприємного запаху, відлякує навіть голодних П. Кров, яка вичавлена з П відразу після годування, знову і нешкідливо може бути з'їдена іншими голодними П. Оскільки, для виживання абсолютно голодні П змушені навіть нападати на собі подібних тварин, причому слабкі тварини стають жертвами більш сильних, а годовані, стають жертвами голодних П, особливо прояв канібалізму характерний для кінських П. Будучи голодними або недостатньо нагодованими, вони можуть нападати на більших за розміром тварин, які добре годовані кров'ю, прорізаючи своїми зубами тканини жертви та висмоктуючи її з їхнього організму. Даний прояв канібалізму може закінчитися хворобливим станом, або навіть гибеллю жертви [151]. Тому експериментальні дослідження цього підрозділу присвячені дослідженню та вирішенню проблем щодо прояву канібалізму у МП виду *Hirudo verbana* та інших видів [137].

Схема дослідження

Дослід проводився на 150 аптечних МП виду *Hirudo verbana* Carena, 1820, віком 7-8 місяців, вирощених на базі навчально-науково-дослідної лабораторії клітинної та організменної біотехнології Запорізького національного

університету «П'явка медична», санітарно-епідеміологічний висновок МОЗ України. Останнє годування МП кров'ю великої рогатої худоби було 4 місяці тому, та 150 аптечних МП виду *Hirudo verbana* Carena, 1820, віком 7-8 місяців, зразу після годування кров'ю (людини та великої рогатої худоби). МП зберігали разом у кількості 5 негодованих та 5 годованих, у 3-літрових ємкостях із дехлорованою стічною водою, об'ємом 2 л на ємність, за температури навколишнього середовища + 22-24°C. До проведення досліду і після нього не годованих та годованих П зважували на аптечних вагах. В дослід переважно брали МП із однаковою вагою тіла: не годовані $1,52 \pm 0,04$ г і з такою ж вагою попередньо П (вага після годування $5,55 \pm 0,09$ г). Після посадки в один резервуар голодних та нагодованих МП виду *Hirudo verbana*, через 20 хвилин голодні П починали атакувати нагодованих, намагаючись прикріпитися до них обома присосками: передньою і задньою (рис. 3.1).

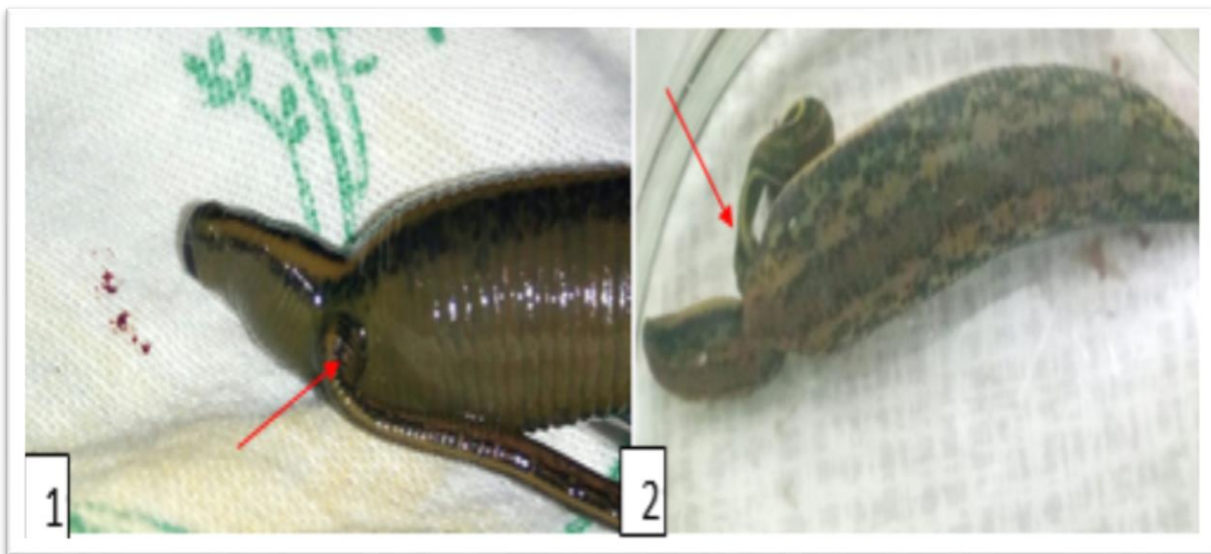


Рис. 3.1. Прикріплені голодної п'явки до ситих п'явок: 1, 2 [137].

Інтенсивність нападів голодних П тільки зростала, пока вони повністю кріпко не закріплювалися на своїй жертві. Після чого годовані П в більшості починали проводити активні та інтенсивні викручувальні рухи, аби скинути з себе інших П. Після прорізування м'язової тканини жертви, голодні П робили спроби інтенсивного висмоктування крові з жертви. Через 20-40 хвилин голодні П починали відпадати, а на тілі годованих МП залишалися сліди у вигляді глибоких ран Y-подібної форми, шириною до 6 мм (рис. 3.2).

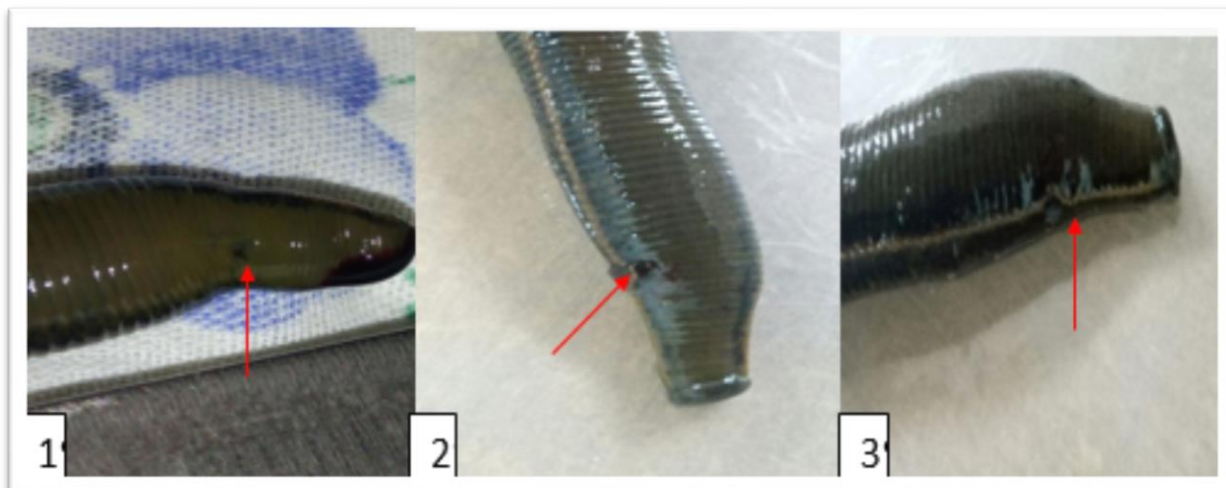


Рис. 3.2. Рани у ситих п'явок *Hirudo verbana* після нападу голодних: 1, 2, 3 [137].

Через деякий час голодні П знову починали інтенсивно атакувати нагодованих П намагаючись знову прикріпитися до тих самих же місць де в же були рани (рис. 3.3).

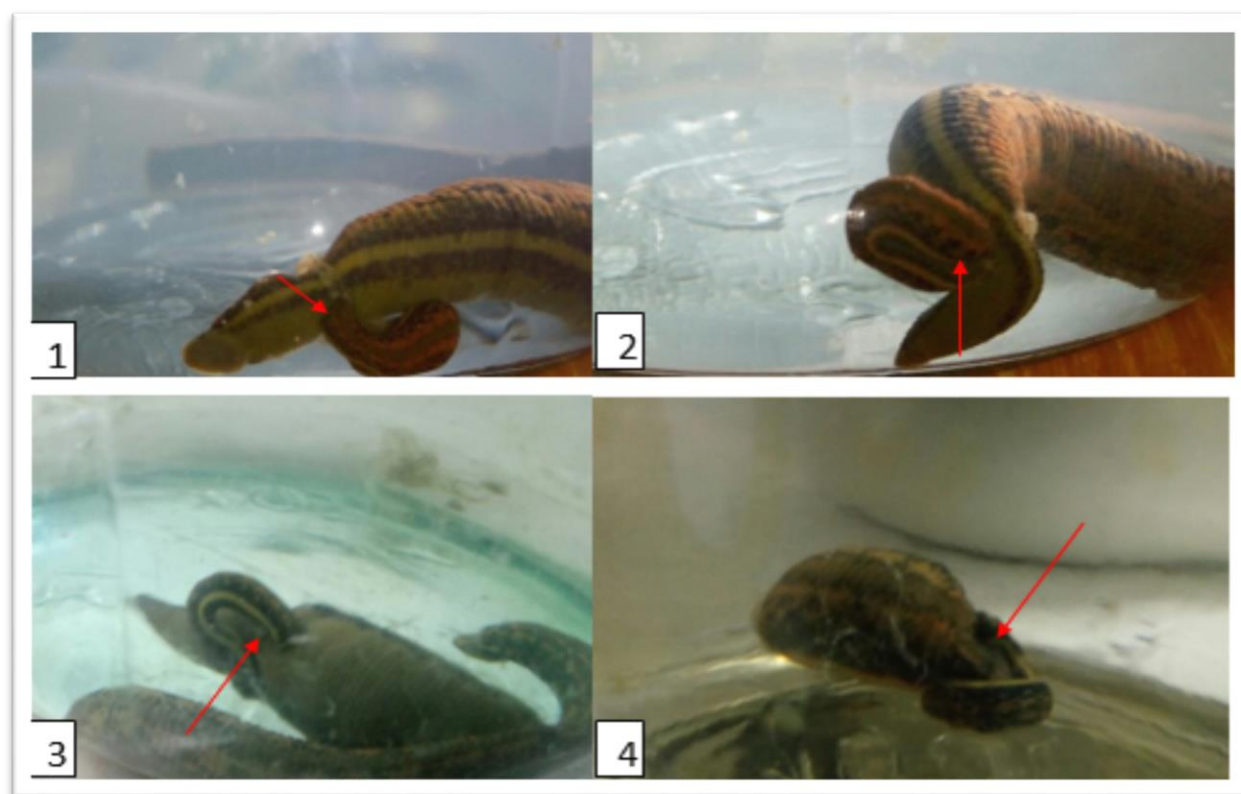


Рис. 3.3. Повторний напад і прикріплення голодних до попередніх укусів нагодованих п'явок *Hirudo verbana*: 1, 2, 3, 4 [137].

Паралельно також була досліджена молодь П, взятих зразу з вилуплених коконів на першу добу, яких годували кров'ю свійської тварини [137].

Результати дослідження

Майже вся молодь П, які були взяті з вилуплених коконів відразу починали атакували кишечник рогатої худоби, який заздалегідь був наповнений кров'ю тварини, що може свідчити про те, що молодь П вже в першу добу після виходу з коконів у більшості дуже голодні та можуть також проявити канібалізм до нагодованих в перші дні годування (рис. 3.4).

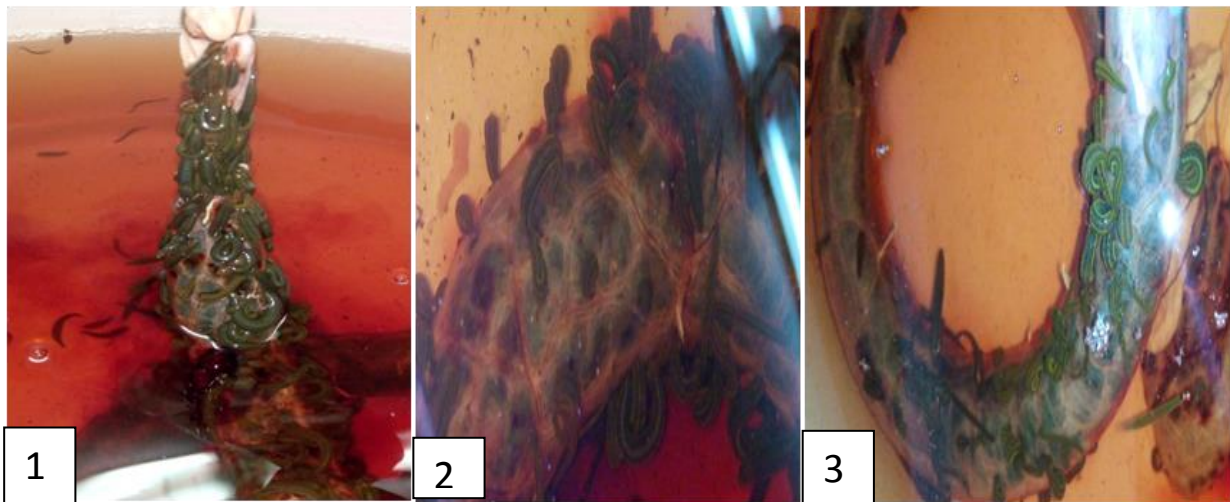


Рис. 3.4. Годування п'явок в першу добу після виходу з коконів: 1, 2, 3 [137].

Загальновідомо, що голодні П активізуються та починають реагувати на будь-які подразники, пов'язані з їжею і намагаються кинутися першими у воду, в надії хоч чимось поживитися навіть, якщо це буде тварина їхнього виду, що можна пояснити спостереження прояву часткового канібалізму у голодних МП виду *Hirudo verbana* у даному дослідженні [137].

Канібалізм проявлявся у однієї четвертої частини всіх голодних дорослих П. Після перших нападів голодних П, насичені П намагалися триматися зверху ємності і не падати на дно, а також при наближенні до них голодних П робили інтенсивні хвилеподібні рухи для відволікання, щоб голодні П не змогли знову на них напасти. Були проведені також вагові вимірювання тіла голодних та нагодованих МП, до та після прояву канібалізму (табл. 3.1).

Таблиця 3.1. Вага медичної п'явки *Hirudo verbana* до та після прояву канібалізму, $X \pm SE$

Групи тварин	Вага тварини г, n=150		Рани тіла, мм
	негодовані	годовані	
Перед підсадкою	1,52±0,04	5,55±0,09	6,00±0,01
Після підсадки: перша атака	1,63±0,03*	5,37±0,07	5,90±0,02
Після підсадки: друга атака	1,77±0,03*	5,22±0,04*	6,01±0,03
Після підсадки: третя атака	1,84±0,06*	5,14±0,06*	5,94±0,01

Примітка: * - $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою [137].

В результаті було виявлено збільшення ваги голодних і зменшення ваги нагодованих П, що може свідчити про наявний прояв часткового канібалізму. Годована П після двох-трьох атак намагалася випускати трохи з'їденої крові у ємкості де вона знаходилася, така їхня поведінка може свідчити про спроби відволікти негодованих П, щоб зменшити інтенсивність їхніх атак щодо них самих [151] та зберегти своє життя (рис. 3.5).



Рис. 3.5. Виділена з'їдена кров п'явки *Hirudo verbana* з ротового апарату [137].

Слід зазначити, що прояви часткового канібалізму були зареєстровані лише в перші дні після годування кров'ю свійської тварини МП виду *Hirudo verbana*. У природі нагодовані МП можуть ховатися від голодних, тому дуже важко визначити, чи є у них прояви канібалізму чи ні. У цьому дослідженні штучні умови були схожі з природими. Нагодовані П не могли втекти від голодних, тому більш детально вдалося дослідити та виявити прояви часткового канібалізму, який проявився у них. Також, отримані вагові зміни як голодних, так і

нагодованих МП, лише підтверджують наявність прояву часткового канібалізму МП виду *Hirudo verbana* [137]. Далі було також проведено дослідження міжвидового прояву часткового канібалізму у МП. Виявлено, що П східна (*H. orientalis* S. Utevsky et Trontelj, 2005) може також нападати на аптечну П (*H. verbana* Carena, 1820). Прояв канібалізму був схожий також щодо іншого виду МП (*H. medicinalis* Linnaeus, 1758). МП годувалися кров'ю домашніх тварин і людей. Канібалізм проявився в обох випадках. Важливо, що різні види МП можуть проявляти частковий канібалізм, як до свого виду, так і до іншого. Згідно результатам цього підрозділу вперше було виявлено прояв часткового канібалізму в МП, за допомогою зміни вагових показників та розмірів ран після повторних нападів П [137], а також виявлено видовий та міжвидовий прояв канібалізму.

Вживання медичних п'явок у лабораторних умовах після прояву часткового канібалізму

МП є ектопаразитарними гематофагами, які досить чутливі до незначних коливань навколишнього середовища, що робить їх екологічним біоіндикатором середовища в якому вони знаходяться. Вони також мають практичне значення для медицини, ветеринарії, фармацевтики та косметології. [6, 138, 17, 18, 152-159], більш детально представлено в 1 розділі. МП можуть смоктати кров у всіх класів хребетних, віддаючи перевагу амфібіям, великій рогатій худобі та людині [160]. У голодних п'явок може спостерігатися агресивна поведінка, яка може перерости у прояв видового та міжвидового прояву часткового канібалізму [137, 161-163], більш детально розглянуто в попередньому підрозділі. Відмічені випадки можливого гіперпаразитування, зокрема хоботкової П виду *Helobdella stagnalis*, на добре годованих особинах іншого виду П виду *Hirudo verbana* [161]. На теперішній час більшість МП знаходяться під загрозою зникнення та

вимирання через забруднення природних водойм та збільшення антропогенного тиску на прісноводні екосистеми [161], а також прояву інших негативних факторів, до яких можна віднести також і прояв канібалізму. Прояв часткового канібалізму у П було описано багатьма дослідниками [22, 160, 161], а також в попередньому підрозділі експериментальних досліджень даної роботи.

Схема дослідження

Дослід проводився півроку на МП трьох видів: *Hirudo verbana* Carena, 1820, *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758, *Hirudo orientalis* Utevsky and Trontelj, 2005, середнього та зрілого віку. Штучні умови були створені зжогими на природні: температура, світло, їжа, вода. МП після годування кров'ю відсаджували по 8-10 штук в ємкість з відстояною водою. Підміна води відбувалася частково та рівномірно, щоб не створювати для МП стресового стану. Спостереження велися вдень і вночі. Напади МП на інших тварин були рівномірними протягом дня і ночі з однаковою інтенсивністю та активністю. Досліджувалася смертність та інтенсивність пошкодження тіла МП після прояву часткового канібалізму [138].

Результати дослідження

У результаті дослідження було виявлено, що виживаємість після всіх нанесених ран від прояву канібалізму у всіх трьох видів становила в середньому близько 35% (табл. 3.2). Частковий канібалізм виявлявся незалежно від того, яким типом крові вони харчувалися: людини чи рогатої худоби. Залишені ними рани були різної глибини та ширини. Ті МП, у яких був пошкоджений лише епідермальний шар, виживаємість залишалася практично в межах фізіологічних норм (рис. 3.6, табл. 3.2) [138].

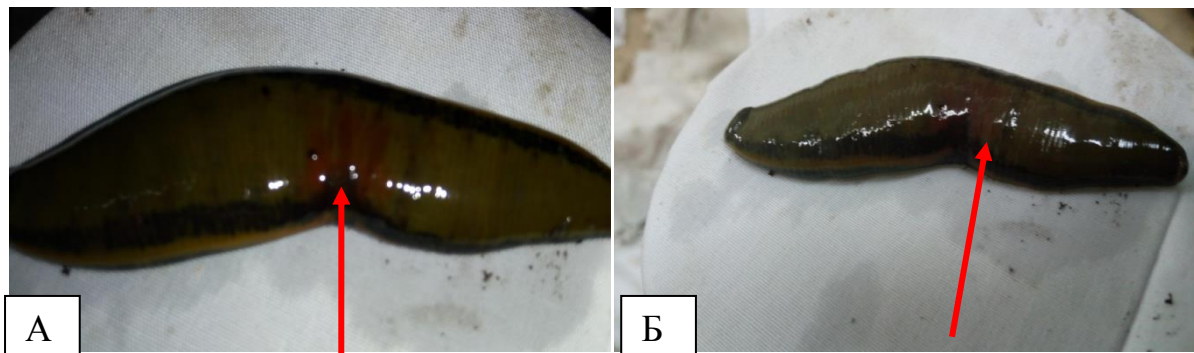


Рис. 3.6. Пошкодження епідермального шару тварини: А, Б [138].

Для тих МП, у яких глибина ран зачіпала м'язову тканину, виживаємість починала знижуватися в середньому на 20 % (рис. 3.7, табл. 3.2).

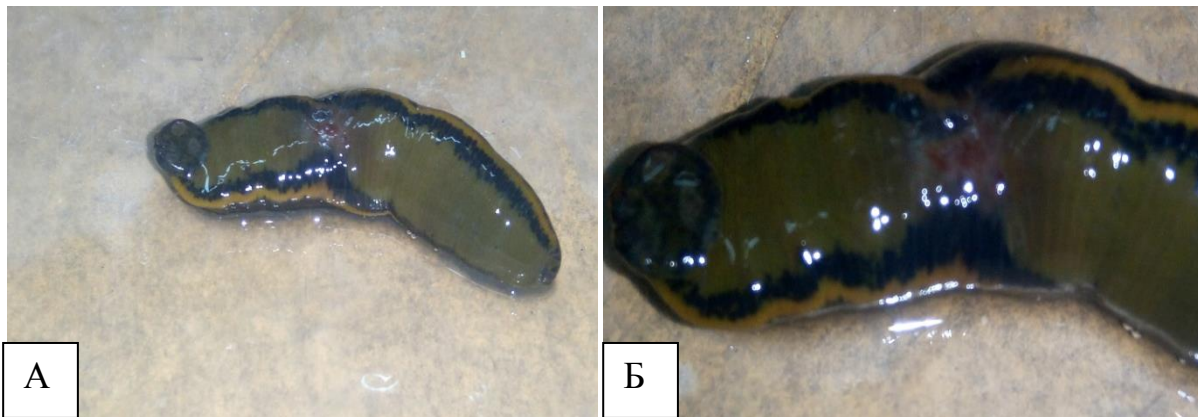


Рис. 3.7. Пошкодження м'язової тканини тварини: А, Б [138].

Частина МП, у яких було пошкоджено всю м'язову тканину і не тільки, з їхніх ран інтенсивно витікала кров (рис. 3.8, 3.9, табл. 3.2) [138].

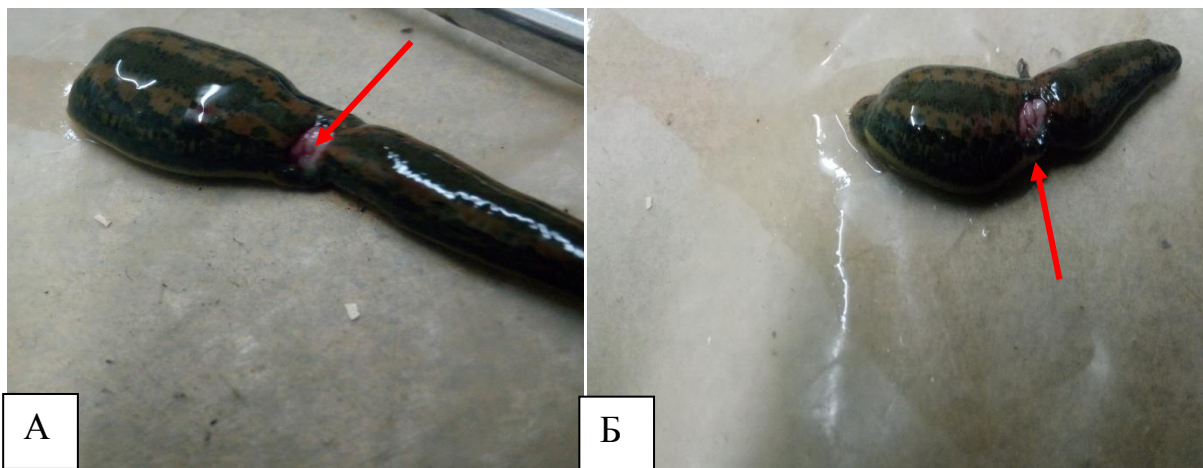


Рис. 3.8. Пошкодження не тільки м'язової тканини тварини: А, Б [138].

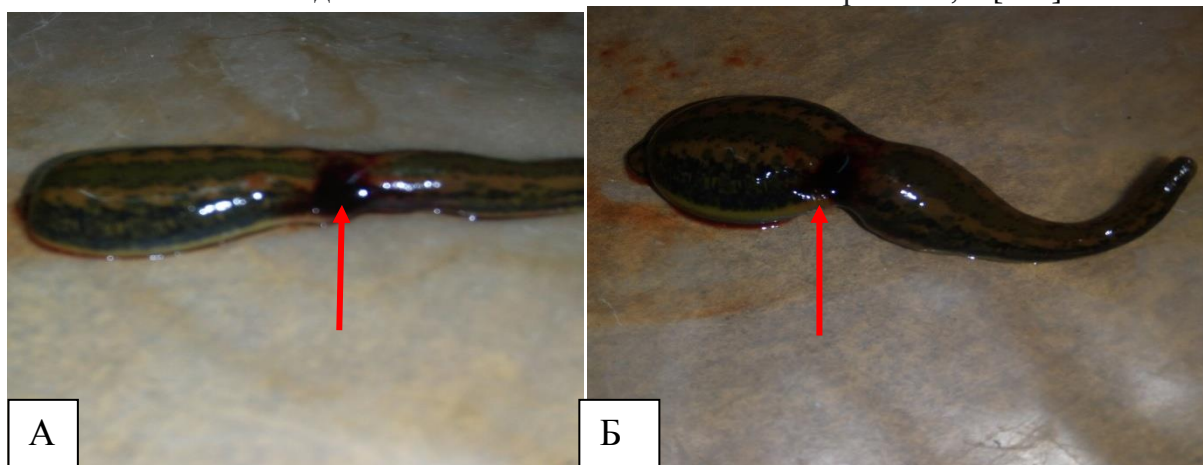


Рис.

3.9. Інтенсивна крововтрата п'явок після нападу: А, Б [138].

Їх виживаємість була знижена в середньому близько на 30%.

Таблиця 3.2. Виживаємість медичних п'явок, $X \pm Se$ [138].

Тварини	Виживання %, n=500			
	Контроль	Пошкоджений епідермальний шар	Пошкоджена м'язова тканина	Страждає не тільки м'язова тканина.
<i>Hirudo verbana</i> Carena, 1820	97,6 $\pm$ 2,1	93,9 $\pm$ 3,2	72,3 $\pm$ 2,0*	30,3 $\pm$ 0,8*
<i>Hirudo medicinalis</i> Linnaeus, 1758	95,9 $\pm$ 1,4	92,3 $\pm$ 1,7	68,4 $\pm$ 1,4*	27,7 $\pm$ 0,6*
<i>Hirudo orientalis</i> Utevsky and Trontelj, 2005	96,8 $\pm$ 1,7	93,4 $\pm$ 2,1	66,5 $\pm$ 1,1*	29,7 $\pm$ 1,2*

Примітка: * - $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою.

Після загоєння ран у тих МП, які виживали після прояву часткового канібалізму, на місці їхніх ран з'являлися звуження у вигляді перетяжок, які залишалися на їхньому тілі на все життя. Слід зазначити, що прояв часткового канібалізму спостерігався у всіх трьох видів МП, а також у одного виду і між видами, що було відмічено і в дослідженнях попереднього підрозділу. У дикій природі прояв часткового канібалізму, ймовірно, пов'язаний з порушенням харчового ланцюга, а саме зі скороченням тваринного світу [138]. Оскільки, були виявлені випадки нападу величезної кількості П-равликів на людину в дикій природі, які в більшості не нападають на тварин та людей, що може свідчити про зменшення їхнього харчового раціону в їхньому середовищі проживання. Зменшення чисельності П у природі, не тільки медичних, а й інших видів, може бути пов'язано з багатьма негативними факторами, одним з яких є прояв часткового канібалізму.

Отримані результати цього розділу можуть бути корисними для розробки методів щодо збереження видів МП у різних середовищах існування, особливо в штучному (лабораторному) [138]. Слід також зазначити, що прояв часткового канібалізму у ситих МП виявляється набагато рідше, ніж у голодних. Найчастіше прояв канібалізму виявлявся коли частина тварин були голодними, а інша частина нагодованою [137].

Розділ 4. ВПЛИВ РІЗНИХ ФАКТОРІВ ЩОДО ВИЖИВАННЯ МЕДИЧНИХ П'ЯВОК У ШТУЧНИХ УМОВАХ

Вплив крові людини, домашніх і дрібних лабораторних тварин на життєздатність та поведінку медичної п'явки

МП в основному відносять до ектопаразитарних тварин, але чи можна їх вважати та називати саме паразитами, незрозуміло, оскільки остаточну відповідь ніхто ще досі не може дати та на рахунок цього ведуться наукові суперечки. Оскільки, МП зі свого боку вживають кров господаря для виживання, а господар на взаєм отримує велику кількість БАР, які проявляють широкий спектр терапевтичних ефектів. Більшість МП розводять на біологічних фабриках та біолабораторіях для медичного застосування [4-9, 13, 16-18]. Наприклад, види *Hirudo verbana* Carena, 1820 та *Hirudo orientalis* Utevsky & Trontelj, 2005 все частіше зникають у дикій природі, а їх глобальне географічне поширення з кожним роком зменшується. Із-за цього вони занесені до Червоної книги як зникаючі види. Тому вчені різних спеціальностей, які їх вивчають шукають різні методи та способи, щоб врятувати цих тварин.

Вчені та наші дослідження виявили оптимальні умови щодо утримання та розведення МП: вологість ґрунту, температуру та рН, вплив спокою, густоти посадки та віку [20-23]. Так, досліджуючи вплив щільності при посадці вагітних МП виду *Hirudo verbana* Carena, 1820 у торф'яне середовище, було встановлено, що чим менше п'явок (1-2 тварини на 2-літрову банку) посаджено в середовище, тим більше коконів вони можуть викинути [22]. Вік тварин дуже впливає на їхню репродуктивну здатність, чим молодша МП, тим більше потомства вона може дати, оптимальний вік тварин - 1 рік [23]. За рахунок недотримання нормальних умов: торф'яного середовища дефектність тіла, часу посадки та відпочинку вагітних МП, може негативно вплинути на їхню репродуктивну здатність. В результаті зменшується відсоток вагітних тварин, отримання приплоду, а

відсоток смертності дуже зростає. Вивчаючи ріст, розмноження і смертність виду *Hirudo orientalis* в лабораторних умовах, було показано, що годування кров'ю овець прискорює їх ріст і збільшує кількість тварин, здатних відкладати нормальне фертильне потомство [24]. Досліджуваний вид *Hirudo verbana*, який споживав кров ссавців і домашньої птиці, показав, що згодовування курячої крові підвищує репродуктивну здатність МП у 2,5 рази порівняно з годуванням кров'ю великої рогатої худоби [25], більш детально представлено в 1 розділі роботи. Але слід зазначити, що смертність П в штучних умовах через споживання різних типів крові все рівно залишається серед важливих проблем їхнього утримання та розмноження. Особливо це стосується не лише через спожиту кров, але й через збільшення відсотку прояву у них канібалізму, що було показано в результатах попередніх розділів [20-23]. Тому проблема отримання оптимальної крові для нормальної життєздатності та подальшого розмноження МП залишається головним завданням учених, біофабрик і біолабораторій. Це стало метою цього підрозділу, щодо отримання оптимального типу крові для МП двох видів: *Hirudo verbana* Carena, 1820 та *Hirudo orientalis* Utevsky & Trontelj, 2005, які споживали різні види крові: людини, домашніх і дрібних лабораторних тварин, для отримання більш оптимальної крові.

Схема дослідження

Для дослідження було сформовано 8 експериментальних груп тварин: 1 (*Hirudo verbana*) та 2 (*Hirudo orientalis*) групи, яких годували кров'ю людини; 3 (*Hirudo verbana*) та 4 (*Hirudo orientalis*) групи годували кров'ю домашньої свині (*Sus domestica*); 5 (*Hirudo verbana*) та 6 (*Hirudo orientalis*) групи, яких годували кров'ю домашніх курей (*Gallus gallus domesticus*); 7 (*Hirudo verbana*) та 8 (*Hirudo orientalis*) групи годували кров'ю нелінійного лабораторного білого щура (*Rattus*).

Кров людини та щурів була видалена з МП після гірудологічного впливу, на першу добу після годування. Свинячу та курячу кров отримували з бійні. Процес годування МП свинячою та курячою кров'ю був схожим на природні умови: температура крові (+37) та середовища (+20 °C), тонкий кишечник отриманий із

свині заповнювали кров'ю та завантажували у воду з МП. Всього тварин годували 3 рази, з перервою у місяць після кожного годування. За цей час визначали смертність та прояв поведінки МП у двох видів: *Hirudo verbana* Carena, 1820 та *Hirudo orientalis* Utevsky & Trontelj, 2005. Експеримент тривав протягом 7 місяців. Її утримувалися в 3-х літрових ємностях з водою у кількості 6-8 особин. При однаковому освітленні, температурі та вологості. Контрольною групою для порівняння були тварини, яких годували кров'ю свиней в тих же умовах, що і дослідну групу.

Результати дослідження

У результаті дослідження після першого годування 6-місячних МП було встановлено, що МП виду *Hirudo verbana* починають гинути на першому та другому тижнях (табл. 4.1): у першій групі до $10,0 \pm 0,9$ %, у сьомій групі до $6,1 \pm 0,6$ % (табл. 4.1).

У третій групі смертність була незначна $0,2 \pm 0,01$ %, а в п'ятій групі смертність не виявлена взагалі (табл. 4.1). Слід зазначити, що при харчуванні кров'ю щура та людини на тілі МП з'являються дефекти у вигляді перетяжок різної інтенсивності ($1,1 \pm 0,07$ % та $4,0 \pm 0,9$ % відповідно) (табл. 4.1).

При аналізі тварин виду *Hirudo orientalis* були зареєстровані схожі результати порівняно з МП виду *Hirudo verbana*, але в меншому діапазоні між кров'ю людини (друга група) та кров'ю щура (восьма група) ($6,0 \pm 0,5$ % і $5,2 \pm 0,7$ %) (табл. 4.1). Слід відмітити, що найбільше звуження на тілі у вигляді перетяжок виникали лише при живленні кров'ю людини (у $2,1 \pm 0,3$ %). Не було виявлено смертності МП при годуванні свинячою (четверта група) і курячою (шоста група) кров'ю (табл. 4.1).

Таблиця 4.1. Смертність, поява перетяжок та прояв часткового канібалізму, перше годування

Показники		Перша група	Друга група	Третя група	Четверта група	П'ята група	Шоста група	Сьома група	Восьма група
		<i>Hirudo verbana</i>	<i>Hirudo orientalis</i>	<i>Hirudo verbana</i>	<i>Hirudo orientalis</i>	<i>Hirudo verbana</i>	<i>Hirudo orientalis</i>	<i>Hirudo verbana</i>	<i>Hirudo orientalis</i>
Перше годування	Смертність, %	10,0 ± 0,9*	6,0 ± 0,5*	0,2 ± 0,01	0	0 *	0	6,1 ± 0,6*	5,2 ± 0,7*
	Поява перетяжок, %	4,0 ± 0,9*	2,1 ± 0,3*	0,02 ± 0,002	0,01 ± 0,001	0,01 ± 0,002	0	1,1 ± 0,07*	0,01 ± 0,001
	Прояв канібалізму, %	0,01 ± 0,002*	0	0,01 ± 0,002	0	0*	0	0,01 ± 0,003	0

* – $p < 0,05$ порівняно з 3 та 4 групою.

Крім того, до другого годування спостерігався невеликий відсоток смертності у тварин виду *Hirudo verbana* та виду *Hirudo orientalis*, яких годували кров'ю людини ($0,5 \pm 0,03\%$ в середньому). Після другого годування відсоток смертності МП виду *Hirudo verbana* в першій групі залишається в межах $8,3 \pm 0,6\%$, а в 7 групі у межах $4,0 \pm 0,3\%$ (табл. 4.2).

Повторна поява звужень на тілі спостерігається в середньому у $3,1 \pm 0,4\%$ (при годуванні кров'ю людини та щурів).

Змінюється і поведінка МП, вони стають більш агресивними та кровожерливими, починає проявлятися частковий канібалізм (рис. 4.1, рис. 4.2) у середньому у $2,0 \pm 0,3\%$ (табл. 4.2). Подібні результати були отримані у тварин виду *Hirudo orientalis*, але в меншій мірі. У другій групі поява перетяжок в середньому у $0,3 \pm 0,01\%$, летальність у $0,2 \pm 0,03\%$ (табл. 4.2), одноразовий

прояв канібалізму. У восьмій групі поява перетяжок у $0,1 \pm 0,04$ %, летальність у $0,2 \pm 0,01$ %, канібалізму не спостерігається (табл. 4.2).

Таблиця 4.2. Смертність, поява перетяжок та прояв часткового канібалізму, друге годування

Показники		Перша група	Друга група	Третя група	Четверта група	П'ята група	Шоста група	Сьома група	Восьма група
		<i>Hirudo verbana</i>	<i>Hirudo orientalis</i>	<i>Hirudo verbana</i>	<i>Hirudo orientalis</i>	<i>Hirudo verbana</i>	<i>Hirudo orientalis</i>	<i>Hirudo verbana</i>	<i>Hirudo orientalis</i>
Друге годування	Смертність/, %	$8,3 \pm 0,6^*$	$0,2 \pm 0,03^*$	$0,02 \pm 0,001$	0	$0,01 \pm 0,001$	0	$4,0 \pm 0,3^*$	$0,2 \pm 0,01^*$
	Поява Перетяжок/, %	$4,0 \pm 0,5^*$	$0,3 \pm 0,01^*$	$0,01 \pm 0,002$	0	$0,01 \pm 0,001$	0	$2,2 \pm 0,3^*$	$0,1 \pm 0,04^*$
	Прояв канібалізму, %	$2,5 \pm 0,3^*$	$0,2 \pm 0,06^*$	$0,01 \pm 0,001$	0	0	0	$1,4 \pm 0,2^*$	0

* – $p < 0,05$ порівняно з 3 та 4 групою

Після 3-го годування МП у виду *Hirudo verbana* смертність зберігається на рівні $6,2 \pm 0,9$ % у 1-й групі, на рівні $5,0 \pm 0,7$ % у 7-й групі, поява перетяжок спостерігається в обох групах у середньому $4,1 \pm 0,6$ % (табл. 4.3). Канібалізм спостерігається у середньому $4,0 \pm 0,8\%$ у обох групах. У третій і п'ятій групах смертність становить $0,4 \pm 0,02\%$, канібалізм зустрічається дуже рідко. Подібні результати були отримані при годуванні виду *Hirudo orientalis* (табл. 4.3).

Таблиця 4.3. Смертність, поява перетяжок та прояв часткового канібалізму, третє годування

Показники		Перша група	Друга група	Третя група	Четверта група	П'ята група	Шоста група	Сьома група	Восьма група
		<i>Hirudo verbana</i>	<i>Hirudo orientalis</i>	<i>Hirudo verbana</i>	<i>Hirudo orientalis</i>	<i>Hirudo verbana</i>	<i>Hirudo orientalis</i>	<i>Hirudo verbana</i>	<i>Hirudo orientalis</i>
Третє годування	Смертність, %	6,2 ± 0,9*	0,4 ± 0,01*	0,5 ± 0,04	0,2 ± 0,03	0,3 ± 0,02*	0,1 ± 0,01*	5,0 ± 0,7*	0,3 ± 0,02*
	Поява перетяжок, %	5,1 ± 0,6*	0,3 ± 0,02*	0,2 ± 0,01	0,1 ± 0,02	0,1 ± 0,01*	0,2 ± 0,01*	3,1 ± 0,4*	0,2 ± 0,03*
	Прояв канібалізму, %	5,5 ± 0,6*	0,4 ± 0,03*	0,1 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,1 ± 0,02*	0,1 ± 0,01*	2,5 ± 0,5*	0,3 ± 0,01*

* – $p < 0,05$ порівняно з 3 та 4 групою.

В результаті проведених досліджень спостерігається переважна смертність тварин двох видів МП *Hirudo verbana* і *Hirudo orientalis* при годуванні їх кров'ю людини та щурів. Значний відсоток смертності спостерігається при триразовій годівлі (таблиці 4.1-4.3), особливо це відображається при годуванні кров'ю людини. У цих групах також спостерігається значний відсоток виникнення перетяжок на їхньому тілі та прояв часткового канібалізму (рис. 4.1). Тварини обох видів поведуться дуже агресивно. Деякі з мертвих тварин мають на своєму тілі сліди укусів (рис. 4.2). При годуванні свинячою і курячою кров'ю спостерігається невеликий відсоток смертності і одиничні прояви часткового прояву канібалізму в обох видів МП. Подібні результати щодо прояву канібалізму після згодовування крові людини і тварин були описані в попередніх розділах роботи та відображені в роботах інших учених [23, 137, 138, 161, 163].

Так, було показано, що недотримання норми щільності МП виду *Hirudo verbana* Carena, 1820 може спровокувати прояв часткового канібалізму [22].



Рис. 4.1. Прояв часткового канібалізму: *Hirudo verbana* Carena, 1820. Фото зроблені в лабораторії клітинної та організмової біотехнології ЗНУ.



Рис. 4.2. Смерть МП виду *Hirudo verbana* Carena, 1820, які споживали кров людини зі слідами прояву часткового канібалізму. Фото зроблені в лабораторії клітинної та організмової біотехнології ЗНУ.

Зменшення смертності МП видів *Hirudo verbana* і *Hirudo orientalis* при харчуванні кров'ю домашніх і, наприклад, диких тварин, можливо, є результатом тисячолітньої адаптації в порівнянні з кров'ю людини. Поява перетяжок на їхньому тілі у обох видів МП, а згодом і їхня загибель, може бути проявом імунологічної реакції від спожитої крові господаря. Це явище відзначалося в роботах інших авторів [161]. Вони виявили появу перетяжок на тілі МП виду *Hirudo verbana* Carena, 1820 після годування людською кров'ю. Також

спостерігалася смертність у деяких дефектних МП. Слід зазначити, що в обох видів МП спостерігається значний потяг до крові після першого годування, особливо людської крові. В результаті чого навіть спостерігається посилений прояв часткового канібалізму. Але цей прояв здебільшого пов'язаний не з поїданням, а з отриманням з'їденої крові від іншої тварини. Можливо, це ще пов'язано з наявністю в з'їденій крові деяких речовин, які діють на МП, за механізмом схожим на наркотичні речовини, які в подальшому призводять до звикання МП і тяги до цього типу крові. Також слід зазначити, що П обох видів інтенсивніше виділяли з'їдену кров людини порівняно з іншими типами крові (рис. 4.3).



Рис. 4.3. Укушені п'явки, які інтенсивно виділяють з'їдену кров господаря. Фото зроблені в лабораторії клітинної та організмальної біотехнології ЗНУ.

Можливо, така поведінка може бути пов'язана з відволіканням та порятунком свого життя від можливого або повторного нападу інших тварин (прояву канібалізму), а також зі зниженням імунологічної реакції на з'їдену кров. Виділення з'їденої крові та подібна поведінка описані в роботах інших авторів [161]. Згідно з отриманими даними бачимо, що кров свині, а особливо куряча, є оптимальними для їх виживання МП обох видів *Hirudo verbena* та *Hirudo orientalis* після годування, порівняно з годуванням кров'ю людини та нелінійних лабораторних щурів. Також слід зазначити, що якість крові може грати важливу роль у життєдіяльності МП. Наприклад, кров яка береться із бійні. Якщо вона не перевірена на умовну стерильність, наявність різних хімічних речовин, які могли вживати тварини, або наявність вірусних, бактеріальних чи грибкових

мікроорганізмів, то може спричинити хворобу та навіть загибель тварин після її вживання. На рис. 4.4 представлені фото МП виду *Hirudo verbena*, які вжили не якісну свинячу кров. Смертність у частини П спостерігалася у перші дні не залежно від віку. У інших значна смертність протягом місяця.



Рис. 4.4. МП після вжитої неякісної свинячої крові. Фото зроблені в лабораторії клітинної та організмової біотехнології ЗНУ.

Своєчасний відпочинок та годування кров'ю значною мірою впливає на повторне розмноження ектопаразитів: *Hirudo verbena*, *Hirudo medicinalis* та *Hirudo orientalis*

Ектопаразитарні МП здавна використовуються у ветеринарії та медицині, оскільки вони володіють цілющими властивостями при різних захворюваннях

[139] більш детально описано в 1 розділі роботи. Перші відомості про застосування П в медичних цілях відносяться до Стародавнього Єгипту. У гробницях фараонів 18-ї династії були знайдені фрагменти справжніх картин, що зображують лікувальння за допомогою МП. Згідно з відомими фактами, вони паразитують на поверхні або в порожнинах поверхні тіла. Серед найбільш поширених і вивчених МП є *Hirudo verbana* Carena, 1820, *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758 та *Hirudo orientalis* Utevsky & Trontelj, 2005. Ці три види використовуються для профілактики та лікування багатьох захворювань, також ефективно вивчаються в онкології, туберкульозі, відновленні після Covid-19 та інших [4, 8, 9, 15, 17, 18, 26, 164, 165] Але в природі ці тварини майже вимерли, а в Червону книгу вони занесені як вразливий вид, тому їх популяція здебільшого підтримується в біолабораторіях. Вчені шукають різні методи їх підтримки та збільшення популяції. Наприклад доведено, що для розмноження та відкладання коконів найбільш оптимальною є температура в межах + 22–25 °С, а для нормальної життєдіяльності рН середовища розчину знаходиться в межах 5,0–6,5 [7, 20-23, 137-139, 140]. Нормальна вага дорослих тварин становить $5,94 \pm 1,06$ г, а найкраща для розведення вологість торфу становить близько 70-75 % [22, 23]. Доведено ефективність нормалізації життєдіяльності та підвищення продуктивності тварин при годівлі різними типами крові домашніх тварин [24]. Показано оптимальний вік тварин для відтворення та отримання великої кількості потомства [25], більш детально представлено в 1 розділі роботи. Згідно з науковими роботами інших вчених, все ще не показано та не доведено, через який час МП здатні відновлюватися в штучних умовах після розмноження та знову відкладати кокони, що може збільшити їхню популяції та не нашкодити при цьому їхньому здоров'ю. Тому дослідження цього підрозділу присвячені перевірці впливу тривалості відпочинку та годівлі МП на повторне їхнє розведення [139].

Схема дослідження

Для дослідження було сформовано три експериментальні групи тварин: 1 контрольна – тварини після першого розмноження, через тиждень вигодовані

кров'ю свійських тварин, повторне розмноження відбулося не раніше ніж через 2 місяці. Процес годування МП кров'ю відбувався на тонкій кишці, яка була заповнена кров'ю домашньої тварини. Кров і кишечник були взяті з бійні від тварин Рід: *Sus*. Процес годування МП був схожий на природні умови: температура крові (+37 - +39 °C) і середовище (+20 °C). 2 дослідна - відібрані тварини, у яких залишилися пояси плодючості після першого розмноження, вони були знову відправлені в торф'яно-грунтове середовище для розмноження, без відпочинку та годування. 3 дослідна - відібраних тварин, у яких залишилися пояси плодючості після першого розмноження, через 1 тиждень вони були погодовані, а ще через 1-2 тижні знову відправлені в торф'яно-грунтове середовище для розмноження. Контрольну групу тварин, повторно відправляли в торф'яно-грунтове середовище для розмноження через два місяці, статистично вона не відрізнялася від першого розведення [139]. Тварини з поясом плодючості після спаровування (6-8 шт.) у водному середовищі годували кров'ю домашньої тварини (рис. 4.5), а через два тижні відправляли в торф'яно-грунтове середовище для розмноження. Усі умови створені та перевірені згідно з дослідями попередніх розділів та робіт інших науковців [20-25]. До одного місяця МП перебували в торф'яно-грунтовому середовищі. При кімнатній температурі +25–26°C, розсіяному денному світлі, суворій тиші та частому провітрюванні приміщення.



Рис. 4.5. Годування медичних п'явок різної вікової категорії: *Hirudo verbana* Carena, 1820, *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758 та *Hirudo orientalis* Utevsky & Trontelj, 2005 [139].

Після появи та остаточного формування коконів (рис. 4.6) дорослих тварин усіх груп видаляли, а тверді кокони залишали ще до 2 тижнів на інкубації.

Подальші дослідження проводились відповідно до розподілу на групи. Визначали у МП смертність, середню кількість відкладених коконів на тварину, дефектність коконів та молодняку [139].

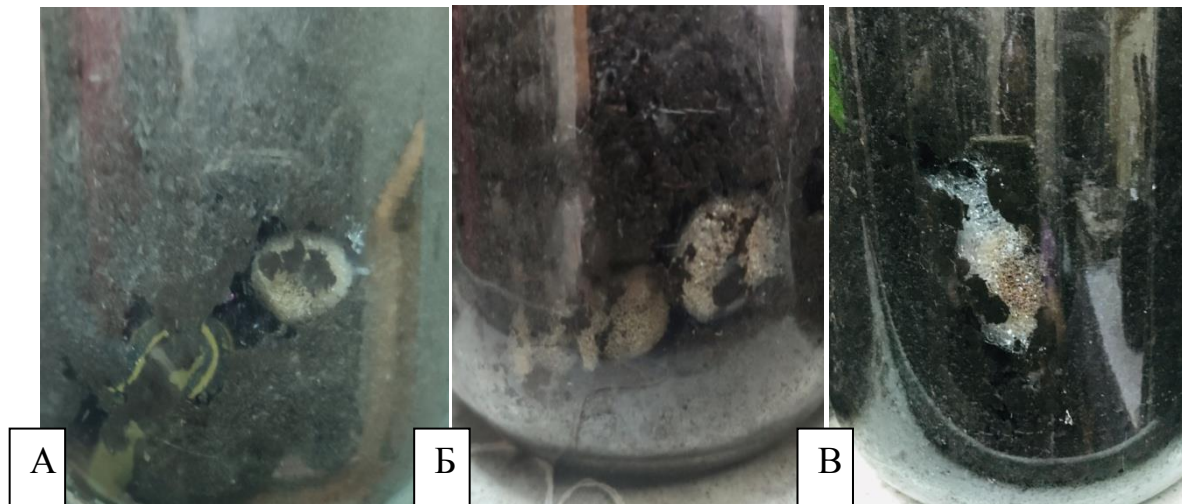


Рис. 4.6. Розмноження п'явок у торф'яно-грунтовому середовищі (2-3 тижні): А – *Hirudo verbana* Carena, 1820, Б – *Hirudo orientalis* Utevsky & Trontelj, 2005 та В – *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758 [139].

Результати дослідження

При аналізі смертності дорослих тварин МП було виявлено, що третя група всіх трьох видів *Hirudo verbana* ($1,6 \pm 0,3$ %), *Hirudo medicinalis* ($2,3 \pm 0,4$ %) та *Hirudo orientalis* ($1,9 \pm 0,3$ %) статистично не відрізнялася від першої групи ($1 \pm 0,3$ %, $1,6 \pm 0,3$ %, $1,4 \pm 0,2$ %, відповідно) (табл. 4.4).

Таблиця 4.4. Смертність дорослих тварин МП та їх потомства, дефект коконів [139].

Показники	Перша група			Друга група			Третя група		
	<i>Hirudo verbana</i>	<i>Hirudo medicinalis</i>	<i>Hirudo orientalis</i>	<i>Hirudo verbana</i>	<i>Hirudo medicinalis</i>	<i>Hirudo orientalis</i>	<i>Hirudo verbana</i>	<i>Hirudo medicinalis</i>	<i>Hirudo orientalis</i>
Смертність дорослих тварин, %	$1 \pm 0,3$	$1,6 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,2$	$4 \pm 0,2^*$	$6 \pm 0,5^*$	$5,5 \pm 0,4^*$	$1,6 \pm 0,3$	$2,3 \pm 0,4$	$1,9 \pm 0,3$

Продовження табл. 4.4

Середня кількість коконів на тварину, шт	9,5±1,5	5,1±0,9	7,2±0,8	5±0,7 *	3,5±0,5*	4±0,3 *	8,5±0,6	4,2±0,4	6,5±0,4
Не фертильні кокони, шт	1,9±0,3	2,1±0,2	2,1±0,1	3±0,2 *	4±0,3 *	3,6±0,2*	2,2±0,1	2,5±0,2	2,4±0,2
Дефектні кокони, шт	1,5±0,1	2,1±0,1	1,9±0,1	2,5±0,1*	2,9±0,1*	2,9±0,1*	1,7±0,2	2,2±0,1	2,0±0,1
Дефектний молодняк, %	0,9±0,2	1,8±0,3	1,2±0,2	10±0,9*	15±1,3*	12,6±1,4*	1±0,3	2,3±0,3	1,7±0,3
Загиблий молодняк, %	0,8±0,2	1,2±0,3	1,1±0,2	2,3±0,2*	3,6±0,4*	3,5±0,3*	1,2±0,3	1,4±0,3	1,2±0,2

* – $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою.

При аналізі другої групи порівняно з першою та третьою спостерігається підвищення смертності ($4 \pm 0,2$ %, $6 \pm 0,5$ %, $5,5 \pm 0,4$ % відповідно) [139]. Тварини гинули, а на їхніх тілах виднілися пояси плідності (рис. 4.7).





Рис. 4.7. Мертві медичні п'явки А, Б, В – *Hirudo verbana*; Г, Ґ – *Hirudo medicinalis* та Д, Е, Є – *Hirudo orientalis* з поясом плодючості (вказано стрілкою) [139].

Середня кількість отриманих коконів від однієї тварини статистично не відрізнялася в першій групі порівняно з третьою (табл. 4.4). Іншу картина спостерігається в другій групі, коли порівняно з іншими відбувалося значне зменшення кількості відкладених коконів. Слід зазначити, що кокони всіх груп не відрізнялися за розмірами та формами (рис. 4.8).

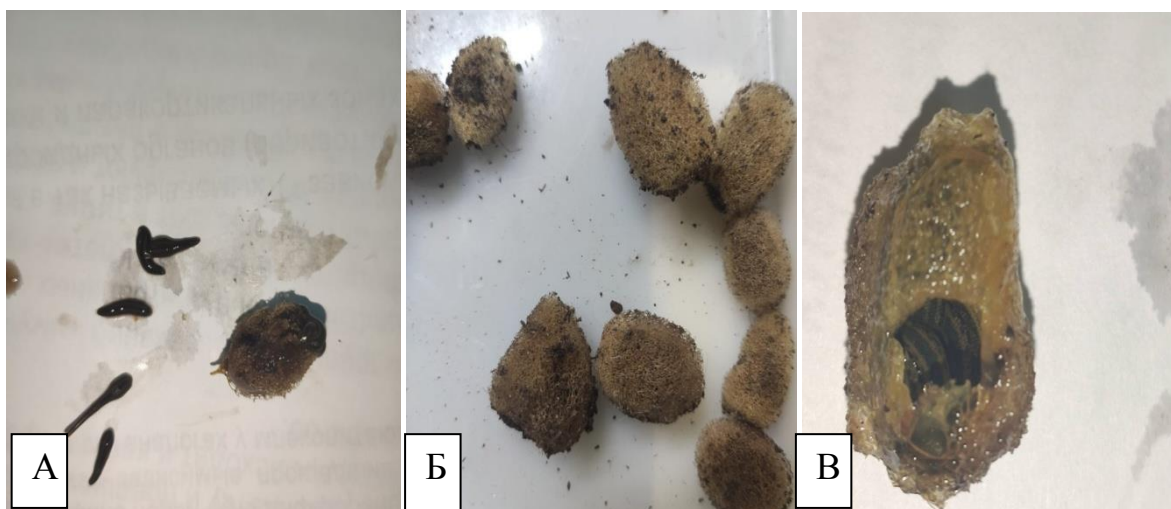


Рис. 4.8. Фізіологічно нормальні кокони (через 1 місяць): А - *Hirudo orientalis* Utevsky & Trontelj, 2005, Б - *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758 та В - *Hirudo verbana* Carena, 1820. [139]

Але в другій групі було більше не фертильних та дефектних коконів порівняно з іншими групами (табл. 4.4, рис. 4.9) [139].



Рис. 4.9. Дефектні кокони (через 1 місяць) наприкладі *Hirudo verbana* Carena, 1820 [139]

При аналізі молодняку також спостерігається значний відсоток дефектних незрілих МП, які в більшості гинуть до та після першого годування порівняно з іншими групами (табл. 4.4, рис. 4.10).



Рис. 4.10. Дефектні та мертві молоді п'явки (2-3 місяці, після першого та другого годування): *Hirudo orientalis* Utevsky & Trontelj, 2005, *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758 та *Hirudo verbana* Carena, 1820 [139].

У результаті дослідження відмічено, що тривалість відпочинку та своєчасна годівля тварин відіграє значну роль у їхній життєдіяльності та розмноженні. Аналізуючи смертність дорослих тварин, можна відмітити, що тварини другої групи є найбільш сприятливими порівняно з першою та третьою групами, де тварини мали час для відпочинку та харчування кров'ю свійської тварини. На це вказують дослідження попередніх підрозділів та експериментальні роботи інших науковців, у яких відмічено, що порушений фізіологічний стан тварин може дуже негативно позначитися на їхній життєдіяльності [20-25, 137-139]. Але згідно

дослідженням спостерігається не лише порушення їхнього фізіологічного стану, а й репродуктивної системи, що відображається на їхньому потомстві: зменшення середньої кількості коконів, їхні дефекти та отримання дефектного потомства. У першій та третій групах суттєвих відхилень не спостерігається, що може свідчити про нормалізацію фізіологічного стану тварини, яке зумовлено відпочинком та вчасною годівлею тварини. Використовуючи спосіб розведення тварин, як у першій так і третій групах, можна збільшити популяцію їхнього виду. Третій спосіб можна використовувати, якщо потрібно швидко збільшити поголів'я тварин, але часу для цього дуже мало. Загалом аналіз другої групи свідчить про погіршення загального стану тварини внаслідок виснаження тварини після першого розмноження. Повторно відправляти тварин на розведення без відпочинку та годування не рекомендується. Тому що це може стати причиною загибелі їх та їхнього потомства, або навіть отримання дефектних коконів без потомства.

Вплив часу та умов посадки на репродуктивні властивості *Hirudo verbana* та *Hirudo medicinalis*

У зв'язку зі значним зменшенням чисельності різних видів МП у природі [21, 166], все більше вчених у всьому світі шукають шляхи щодо підвищення їх виживаємості та розмноження в штучних (лабораторних) умовах, із збереженням абіотичних факторів: водного режиму, температури, світлового режиму, мінералізації, рН води, концентрації кисню у воді тощо [167]. Наприклад, в роботах учених було вказано, що в штучних умовах попередня ізоляція МП одна від одної та зміна води, підвищення температури також можуть посилити процес копуляції та виживання. Так, в природних умовах МП проявляють статеву активність саме в теплих водах. З біотичних факторів найбільшого значення має

щільність особин у акваріумах. Рекомендується замінювати воду 1 раз на 72 години, таким чином реєструється найнижча смертність МП [28, 29, 128].

У роботах кількох авторів встановлено оптимальні температурні умови для спаровування та відкладання коконів: +22–25°C та +24°C відповідно. При температурі нижче +15–16°C копуляції не реєструються. У дослідженнях встановлено, що оптимальним для нормальної життєдіяльності МП є слабокисле (рН 5,0–6,5) середовище. Вага МП може значно впливати на якість потомства [168, 169].

Слід зазначити, що спаровування відбувається у воді і може бути поперечним або одностороннім [24, 170-172] і фактори, які впливають на статеву поведінку та смертність МП не лише *in vivo*, але й у штучних умовах, залишаються в основному невивченими. Наприклад, не з'ясовано, що буде з МП, яких не відразу відправляють розмножуватися в торф'яно-грунтове середовище чи інші умови, які підтримуються після появи поясів плодючості. Тому метою дослідження даного підрозділу стало проаналізувати, як часові рамки та умови можуть вплинути на дорослих статевозрілих МП та їхніх нащадків [21].

Схема дослідження

Для дослідження було сформовано чотири експериментальні групи тварин: 1 контрольна група – МП виду *Hirudo verbana*, яких допустили до розмноження одразу після появи поясів плодючості; 2 дослідна група – МП виду *Hirudo verbana*, яких після появи поясів плодючості утримували у водному середовищі протягом місяця, а потім відправляли на розмноження; 3 контрольна група – МП виду *Hirudo medicinalis*, яких допустили до розмноження відразу після появи поясів плодючості; 4 дослідна група – МП виду *Hirudo medicinalis*, яких після появи поясів плодючості місяць утримували у водному середовищі, після чого відправляли на розмноження [21].

Спочатку МП поміщали в 4-літрові стерильні скляні пляшки з 2 л дехлорованою відстійною водою (4 тварини в кожную ємність) на 2–3 тижні для спаровування при температурі навколишнього середовища +22–24 °C. Тваринам контрольної та дослідної груп щодня змінювали водне середовище. Ця процедура

дозволяла уникнути негативного фактору забруднення метаболічними відходами МП, які на 4-й день можуть призвести до їх загибелі. МП утримували в кількості 4 особини на контейнер, що запобігало негативному впливу щільності, яка також може негативно вплинути та викликати хворобливий стан у МП або навіть їхню загибель.

Показники дослідної групи тварин порівнювали з показниками контрольної групи. Контрольною групою слугували МП, яких відразу відправляли на розмноження. Після появи поясів плодючості за дослідною групою спостерігали щоденно протягом місяця. Враховувалася смертність П із поясами плодючості перед посадкою на протязі одного місяця, а також їх виживаємість після посадки в торф'яно-грунтове середовище. Контрольні групи відправляли в торф'яно-грунтове середовище відразу на розмноження на 2–3 добу після появи поясів плодючості. Потомство аналізували після вилуплення із коконів [21].

Результати дослідження

Результати експериментального дослідження статевозрілих особин двох видів МП після копуляції та появи поясів плодючості на їхньому тілі, після трьох-чотирьох тижнів перебування у воді зареєстрували у них смертність в середньому у МП виду *Hirudo verbana* $15,6 \pm 2\%$ та виду *Hirudo medicinalis* $14,3 \pm 1,5\%$ порівняно з контрольною групою, де їх смертність становила $0,000091 \pm 0,0000002$ та $0,000085 \pm 0,00000015$, відповідно $p < 0,05$ (табл. 4.5, 4.6).

Таблиця 4.5. Загальна кількість тварин та смертність п'явок виду *Hirudo verbana* та виду *Hirudo medicinalis* [21].

Група тварин		Загальна кількість тварин під час статевого акту	Кількість тварин з поясами плодючості	Смертність тварин з поясами плодючості (кількість тварин)
1	<i>H. verbana</i>	140	110	0
2	<i>H. verbana</i>	140	115	18
3	<i>H. medicinalis</i>	60	52	1
4	<i>H. medicinalis</i>	60	49	7
Загальна кількість тварин		400	326	26

Таблиця 4.6. Виживаємість тварин після посадки на відкладання коконів [21].

Група тварин	% смертності п'явок з поясами плодючості у водному середовищі перед посадкою на розмноження		% смертності тварин після відкладання коконів	
	Контрольна група	Дослідна група	Контрольна група	Дослідна група
<i>H. verbena</i>	0,000091±0,0000002	15,6 ±2,1*	2,0±0,4	95,1±0,7*
<i>H. medicinalis</i>	0,000085±0,00000015	14,3±1,5*	1,5±0,2	93,2±0,9*

Примітка: * - $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою.

На тілі мертвих МП були відмічені величезні пояси плодючості, які буквально виступали вперед (рис. 4.11).



Рис. 4.11. Мертві п'явки з поясами плодючості. Білі стрілки позначають пояси плодючості: А, Б, В, Г. [21]

Після смерті на їхніх тілах не було ушкоджень та інших дефектів. Часткового канібалізму також не виявлено. Аналізуючи смертність статевозрілих МП під час розмноження в торф'яно-грунтовому середовищі в дослідній групі становила для виду *Hirudo verbana* $95,1 \pm 0,7$ % та для виду *Hirudo medicinalis*

$93,2 \pm 0,9 \%$ порівняно з контрольними групами $2,0 \pm 0,4 \%$ та $1,5 \pm 0,2 \%$ відповідно $p < 0,05$ (табл. 4.6) [21].

Також дослідна група тварин відкладала дефектні в більшості не фертильні кокони порівняно з контрольними групами (рис. 4.12).

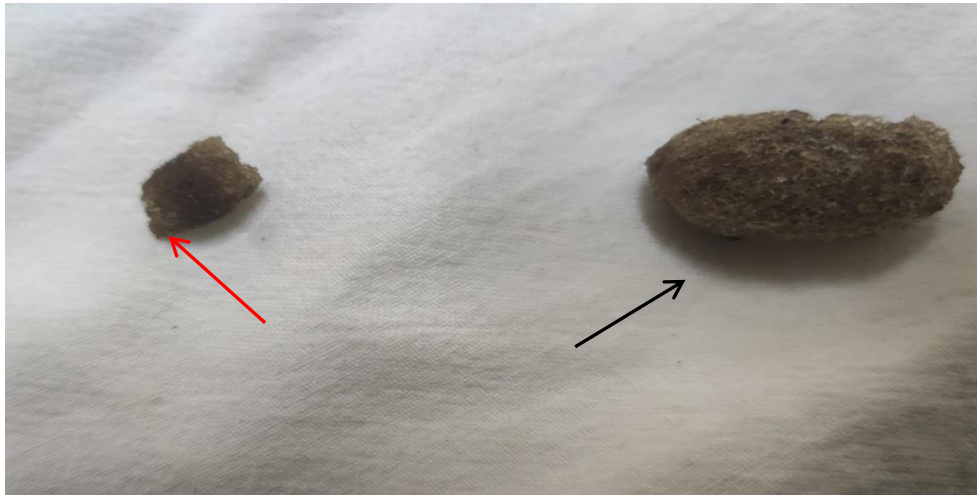


Рис. 4.12. Кокони медичної п'явки *Hirudo medicinalis*: червона лінія дослідної групи; чорна контрольна група [21].

Крім того, дослідна група тварин мала невелику кількість живого потомства, а ті, що вижили, були меншими подекуди з дефектами на тілі, у порівнянні з контрольними групами (рис. 4.13).

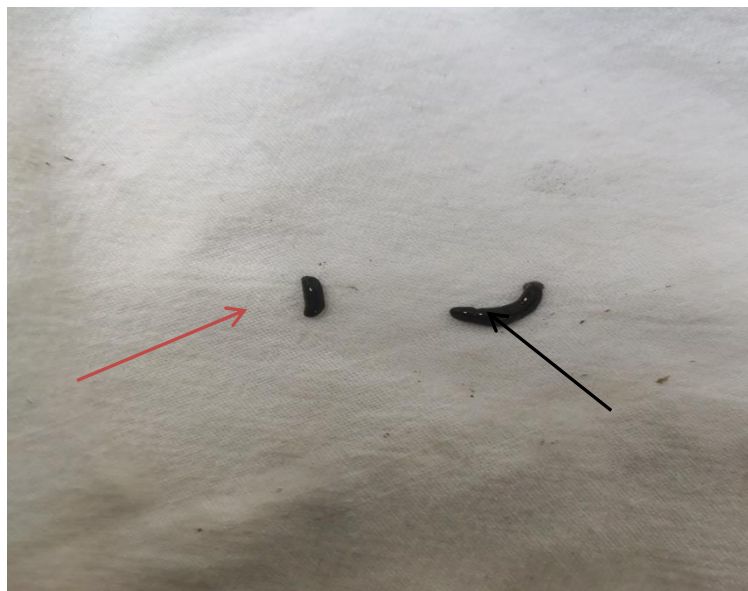


Рис. 4.13. Розміри потомства медичної п'явки: червоною лінією позначено вціліле потомство дослідної групи; чорна контрольна група [21].

У більшості випадків кокони піддослідної групи тварин були не фертильними із нагноєнням, а ті, що були фертильними, то потомство із них гинуло через одну-дві доби (рис. 4.14, 4.15) [21].

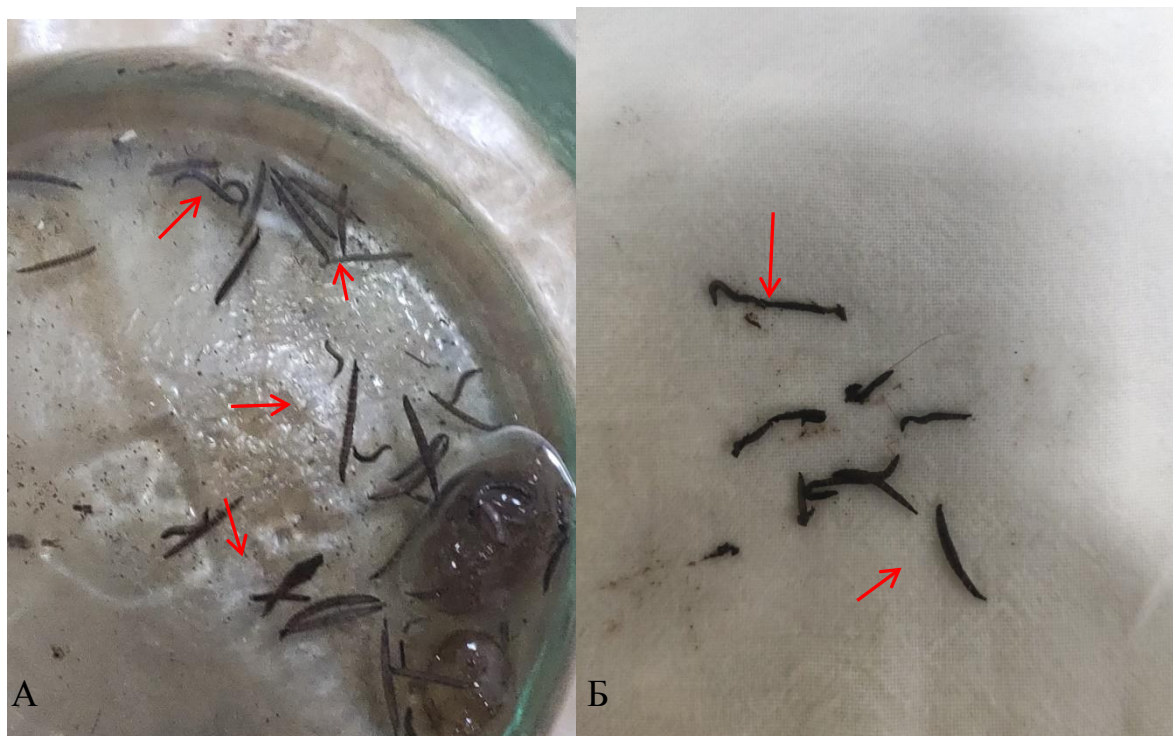


Рис. 4.14. Потомство дослідної групи А і Б: червоними стрілками позначені мертві п'явки дослідної групи [21].

На підставі отриманих результатів висунута попередня гіпотеза про те, що загибель МП з вираженими поясами плодючості може бути наслідком некротичної інтоксикації. У статевих шляхах МП можуть накопичуватися плідні статеві клітини з живильним матеріалом і супутніми структурами для розвитку кокона. Недорозвинений репродуктивний матеріал, ймовірно, через стадії апоптозу і подальшого некрозу, накопичується в статевих шляхах статевозрілих особин, викликаючи цим самим гостре запалення та інтоксикацію їхнього організму з подальшою гибеллю. Припускається, що обмежуючим фактором може служити киснево-повітряне середовище та навколишній субстрат, який дозволяє йому утворювати твердий кокон [21]. Слід також зазначити, що у деяких МП пояси плодючості могли зникати. Це може бути причиною того, що більшість П знищують ці сторонні частинки, або процес запліднення не був докінця завершеним.

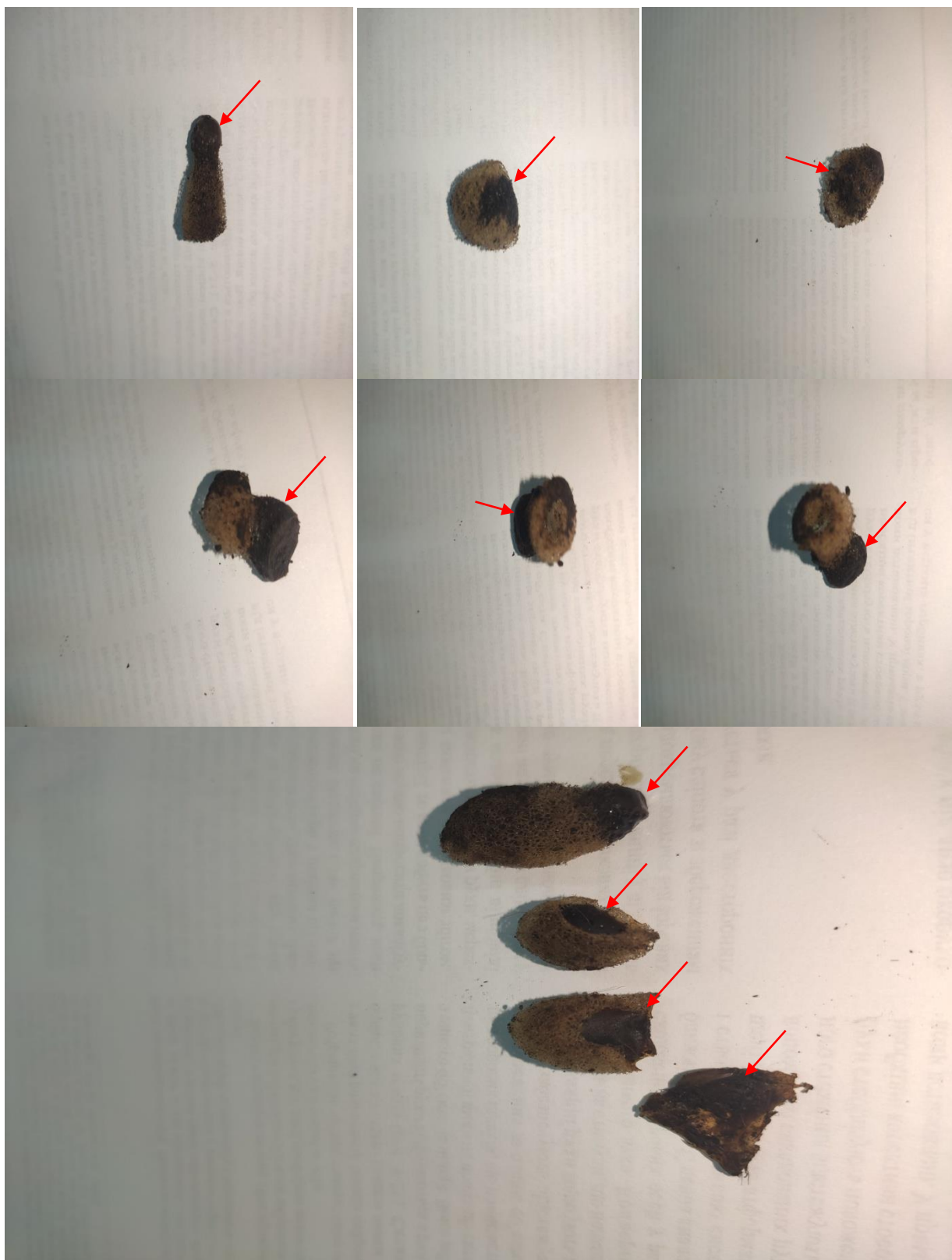


Рис. 4.15. Дефектні кокони МП. Червоними стрілками позначено місця дефекту.

Інші роботи дослідників відмітили, що певний відсоток МП не справляється зі спожитою кров'ю господаря і внаслідок цього також можуть гинути [173-176]. Але щоб підтвердити, що смертність пов'язана не лише з цим фактором, але й із часовими рамками та умовами посадки, було порівняння з

контрольною групою тварин, яких вчасно поміщали в торф'яно-грунтове середовище. У попередніх дослідженнях було показано, що МП з дефектом тіла можуть гинути при відкладенні коконів [20]. Внаслідок цього отримані дослідження також можуть бути виправдані, але тут також грає ще роль дефект тіла. За отриманими результатами можна зробити висновок, що після копуляції МП варто спостерігати за появою поясів плодючості і після їхньої появи необхідно якнайшвидше відокремити, та зробити їхню посадку для відкладання коконів, інакше (якщо їх залишити у водному середовищі) можлива їхня загибель [21]. Слід також зазначити, що у деяких П слабодиференційовані пояси плодючості могли зникати, і тоді П могли не гинути. У попередніх дослідженнях і за спостереженнями робіт інших авторів МП можуть проявляти частковий канібалізм [137-138], що може навіть призвести до їхньої смерті, але в поточному дослідженні не було виявлено жодних ознак канібалізму, які могли б бути фактором їхньої загибелі. Також слід зазначити, що щільність і водний фактор також не впливали на смертність тварин. По-перше, в дослідній і контрольній групах щодня змінювалося водне середовище, що унеможливлювало його токсичність. По-друге, в резервуарі було всього чотири тварини, що не дозволяло вплинути фактору щільності. Усі показники дослідної групи порівнювалися з контрольною групою, що відкидало повністю ці два негативні фактори. Також торф'яно-грунтове середовище для розміщення МП для відкладання коконів було однаковим, що виключало негативний вплив самого середовища. Усі показники дослідної групи порівнювалися з контрольною групою [21].

Підсумовуючи, результати даного підрозділу вказують на те, що в штучних умовах, якщо МП вчасно не відправити на розмноження для відкладання коконів (після появи поясів плодючості), то деякі МП можуть загинути, а при розведенні, то майже всі. Частина, що виживає, дає неповноцінні кокони і переважно в них мертве потомство. Отримані наукові результати цього підрозділу можуть зменшити процес вимирання МП при розведенні, що призведе до збільшення їх чисельності в популяції [21].

Вплив перетяжок на тілі медичної п'явки на їхню репродуктивну здатність

Нині екологічна ситуація на всій планеті загострилася. Тому, якщо раніше МП можна було зустріти в багатьох водоймах, то зараз вона все рідше зустрічається в дикій природі [20, 178]. І актуальним завданням усього світу є захистити МП від вимирання. Отже, оскільки ця жива істота є не тільки екологічним біоіндикатором, а й біологічною мікрофабрикою ряду БАР з лікувальними властивостями [6, 18, 26, 158, 179]. Тому зараз багато дослідників шукають різні способи та методи, які могли б захистити їх від вимирання та зберегти їхню популяцію [137, 138, 160, 161, 180].

У попередніх розділах роботи та наукових роботах інших авторів у МП було виявлено прояв канібалізму [137, 138, 160, 161, 180], який негативно впливав на їхню популяцію. Найбільше прояв канібалізму спостерігався, якщо годованих та не годованих П поміщали в одне й те саме середовище існування. Канібалізм сам по собі може бути однією з основних причин їхнього вимирання в дикій природі. Багато дослідників біофабрик шукають різні способи боротьби з багатьма проблемами, які можуть виникнути в штучних умовах їхнього існування, що може не тільки підвищити їхню продуктивність, але зберегти їх, як вид [22, 23, 25, 75, 181-183].

Дефект на їхньому тілі може негативно вплинути на їхню життєдіяльність, більш детально результати представлено в попередніх розділах. Поява перетяжок на тілі у МП може свідчити про імунологічний конфлікт між з'їденою людською кров'ю та тканинним мікрооточенням П, також вченими виявлено під час гістологічного дослідження наявність деструктивних патологічних процесів у ділянці цих перетяжок [175].

Вчені вважають, що лише близько половини МП, які раніше мали звуження на тілі, гинуть, а інша частина, ймовірно, може впоратися з імунологічною агресією спожитої крові через її зменшення в організмі під час регургітації [176].

Тому дослідження даного підрозділу спрямовані саме на визначення впливу перетяжок МП на їхнє подальше розмноження [20].

Схема дослідження

Після годування П маточного віку висаджували їх для спаровування по 6-8 шт. у трилітрову ємність з відстояною водою, при температурі навколишнього середовища + 23-25 °С. Після появи поясів плодючості у МП, висаджували їх у торф'яно-грунтове середовище на місяць.

Порівняння проводили з контрольною групою МП, які не мали на своєму тілі перетяжок, і виглядали умовно здоровими. Перетяжки у дослідної групи МП були різної інтенсивності, від незначних пошкоджень, аж до розриву їх тканин в цих місцях. Їхню готовність до розмноження підтверджувалася появою поясів плодючості, які свідчили про накопичення в їх організмі репродуктивних клітин (сперматозоїдів) і їхню готовність до розмноження. На прикладах їх проживання в дикій природі були створені штучні умови їхнього утримання [20], більш детально представлено в 1 розділі.

Результати дослідження

У П із поясами плодючості (рис. 4.16 – А) та перетяжками різної інтенсивності (рис. 4.16 – Б, В, Г) було виявлено, що даний дефект (перетяжки) негативно впливають на процеси репродукції, в результаті ці МП відкладали дуже малу кількість коконів (рис. 4.16 – Д, табл. 4.7). Даний дефект впливав не залежно від виду МП: *Hirudo verbana*, *Hirudo medicinalis* та *Hirudo orientalis* [20].

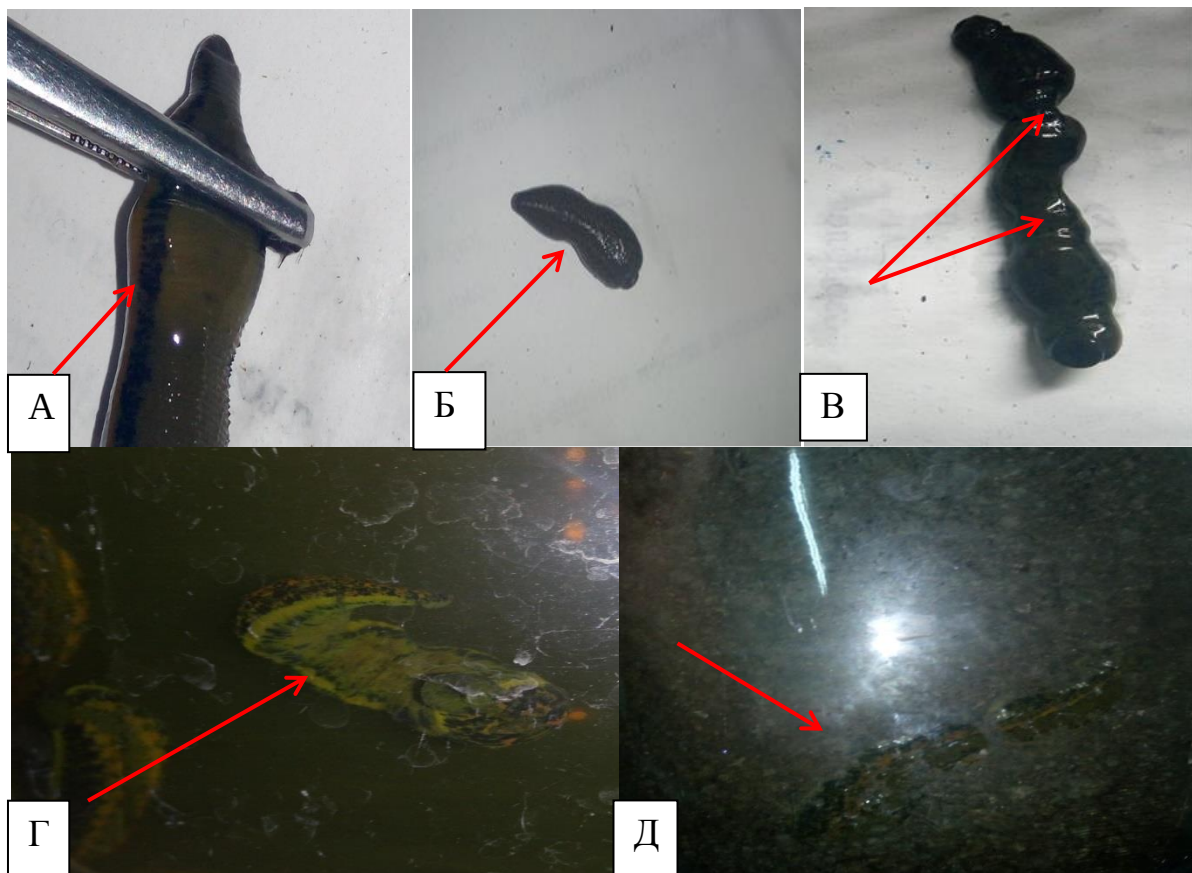


Рис. 4.16. Пояси плодючості – А, за перетяжками різної інтенсивності – Б, В, Г, Д.

Крім того, більшість п'явок загинуло без відкладання коконів у перший тиждень у трьох видах: *H. verbana*, *H. medicinalis*, *H. orientalis* [20].

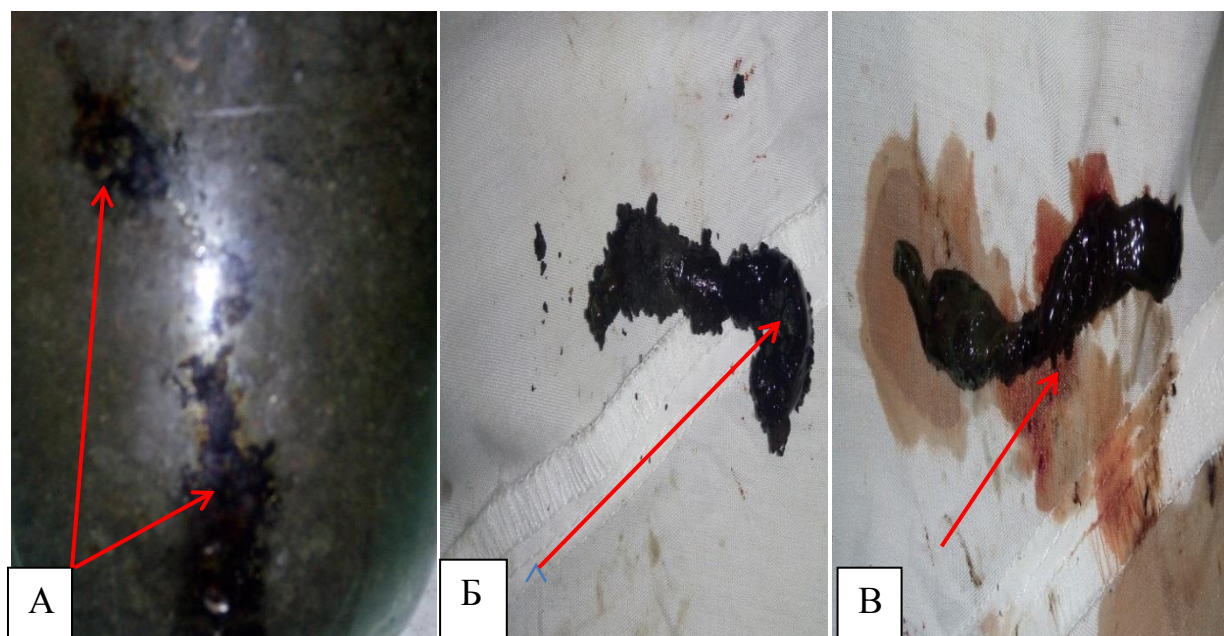


Рис. 4.17. Загибель медичної п'явки з перетяжками: А, Б, В. [20].

Спочатку вони випускали велику кількість з'їденої крові в землю, а потім гинули (рис. 4.17 – А, Б, В).

Отримані кокони були дефектними, під час вскривання коконів, потомства не було, а замість нього гниль у вигляді жижи рис. 4.18.

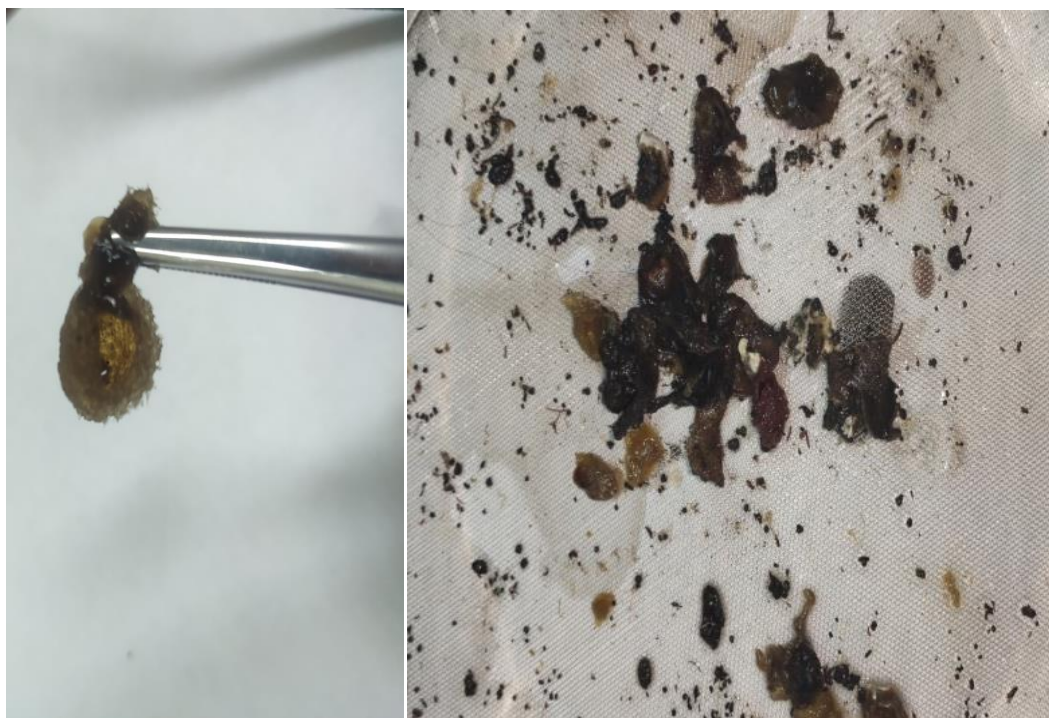


Рис. 4.18. Вскриті дефектні кокони з гниллю.

Отримані результати доводять, що поява перетяжок у МП суттєво впливає не лише на їхній загальний стан, але й на їхню репродуктивну здатність (табл. 4.7).

Таблиця 4.7. Середня кількість коконів, $X \pm Se[20]$.

Тварини	Кількість коконів, n=120	
	Контроль	Дослід (з перетяжками)
<i>H. verbana</i>	4,8±0,5	0,45±0,07*
<i>H. medicinalis</i>	3,7±0,4	0,41±0,04*
<i>H. orientalis</i>	2,6±0,4	0,30±0,05*

Примітка: * - $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою.

Як було сказано вище, під час гістологічного дослідження дослідники помітили наявність деструктивних патологічних процесів у ділянці цих звужень, а наші дослідження доводять, що в результаті цих патологій страждає саме їхня репродуктивна функція [175]. Відрижка з'їденою кров'ю в землю під час відкладання коконів у дослідженнях схожа з результатами інших дослідників, які вважають, що гине лише половина МП із перетяжками на тілі, а інша половина

може впоратися із імунологічною агресією з'їденої крові за рахунок її регургітації [176].

І це підтверджується спостереженнями даного дослідження, що ці звуження могли як з'являтися, так і зникати через деякий час у частини МП. Можливо, що це відбувається також завдяки регенераційній здатності наявних речовин в її організмі, які могли б сприяти загоєнню тканин самих же МП після отриманого дефекту. Ці звуження з'являються приблизно у 4-5% П, яких годують кров'ю людини і тварини.

Тому отримані результати досліджень цього підрозділу можуть бути використані для покращення розмноження МП в середовищі їхнього існування. Знаючи, що МП сьогодні все рідше з'являється в дикій природі, а їхні БАР мають багато терапевтичних ефектів. Цей фактор може сприяти збільшенню їх виробництва на біологічних фабриках.

Вплив «Coral-Mine» на життєздатність та розведення медичних п'явок:

Hirudo verbana* та *Hirudo orientalis

«Coral-Mine» – це продукт, який отримують із глибоководних коралів склерактиній і виробляється в Японії [140]. Скелет цього корала містить комплекс мінеральних солей, що і обумовлює його унікальність при впливі на живі організми. До його складу входять: кальцій, магній, калій, натрій, залізо, фосфор, сірка, кремній, хром, цинк, марганець та багато інших елементів [140]. Подрібнені корали не розчинні у воді, але під час взаємодії з нею здатні змінювати фізико-хімічні властивості води (збільшення Рн до лужної та електропровідність) [184, 185]. Ефективність застосування коралів у воді, в більшості стосується саме адсорбуванню токсичних продуктів. Їхнє масивне використання також може і нашкодити живому організму [140, 186]. Оскільки не всі живі організми швидко адаптуються до змін фізико-хімічного складу води.

Наприклад, МП, які дуже чутливі до будь-яким коливанням у навколишньому середовищі [187, 188]. МП, як говорилося раніше це ектопаразитарні тварини, яких широко використовують у ветеринарії та медицині [9, 11,12,16, 128, 140, 148, 189]. Оскільки в їхньому організмі знаходиться більше 100 БАР, які володіють широким спектром терапевтичних ефектів [140]. В наш час, ці цілющі тварини зникають із дикої природи, із-за впливу різних негативних факторів, один із яких - це забруднені водойми та ґрунт різними ксенобіотичними речовинами [128, 187, 188]. Наприклад, наявність у воді інсектицидів: дихлордифенілтрихлорметилметану, хлордану, дінексу [140]; пестицидів, нітратів та фосфорних добрив [190]; цинку, міді, паладію та кадмію [41, 191-193], які сприяють зміні поведінкових реакцій та зростанню смертності [41, 191-193]. Тому МП у більшості країнах світу віднесені до Червоної книги, як чутливий вид, а їх утримання та розведення, зараз в більшості проводиться у штучних умовах на біофабриках та біофермах. Де суворо дотримуються умови їхнього утримання (підтримання температурного, кисневого, світлового та вологого режиму) [128]. Також, слід відмітити, що заміна водного середовища де утримуються МП потребує кожні 3-4 доби [128, 148]. Оскільки, якщо не дотримуватися завчасній заміні водного середовища МП, то починає зростати їхня смертність [128, 148]. У більшості на біофабриках та біофермах для утримання та розведення МП, використовують відстояну проточну воду [128, 148], яка також може мати різний фізико-хімічний склад та впливати порізно на життєздатність МП. Тому перед ученими, біофабриками та біофермами постають завдання, щодо отримання нормального водного середовища для утримання та розведення МП. Згідно властивостям «Coral-Mine», щодо покращення якості води, стало актуально дослідити, чи зможе цей продукт покращити якість водного середовища утримання та сприяти нормальній життєздатності МП. Тому метою роботи дослідження даного підрозділу стало вивчення тривалого впливу «Coral-Mine» на життєздатність та подальшу репродуктивну здатність МП [140].

Схема дослідження

У дослідженнях використовували, пакетований кораловий порошок «Coral-Mine», Виробник: Japan.

Проводилися 2 серії дослідів: 1 – з постійним знаходженням порошку «Coral-Mine» у водному середовищі з МП, кожні 3-4 доби відбувалася заміна води та порошку; 2 – знаходження МП у водному середовищі після годинної очистки його порошком «Coral-Mine» зі зміною води кожні 3-4 доби. Один пакетик порошку «Coral-Mine» (вага 10 г) у обох серіях дослідів поміщали в 3 літрову ємність із відстояною проточною водою. МП утримували у кількості 4 особини на одну 3 літрову ємність.

Тварин обох груп порівнювали з контрольними групами, МП які знаходилися у проточній відстояній воді, яка змінювалася кожні 3-4 доби. За тваринами спостерігали впродовж 2 років. Усі групи знаходилися в однакових оптимальних умовах більш детально представлено в 1 розділі роботи. У тварин на протязі цього часу фіксували смертність, поведінкові реакції, репродуктивну здатність (появу поясів плодючості, процес копуляції, відкладання коконів, фертильність і дефекти коконів та нитчаток) [140].

Результати дослідження

У обох серіях дослідів порівняно з контрольними групами тварин зареєстрована інтенсивна смертність статевозрілих дорослих МП ($p \leq 0,05$), через 1-2 місяці після знаходження у водному середовищі порошку «Coral-Mine». Особливо у першій серії досліду, де дана речовина знаходилася разом із тваринами (в середньому у виду МП *Hirudo verbana* смертність зросла у 6 разів та у виду *Hirudo orientalis* у 3 рази $p \leq 0,05$) табл. 4.8. У другій серії дослідів гибель тварин спостерігалася у меншій мірі (в середньому у виду *Hirudo verbana* та виду *Hirudo orientalis* збільшено в 3 рази $p \leq 0,05$) [140].

Форми тіла МП, які загинули в перші тижні досліду в більшості були без видимих дефектів табл. 4.8, але через півроку у виживших МП з'являлися дефекти тіла у вигляді перетяжок: у першій серії досліду в середньому у виду *Hirudo verbana* та виду *Hirudo orientalis* збільшено появу перетяжок у 6 разів у

порівнянні з контрольними групами $p \leq 0,05$. У другій серії досліду появу перетяжок збільшено у середньому у виду *Hirudo verbana* та виду *Hirudo orientalis* в 4 рази ($p \leq 0,05$) табл. 4.8 [140]. Слід відмітити, що виживші МП відкладали більшість коконів не фертильні та з дефектами. У першій серії дослідів відкладання не фертильних коконів у середньому у виду *Hirudo verbana* та виду *Hirudo orientalis* збільшено в 8 разів $p \leq 0,05$. У другій серії дослідів в середньому у виду *Hirudo verbana* та виду *Hirudo orientalis* збільшено в 5 разів у порівнянні з контрольними групами ($p \leq 0,05$) табл. 4.8 [140].

Фертильні кокони, які мали все-таки нитчаток МП, частина з них гинула після першого годування кров'ю свійських тварин табл. 4.9. В середньому смертність зросла у виду *Hirudo verbana* та виду *Hirudo orientalis* у 2 рази в порівнянні з контрольною групою ($p \leq 0,05$) табл. 4.9 [140].

Таблиця 4.8. Статевозрілі особини (матки) медичних п'явок *Hirudo verbana* та *Hirudo orientalis* за 2 роки, % [140].

Показники	Вид					
	<i>Hirudo verbana</i>			<i>Hirudo orientalis.</i>		
	Контроль	Дослід перший	Дослід другий	Контроль	Дослід перший	Дослід другий
Смертність	8,1 (7,9; 8,3)	45,2 (43,4; 46,6)*	27,1 (25,0; 28,4)*	9,4 (8,1; 10,4)	49,4 (47,1; 50,2)*	30,1 (28,7; 31,0)*
Дефект на тілі (перетяжки)	4,2 (3,3; 5,1)	26,3 (24,7; 28,2)*	15,4 (14,9; 16,0)	4,6 (3,3; 5,9)	27,2 (26,2; 28,6)*	16,2 (15,1; 17,1)*
Інтенсивне випльовування з'їденої крові	6,2 (5,0; 7,4)	15,1 (13,9; 16,3)*	9,4 (8,3; 10,6)*	6,5 (5,1; 7,7)	10,1 (9,0; 11,6)*	8,6 (7,5; 9,7)*
Не фертильні та дефектні кокони	4,7 (3,2; 5,9)	37,4 (36,0; 39,1)*	20,4 (19,1; 21,5)*	5,6 (4,4; 6,8)	40,1 (39,0; 41,5)*	29,4 (28,2; 31,0)*

Примітка: * – показники, що достовірно відрізняються від контролю ($p \leq 0,05$).

У більшості нитчаток МП після першого та наступних годувань з'являлися дефекти на тілі у вигляді перетяжок табл. 4.9. У першій серії дослідів у середньому ці дефекти зросли у виду *Hirudo verbana* та виду *Hirudo orientalis* в 4 рази у порівнянні з контрольною ($p \leq 0,05$). У другій серії дослідів у середньому зросли у виду *Hirudo verbana* та виду *Hirudo orientalis* в 2 рази у порівнянні з контрольною групою ($p \leq 0,05$) табл. 4.9 [140].

Також, слід відмітити, що після годування більшість МП інтенсивно виділяли з'їдену кров. Статевозрілі матки, які знаходилися у водному середовищі з порошком «Coral-Mine» тільки через 1,5 роки почали давати більше фертильного потомства, але дефект тіла та смертність залишилися [140].

Таблиця 4.9. Нитчатки медичних п'явок *Hirudo verbana* та *Hirudo orientalis*, % [140].

Показники	Вид					
	<i>Hirudo verbana</i>			<i>Hirudo orientalis</i>		
	Контроль	Дослід перший	Дослід другий	Контроль	Дослід перший	Дослід другий
Смертність	10,1 (9,5; 11,6)	25,4 (24,0; 26,7)*	20,1 (19,0; 21,5)*	11,2 (9,6; 12,4)	22,4 (21,1; 23,6)*	17,2 (16,5; 18,7)*
Дефект на тілі (перетяжки)	8,6 (7,2; 9,4)	33,4 (31,8; 34,6)*	18,4 (17,0; 19,5)*	9,2 (8,1; 10,4)	35,1 (33,9; 37,0)*	20,1 (19,0; 21,4)*
Інтенсивне випльовування з'їденої крові	7,6 (6,4; 8,8)	28,6 (27,2; 30,0)*	19,7 (18,6; 20,8)*	8,4 (7,2; 9,6)	25,7 (24,3; 27,1)*	21,0 (19,1; 22,3)*

Примітка: * – показники, що достовірно відрізняються від контролю ($p \leq 0,05$).

«Coral-Mine» містить широкий комплекс мінеральних солей, а до його складу також входять кальцій, магній, калій, натрій, залізо, фосфор, сірка, кремній, хром, цинк, марганець та багато інших елементів [186]. Відомо, що звичайна вода з порошком коралового кальцію змінює кислотно-лужний баланс у бік збільшення лужності: рН води збільшується до 9 залежно від концентрації розчину [186]. Окисно-відновний потенціал води зміщується в бік негативних

показників, що є оптимальним показником для міжклітинних рідин, тканин організму тварин та людей [140]. Порошок коралу є достатньо потужним сорбентом. Доведено його позитивний вплив на ріст і розвиток кукурудзи та квасолі [186]. Хоча він виявляє широкий спектр позитивних ефектів, але він може і нашкодити тваринам, особливо тим які дуже чутливі до будь-яких коливань навколишнього середовища. Наприклад, МП які дуже чутливі на різні зміни навколишнього середовища [140, 187, 188]. Petrauskiene L. у своїх дослідженнях виявила зміну поведінкових реакцій МП (порушення рухливості, харчової активності, форми тіла, спроби вирватися із середовища) на забруднену воду важкими метали (цинк та мідь) та іншими токсикантами [187, 188], більш детально в 1 розділі. Seylan M зі співавторами у МП виявили інтенсивне виділення слизу, неконтрольоване плавання, спроби вирватися з дослідного середовища, зниження сили прикріплення, скручування, значне виділення з'їденої крові, деформації тіла на отримані різні концентрації цинку [41], більш детально представлено у 1 розділі. У роботах Juliantara I.K.P. зі співавторами була доведена значна смертність МП у водоймах із наявними миючими засадами [194]. Згідно, отриманих експериментальних даних досліджень вищезгаданих учених можна пояснити прояв токсичності і «Coral-Mine» на МП у досліді даного підрозділу. Де у статевозрілих МП спостерігаються дефекти тіла у вигляді перетяжок, інтенсивне виділення з'їденої крові, зростання смертності [140]. Крім цього, слід також відмітити, що у МП спостерігається ще погіршення репродуктивної здатності, що відображається у відкладанні не фертильних коконів та отримання нитчаток із дефектами [140]. Можливо, що «Coral-Mine» викликає у МП збільшення дефектів тіла у вигляді перетяжок на тілі та інтенсивніше випльовування з'їденої крові після кожного годування, за рахунок порушень їхньої загальної імунної системи, яка не в змозі впоратися із імунними клітинами хазяїна. Даний феномен у МП було відмічено у попередніх розділах та роботах інших вчених [176].

Згідно отриманих даних цього підрозділу «Coral-Mine» у водному середовищі проявляє значну токсичність щодо МП.

Розділ 5. ТОКСИЧНІСТЬ МЕДИЧНИХ П'ЯВОК

Визначення гострої токсичності у щурів після дії комплексу речовин, отриманих з п'явки медичної *Hirudo verbana* Carena, 1820

В останнє десятиліття інтенсивно зростає відсоток інфекційних і неінфекційних захворювань, що сприяє пошуку і створенню різноманітних нових лікарських засобів синтетичного і природного походження [141]. Вивчення гострої токсичності є обов'язковим етапом дослідження нових лікарських речовин, що дозволяє оцінити небезпеку речовин для здоров'я за умов короткочасної дії та визначити клас токсичності та широту терапевтичної дії. Слід зазначити, що зараз пріоритет надається вивченню природних речовин, отриманих з бактерій, грибів, рослин, тварин і людини. Оскільки, природні речовини практично не мають протипоказань і побічних ефектів від використання [19, 195-198]. До них також відносяться і БАР МП, які виявляють значну кількість терапевтичних ефектів [5, 6, 18, 158, 199-201]. Важливим з яких є здатність регулювати гемостаз і судинний тонус, виявляти протизапальну, регенеративну, нейротропну, бактеріостатичну та імуномодулюючу дію [5, 7, 106, 127, 201-203]. Їх почали використовувати у ветеринарії, сільському господарстві та медицині для профілактики та лікування багатьох захворювань [9, 13-15]. Нещодавно було виявлено позитивний вплив на нейтралізацію ракових клітин і *Mycobacterium tuberculosis*, відновлення після Covid-19 [17, 204, 205]. Більш детально представлено в попередніх розділах роботи. Згідно з представленими дослідженнями вчених і попередніми дослідженнями, МП та їх БАР при застосуванні викликають широкий спектр терапевтичних ефектів і гіпотетично не викликають токсичних ефектів. Метою дослідження цього розділу було перевірити цю гіпотезу, перевірити наявність гострої токсичності у щурів після введення максимальних концентрацій двома методами:

внутрішньочеревинно та внутрішньошлунково водно-сольового екстракту, отриманого з МП [141].

Схема дослідю

За розробленою та апробованою нами методикою отримано водно-сольовий екстракт з тіл 40 МП виду аптечних (*Hirudo verbana* Carena, 1820) віком 7-8 місяців, вирощених на базі лабораторії клітинної та організменної біотехнології Запорізького національного університету [141]. Вивчення гострої токсичності водно-сольового екстракту проводили на 80 лабораторних нелінійних білих статевозрілих щурах віком 7 місяців середньою масою $260 \pm 14,7$ г. Використання 2 офіційно стандартизованих методів введення, з метою тестування нових речовин на гостру токсичність: внутрішньочеревинно та внутрішньошлунково [128, 206]. Для дослідження використовували тварин, які пройшли карантинний режим і не мали ніяких зовнішніх проявів захворювань [141].

1. Внутрішньочеревинне введення. Тваринам одноразово внутрішньочеревинно вводили 1 мл водно-сольового екстракту МП у максимальній дозі 3500 мг/кг (VI клас токсичності, $LD_{50} > 3000$ мг/кг) згідно з методичними рекомендаціями.

2. Внутрішньошлункове введення. Тваринам вводили внутрішньошлунково 2 мл водно-сольового екстракту МП у максимальній дозі 5500 мг/кг (V клас токсичності, $LD_{50} > 5000$ мг/кг) згідно з методичними рекомендаціями. За тваринами спостерігали 14 днів. Для порівняння використовували контрольні групи тварин, яким тими ж методами вводився фізіологічний розчин в однаковому об'ємі [141]. Протягом цього часу спостерігали за загальним станом тварин усіх груп: реакцією на звукові та світлові подразники, станом шкіри та шерсті, наявністю судом і крововиливів на шкірі, руховою активністю та апетитом, що дає первинну загальну характеристику токсичності препарату [207, 208]. Тварин виводили з експерименту шляхом зміщення шийних хребців з наступною декапітацією. Дослідження проводили в один і той же час доби. Визначали смертність тварин; вагу: тіла, лімфоїдних органів (тимусу і селезінки),

придатка яєчка; загальний стан: стан шкіри та шерсті, реакцію на звукові подразники, наявність судом і крововиливів, рухову активність, зовнішні зміни внутрішніх органів; гематологічні показники крові (загальну кількість еритроцитів, загальну кількість лейкоцитів, лейкоцитарну формулу крові), імунологічні (фагоцитарну та метаболічну активність нейтрофілів); репродуктивну функцію (фертильність, кількість і дефекти сперматозоїдів), морфологію тимуса та селезінки [128, 141].

Результати дослідження

При аналізі загального стану дослідних груп тварин він не відрізнявся від контрольних груп: усі тварини майже однаково реагували на звукові та світлові подразники, мали задовільний апетит, стан шкіри та шерсті був у межах фізіологічної норми, судом та крововиливів не спостерігалось, рухова активність у дослідних групах була дещо підвищена порівняно з контрольною групою (табл. 5.1) [141].

Таблиця 5.1. Показники загального стану тварини [141].

Показники	Внутрішньочеревне введення		Внутрішньошлункове введення	
	Контрольна група (n=20)	Дослідна група (n=20)	Контрольна група (n=20)	Дослідна група (n=20)
Реакція на світлові та звукові подразники	присутня	присутня	присутня	присутня
Апетит	задовільний	задовільний	задовільний	задовільний
Стан шкіри	без дефектів	без дефектів	без дефектів	без дефектів
Шерсть	гладка, без ознак облісіння	гладка, без ознак облісіння	гладка, без ознак облісіння	гладка, без ознак облісіння
Винекнення судом	немає	немає	немає	немає
Шкіра	пошкоджень та крововиливів немає	пошкоджень та крововиливів немає	пошкоджень та крововиливів немає	пошкоджень та крововиливів немає
Рухова активність	задовільна	задовільна	задовільна	задовільна

Таблиця 5.2. Показники фізичного розвитку, гематологічні та імунологічні показники крові, репродуктивна здатність: $X \pm SE$ [141].

Показники	Внутрішньочеревне введення		Внутрішньошлункове введення	
	Контрольна група (n=20)	Дослідна група (n=20)	Контрольна група (n=20)	Дослідна група (n=20)
Смертність, %	-	-	-	-
Вага тіла, г	263.3±13.2	295.4±12.1*	257.3±14.1	280.1±12.1
Вага епідеміуса, мг	520.2±21.1	655.3±17.7*	490.5±16.3	610.3±15.7*
Вага тимуса, мг	220.4±12.1	263.1±13.2*	235.1±10.1	276.2±13.2*
Вага селезінки, мг	871.2±11.1	965.2±9.0*	853.4±10.3	933.4±12.1*
Гематологічні показники				
Загальне число еритроцитів $\times 10^{12}/L$	6.5±0.4	8.8±0.3*	5.7±0.2	7.9±0.4*
Загальне число лейкоцитів $\times 10^9/L$	7.2±0.3	9.8±0.4*	6.8±0.1	9.2±0.3*
Імунологічні показники				
Фагоцитарний індекс, %	55.22±1.30	77.22±1.21*	48.30±2.10	66.20±1.70*
Фагоцитарне число	3.32±0.03	3.65±0.06*	3.45±0.01	3.58±0.03*
Нітро-синій тетразолний тест, %	35.12±1.60	62.11±1.30*	39.20±0.90	58.40±1.20*
Репродуктивна функція				
Фертильність сперматозоїдів в 1 мкл 5 мл суспензії еякуляту	450±15	1100±36*	510±13	995±22*
Загальна кількість сперматозоїдів в 1 мкл 5 мл суспензії еякуляту.	6510±246	8885±345*	5920±129	9100±201*
Дефектні сперматозоїди на 200 клітин, %	38.0±3.1	19.1±2.0*	41.2±2.9	21.4±1.3*

Примітка: * – показники, що достовірно відрізняються від контролю ($p \leq 0,05$).

Візуальне обстеження внутрішніх органів при обох способах введення водно-сольового екстракту не виявило змін порівняно з контрольними групами. Загибель тварин була відсутня в усіх групах (табл. 5.1) [141], вага тіла в дослідних групах зросла в середньому на 11,0 % порівняно з контрольною групою в межах фізіологічної норми (табл. 5.2). При аналізі гематологічних показників крові зареєстровано достовірне збільшення еритроцитів на 35,0 % при внутрішньочеревинному введенні та на 38,6 % при внутрішньошлунковому введенні порівняно з контрольними групами (табл. 5.2). Те ж саме спостерігається при аналізі загальної кількості лейкоцитів у дослідних групах, збільшення порівняно з контролем на 36,1 % і 35,3 % відповідно (табл. 5.2) [141].

Таблиця 5.3. Зміни лімфоїдних фолікулів селезінки щурів-самців під впливом *Hirudo verbana*: $X \pm SE$ [141].

Показники	Внутрішньочеревне введення		Внутрішньошлункове введення	
	Контрольна група (n=20)	Дослідна група (n=20)	Контрольна група (n=20)	Дослідна група (n=20)
Площа лімфоїдного фолікула, мкм ²	15650.1±1157.1	18845±1022.1*	14995.3±1011.3	19042±996.3*
Діаметр лімфоїдного фолікула, мкм	133.6±6.7	155.1±9.3*	138.2±4.4	149.3±5.2*
Кількість лімфоцитів у лімфоїдному фолікулі на 400 мкм ²	16.09±0.48	18.91±0.57*	15.11±0.46	19.66±0.51*
Площа лімфоїдного фолікула центральної артерії в мкм ²	822.2±57.1	986.3±61.6*	844.1±49.2	998.1±56.3*

Примітка: * – показники, що достовірно відрізняються від контролю ($p \leq 0,05$).

Слід зазначити, що лейкоцитарна формула крові залишається статистично незмінною у всіх групах. При аналізі ФАН в дослідних групах ФІ збільшується на 30,8% і 37,0% відповідно в контрольних групах (табл. 5.2). Подібні результати по відношенню до експериментальних груп спостерігаються при аналізі метаболічної активності, яка в середньому збільшується на 38 %. Значно підвищується репродуктивна здатність: фертильність сперматозоїдів дослідних груп зростає майже в 2 рази, дефекти зменшуються в 2 рази, а також значно збільшується їх загальна кількість в середньому на 29 % порівняно з контрольними групами (табл. 5.2). При морфологічному дослідженні в тимусі та селезінці клітинний склад у межах фізіологічної норми, дефектів гістоструктури лімфоїдних органів немає, клітини нормальної форми (рис. 5.1, 5.2).

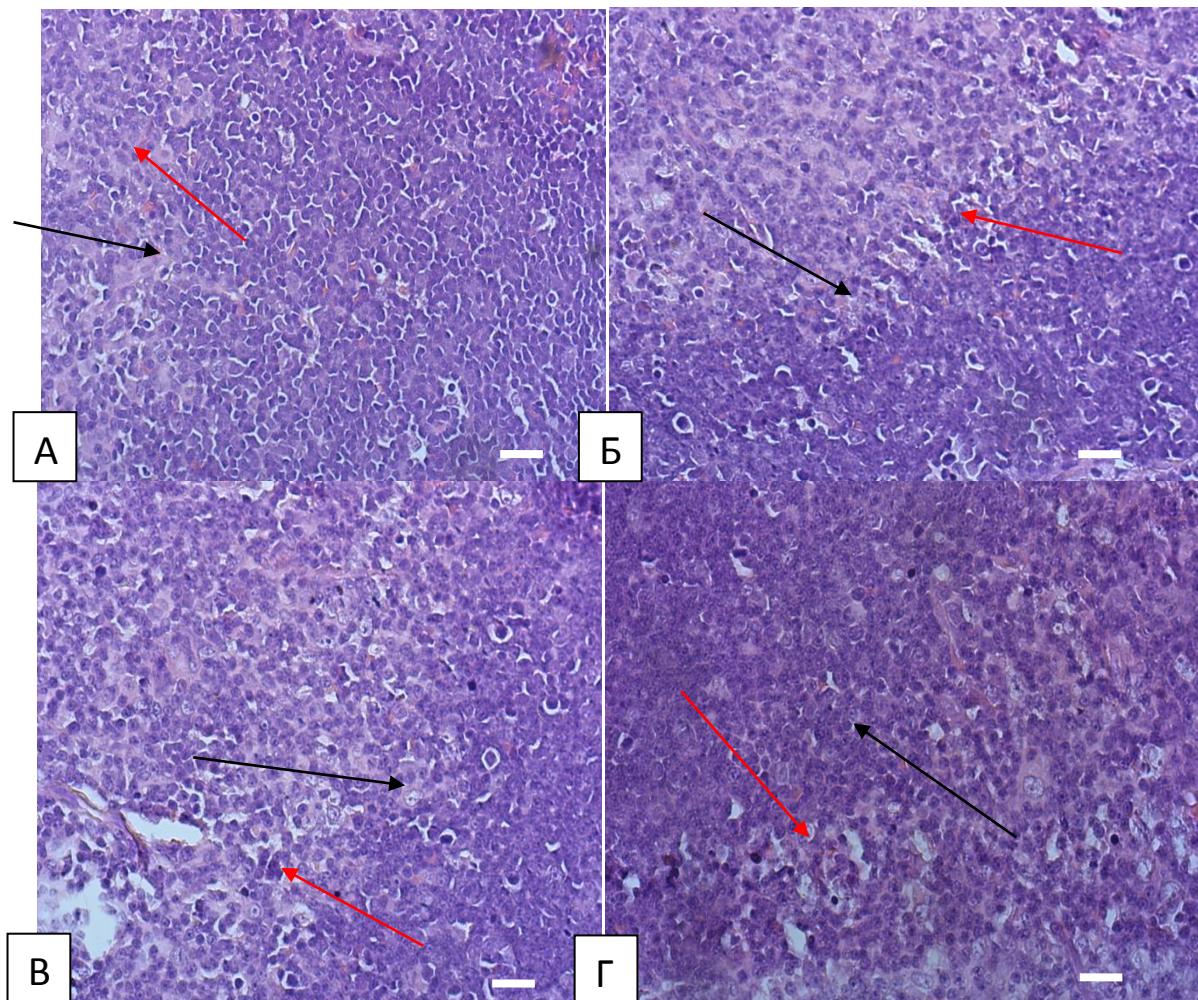


Рис. 5.1. Тимус: А – контроль і Б – дослід з внутрішньочеревинним введенням; В – контроль і Г – дослід із внутрішньошлунковим введенням. Червона стрілка вказує на мозкову речовину, чорна – на кору. Забарвлення: гематоксилін і еозин. Масштабні шкали: 20 мкм [141].

У результаті дослідження кількості лімфоцитів на одиницю площі (400 мкм²) білої пульпи селезінки зареєстровано збільшення лімфоцитів в обох дослідних групах порівняно з контрольними групами тварин ($P < 0,05$; табл. 5.3, рис. 5.2). А також спостерігалось збільшення інших параметрів лімфоїдного фолікула дослідних груп порівняно з контрольними, а саме його площі та діаметра ($P < 0,05$; табл. 5.3, рис. 5.2). При дослідженні центральних артерій у лімфоїдних фолікулах дослідних груп їх діаметр і товщина збільшувалися (табл. 5.3). При аналізі морфологічної будови центрального лімфоїдного органу – тимуса щурів зареєстровано збільшення кількості лімфоїдних клітин на одиницю площі (400 мкм²) ($P < 0,05$) у корі та мозковій речовині дослідних груп порівняно з контролем (табл. 5.4, рис. 5.1) [141].

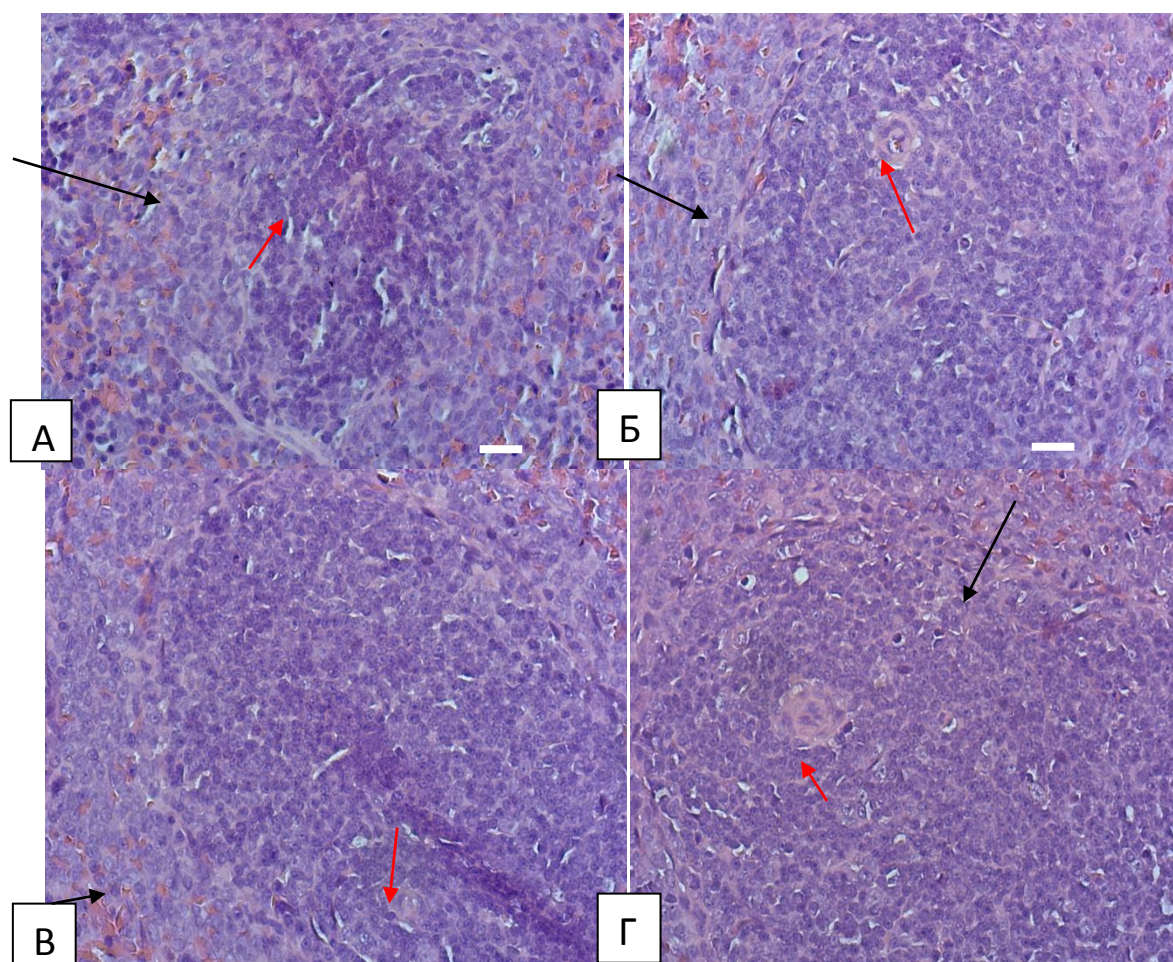


Рис. 5.2. Селезінка, біла пульпа: А – контроль і Б – експеримент із внутрішньочеревинною ін'єкцією; В – контроль і Г – дослід із внутрішньошлунковим введенням. Червоною стрілкою позначено центральну артерію лімфоїдного фолікула, чорною – лімфоїдний фолікул. Забарвлення: гематоксилін і еозин. Масштабні шкали: 20 мкм [141].

Згідно з отриманими результатами, при обох способах введення водно-сольового екстракту, де використовувалися загальноприйняті максимальні концентрації, токсичних ефектів не спостерігалось порівняно з контрольними групами (табл. 5.1-5.4, рис. 5.1, 5.2).

При аналізі загального стану дослідних груп тварин: реакції на звуки, шкірно-шерстяний покрив у межах норми; рухова активність дещо підвищена, судом і крововиливів на шкірі немає, зовнішні внутрішні органи візуально без видимих дефектів, що нейтралізує токсичну дію водно-сольового екстракту, отриманого з МП (табл. 5.1) [141].

Таблиця 5.4. Зміни кількості лімфоцитів у кірковій та мозковій речовинах тимуса щурів-самців під впливом *Hirudo verbana*: $X \pm SE$, [141].

Показники	Внутрішньочеревне введення		Внутрішньошлункове введення	
	Контрольна група (n=20)	Дослідна група (n=20)	Контрольна група (n=20)	Дослідна група (n=20)
Кількість лімфоцитів у корковій речовині тимуса на 400 мкм ²	15.36±0.22	18.25±0.27*	14.96±0.30	19.01±0.22*
Кількість лімфоцитів у мозковій речовині тимуса на 400 мкм ²	8.07±0.62	13.11±0.44*	9.42±0.35	12.44±0.39*

Примітка: * – показники, що достовірно відрізняються від контролю ($p \leq 0,05$).

При морфометричному дослідженні у тварин спостерігається збільшення ваги тіла, основних лімфоїдних органів (вилочкової залози та селезінки) (табл. 5.2). Підвищуються гематологічні та імунологічні показники крові, репродуктивна функція (табл. 5.2). Отримані результати свідчать про прояв сильного морфогенетичного та імуномодуючого ефекту від застосування МП, що відзначалося також у роботах інших вчених та наших попередніх роботах

[9, 106, 127, 128]. Збільшення ваги тіла та органів також може бути проявом посилення проліферації клітин в органах і самій крові, що також відзначалося в наших попередніх результатах та результатах інших вчених [9, 128]. Наприклад, після дії комплексу БАР МП збільшується загальна кількість еритроцитів і лейкоцитів без видимих змін лейкоцитарної формули крові; збільшується загальна кількість сперматозоїдів, збільшується кількість лімфоцитів у головних лімфоїдних органах: тимусі та селезінці, а також підвищується функціональна активність клітин: фагоцитарна та метаболічна активність нейтрофілів, підвищується фертильність сперматозоїдів [9, 106, 127, 128]. Ці припущення також підтверджуються нашими результатами, отриманими в цьому експерименті при морфологічному аналізі тимуса і селезінки. При цьому спостерігаємо достовірне збільшення кількості лімфоцитів дослідних груп у лімфоїдному фолікулі селезінки, у корі та мозковій речовині тимуса порівняно з контрольними групами (табл. 5.3, 5.4). Це відображає відомий імуностимулюючий ефект речовин МП. Згідно з представленими результатами досліджень цього підрозділу, водно-сольовий екстракт, отриманий з тіла МП, відноситься до групи речовин, які практично не мають токсичної дії, і здатний спричиняти імуномодулюючий ефект у межах фізіологічних норм [141].

Вплив водно-сольового екстракту медичної п'явки виду *Hirudo verbana*

Carena, 1820 на загальний перебіг ембріогенезу у щурів після

внутрішньоочеревинного введення

Збільшення в останнє десятиліття кількості інфекційних і неінфекційних захворювань, особливо у новонароджених тварин і людей, які більш схильні до їхнього впливу, спонукає вчених шукати різні методи і способи боротьби з цими недугами [1]. Застосовуються різні методи лікування: дієтотерапія, вітамінотерапія, хіміотерапія, фізіотерапія, фармакотерапія, рефлексотерапія, бальнео- та кліматотерапія, мануальна та променева терапія, фітотерапія.

Створюються нові синтетичні ліки, отримують різноманітні природні речовини з бактерій, грибів, рослин і тварин [128].

Сьогодні перевага віддається натуральним речовинам, які практично не мають побічних ефектів і протипоказань [1]. До них належать і речовини, які отримують з МП, які мають широкий спектр терапевтичних ефектів [2, 3, 13, 128]. Ці речовини показали ефективність у профілактиці та лікуванні значної кількості захворювань у тварин і людей [2, 9-12, 205]. Наприклад, у ветеринарії та сільському господарстві [1]: для лікування маститів, судинних захворювань, діабетичної нефропатії, загоєння ран, гематом, запалень, лихоманки, атаксії, артритів, міозитів, екзем, абсцесів, невритів, остеоартритів та інших [2, 3, 9, 13, 128]. У медичній практиці: при лейоміомах шкіри, псоріазі, серцевій недостатності, гіпертонічній хворобі, інфекційному міокардиті, стенокардії, глаукомі, гострій сенсоневральній приглухуватості, гострих і хронічних захворюваннях середнього і внутрішнього вуха, радикулопатіях, артритах, остеохондрозі, артрозах, цереброваскулярних захворюваннях, ендометріозі, міомі матки, хронічних запаленнях придатків, нефриті, діабетичній стопі, цукровому діабеті, при лікуванні тромбофлебиту, фурункулів, стоматиту, пульпіту та багатьох інших [10, 11, 13-15, 128]. Є докази їх позитивного ефекту при лікуванні раку, туберкульозу та Covid-19 [17, 128, 205]. Наприклад, ССЗ продемонстрував виражену бактерицидну активність щодо всіх досліджуваних штамів *M. tuberculosis* на рівні 50%. Оскільки ССЗ багатий на олеїнову кислоту (33,9%) і пальмітиновою кислотою (22,6%), а ці дві сполуки мають протитуберкульозну дію. Сеанси ГТ сприяють відновленню легень та частоти дихання у пацієнтів зрілого та старечого віку після перенесеної коронавірусної хвороби ускладненою хронічним бронхітом та бронхіальною астмою [128]. Серед вчених ведеться багато суперечок про ефективність вищевказаних речовин у ветеринарії та медицині, оскільки попередні доклінічні дослідження є необхідною умовою для використання нових терапевтичних засобів [1]. Особливо це стосується їх вживання вагітними жінками та дітьми. Таким чином, вивчення ембріотоксичної

та тератогенної дії речовин є важливою умовою їх практичного використання [142-144, 209, 210], більш детально застосування описано в 1 розділі роботи.

Тому метою даної роботи цього підрозділу було дослідити вплив водно-сольового екстракту МП *Hirudo verbana* Carena, 1820 на загальний перебіг ембріогенезу у щурів при внутрішньочеревинному введенні [1].

Схема дослідження

Тварин розділили на чотири групи, 15 особин у кожній. Перші дві групи були контрольними, яким вводили внутрішньочеревинно фізіологічний розчин об'ємом 0,5 мл тричі перед спаровуванням і тричі під час вагітності кожні три дні. Інші дві групи були дослідними, їм вводили внутрішньочеревно 0,5 мл водно-сольового екстракту МП в концентрації (5 мкг/г тварини) тричі перед спаруванням і тричі під час вагітності, кожні три дні. Обрана концентрація речовини була попередньо експериментально перевірена *in vitro* в наших попередніх дослідженнях і була обрана як нетоксична терапевтична концентрація [128]. На підготовчому етапі проводили дослідження естрального циклу самиць методом вагінальних мазків, що дало змогу визначити тривалість циклу та окремих фаз, наявність усіх фаз циклу та ритмічність їх чергування у кожної самиці. Виявлено самиць із стабільним ритмом естрального циклу проєструсу та стадії тічки було злучено з інтактними самцями за схемою 3:1. Визначення першого дня вагітності у самиць визначали за наявністю сперматозоїдів у вагінальних мазках. Вагітних самиць щурів утримували в окремих клітках і забезпечували необхідною підстилкою для гніздування [1].

З першого дня вагітності за тваринами спостерігали: стежили за загальним станом і поведінкою; реєстрували динаміку зміни ваги тіла, термін вагітності, перебіг пологів. Паралельно спостерігали за контрольними групами тварин [1]. У подальшому одну з груп як контрольних, так і дослідних самиць щурів умертвляли під легким ефірним наркозом шляхом вивиху шийних хребців на 20-й день вагітності (15 тварин у кожній групі). У цих самиць щурів розсікали черевну порожнину і роги матки; аналізували кількість жовтих тіл вагітності, кількість живих і мертвих плодів [142-144].

Ембріотоксичну дію досліджуваних речовин оцінювали за такими показниками [142-144]:

1. Загальна ембріональна смертність (ТЕС):

$$ТЕМ = \frac{В - А \times 100}{Б},$$

де А - кількість живих плодів, В - кількість жовтих тіл вагітності.

2. Передімплантаційна смертність (РІМ):

$$РІМ = \frac{В - (А + С) \times 100}{Б},$$

де А – кількість живих плодів,

Б - кількість загиблих плодів,

С - кількість жовтих тіл вагітності.

3. Постімплантаційна смертність (PostІМ):

$$\text{ostIMP} = \frac{В \times 100}{А + В},$$

де А – кількість живих плодів,

Б - кількість загиблих плодів.

У плодів проводили морфометричне дослідження параметрів тіла, наявність гематом на шкірі, каліцтв, зовнішніх аномалій розвитку внутрішніх органів.

Дві інші групи контрольних і дослідних самиць щурів (15 тварин у кожній групі) утримували до народження потомства. Після народження щуренят у самиць обох груп визначали вагу тіла, оцінювали загальний стан, реєстрували термін вагітності та загальну кількість живих і мертвих новонароджених. З обох груп щуренят аналізували всіх новонароджених щуренят у перший (рис.5.3) і 15-й день (рис. 5.4) (130 щуренят з кожної групи). Визначали вагу тіла та довжину щуренят, реєстрували смертність від початку народження до 15-ї доби, наявність гематом на шкірі, каліцтв, зовнішніх аномалій розвитку внутрішніх органів. Тератогенну дію речовини реєстрували візуально у кожної тварини [1].

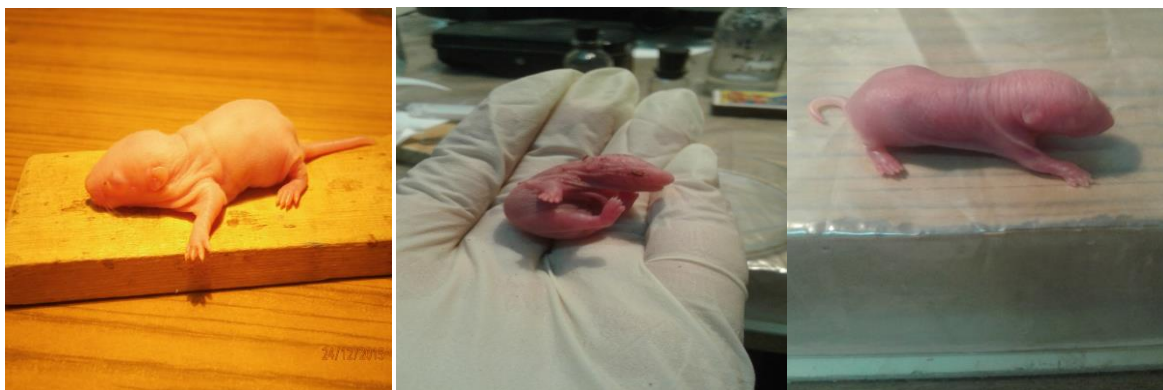


Рис. 5.3. Новонароджений щур перша доба.



Рис. 5.4. Щур віком 15 діб.

Результати дослідження

В експерименті всі самиці вижили після введення екстракту, були активними та добре споживали їжу та воду. Загальний стан і поведінка експериментальної групи не відрізнялися від контрольної групи. Випадків абортів в жодній із груп тварин не зареєстровано [1]. Відзначено більш виражений приріст ваги тіла самиць дослідної групи на 20 добу вагітності на $30,2 \pm 3,2$ г порівняно з контрольною групою на $18,2 \pm 2,4$ г ($p < 0,05$). Збільшення ваги тіла може бути зумовлене стимуляцією морфогенетичної функції імунної системи під дією БАР МП [128, 189]. Подібні дані отримані й іншими авторами на свійських тваринах і домашніх тваринах під ГВ [1, 9, 26, 119, 189]. Так, у кіз після курсів гірудологічних приріст у молоці, збільшення ваги тіла, без ускладнень маститом, а в репродуктивному періоді відзначалося 100 % запліднення, а також народження двійнят з підвищеною вагою порівняно з контрольною групою тварин [128, 189]. У щурів після непрямого ГВ відмічено збільшення ваги та

довжини тіла, зниження відсотка мертвонароджених, підвищення гематологічних та імунологічних показників крові [128].

Після розтину самиць на 20-ту добу вагітності в обох групах кількість жовтих тіл вагітності, кількість живих і мертвих плодів статистично не відрізнялися (табл. 5.5) [1]. Усі органи самиць обох груп мали нормальну топографію та розмір.

Таблиця 5.5. Вплив водно-сольового екстракту п'явки медичної на ембріогенез ($X \pm SE$) [1].

Показники	Група тварин	
	Контроль	Експеримент
Кількість вагітних самок	15	15
Кількість плодів на одну самку	$8 \pm 1,07$	$8 \pm 0,7$
Загальна кількість досліджених плодів	120	120
Кількість жовтих тіл вагітності	$10,1 \pm 0,59$	$10,6 \pm 0,45$
Кількість загиблих плодів	$0,16 \pm 0,07$	$0,12 \pm 0,09$
Кількість живих плодів	$9,42 \pm 0,51$	$9,94 \pm 0,36$
Вага плода, мг	$2590,11 \pm 1,81$	$2596,30 \pm 1,65^*$
Довжина плоду, мм	$35,52 \pm 0,33$	$37,01 \pm 0,23^*$
Наявність підшкірних гематом	$0,40 \pm 0,04$	$0,20 \pm 0,09^*$
Кількість плодів з аномаліями, каліцтвами	відсутні	відсутні

Примітка: * - $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою.

Аналіз ваги та довжини ембріонів обох груп не виявив затримки у внутрішньоутробного розвитку. В дослідній групі ці показники вищі, що може бути наслідком позитивного ГВ ($p < 0,05$) (табл. 5.5). При зовнішньому огляді в обох групах аномалій розвитку не виявлено. Положення, форма кінцівок і кількість пальців у дослідних і контрольних ембріонів були в межах норми. Ознак порушення пігментації шкіри не виявлено [1]. Слід зазначити, що кількість підшкірних гематом в дослідній групі порівняно з контрольною була меншою в середньому на 50 % ($p < 0,05$). Це може бути проявом добре відомого кровоспинного ефекту МП [9, 10]. Наприклад, після сеансів ГВ у домашніх і свійських тварин швидко зникали шкірні гематоми і відновлювався фізіологічний

стан [8, 9, 26, 211]. Наші результати щодо зменшення шкірних гематом у плода після ГВ збігаються з результатами інших дослідників. Також зарубіжними та українськими вченими виявлено багато інших терапевтичних гірудологічних ефектів у тварин, без токсичних побічних ефектів [9, 119, 189]. Наприклад, МП широко застосовуються при лікуванні артритів і остеоартрозів, післяопераційних ран, екзем, атаксії, невритів, дисплазій, міозитів, маститів, тендинітів, розтягнень зв'язок [9, 119, 189]. Показники вагітних самиць дослідних груп відповідали аналогічним показникам контрольних груп (табл. 5.5). Усі органи обох груп були нормальної топографії та розмірів [1].

Аналізуючи показники загальної ембріотоксичної смертності, доімплантаційної смертності та постімплантаційної смертності, вони були достовірно нижчими в дослідній групі порівняно з контрольною (табл. 5.6) [1].

Таблиця 5.6. Динаміка показників ембріонального розвитку, ($X \pm SE$) [1].

Параметри	Група тварин	
	Контроль	Експеримент
Загальна ембріональна смертність, %	6,73±0,02	6,23±0,02*
Передімплантаційна смертність, %	5,15±0,02	3,11±0,02*
Постімплантаційна смертність, %	1,67±0,01	1,17±0,01*

Примітка: * - $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою.

Отримані експериментальні дані цього підрозділу свідчать про відсутність ембріотоксичної дії, що підтверджено й іншими авторами щодо речовин МП [142-144, 209, 210]. Слід також зазначити, що вага тіла та довжина тварин дослідної групи збільшувалися в межах фізіологічної норми для цього віку ($p < 0,05$).

Підвищення морфометричних показників тіла може бути проявом відомої стимулюючої морфогенетичної дії речовин МП, яка відзначалася іншими авторами та в наших попередніх експериментах на ранніх етапах постембріонального онтогенезу [9, 119, 128, 189]. Наступним етапом дослідження був аналіз потомства на ранніх етапах постнатального онтогенезу: новонароджених та на 15 добу щодо відсутності вад розвитку. Так як, в більшості

випадків, негативна дія речовин може проявитися при народженні. Результати представлені в табл. 5.7 [1].

Таблиця 5.7. Показники щурів у період раннього постнатального розвитку під дією водно-сольового екстракту медичної п'явки, ($X \pm SE$) [1].

Параметри	Група тварин	
	Контроль	Експеримент
Термін вагітності самиць, днів	22±2	23±2
Вага тіла нелінійних білих самиць щурів, г	219,10±10.6	262,23±13,2*
Кількість вагітних самиць	15	15
Кількість народжених щурів на одну самицю	9.5±1.1	10.6±1.3
Постнатальна смертність, %	0.94±0.01	0.32±0.005*
Вага тіла при народженні, г	6.23 ±0.17	6.74 ±0.20*
Довжина тіла при народженні, см	4.91 ± 0.16	5.16±0.14
Вага тіла на 15 добу, г	21.12 ± 0.34	24.68±0.42*
Довжина тіла на 15 добу, см	7.99 ± 0.29	8.26±0.19
Наявність підшкірних гематом	0.14±0.03	0.11±0.02
Кількість щурів з аномаліями, каліцтвами	відсутні	відсутні

Примітка: * - $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою.

Встановлено, що терміни пологів у обох групах були однаковими. Кількість потомства статистично не відрізнялася. Слід зазначити, що в дослідних групах спостерігали збільшення ваги та довжини тіла як у новонароджених, так і у 15-денних щурів порівняно з контрольними групами (табл. 5.7 ($p < 0,05$)). Збільшення ваги тіла в ранньому постембріональному онтогенезі після гірудологічного впливу спостерігалось в наших попередніх роботах та результатах інших авторів [3, 9, 13, 128], як морфогенетичний ефект речовин лікарського засобу. При зовнішньому огляді в обох групах аномалій розвитку не виявлено. Усі органи тварин обох груп мали нормальну топографію та розмір. Слід зазначити, що в даному підрозділі вперше експериментально досліджено вплив водно-сольового екстракту МП при внутрішньочеревинному введенні терапевтичної концентрації (5 мкг/г тварини) на загальний перебіг ембріогенезу у щурів, при цьому токсичної дії не виявлено. Це говорить про майбутні перспективи застосування досліджуваних речовин вагітним тваринам для лікування та профілактики багатьох захворювань після ретельного доклінічного дослідження [1].

РОЗДІЛ 6. МОЖЛИВЕ ВИЯВЛЕННЯ РОЗЛАДІВ ФІЗІОЛОГІЧНОГО СТАНУ ЗА ДОПОМОГОЮ МЕДИЧНИХ П'ЯВОК *HIRUDO VERBANA* CARENA, 1820

Зростання різноманітних патологічних станів у світі призвело не лише до інтенсивного пошуку різноманітних методів їх лікування. А також щоб знайти методи їх швидкої діагностики. Тому що велика кількість захворювань може спричинити незворотні зміни в організмі або навіть смерть. Згідно з результатами інших вчених і нашими попередніми дослідженнями, МП можуть гинути, на їх тілі після вживання крові людини з'являються різні звуження у вигляді перетяжок на тілі [128, 212], виявляються зміни різних гематологічних та імунологічних показників крові господаря [6, 7, 20, 21, 128], але до цього ніхто не звертав уваги на МП і з'їдену ними кров з боку експрес-діагностики поза організмом господаря. Тому актуальністю та метою даного дослідження цього розділу стало вивчення стану МП та аналіз з'їденої ними крові господаря із метою розробки швидкої експрес-діагностики для виявлення будь-яких порушень фізіологічного стану господаря.

Схема дослідження

Було проведено два дослідження. Першим експериментом було дослідження МП, яких одноразово годували кров'ю статевозрілої людини (чотири П від кожної людини). Контрольна група, які харчувалися кров'ю умовно здорової людини, які не зверталися до лікаря, загальний стан нормальний, загальні показники крові в нормі (перша група, контроль). Дослідна група, які харчувалися кров'ю хворих людей (діагноз підтверджено в лікарні) під час прояву різних захворювань: варикозного розширення вен, артрозу та остеохондрозу, стенокардії, розладів шлунково-кишкового тракту, початкових стадій простатиту та ін. Другий експеримент: перша група МП (чотири П від кожної тварини), які годували кров'ю умовно здорових нелінійних лабораторних щурів: всі гематологічні та імунологічні показники крові відповідали

фізіологічним нормам даного віку. Друга група МП, які харчувалися кров'ю хворих тварин: виразковий дерматит, нагноєння ран різних частин тіла, опіки, захворювання органів дихання, абсцеси та ін. [213].

Брали МП, які харчувалися не більше доби кров'ю людини або тварини (умовно здорової та з патологією). Згідно з відомими фактами, з'їдена П кров протягом цього часу не змінює свого фізіологічного складу. Протягом трьох тижнів спостерігався за їхнім загальним станом: гибелю (зі зміненою формою тіла і без змін), появою перетяжок на їхньому тілі, інтенсивним відхаркуванням з'їденою кров'ю господаря. Слід зазначити, що загибель відзначалася у більшості МП в перші дні після годування. За допомогою пінцета кров господаря була охайно вичавлена з їхнього тіла в стерильну пробірку. Вивчали гематологічні та імунологічні показники з'їденої крові з додаванням 2% розчину гепарину («Спофа»). Порівнювали показники крові умовно здорових і хворих [213].

Результати дослідження

В результаті досліджень у першому досліді (кров людини) в патологічних умовах спостерігаємо підвищену загибель МП, появу перетяжок на їхньому тілі, а інтенсивність випльовування з'їденої крові більше ніж у 2 рази перевищує табл. 6.1 та рис. 6.1. При аналізі гематологічних та імунологічних показників крові вони не відповідають фізіологічним нормам даного віку. Загальна кількість еритроцитів зросла на $30,8 \pm 2,9\%$, лейкоцитів на $35,6 \pm 3,1\%$, порівняно з контрольною групою. У лейкоцитарній формулі крові хворих зміни, що свідчать про прояв патологічного стану в організмі: відсоток лімфоцитів збільшився на $32,9 \pm 2,9\%$, відсоток сегментоядерних нейтрофілів знизився на $45,4 \pm 4,3\%$, відсоток паличкоядерних нейтрофілів збільшився більш ніж у 3,5 рази, відсоток моноцитів збільшився у 2 рази. У другому досліді (кров тварин) спостерігаємо аналогічну картину. Тварини не приймали ніяких ліків, заради чистоти експерименту. При аналізі МП у другому досліді на патологію спостерігаємо збільшення загибелі П майже в 4 рази, появу перетяжок у 3 рази, інтенсивність кровохаркання більш ніж у 2 рази, табл. 6.1.

Таблиця 6.1. Загальний стан медичних п'явок, еритроцитів, кількості лейкоцитів і лейкоцитарної формули з'їденої крові людини і тварин, $X \pm SE$

Групи тварин		Медичні п'явки (n=160)			З'їдена кров людини (n=20) і тварин (n=20)						
		Смертність, %	Перетяжки на тілі, %	Інтенсивне крововиділення %	Еритроцити/л ($\times 10^{12}$)	Лейкоцити ($\times 10^9$)	Лімфоцити %	Паличкоядерні нейтрофіли, %	Сегментоядерні нейтрофіли, %	Еозинофіли, %	Моноцити, %
Перша серія експерименту	Умовно здорові	2,1 $\pm$ 0,3	1,5 $\pm$ 0,2	3,1 $\pm$ 0,1	4,5 $\pm$ 0,4	6,5 $\pm$ 0,5	23,5 $\pm$ 1,2	4,3 $\pm$ 0,3	67,2 $\pm$ 3,1	2,0 $\pm$ 0,5	3,0 $\pm$ 0,3
	Хворі	5,1 $\pm$ 0,4*	3,2 $\pm$ 0,4*	7,2 $\pm$ 0,2*	6,5 $\pm$ 0,3*	10,1 $\pm$ 1,1*	35,0 $\pm$ 3,5*	15,2 $\pm$ 1,6*	30,5 $\pm$ 2,1*	3,1 $\pm$ 0,6	6,1 $\pm$ 0,5*
Друга серія експерименту	Умовно здорові	1,5 $\pm$ 0,3	1,4 $\pm$ 0,1	2,8 $\pm$ 0,3*	5,5 $\pm$ 0,3	10,5 $\pm$ 0,9	57,8 $\pm$ 1,9	0,7 $\pm$ 0,02	25,0 $\pm$ 1,4	2,5 $\pm$ 0,3	3,5 $\pm$ 0,5
	Хворі	5,7 $\pm$ 0,2*	4,5 $\pm$ 0,4*	6,6 $\pm$ 0,2*	7,0 $\pm$ 0,4*	16,2 $\pm$ 1,3*	35,0 $\pm$ 2,1*	8,0 $\pm$ 0,4	33,2 $\pm$ 1,2	5,1 $\pm$ 0,8*	2,5 $\pm$ 0,5

Примітка: * - $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою.

При видаленні з'їденої крові хворих тварин зі шлунка МП спостерігаємо збільшення гематологічних та імунних клітин порівняно з умовно здоровими. Загальна кількість еритроцитів збільшується на 21,4 $\pm$ 2,9%, а лейкоцитів на 35,2 $\pm$ 3,2%. У лейкоцитарній формулі крові: зниження відсотка лімфоцитів на 60,5 $\pm$ 4,5%, збільшення сегментоядерних нейтрофілів на 25,0 $\pm$ 2,1%, збільшення відсотка еозинофілів у 2 рази, збільшення паличкоядерних нейтрофілів більш ніж в 11 разів, що може свідчити про різні патологічні стани в організмі.



Рис. 6.1. Інтенсивне виділення зїденої крові господаря МП.

Відомо, що при більшості захворювань МП більше ставлять локально на уражені ділянки [153, 214-233], а при різних локальних патологічних станах у цих ділянках організму накопичується загальна кількість імунних клітин, які намагаються впоратися та відновити нормальний фізіологічний стан. Тому можливо, що МП з'їдали набагато більшу кількість імунних клітин, в результаті чого їх імунна система не справлялася з імунною системою крові господаря і П гинули, що ми спостерігаємо в отриманих результатах дослідження. Оскільки ці тварини під час споживання крові намагаються поглинути більше клітинного складу крові, ніж рідкого, це більш імовірно. Також поява перетяжок на їхньому тілі може бути пов'язана саме зі збоєм їхньої імунної системи, подібні результати отримали й інші вчені [212]. По-друге, в деяких випадках смертність МП може бути пов'язана з токсичністю речовин, які людина могла приймати раніше. Наприклад, ліки або якісь наркотичні засоби, смертельні для П. Тому для відкидання цього негативного фактору був проведений другий експеримент. У якому досліджували кров нелінійних лабораторних білих щурів, які не приймали ніяких речовин, на предмет чистоти отриманих експериментальних результатів. Слід зазначити, що відсоток загибелі МП також підвищувався при годуванні

кров'ю хворих тварин. Це підтверджує нашу гіпотезу, отриману в першому експерименті. Щодо збільшення імунних клітин в зоні патології та неспроможності імунної системи ектопаразита впоратися з імунною системою господаря. Також, слід зазначити, що не правильність постановок, не дотримання санітарно-епідемічних норм може спровокувати різні негативні побічні ефекти [128, 234-247], але МП та отримані з їхнього тіла БАР на цей час все рівно широко використовують у ветеринарії та медицині, оскільки більшість її речовин не мають аналогів. Більш детально представлено та описано в 1 розділі роботи. Також слід відмітити, що МП з різними харчовими звичками використовують хеморецептори для сприйняття зовнішніх хімічних сигналів під час пошуку їжі, і існують значні відмінності між видами в поведінці пошуку їжі, хеморецепторах [248]. Тому повторна активність на спожиту вже кров може, бути в результаті запам'ятовування спожитої їжі і її компонентів.

В результаті дослідження спостерігаємо, що МП, харчуючись кров'ю хворих тварин і людей, починають гинути в більшості випадків з деформованим тілом, на їхньому тілі з'являються перетяжки, вони починають інтенсивніше харкати кров'ю. Згідно з отриманими даними цього розділу, МП і їх кров, з'їдена господарем, можуть бути використані в якості експрес-діагностики на ранніх стадіях розвитку різних патологій запального характеру. При будь-яких змінах досліджуваних показників варто звернутися в лікарню для більш детальної діагностики.

ВИСНОВКИ

1. У негодованих МП виду *Hirudo verbena*, проявляється канібалізм до годованих П в перші дні після споживання крові. Голодні МП виду *Hirudo verbena* намагаються не просто прогризти глибокі рани шириною до 6 мм у годованих П, але і дістатися до їхньої крові, яку вони поглинули. Ситі П всіма силами намагаються відволікти і захиститися від голодних: хвилеподібними рухами, виділенням невеликої кількості крові з ротового апарату, прикріпленням присосками вверху до стінок ємкостей. В результаті часткового канібалізму гине в середньому 65% всіх трьох видів МП. Найменша виживаємість спостерігається у тварин, у яких м'язова тканина уражена повністю. У них рясно витікає кров із ран. При незначних пошкодженнях у більшості П рани затягуються, а на їх місці утворюються перетяжки, які залишаються з ними на все життя. Слід зазначити, що канібалізм у МП проявляється як видовий, так і міжвидовий. Отримані експериментальні результати про низьку виживаємість після часткового канібалізму може бути одним із негативних факторів, що впливає на зникнення МП в природному середовищі.

2. Тип крові свиней, а особливо курячої, є найбільш оптимальними для виживання МП після годування порівняно з кров'ю людини та кров'ю нелінійних лабораторних щурів.

3. Тривалість відпочинку та своєчасна годівля тварин відіграє значну роль у їхньому житті та розмноженні. Ті тварини, які мають достатній час для відпочинку та вчасно харчуються кров'ю свійської тварини, після повторної посадки дають набагато більше фертильного потомства, смертності практично не має.

4. В штучних умовах, якщо П вчасно не випустити для відкладання коконів (після появи поясів плодючості), деякі П можуть загинути, а при розведенні – майже всі. Частина, що вижила, дає неповноцінні кокони і переважно з мертвим потомством.

5. Перетяжки негативно впливають не тільки на тканини в зоні дефекту, а й негативно впливають на загальну репродуктивну здатність. У середньому 4–5% П мають цей дефект. Більшість МП гинуть, навіть не відклавши більше одного кокона. Отримані кокони у П неповноцінні без потомства. Можлива поява, а потім і зникнення перетяжок, також пов'язано з регенеративними речовинами в її організмі, які могли б сприяти загоєнню тканин самої П та зникненню цього дефекту.

6. При застосуванні порошку «Coral-Mine» у водному середовищі, спостерігається значна його токсичність, яка проявляється у зростанні смертності МП, появі дефектів на їхньому тілі у вигляді перетяжок, інтенсивнішого виділення з'їденої крові, відкладанні не фертильних і дефектних коконів та молодняку.

7. Згідно з представленими результатами досліджень, водно-сольовий екстракт, отриманий з тіла МП, відноситься до групи речовин, які практично не мають токсичної дії. У піддослідних самиць щурів не спостерігалось смертності, випадків абортів, змін у поведінці, порушення загального стану, термінів вагітності та кількості потомства. Показники загальної ембріотоксичної смертності, доімплантаційної смертності та постімплантаційної смертності були вірогідно нижчими в дослідній групі порівняно з контрольною ($p < 0,05$). Аномалій розвитку та порушень пігментації у плодів і потомства в жодній із груп не виявлено. Слід зазначити, що кількість підшкірних гематом у плодів дослідної групи була нижчою в середньому на 50 %, а постнатальна смертність — у середньому більш ніж у 3 рази порівняно з контрольною групою.

8. У результаті харчування МП кров'ю хворих тварин і людей зареєстрована смертність в більшості випадків з деформованим тілом у вигляді перетяжок, вони починають інтенсивніше випльовувати з'їдену кров.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Aminov, R., The influence of the water-salt extract of the medicinal leech *Hirudo verbana* Carena, 1820 on the general course of embryogenesis in rats after intraperitoneal administration. *Studia Biologica*, **2023**, 17(2), 85–94. <https://doi.org/10.30970/sbi.1702.713>.
2. Amani, L.; Motamed, N.; Mirabzadeh, A.M.; Dehghan, S.M.; Malek, M., et al. Semi-Solid Product of Medicinal Leech Enhances Wound Healing in Rats. *Jundishapur J Nat Pharm Prod.*, **2021**, 16(4), e113910. <https://doi.org/10.5812/jjnpp.113910>.
3. Davoodi, F.; Taheri, S.; Raisi, A., Leech therapy (*Hirudo medicinalis*) attenuates testicular damages induced by testicular ischemia/reperfusion in an animal model. *BMC Veterinary Research*, **2021**, 17(256), 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02951-5>.
4. Krashenyuk, A.I., “Neurotrophic (Neural Stimulating) and Neuromediator Effects of *Hirudo medicinalis*. Pathogenetic Mechanism of Treatment of Diseases of the Nervous System of the Human”. *Acta Scientific Medical Sciences*, **2020**, 4(3), 4-9. <https://doi.org/10.31080/ASMS.2020.04.0552>.
5. Aminov, R.; Aminova, A.; Makyeyeva, L., Morphological parameters of spleen and thymus of the male rats on the basis of the hirudological influence of *Hirudo verbana*. *Annals of parasitology*. **2022**, 68(1), 55-60. <https://doi.org/10.17420/ap6801.408>.
6. Aminov, R.F.; Frolov, A.K. The impact of fetal load of *Hirudo verbana* saline extract antigens morphometrical, hematological and immunological parameters of rats in the early stages of postembryonic development. *Annals of parasitology*. **2018**, 64(1), 13-20. <https://doi.org/10.17420/ap6401.127>.
7. Aminov, R.; Aminova, A., Indirect effect of substances of the hemophagous parasite *Hirudo verbana* on the immune system of the host rats. *Annals of Parasitology*. **2021**, 67(4), 603–610. <https://doi.org/10.17420/ap6704.376>.

8. Nowicki, A.; Jaworska, J.; Baranski, W., Leech therapy in the treatment of a penile haematoma in a stallion. *Veterinárni Medicina*, **2021**, 66(6), 266–271. <https://doi.org/10.17221/163/2020-vetmed>.
9. 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**, 31(5), 661-667. <https://doi.org/10.1111/vec.13094>.
10. Afroz, A.T.; Najar, F.A.; Faisal, M.; Fatima, M., Effect of Irsale Alaq (leech therapy) in thrombosed pile mass: a case study. *Int J Sci Rep*. **2020**, 6(6), 220-222. <https://doi.org/10.18203/issn.2454-2156.intjsci20202098>.
11. Akalın, Ç.; Ekmen, N., Non-occlusive mesenteric ischemia due to hirudotherapy: a case report. *Cureus*. **2020**, 12(7), e9467. <https://doi.org/10.7759/cureus.9467>.
12. Curcio, A.; Lloyd, C.M., Leech me alone! Atraumatic hemarthrosis after hirudotherapy. *Cureus*. **2020**, 12(2), e6915. <https://doi.org/10.7759/cureus.6915>
13. Yang, F.; Li, Y.; Guo, S.; Pan, Y.; Yan, C.; Chen, Z., *Hirudo* lyophilized powder ameliorates renal injury in diabetic rats by suppressing oxidative stress and inflammation. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, **2021**, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2021/6657673>.
14. Huang, H.; Lei, R.; Li, Y.; Huang, Q.; Gao, N.; Zou, W., *Hirudo* (Leech) for proliferative vitreous retinopathy: a protocol for systemic review and meta-analysis. *Medicine*, **2021**, 100(3), e24412. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000024412>.
15. Rehman, S., Management of Diabetic Foot Ulcer by *Hirudo medicinalis*, the “Healing Leech”. *Diabetic Foot Ulcer*, **2020**, 315-330. https://doi.org/10.1007/978-981-15-7639-3_19.
16. Sudhadevi, M. Leech therapy: A holistic treatment. *International Journal of Advance Research in Nursing*, **2020**, 3(1), 130-132. <https://doi.org/10.33545/nursing.2020.v3.i1b.88>
17. Ojo, P.O.; Babayi, H.; Olayemi, I.K.; Peter, O.O.; Fadipe, L.A.; Baba, E.; Izebe, K., Anti-Tubercular Activities and Molecular Characterization of Salivary

Extract of Leech (*Hirudo medicinalis*) against *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Tuberculosis Research*, **2018**, 6, 1-9. <https://doi.org/10.4236/jtr.2018.61001>.

18. Hosseinirad, S.A.; Yaghoubi, G.; Haidari, B., Misdiagnosis of Ocular Leech Infestation. *Journal of surgery and trauma*, **2017**, 5(1-2), 36-38.

19. Cheng, B.; Liu, F.; Guo, Q.; Lu, Y.; Shi, H.; Ding, A.; Xu, C., Identification and characterization of hirudin-HN, a new thrombin inhibitor, from the salivary glands of *Hirudo nipponia*. *Peer J*, **2019**, 7, e7716. <https://doi.org/10.7717/peerj.7716>.

20. Aminov, R.; Frolov, A.; Aminova, A., Influence of constricts on the body of a medical leech on their reproductive ability. *Eurasian Journal of Biosciences*, **2020**, 14, 7-10.

21. Aminov, R.; Frolov, A.; Aminova, A., The influence of the planting time and conditions on the reproductive properties of *Hirudo verbana* and *Hirudo medicinalis*. *Annals of Parasitology*, **2021**, 67(2), 169–174. <https://doi.org/10.17420/ap6702.326>.

22. Ceylan, M.; Küçükkara, R.; Akçimen, U., Effects of broodstock density on reproduction efficiency and survival of southern medicinal leech, *Hirudo verbana* Carena, 1820. *Aquaculture*, **2019**, 498, 279-284. [doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.08.016](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.016).

23. Ceylan, M., Effects of maternal age on reproductive performance of the southern medicinal leech, *Hirudo verbana* Carena, 1820. *Animal Reproduction Science*, **2020**, 218, 106507. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106507>.

24. Malek, M.; Jafarifar, F.; Aminjan, A.R.; Salehi, H.; Parsa, H., Culture of a new medicinal leech: growth, survival and reproduction of *Hirudo orientalis* Utevsky and Trontelj, 2005 under laboratory conditions. *Journal of Natural History*, **2019**, 53(11-12), 627-637. <https://doi.org/10.1080/00222933.2019.1597200>.

25. Manav, M.; Ceylan, M.; Büyükçapar, H.M., Investigation of reproductive efficiency, growth performance and survival of the southern medicinal leech, *Hirudo verbana* Carena, 1820 fed with mammalian and poultry blood. *Animal Reproduction Science*, **2019**, 206, 27-37. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.05.004>

26. Abdisa, T., Therapeutic importance of leech and impact of leech in domestic animals. *MOJ Drug Design Development & Therapy*, **2018**, 2(6), 235-242. <https://doi.org/10.15406/mojddt.2018.02.00068>.
27. Khalid, I.; Nayyef, N.S.; Merkhani, M.M., Taxonomic Study comparing the two types of Medicinal Leeches available in Iraq *J. Pharm.and Tech*, **2022**, 15(3), 1119-1122 <https://doi.org/10.52711/0974-360X.2022.00187>.
28. Yapici, A.K.; Durmus, M.; Tanyuksel, M.; Turkkan, S.; Tuzun, H.Y.; Arsenishvili, A., *Hirudo medicinalis*— historical and biological background and their role in microsurgery. Review article. *Hand Microsurg*, **2017**, 6, 34-38.
- 29 Faleh, N.; Hassan, Z.N.; Shafeeq, M.A.A., Leeches review: biology, ecology and medical important. *Indian journal of public health research & development*, **2019**, 10(10), 3275-3279.
30. Sağlam, N., Internal and External Morphological Characteristics of the Medicinal Leech Species *Hirudo sulukii* and *Hirudo verbena*. *Turkiye Parazitol Derg*, **2019**, 43(4), 204-209. <https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2019.6422>.
31. Yapici, A.K.; Durmus, M.; Tanyuksel, M.; Turkkan, S.; Tuzun, H.Y.; Arsenishvili, A., *Hirudo medicinalis* - historical and biological background and their role in microsurgery: Review article. *Hand Microsurg*, **2017**, 6, 34-38. <https://doi.org/10.5455/handmicrosurg.217838>.
32. Oh, T.S.; Hallock, G.; Hong, J.P., Freestyle propeller flaps to reconstruct defects of the posterior trunk: a simple approach to a difficult problem. *Annals of plastic surgery*, **2012**, 68(1), 79-82. <https://doi.org/10.1097/SAP.0b013e3182157940>.
33. Ayhan, H.; Özyurt Koçakoğlu, N.; Candan, S., Functional morphology of the suckers and teeth of the medicinal leech *Hirudo verbena* Carena, 1820 (Annelida; Clitellata; Hirudinida): A scanning electron microscope study. *Microsc Res Tech.*, **2021**, 84(12), 2930-2935. <https://doi.org/10.1002/jemt.23851>.
34. Abdullah, S.; Dar, L.M.; Rashid, A.; Tewari, A., Hirudotherapy/leech therapy: applications and indications in surgery. *Arch Clin Exp Surg*. **2012**, 1(3), 172-180. <https://doi.org/10.5455/aces.20120402072447>.

35. Tian, Q.; Cheng, B.; Wu, Z.; Ji, H.; Shao, G.; Gao, T.; Zhang, X.; Liu, F., Microbial-feeding interactions reveal the effects of feeding blood on the gut microbiota of the aquaculture leech (*Hirudo nipponica*). *Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*, **2023**, 75 (1): 1–13. <https://doi.org/10.46989/001c.70958>.
36. Fort CW. Leech therapy: current uses for an old treatment. *DNA Reporter*. **2001**, 26, 16-17.
37. Amarprakash, P.D., Case study of leech application in diabetic foot ulcer. *International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy*, **2012**, 3(5), 748-751. <https://doi.org/10.7897/2277-4343.03536>.
38. Wagenheim, G.N.; Au, J.; Gargollo, P.C., Medicinal Leech Therapy for Glans Penis Congestion After Primary Bladder Exstrophy-Epispadias Repair in an Infant: A Case Report. *Urology*, **2016**, 87, 193–195. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2015.09.010>.
39. Julianlara, I K. P.; Putra dan I G. P. A. F. S.; Utam A. A. S. R. S. D. Detergent Toxicity to Leeches (*Hirudo medicinalis*). *Jurnal media sains*, **2018**, 2(2), 64–70.
40. Petrauskienė, L., Lethal effects of Zn, Cu and their mixture on the medicinal leech (*Hirudo verbana*). *Ekologija*, **2008**, 54(2), 77–80. <https://doi.org/10.2478/V10055-008-0012-2>.
41. Ceylan, M.; Çetinkaya, O.; Bulut, C., Acute toxicity of zinc on Southern Medicinal Leech, *Hirudo verbana* Carena, 1820. *Acta Aquatica Turcica*, **2021**, 17(3), 421-428. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.874241>.
42. Buczyrnski, P.; Tornczyk, G.; Bielecki, A., Cichocka, J.M.; Kitowski, I.; Grzywaczewski, G.; Krawczyk, R.; Nieoczym, M.; Jablonska, A.; Pakulnicka, J.; Buczyrska, E., Occurrence of the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*) in birds' nests. *Biologia*, **2014**, 69(4), 484—488. <https://doi.org/10.2478/s11756-014-0329-0>.
43. Dudhrejiya, A.V.; Pithadiya, S.B.; Patel, A.B., Medicinal Leech Therapy and Related Case Study: Overview in Current Medical Field. *J Pharmacogn Phytochem*, **2023**, 12(1), 21-31. <https://doi.org/10.22271/phyto.2023.v12.i1a.14543>.

44. Herlin, C.; Bertheuil, N.; Bekara, F., Leech therapy in flap salvage: systematic review and practical recommendations. *Ann Chir Plast Esthet.*, **2017**, 62, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.anplas.2016.06.004>.
45. Clarke, C. E., Medical therapeutics derived from leeches (Phy. Annelida; Cl. Hirudinea). *MacEwan University Student eJournal*, **2017**, 3(1), 211-223. <https://doi.org/10.31542/j.muse.297>.
46. Davis, A.; Mejia, P.; Lu, F., Biological activities of C1inhibitor. *Molecular immunology*, **2008**, 45(16), 4057–4063. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.06.028>.
47. Markwardt, F., Historical perspective of the development of thrombin inhibitors. *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis*, **2002**, 32(3), 15–22. <https://doi.org/10.1159/000069104>.
48. Das, B., An overview on hirudotherapy/leech therapy. *Ind Res J Pharm Sci.* **2014**, 1(1), 33–45.
49. Zavalova, L.; Artamonova, I.; Berezhnoy, S.N., Multiple forms of medicinal leech destabilase-lysozyme. *Biochemical and biophysical research communications.* **2003**, 306(1), 318–323. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00896-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00896-9).
50. Hildebrandt, J.; Lemke, S., Small bite, large impact-saliva and salivary molecules in the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*. *Naturwissenschaften.* **2011**, 98(12), 995–1008. <https://doi.org/10.1007/s00114-011-0859-z>.
51. Zaidi, S.M.; Jameel, S.S.; Zaman, F.; Jilani, S.; Sultana, A.; Khan, S.A., A systematic overview of the medicinal importance of sanguivorous leeches. *Altern med rev.*, **2011**, 16(1), 59-65.
52. Indergand, S.; Graf, J., Ingested blood contributes to the specificity of the symbiosis of aeromonas veronii biovar sobria and *Hirudo medicinalis*, the medicinal leech. *Applied and environmental microbiology*, **2000**, 66(11), 4735–4741. <https://doi.org/10.1128/aem.66.11.4735-4741.2000>.
53. Kashuba, E.; Bailey, J.; Allsup, D., et al. The kinin-kallikrein system: physiological roles, pathophysiology and its relationship to cancer biomarkers. *Biomarkers*, **2013**, 18(2), 279–296. <https://doi.org/10.3109/1354750x.2013.787544>.

54. Sharma, J.; Al-Sherif, G., The Kinin System: Present and Future Pharmacological Targets. *American journal of biomedical sciences*, **2011**, 3(2), 156–159.
55. Caughey, G.H., Mast cell proteases as pharmacological targets. *European journal of pharmacology*, **2016**, 778, 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.04.045>.
56. Campos, I.; Silva, M.M.; Azzolini, S., et al., Evaluation of phage display system and leech-derived tryptase inhibitor as a tool for understanding the serine proteinase specificities. *Archives of biochemistry and biophysics*, **2004**, 425(1), 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.03.004>.
57. Kumar, V.; Abbas, A.; Fausto, N.; Jon, A., Robbins and Cotran pathologic basis of disease. *Philadelphia: Elsevier health sciences*, **2014**. 1464.
58. Kouyoumdjian, M.; Nagaoka, M.R.; Loureiro, S., et al. Portal hypertensive response to kinin. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, **2009**, 81(3), 431–442. <https://doi.org/10.1590/s0001-37652009000300008>.
59. Darestani, K. D.; Mirghazanfari, S. M.; Moghaddam, K. G., et al. Leech therapy for linear incisional skin-wound healing in rats. *Journal of acupuncture and meridian studies*, **2014**, 7(4), 194–201. <https://doi.org/10.1016/j.jams.2014.01.001>.
60. Rahul, S.; Swarnasmita, P.; Janhavi D., et al. Hirudotherapy-a holistic natural healer: a review. *LEECH*, **2014**, 2(6), 60-61.
61. Michalsen, A.; Roth, M.; Dobos, G., et al. Medicinal leech therapy. Stuttgart, Germany : Apple Wemding. **2007**, 235.
62. Segal, S.S., Regulation of blood flow in the microcirculation. *Microcirculation*. **2005**, 12(1), 33-45. <https://doi.org/10.1080/10739680590895028>.
63. Kauskot, A.; Hoylaerts, M., Platelet receptors. *In Antiplatelet Agents*, **2012**, 210, 23–57.
64. Springer, T.A., Von Willebrand factor, Jedi knight of the bloodstream. *Blood*, **2014**, 124(9), 1412–1425. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-05-378638>.

65. Gronwald, W.; Bomke, J.; Maurer, T., et al. Structure of the leech protein saratin and characterization of its binding to collagen. *Journal of molecular biology*, **2008**, 381(4), 913–927. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.06.034>.
- 66 Becanim, F.; Berktaş, S.A.; Ceylan M., What is need to be known about medicinal leeches and hirudotherapy? : A comprehensive review. *Anadolu Tıbbi Dergisi*, **2022**, 1230, 1(3), 2822-3292. <https://anadolutibbidergisi.saglik.gov.tr> No: 1230.
67. Najjari, M.; Solgi, R.; Kareshk A.T., Cellulitis Caused by *Hirudo orientalis* Bites That Lead to an Allergic reaction. *Case Reports in Infectious Diseases*, **2022**, 1-4. <https://doi.org/10.1155/2022/5493057>.
68. Masaki, I.; Tamotsu, M.; Kazuhide, N., et al. “Use of Medical Leech to Relieve Congestion of a Free Forearm Flap in the Oral Cavity: Report of a Case.” *Japanese Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*, **2002**, 48(12), 632-635.
- 69 Chhayani, K.; Daxini, P.; Patel, P., An Overview on Medicinal Leech Therapy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **2023**, 11, 107-113. <https://doi.org/10.17265/2328-2150/2023.06.001>.
70. Lemke, S.; Vilcinskas, A., “European Medicinal Leeches-New Roles in Modern Medicine.” *Biomedicines*, **2020**, 8(5), 99. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8050099>.
71. Mulilo M.A.; Siwila J.; Madoshi, P.B.; Silayo, R.S., Hirudiniasis in Cattle in Mpwapwa District, Dodoma Region of Tanzania. *Case Reports in Veterinary Medicine*, **2020**, 1-6. <https://doi.org/10.1155/2020/3028345>.
72. Iızkaya, D., Keratitis following leech therapy for periocular eczematous dermatitis: a case report. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, **2023**, 23, 124. <https://doi.org/10.1186/s12906-022-03613-1>.
73. 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**, 37(3), 207-211. <https://doi.org/10.12714/egejfas.37.3.01>.
74. Sağlam, N.; Özbay, Ö.; Demir, T.; Balcı, M.; Pala, A.; Kılıç, A., Effect of Water Quality on Monthly Density Variation of the Endangered Southern Medicinal

Leech *Hirudo verbena* Carena, 1820 (Hirudinea: Arhynchobdellida: Hirudinidae). *Acta zool. bulg.*, **2018**, 70(3), 433-441.

75. Ceylan, M.; Çetinkaya, O.; Küçükkara, R.; Akçimen, U., Reproduction efficiency of the medicinal leech *Hirudo verbena* Carena, 1820. *Turk. J. Fish. Aquat. Sc.*, **2015**, 15, 411–418. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v15_2_27.

76. Bidmal, H.R.; Sudagar, M.; Shakouri, M., The effect of different blood (goat and sheep) on sexual maturity, survival and the production of cocoons and larvae in oriental leech (*Hirudo orientalis*). *Journal of Animal Environment (AEJ)*, **2022**, 13(4), 301-306. <https://doi.org/10.22034/AEJ.2020.232247.2268>.

77. Ceylan, M.; Küçükkara, R.; Karataş, E., Effects of cocoon incubation angle on hatching success of medicinal leeches (*Hirudo* spp.). *Invertebrate Reproduction & Development*, **2023**. <https://doi.org/10.1080/07924259.2023.2241418>.

78. Фролов, О.К., Литвиненко, Р.О., Амінов Р.Ф., винахідники; Запорізький національний університет, патентовласник. Спосіб годування медичних п'явок. Патент Україна на винахід. № u 202101829. **2021** вересень 36.

79. Bidmal, H.; Sudagar, M.; Shakouri, M., The effect of different blood (camel and frogs) on sexual maturity, survival and the production of cocoons and larvae in oriental leech (*Hirudo orientalis*). *JAD*, **2022**, 16(1), 33-42. <http://dx.doi.org/10.52547/aqudev.16.1.33>.

80. Gururaja, D.; Ballal, A., Comparative Study on traditional and prevailing Leech Storage methods in Ayurveda Leech Therapy. *Centers Annals Ayurvedic Med*, **2021**, 10(2), 98-108.

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

82. Dash B, Pattajoshi G, Mohd Abbas Zaidi S, Das SS. Practice of Leech Therapy in Ayurveda-Siddha-Sowa Rigpa-Unani (ASU) System of Medicines: A Cost Effective Treatment. *International Journal of Ayurveda and Traditional Medicine*, **2021**, 3(4):30-37.

83. Sonani, S.R.; Dudhamal, T.S., Leech therapy and adjuvant Ayurveda treatment in the management of diabetic foot ulcer with atherosclerosis. *BLDE Univ J Health Sci*, **2023**, 8, 192-196.
84. Vargas, N.; Lieberman, B.; Hwang, L.; Badner, V., Hirudotherapy for Venous Congestion in an Almost Completely Avulsed Earlobe without Microsurgical Repair. *Plast Reconstr Surg Glob Open*, **2023**, 26, 11(5), e5030. <https://doi.org/10.1097/GOX.0000000000005030>.
85. Shakouri A.; Kahroba, H.; Hamishekar, H.; Abdolalizadeh, J., Nanoencapsulation of *Hirudo medicinalis* proteins in liposomes as a nanocarrier for inhibiting angiogenesis through targeting VEGFA in the Breast cancer cell line (MCF-7). *BioImpacts*, **2021**, 11(5), x-x. <https://doi.org/10.34172/bi.2021.39>.
86. Buote, N.J., The use of medical leeches for venous congestion. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, **2014**, 27(3), 173-178. <https://doi.org/10.3415/vcot-13-10-0122>.
87. Mommsen, J.; Rodriguez-Fernandez, J.; MateosMicas, M., et al. Avulsion of the auricle in an anticoagulated patient: Is leeching contraindicated? A review and a case. *Craniomaxillofac Trauma Reconstr*, **2011**, 4, 61-68. <https://doi.org/10.1055%2Fs-0031-1279668>.
88. Abdualkader, A.M.; Ghawi, A.M.; Alaama, M.; Awang, M.; Merzouk, A., Leech therapeutic applications. *Indian J Pharm Sci.*, **2013**, 75(2), 127–137.
89. Vasei N, Jahangiri K. Leech therapy of nipple-areolar complex (NAC) congestion in reduction mammoplasty: A case report. *Clin Case Rep.*, **2021**, 9(10), e05013. <https://doi.org/10.1002%2Fccr3.5013>.
90. Lee, Z.H.; Cohen, J.M.; Daar, D.; Anzai, L.; Hacquebord, J.; Thanik, V., Quantifying outcomes for leech therapy in digit revascularization and replantation. *The Journal of hand surgery, European volume*, **2019**, 44(4), 414–418. <https://doi.org/10.1177/1753193418823595>.
91. Cornejo, A.; Shammas, R.L.; Poveromo, L.P.; Lee, H.J.; Hollenbeck, S.T., Institutional Outcomes of Leech Therapy for Venous Congestion in 87 Patients.

Journal of reconstructive microsurgery, **2017**, 33(9), 612–618.
<https://doi.org/10.1055/s-0037-1604082>.

92. Zarnigar, A.A., Clinical efficacy of leech therapy in varicose ulcer—a case series. *Unani Res*, **2011**, 1, 31–38.

93. Cheng, B.; Liu, F.; Guo, Q.; Lu, Y.; Shi, H.; Ding, A.; Xu, C., Identification and characterization of hirudin-HN, a new thrombin inhibitor, from the salivary glands of *Hirudo nipponia*. *Peer J*, **2019**, 7, e7716. URL: <https://doi.org/10.7717/peerj.7716>.

94. Afify, O.; Alkhouri, S.; Lauder, N., Improving Symptoms of Peripheral Artery Disease With Hirudotherapy. *Cureus*, **2021**, 13(7), e16270. <https://doi.org/10.7759%2Fcureus.16270>.

95. Ahmad, T.; Anwar, M. Clinical importance of Leech therapy. *Indian J. Tradit. Know.* **2009**, 8, pp. 443–445.

96. Heinz, P.; Tvrđý, P.; Pink, R.; Dvořák, Z.; Michl, P., Hirudotherapy in reconstructive surgery: casereports and review. *Acta chirurgiae plasticae*, **2020**, 62(3-4), 95–102.

97. Arusan, S.; Bayar, B.; Gödekmerdan, A.; Sağlam, N., A case report: hirudotherapy as a treatment modality in the microsurgery. *Turkiye parazitolojii dergisi*, **2013**, 37(2), 154–156. <https://doi.org/10.5152/tpd.2013.34>.

98. Mineo, M.; Jolley, T.; Rodriguez, G., Leech therapy in penile replantation : a case of recurrent penile selfamputation. *Urology*, **2004**, 63, 981–983. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2004.01.019>.

99. McCrary, B.F., Hyperbaric oxygen (HBO2) treatment for a failing facial flap. *Postgraduate medical journal*, **2007**, 83(975), e1. <https://doi.org/10.1136%2Fpgmj.2006.051706>.

100. Tuncali, D.; Terzioglu, A.; Cigsar, B.; Aslan, G., The value of medical leeches in the treatment of class IIC ring avulsion injuries: report of 2 cases. *The Journal of hand surgery*, **2004**, 29(5), 943–946. <https://doi.org/10.1016/j.jhsa.2004.05.011>.

101. Resch, J.C.; Hedstrom, R.; Steiner, M.E.; Said, S.M.; Somani, A., Hirudotherapy for limb ischemia in the pediatric intensive care unit: A retrospective

observational cohort. *Front. Pediatr.*, **2023**, 10, 1011171. <https://doi.org/10.3389/fped.2022.1011171>.

102. Nair, H.K.R.; Ahmad, N.W.; Lee, H.L.; Ahmad, N.; Othamn, S.; Mokhtar, N.S.H.M.; Chong, S.S.Y., Hirudotherapy in Wound Healing. *Int J Low Extrem Wounds*, **2022**, 21(4),425-431. <https://doi.org/10.1177/1534734620948299>.

103 Arami, A.; Gurevitz, S.; Palti, R.; Menachem, S.; Berelowitz, M.; Yaffe, B., The Use of Medicinal Leeches for the Treatment of Venous Congestion in Replanted or Revascularized Digits. *The Journal of hand surgery*, **2018**, 43(10), 949, e1–949.e5. <https://doi.org/10.1016/j.jhsa.2018.02.018>.

104. Ramzan, M.; Droog, W.; Sleeswijk, V.; van Roessel, E.W.; Meynaar, I.A., Leech got your tongue? Haematoma of the tongue treated with medicinal leeches: a case report. *Neth J Crit Care.*, **2010**, 14(4), 268–270.

105. Heckmann, J.G.; Dütsch, M.; Neundörfer, B.; Hartung, U., Leech therapy in the treatment of median nerve compression due to forearm haematoma. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **2005**, 76(10), 1465. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2003.029512>.

106. Wang, H.; Zhang, J.; Chen, L., The efficacy and safety of medical leech therapy for osteoarthritis of the knee: A meta-analysis of randomized controlled trials. *International journal of surgery (London, England)*, **2018**, 54(Pt A), 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2018.04.035>.

107. Koeppen, D.; Aurich, M.; Rampp, T., Medicinal leech therapy in pain syndromes: a narrative review. *Wien. Med. Wochenschr.*, **2014**, 164(5-6), 95-102. <https://doi.org/10.1007/s10354-013-0236-y>.

108. Andereya, S.; Stanzel, S.; Maus, U.; Müller-Rath, R.; Mumme, T.; Siebert, C.H.; Stock, F.; Schneider, U., Assessment of leech therapy for knee osteoarthritis. A randomized study. *Acta Orthop.*, **2008**, 79(2), 235–243. <https://doi.org/10.1080/17453670710015030>.

109. Stange, R.; Moser, C.; Hopfenmueller, W.; Mansmann, U.; Buehring, M.; Uehleke, B., Randomised controlled trial with medical leeches for osteoarthritis of the knee. *Complementary therapies in medicine*, **2012**, 20(1-2), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2011.10.006>.

110. Lauche, R.; Cramer, H.; Langhorst, J.; Dobos, G., A systematic review and meta-analysis of medical leech therapy for osteoarthritis of the knee. *The Clinical journal of pain*, **2014**, 30(1), 63–72. <https://doi.org/10.1097/ajp.0b013e31828440ce>.
111. Shiffa, M.; Siddiqui, M.A.; Sultana, A.; Zaman, F.; Fahamiya, N.; Akhtare, M.U., Comparative clinical evaluation of leech therapy in the treatment of knee osteoarthritis. *Eur J Integr Med*, **2013**, 5(3), 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2012.12.004>.
112. Kalender, M.E.; Comez, G.; Sevinc, A.; Dirier, A.; Camci, C., Leech therapy for symptomatic relief of cancer pain. *Pain Med*, **2010**, 11(3), 443–445. <https://doi.org/10.1111/j.1526-4637.2010.00800.x>.
113. Rasi, A.; Faghihi, A.; Jalali, M.A.; Zamanian, A.; Ghaffarpour, G., Leech therapy for epidermoid cysts and review of the literature. *Adv Biomed Res*, **2014**, 3, 112. <https://doi.org/10.4103%2F2277-9175.129719>.
114. Hamidizadeh, N.; Azizi, A.; Zarshenas, M.M.; Ranjbar, S., Leech therapy in treatment of cutaneous leishmaniasis: a casemreport. *Journal of integrative medicine*, **2017**, 15(5), 407–410. [https://doi.org/10.1016/s2095-4964\(17\)60366-2](https://doi.org/10.1016/s2095-4964(17)60366-2).
115. Thakur I., Reddy B.H.S., Patil S., Rajendra K., Hirudotherapy in dentistry. *Int J Oral Health Sci.*, **2016**, 6, 65–69.
116. Schenker, M.; Murray, A.; Kay, S.P., Leech therapy in the treatment of median nerve compression due to forearm haematoma. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, **2006**, 77(6), 799–800.
117. Philip, J.; Armitage, D.W.; Phillips, K.R.; Parr, N.J., Leech therapy for penoscrotal oedema in patients with hormonerefractory prostate carcinoma. *BJU international*, **2003**, 91(6), 579–580. <https://doi.org/10.1046/j.1464-410x.2003.04120.x>.
118. Emtiazi, M.; Jokar, S.Z.; Sadeghmanesh, R., Nasal Polyp in Iranian Traditional Medicine & Conventional Medicine. *Iranian journal of medical sciences*, **2016**, 41(3), 44.
119. Sobczak, N.; Kantyka, M., Hirudotherapy in Veterinary Medicine. *Annals of parasitology*, **2014**, 60(2), 89–92.

120. Eguale, T.; Abie, G.; Sahile, M., et al. Control of aquatic leeches (*Limnatis nilotica*) using *Phytolaccadodecandra* (*Endod*) in Sodo District, Gurage Zone, Southern Nations, Nationalities and Peoples Region, Ethiopia. *Ethiopian Veterinary Journal*, **2010**, 14(2), 125–136. <https://doi.org/10.4314/evj.v14i2.63889>.
121. Adam, R.; Zakrzewski, P., Therapeutic Use of Leeches: From the Annelids of Medicine. *University of Toronto Medical Journal*, **2001**, 79(1), 65–67.
122. Mekonnen, D., Leech infestation: the unusual cause of upper airway obstruction. *Ethiopian journal of health sciences*, **2013**, 23(1), 65–68.
123. Belay, D.; Getachew, E.; Azage, T., et al. Farmers perceived livestock production constraints in Ginchi watershed area: Result of participatory rural appraisal. *International Journal of Livestock Production*. **2013**, 4(8), 128–134.
124. Bahmani, M.; Eftekhari, Z.; Mohsezaideghan, A., et al., Leech (*Limnatis nilotica*) causing respiratory distress in a pregnant cow in Ilam province in Iran. *Comparative Clinical Pathology*, **2012**, 21(4), 501–503. <https://doi.org/10.1007/s00580-011-1236-1>.
125. Bahmani, M.; Vakili, S.N.; Gholami, A.M., et al., A comparison study on the anti-leech effects of onion (*Allium cepa* L) and ginger (*Zingiber officinale*) with levamisole and triclabendazole. *Journal of HerbMed Pharmacology*. **2013**, 2(1), 1–3.
126. Bahmani, M.; Abdi, F.; Adineh, A. et al., The anti leech effect of ethanolic extract of achillea millefolium l. compared to levamisole and niclosamide on limnatis nilotica. *Studia Universitatis" Vasile Goldis" Arad. Seria Stiintele Vietii*. **2014**, 24(3), 293.
127. Baranzini, N.; De, V.A.; Orlandi, V.T.; Reguzzoni, M.; Monti, L.; de Eguileor M.; Rosini, E.; Pollegioni, L.; Tettamanti, G.; Acquati, F.; Grimaldi, A. Antimicrobial Role of RNASET2 Protein During Innate Immune Response in the Medicinal Leech *Hirudo verbana*. *Front. Immunol.*, **2020**, 11, 1-18. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00370>.
128. Амінов, Р. Ф., Природний імуномодулятор із тіл медичних п'явок: отримання та застосування: монографія. Запоріжжя : Запорізький національний університет, **2022**. 164.

129. 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., Київський національний університет, К., **2018**. 149.

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

131. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington D.C.: National Academy press [Електронний ресурс]. Режим доступа: <http://www.cpp.edu/~research/acuc/doc/guide%20to%20use%20lab%20animals.pdf> (дата обращения 15.04.2017)

132. Council Directive 2010/63/EU of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Communities*, **2010**, 276, 33–79.

133. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (м. Страсбург, Франція, 1986). Збірка договорів Ради Європи. К.: Парламентське видавництво, **2000**. URL: http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/994_137.

134. Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження». URL: <http://zakon4.rada.gov.ua/laws/show/3447-15>.

135. Порядок проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах. Офіційний вісник України. Офіц. вид., **2012**, 24, 82. (Нормативний документ Міністерства освіти, науки, молоді та спорту України. Наказ від 01.03.2012 № 249).

136. Положення про Комітет з питань етики (біоетики). (Нормативний документ Міністерства освіти, науки, молоді та спорту України. Наказ від 19.11.2012 р. № 1287): Нормативно-правова база Міністерства освіти і науки України (офіційний веб-сайт) [Електронний ресурс]. Режим доступу до документу: <http://www.mon.gov.ua/ua/activity/63/64/normativno-pravova-baza/>.

137. Aminov, R., Cannibalism of the medical leeches *Hirudo verbana*. *Eurasia J Biosci*, **2019**, 13, 23-26.

138. Aminov, R., Survival of medical leeches after partial cannibalism. *Eurasia J Biosci*, **2019**, 13, 909-912.

139. Aminov, R.; Frolov, A.; Aminova, A., The duration of rest and feeding greatly affects the re-breeding of ectoparasites: *Hirudo verbana*, *Hirudo medicinalis* and *Hirudo orientalis*. *Annals of Parasitology*, **2022**, 68(4), 721–726. <https://doi.org/10.17420/ap6804.479>.

140. Амінов, Р.Ф., Вплив «Coral-Mine» на життєздатність та розведення медичних п'явок (*Hirudo verbana* та *Hirudo orientalis*). *Acta Biologica Ukrainica*, **2023**, 1, 5-10. <https://doi.org/10.26661/2410-0943-2023-1-01>.

141. Aminov, R., Determination of acute toxicity in rats after exposure to a complex of substances obtained from the medicinal leech (*Hirudo verbana* Carena, 1820). *BIHAREAN BIOLOGIST*, **2023**, 17(1), e231303 <http://biozoojournals.ro/bihbiol/index.html>

142. Shamelashvili, K.L.; Shatorna, V.F., Embryotoxic effect of cadmium chloride on rat body. *Bulletin of Problems Biology and Medicine*, **2021**, 1(159), 147–150. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2021-1-159-147-150>.

143. Shatorna, V.F.; Krasnov, O.O., Chronic influence of cadmium chloride on rat embryogenesis in isolated and combined with zinc and copper succinates intragastric administration in the experiment. *Ukrainian Journal of Medicine, Biology and Sport*, **2022**, 7(2), 254–260. <https://doi.org/10.26693/jmbs07.02.254>.

144. Shatorna, V.F.; Rudenko, K.M., Determination of the degree of embryotoxicity of cadmium chloride by enteral administration throughout pregnancy in rats. *Bulletin of Problems Biology and Medicine*, **2020**, 3(157), 66–70. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2020-3-157-66-70>.

145. Амінов, Р.Ф.; Фролов, О.К.; Федотов, Є.Р., винахідники; Запорізький національний університет, патентовласник. Спосіб визначення кисень активуючої здатності нейтрофілів периферичної крові. Патент Україна на винахід. № а201609243. **2017** липень 10.

146. Амінов, Р.Ф.; Фролов, О.К.; Федотов, Є.Р., винахідники; Запорізький національний університет, патентовласник. Спосіб визначення фагоцитарної

активності нейтрофілів. Патент Україна на винахід. № а201604503. **2018** квітень 10.

147. Амінов, Р.Ф.; Фролов, О.К, винахідники; Запорізький національний університет, патентовласник. Спосіб стимуляції репродуктивної функції самців. Патент Україна на корисну модель. № u201904675. **2019** грудень 26.

148. Литвиненко, Р.О., Імуномодуляторні властивості біологічно активних речовин медичної п'явки в умовах гірудовпливу : дис. ... канд. біол. наук: 03.00.09., Київський національний університет, К., **2016**. 169.

149. Abduvaliev, A.A; Daurekhanov, A.M.; Hirudotherapy in complex treatment of patients with reactive arthritis. *Vestnik of KazNMU*, **2017**, 250-252.

150. Konyrtaeva, N.N.,) Hirudotherapy in Kazakhstan: a contingent of patients and adherence to treatment. *Human Ecology*, **2016**, 2, 42-48.

151. Lunghi, E.; Ficetola, G.F.; Mulargia, M.; Cogoni, R.; Veith, M.; Corti, C.; Manenti, R., Batracobdella leeches, environmental features and *Hidromantes* salamanders. *IJP: Parasites and Wildlife*, **2018**, 7, 48-53. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2018.01.003>.

152. Xiao, L.; Xu, X.L.; He, K.Y.; Chen, K.L., Assay of anticoagulation activity of leeches by using biological standardization method. *Chinese Pharmaceutical Journal*, **2015**, 50(3), 258–262. <https://doi.org/10.11669/cpj.2015.03.016>.

153. Dong, H.; Ren, J. X., Chinese medicinal leech: ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacological activities. *Evid based complement alternat med.*, **2016**, 7895935. <https://doi.org/10.1155 / 2016/7895935>.

154. Li, X.; Zheng, T.; Liang, X; Li, J.; Huang, J.; Pan, Z.; Zheng, Y. The effect of the immune system on ovarian function and features of ovarian germline stem cells. *SpringerPlus*, **2016**, 5(1), 990-991.. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2390-3>.

155. Surendranth, D., et al. Role of Leeches in Peri-orbital lacerations healed by primary intention. *International Journal of Ayurvedic Medicine*, **2016**, 7(1), 88-93.

156. Zulhisyam, A.K., et al., Local (Malaysian) leech as alternative healing treatment and an islamic perspective. *International Journal of Islamic Thought.*, **2016**, 10, 68-77. <https://doi.org/10.24035/ijit.10.2016.007>.

157. Valerio, E., et al., Use of *Hirudo medicinalis* in paediatric reconstructive surgery. *Arch Dis Child Educ Pract Ed.*, **2017**, 1–2. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2017-313306>.
158. Aminov, R.F.; Frolov, A.K., Influence of ectoparasite - *Hirudo verbana* on morphogenetic reactions of the host organism – rattus. *Current trends in immunology*, **2017**, 18, 107-117.
159. Shakouri, A.; Adljouy, N.; Abdolalizadeh, J., Anti-Cancer Activity of liposomal Medical leech saliva extract (LSE). Proceedings of the 3rd World Congress on Recent Advances in Nanotechnology (RAN'18), **2018**, April, Budapest, Hungary. Paper No. NDDTE XXX. <https://doi.org/10.11159/nddte18.102>.
160. Kutschera, U.; Roth, M.; Ewert, J.P., Feeding on Bufoid Toads and Occurrence of Hyperparasitism in a Population of the Medicinal Leech (*Hirudo verbana* Carena 1820). *Research Journal of Fisheries and Hydrobiology*, **2010**, 5(1), 9-13.
161. Kutschera, U.; Roth, M., Cannibalism in a population of the medicinal leech (*Hirudo medicinalis* L.). *Biology Bulletin*, **2005**, 32, 626-628. <https://doi.org/10.1007/s10525-005-0154-7>.
162. Merilä, J., Sterner, M., Medicinal leeches (*Hirudo medicinalis*) attacking and killing adult amphibians. *Annales Zoologici Fennici*, **2002**, 39, 343-349.
163. Ceylan, M.; Erbatur, İ., A study on nutrition of medicinal leech (*Hirudo verbana* Carena, 1820): Cannibalism?. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **2012**, 29(4), 167-170. <https://doi.org/10.12714/egejfas.2012.29.4.03>.
164. Shakouri A.; Kahroba, H.; Hamishekar, H.; Abdolalizadeh, J., Nanoencapsulation of *Hirudo medicinalis* proteins in liposomes as a nanocarrier for inhibiting angiogenesis through targeting VEGFA in the Breast cancer cell line (MCF-7). *BioImpacts*, **2021**, 11(5), x-x. <https://doi.org/10.34172/bi.2021.39>.
165. Sudhadevi, M. Leech therapy: A holistic treatment. *International Journal of Advance Research in Nursing.*, **2020**, 3(1), 130-132.

166. Elliott, J.M.; Kutschera, U., Medicinal leeches: historical use, ecology, genetics and conservation. *Freshwater Reviews*, **2011**, 4, 21-41. <https://doi.org/10.1608/FRJ-4.1.417>.
167. Kari, Z.A.; Jamaludin, M.H.; Wei, L.S.; Andu, Y.; Ibrahim, W.A.; Shazani, S., Effect of broodstock density on reproduction and juvenile culture of green buffalo leech, *Hirudinaria manillensis*. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, **2015**, 37, 581-585.
168. Abdisa, T., Therapeutic importance of leech and impact of leech in domestic animals. *MOJ Drug Design Development & Therapy*, **2018**, 2(6), 235-242. <https://doi.org/10.15406/mojddt.2018.02.00068>.
169. Daaj, H.; Al-Mozan, K.; Jabbar, N.; Alrikabi, A., *Hirudo* and its medical role. *International Journal of Pharmaceutical Research*, **2020**, 12, 1843-1844. <https://doi.org/10.31838/ijpr/2020.12.02.192>.
170. Sağlam, N., Internal and external morphological characteristics of the medicinal leech species *Hirudo sulukii* and *Hirudo verbana*. *Turkiye Parazitoloji Dergisi*, **2019**, 43, 204-209. <https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2019.6422>.
171. Nebrass, F.; Zaid, N.H.; Maan, A.A., Leeches review: biology, ecology and medical important. *Indian Journal of Public Health Research and Development*, **2019**, 10, 3275-3279.
172. Sawyer, R.T., Reproduction without crossfertilisation in the invasive Asian leech *Barbronia weberi* (Blanchard, 1897) (Hirudinea: Arhynchobdellida). *Aquatic Invasions*, **2020**, 15, 271-281. <https://doi.org/10.3391/ai.2020.15.2.04>
173. Sirtsov, V.K.; Frolov, O.K.; Aliva, O.G.; Voloshin, M.A.; Litvinenko, R.O., Morphofunctional features of *Hirudo verbana* after a gerudological procedure. *Zaporizhzhya Medical Journal*, **2013**, 4, 106-108.
174. Frolov, O.K.; Litvinenko, R.O., Morphofunctional facilities for the appearance of *Hirudo verbana* in the closest industrial hours during the sessions of hirudotherapy. *Newsletter of the Zaporizhzhya National University*, **2013**, 3, 127-133.

175. Frolov, A.K.; Litvinenko, R.A., Cellular and tissue reactions of *Hirudo verbana* (Carena, 1820) in the post-trophic process. *Newsletter of the Zaporizhzhya National University*, **2014**, 2, 176-189.

176 Мілевська, К.Г.; Федотов, Є.Р., Морфофункціональний стан медичної п'явки після годування кров'ю. *Актуальні питання біології, екології та хімії*, **2015**, 10(2), 63-71.

178. Collier, K.J.; Probert, P.K.; Jeffries, M. Conservation of aquatic invertebrates: concerns, challenges and conundrums. *Aquat. Conserv.*, **2016**, 26, 817–837. <https://doi.org/10.1002/aqc.2710>.

179. Grafiskaia, E.N., Medicinal leech antimicrobial peptides lacking toxicity represent a promising alternative strategy to combat antibiotic-resistant pathogens. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2019**, 180, 143e153. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.080>.

180. Chernaya, L.V.; Kovalchuk, L.A.; Mikshevich, N.V., Geographical variability of heavy metal concentrations in tissues of medical leeches (*Hirudo medicinalis*, *Hirudo verbana*) and in bottom deposit. *Nature Conservation Research*, **2019**, 4(3), 67–77. <https://dx.doi.org/10.24189/ncr.2019.051>

181. Elliott, J.M., Population size, weight distribution and food in a persistent population of the rare medicinal leech, *Hirudo medicinalis*. *Freshw. Biol.*, **2008**, 53, 1502–1512. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2008.01978.x>

182. Zhang, B.; Lin, Q.; Lin, J.; Chu, X.; Lu, J., Effects of broodstock density and diet on reproduction and juvenile culture of the leech, *Hirudinaria manillensis* Lesson, 1842. *Aquaculture*, **2008**, 276, 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.00>.

183. Ceylan, M.; Küçükara, R.; Akçimen, U.; Yener, O., Reproduction efficiency of the Horse Leech, *Haemopsis sanguisuga* (Linnaeus, 1758). *Invertebr Repro Dev.*, **2017**, 61, 182–188. <https://doi.org/10.1080/07924259.2017.1318096>.

184. Сілін, Р.І.; Гордєєв, А.І., Вплив кавітаційного і магнітного полів та нанополів мінералів на активацію води. *Вісник Хмельницького національного університету* **2013**, 6, 122-126.

185. Zaliavska, O.V.; Antoniv, A.A.; Kaushanska, O.V.; Pavlyukovich, N.D.; Nika, O.M., A rehabilitation effect of water with low surface tension on the functional condition of the kidneys..*EUMJ* **2021**, 9(1), 39-45. [https://doi.org/10.21272/eumj.2021;9\(1\):39-45](https://doi.org/10.21272/eumj.2021;9(1):39-45).
186. Неведомська, Є.О., Вплив коралової води на живі організми. *International Scientific and Practical Conference "WORLD SCIENCE"* **2016**, 2(6), 3, 6-10.
187. Petrauskiene, L. Water and sediment toxicity assessment by use of behavioural responses of medicinal leeches. *Environ Int* **2003**, 28(8), 729-736. [https://doi.org/10.1016/s0160-4120\(02\)00118-6](https://doi.org/10.1016/s0160-4120(02)00118-6).
188. Petrauskiene, L. The medicinal leech as a convenient tool for water toxicity assessment. *Environ Toxicol* **2004**, 19(4), 336-341. <https://doi.org/10.1002/tox.20039>
189. Frolov, A.; Kopeyka, V.; Fedotov, E.; Kapustin, S.; Lytvynenko, R., The effect of hirudotherapy on physiological parameters in goats. *Tvarynnystvo Ukrainy*, **2010**. 7, 7–10.
190. Saglam, N., The effects of environmental factors on leeches. *Advances in Agriculture and Environmental Science*, **2018**, 1(1), 1–3. <https://doi.org/10.30881/aaeoa.00001>.
191. Petrauskienė, L. Lethal effects of Zn, Cu and their mixture on the medicinal leech (*Hirudo verbana*). *EKOLOGIJA* **2008**, 54(2), 77–80 DOI: <https://doi.org/10.2478/V10055-008-0012-2>.
192. Chornaya, L.V.; Kovalchuk, L.A.; Mikshevich, N.V. Seasonal bioaccumulation of heavy metals by medicinal leech *Hirudo verbana*. *Hydrobiological Journal* **2018**, 54(5), 56-62. <https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v54.i5.60>.
193. Kabeiseman, E.; Paulsen, R.; Burrell, B. D., Characterization of a monoacylglycerol lipase in the medicinal leech, *Hirudo verbena*. *Biochemistry and Molecular Biology*, **2020**, 243–244, 110433. <https://doi.org/10.1016%2Fj.cbpb.2020.110433>.

194. Ashfaque, A.; Khan, A.M.; Safdar, M., Potential applications in modern medicine . *Journal of Biological & Scientific Opinion*, **2023**, 11(3). <https://doi.org/10.7897/2321-6328.113177>.
195. Abdelghani, Z.; Hourani, N.; Zaidan, Z.; Dbaiho, G.; Mrad, M.; Hage-Sleiman, R., Therapeutic applications and biological activities of bacterial bioactive extracts. *Archives of Microbiology*, **2021**, 203(8), 4755-4776. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02505-1>.
196. Godlewska-Żyłkiewicz, B.; Świsłocka, R.; Kalinowska, M.; Golonko, A.; Świdorski, G.; Arciszewska, Ż.; Nalewajko-Sieliwoniuk, E.; Naumowicz, M.; Lewandowski, W., Biologically active compounds of plants: structure-related antioxidant, microbiological and cytotoxic activity of selected carboxylic acids. *Materials*, **2020**, 13(19), 1-37. <https://doi.org/10.3390/ma13194454>.
197. Ivanova, T.S.; Krupodorova, T.A.; Barshteyn, V.Y.; Artamonova, A.B.; Shlyakhovenko, V.A., Anticancer substances of mushroom origin. *Experimental Oncology*, **2014**, 36, 58–66.
198. Carrillo-Vico, A.; Guerrero, J.M.; Lardone, P.J.; Reiter, R.J., A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine*, **2005**, 27(2), 189–200. <https://doi.org/10.1385/endo:27:2:189>.
199. Wüstenhagen, D.A.; Lukas, P.; Müller, C., Cell-free synthesis of the hirudin variant of the blood-sucking leech *Hirudo medicinalis*. *Scientific Reports*, **2020**, 10, 19818. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76715-w>.
200. Hu, B.; Xu, L.; Li, Y.; Bai, X.; Xing, M.; Cao, Q. A peptide inhibitor of macrophage migration in atherosclerosis purified from the leech *Whitmania pigra*. *J Ethnopharmacol*, **2020**, 254, 112723. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112723>.
201. Aminov, R.; Frolov, O.; Aminova, A., The effect of the biologically complex of a medical leech active substances on the immunosuppressive state of rats. *Jordan journal of biological sciences*, **2022**, 15(2), 257–261.
202. Malik, B.; Astuti, D.A.; Arief, D.J.F.; Rahminiwati M., A study on antioxidative and antimicrobial activities of saliva extract of Indonesian local leeches.

IOP Conf. Ser. Earth. Environ. **2019**, 251, 1-16. <https://doi.10.1088/1755-1315/251/1/012061>.

203. Aminov, R.F.; Frolov, O.K.; Aminova, A.S.; Makyeyeva, L.V., Evaluation of mitotic activity of bone marrow under short-term hypothermia. *Problems of cryobiology and cryomedicine*, **2022**, 32(2), 81–91.

204. Sheeraz, M.; Zaheer, A.N.; Parvez, A.; Haqeeq, A., Anti psoriatic effect of leech therapy in psoriasis - a case report. *Hippocratic Journal of Unani Medicine*, **2017**, 12(3), 43-50.

205. Fattakhov, N.K.; Tilyakhodzhaeva, G.B., Abdulkhakimov A.R. Efficiency of application of hirudotherapy to have been having coronaviral infection. *Journal of applied research*. **2021**, 7(4), 2908-2911.

206. Nechyporenko, O.L.; Ulko, L.G.; Fotina, G.A., Determination of acute toxicity parameters of the new disinfectant effect "Dezsan". *Scientific Bulletin of Veterinary Medicine*, **2018**, 1, 108-116.

207. Todoruk, V.; Hunchak, V.; Gufrij, D.; Gutyj, B.; Hariv, I.; Khomyk, R.; Vasiv, R.; Slobodyuk, N.; Vynyarska, A.; Zhuravlov, O.; Husar, P.; Nazaruk, N.V.; Nazaruk, N.Y.; Soltis, M., Research of sharp and chronic toxicness of experimental preparation of «Ferosel T». *Scientific Messenger LNUVMBT named after S.Z. Gzhytskyj*, **2017**, 19(73), 104-111. <https://doi.org/10.15421/nvlvet7322>.

208. Verkhovodova, Y.V.; Kireev, I.V.; Koshovyi, O.M.; Myha, M.M.; Molochna, S.E., The study of acute toxicity of first obtained salvia officinalis extracts. *Art of Medicine*, **2019**, 2(10), 20-24.

209. Grytsaj, I.R.; Mandzynets, S.M.; Bura, M.V., Influence of the sodium fluoride on the development and survival of the loach embryos. *Biophysical Bulletin*, **2022**, 47, 13–26. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2022-47-02>.

210. Nefodova, O.O.; Halperin, O.I., Comparison of embryotropic effect of cadmium salts on embryogenesis of rats in experiment. *Bulletin of Problems Biology and Medicine*, **2018**, 3(145), 305–309. <http://dx.doi.org/10.29254/2077-4214-2018-3-145-305-309>.

211. Canpolat, İ.; Sağlam, N., Treatment of aural hematomas in dogs with the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*. *Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları*, **2004**, 2(2), 67–69.
212. Frolov, A.K.; Litvinenko R.A., Basic morphofunctional features of pharmaceutic leech (*Hirudo verbana* Carena, 1820) tissues in various forms of response after hirudotherapeutic procedures. *Annals of Parasitology*, **2015**, 61(1), 27–35.
213. Амінов, Р.Ф., винахідники; Запорізький національний університет, патентовласник. Спосіб визначення фізіологічного стану організму. Патент Україна на корисну модель. № u202300654. **2023** серпень 17.
214. Kumar, S.A. Anti inflammatory effect of leech therapy in the patients of psoriasis (ek kustha). *J. Pharmaceut and Sci. Innovat.*, **2012**, 1(1), 71-74.
215. Vallejo, J.R.; González, J.A., The medical use of leeches in contemporary spain: between science and tradition. *Acta med-hist Adriat*, **2015**, 13(1), 131-158.
216. Liu, J.; Sui, Y., Effects of leech superfine powder on the level of serum lipid in the rabbit of atherosclerosis model. *Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, **2015**, 17(6), 26–28.
217. Tashiro, K.; Fujiki, M.; Arikawa, M.; Kagaya, Y.; Miyamoto, S., Free flap salvage after recurrent venous thrombosis by means of large-scale treatment with medical leeches. *Plast Reconstr Surg Glob Open*, **2016**, 4, e1157. <https://doi.org/10.1097%2FGOX.0000000000001157>.
218. Sayed, A.A.; Sadeq, R.; Mojtaba, T., Leech Therapy for Treating Priapism: Case Report Iran. *J Public Health.*, **2017**, 46(7), 985-988.
219. Karadag, A.S.; Calka, O.; Akdeniz, N., A case of irritant contact dermatitis with leech. *Cecen I Cutan Ocul Toxicol*, **2011**, 30, 234-235. <https://doi.org/10.3109/15569527.2010.547543>.
220. Savrun, A.; Bozkurt, S.; Okumu, M.; Gokcen, E.; Turkaslan, M. Prolonged bleeding on the neck in leech therapy:case report. *Arch Clin Exp Surg (ACES)*, **2015**, 4, 234–237.

221. Борисенко, О.М.; Бедзик, О.В.; Міщанчук, Н.С., Гірудотерапія при комплексному лікуванні осіб з гострою сенсоневральною приглухуватістю. *Журнал вушних, носових і горлових хвороб*, **2005**, 3, 80-83.
222. Міщанчук, Н.С., Гірудотерапія при гострій сенсоневральній приглухуватості та гострих вестибулярних порушеннях у ліквідаторів наслідків аварії на ЧАЕС з фібринолітичними змінами. *Журнал вушних, носових і горлових хвороб*, **2005**, 2, 13-18.
223. Porshinsky, B.S.; Saha, S.; Grossman, M.D., Clinical uses of the medicinal leech: a practical review. *J. Postgrad. Med.*, **2011**, 57, 65–71. <https://doi.org/10.4103/0022-3859.74297>.
224. Niqar, Z.; Alam, M.A., Effect of taleeq (leech therapy) in dawali (varicose veins). *Anc. Sci. Life.*, **2011**, 30, 84–91.
225. Prakash, A.; Parikshit, D.; Arun, G.R. Raj A review on the role of jalaukavacharana (hirudotherapy) in the management of the venous ulcer. *Universal Journal of Pharmacy*. **2013**, 2(4), 38-43.
226. Ткаченко, П.І., та ін. Гірудотерапія в комплексному лікуванні загострення хронічного паренхіматозного паротиту в дітей. *Український стоматологічний альманах*, **2006**, 3, 63–65.
227. Jha, K., et al. Hirudotherapy in medicine and dentistry. *J Clin Diagn Res*, **2015**, 9(12), ZE05- ZE07. <https://doi.org/10.7860%2FJCDR%2F2015%2F16670.6918>.
228. Ouyang, L-D.; Hu, X-S.; Niu M., Mechanisms of Hirudo in promoting blood circulation and removing stasis based on network pharmacology. *China journal of Chinese materia medica*, **2018**, 43(9), 1901-1906. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcmm.2018.0065>.
229. Liubov B-N., Medicinal properties of leeches. Israel: B. N. Publication House, **2020**, 94.
230. Butt, A.M., et al., Leech therapy for the treatment of venous congestion in flaps, digital re-plants and revascularizations – a two-year review from a regional centre. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, **2016**, 28(2), 219–223.

231. Aldemir, C.; Duygun, F., When and how should leeches be applied in cases of venous congestion?. *International Medical Journal. Medicine Science*, **2017**, 6(1), 1- 4.
232. Junren, C.; Xiaofang, X.; Huiqiong, Z.; Gangmin, L.; Yanpeng, Y.; Xiaoyu, C.; Yuqing, G.; Yanan, L.; Yue, Z.; Fu, P.; Cheng, P., Pharmacological Activities and Mechanisms of Hirudin and Its Derivatives - A Review. *Front. Pharmacol.* **2021**, 12, 660757. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.660757>.
233. Müller, C.; Lukas, P.; Sponholz, D.; Hildebrandt, J-P. The hirudin-like factors HLF3 and HLF4—hidden hirudins of European medicinal leeches. *Parasitology Research.*, **2020**, 119, 1767–1775. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06697-1>.
234. Daye, M.; Işık, B.; Kılınç, F. Lichen planus due to hirudotherapy. *Türkiye parazitolojii dergisi.* **2021**, 45(2), 149–152. <https://doi:10.4274/tpd.galenos.2020.7066>
235. 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**. <https://doi:10.1007/s00105-021-04812-6>.
236. Kılıç, M.; Ak, R. Orbital cellulitis due to leech therapy. *Bulletin of emergency and trauma.* **2019**, 7(3), 335–336. <https://doi:10.29252/beat-0703020>
237. Çakmak, O.; Çaltekin, İ.; Gökçen, E.; Savrun, A.; Yaşar, E. Kounis syndrome due to hirudotherapy (leech therapy) in emergency department; a case report. *Turkish journal of emergency medicine.* **2018**, 18(2), 85–87. <https://doi:10.1016/j.tjem.2017.12.005>
238. Sadati, M. S.; Rezaee, M.; Ghafarpur, S.; Aslani, F. S.; Dastgheib, L.; Jahankhah, R., "Cutaneous lymphoid hyperplasia induced by *Hirudo medicinalis* (leeches)" *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, **2019**, 16(4), 20160056. <https://doi.org/10.1515/jcim-2016-0056>
239. Spear, M. Medicinal leech therapy: friend or foe. *Plastic Surgical Nursing: official journal of the american society of plastic and reconstructive surgical nurses.* **2016**, 36(3), 121–125. <https://doi:10.1097/PSN.0000000000000152>.

240. Hyson, J.M., Leech Therapy: A History. *Journal of the History of Dentistry*, **2005**, 53(1), 25–27.
241. Sanchez, A.; Victoria, M.; Portillo, A., et al. Antibacterial activity in a collection of amps from a *Hirudo medicinalis*. *J Mic Bio Rep.*, **2022**, 5(4), 35-38. [https://doi.org/10.37532/puljmbr.2022.5\(4\).35-38](https://doi.org/10.37532/puljmbr.2022.5(4).35-38).
242. Zaidi, S.M., Unani treatment and leech therapy saved the diabetic foot of a patient from amputation. *Int Wound J.*, **2016**, 13(2), 263-264. <https://doi.org/10.1111/iwj.12285>.
243. Arabacı, B., ‘Pearls’ of the nineteenth-century: from therapeutic actors to global commodities medicinal leeches in the Ottoman Empire. *Medical History*. **2023**, 67(2), 128–147. <https://doi.org/10.1017/mdh.2023.17>.
244. Han, Q.Q.; Wen, Z.Y.; Lyu, Q.; Pan, Y.Y., Network Meta-analysis of Chinese patent medicine containing *Hirudo* in treatment of atherosclerosis. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.*, **2023**, 48(1), 234-246. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcmm.20221018.501>.
245. Ünal, K.; Erol, M.E.; Ayhan, H., Literature review on the effectiveness of medicinal leech therapy in the wound healing. *Ankara Med J*, **2023**, 1, 151-164. <https://doi.org/10.5505/amj.2023.20280>.
246. Pham, V.A.; Tran, H.T.; Mai, T.P.; Nguyen, L.H.; Nguyen, V.H.; Nguyen, T.H.; Bui, S.S.; Vu, A.V.; Do, H.T.; Trinh, Q.V., Myocardial infarction model induced by isoproterenol in rats and potential cardiovascular protective effect of a nattokinase-containing hard capsule. *Phytomedicine*, **2023**, 100472. <http://www.sciencedirect.com/journal/phytomedicine-plus>.
247. Namjou, A.; Razavie, E.; Heidarian, E.; Yazdani, N.; Rafieian-Kopaei, M., Effects of Hirudotherapy in Alloxan-induced Diabetic Male Rats: Histopathological and Biochemical Changes. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*, **2023**, e120208.
248. Miao, Y.; Guo, Q.; Shi, H.; Wang, J.; Guo, L., Study on foraging mechanism of leeches with different feeding habits based on chemoreception and foraging behavior. *Invertebrate biology*, **2023**, 142(1), e12390. <https://doi.org/10.1111/ivb.12390>.

Наукове видання
(українською мовою)

Монографія

Амінов Руслан Флузович

**МЕДИЧНІ П'ЯВКИ В ШТУЧНИХ УМОВАХ:
ОТРИМАННЯ, ЗБЕРІГАННЯ ТА ВИКОРИСТАННЯ**

Редактор *Амінова А. С.*

Коректор *Циткіна Л. М.*

Підписано до друку 28.09.2023. Формат 60х90/16.
Папір офсетний. Друк ризографічний. Гарнітура Times.
Умовн. друк. арк. 5,6. Тираж 300 прим. Зам. № 89.

Запорізький національний університет
69600, м. Запоріжжя, МСП-41
вул. Жуковського, 66.

Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи
до Державного реєстру видавців, виготівників
і розповсюджувачів видавничої продукції
ДК № 5229 від 11.10.2016

