

УДК:[577.1:595.143]:611.018.5

ВПЛИВ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН МЕДИЧНОЇ П'ЯВКИ НА ІМУНОЛОГІЧНУ РЕАКТИВНІСТЬ НЕЙТРОФІЛІВ І ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ ЛЮДИНИ У КУЛЬТУРІ

Амінов Р.Ф.

Запорізький національний університет, Україна, 69600, м. Запоріжжя, вул. Жуковського, 66

91_amin_91@mail.ru

Досліджували венозну кров чотирьох донорів чоловічої статі з різним анамнезом захворювання і життя. В якій, *in vitro* вивчали імунологічну реактивність нейтрофілів і лімфоцитів на пекарські дріжджі на фоні різної концентрації біологічно активних речовин сольового екстракту із тіл медичної п'явки для визначення оптимальних імуногенних концентрацій. В результаті експериментальних досліджень у донорів при дії різної концентрації антигенів медичної п'явки було виявлено, що в короткостроковій культурі лейкоцитів на 30 і 90 хвилинній інкубації малі і середні концентрації антигенів стимулювали фагоцитарну активність нейтрофілів, а великі пригнічували, в тому числі і їх перетравлюючу здатність. Лімфоцити крові переважно реагували на антигени медичної п'явки і дріжджі апоптичними реакціями, які проявлялись збільшенням малих і різким зниженням великих лімфоцитів. Оптимальними дозами для фагоцитарної реакції нейтрофілів і реактивності лімфоцитів є концентрації антигенів починаючи з 20 мкг / мл і закінчуючи кінцевою концентрацією 80 мкг / мл. Концентрації доз 120 – 250 мкг / мл є цитотоксичними.

Ключові слова: гірудотерапія, біологічно активні речовини, медична п'явка, лейкоцити, фагоцитоз, цитоморфометрія.

ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ НА ИМУНОЛОГИЧЕСКУЮ РЕАКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ И ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В КУЛЬТУРЕ

Аминов Р.Ф.

Запорожский национальный университет, Украина, 69600, г. Запорожье, ул. Жуковского, 66

Исследовали венозную кровь четырех доноров мужского пола с различным анамнезом заболевания и жизни. В которой, *in vitro* изучали иммунологическую реактивность нейтрофилов и лимфоцитов на пекарские дрожжи на фоне различной концентрации биологически активных веществ солевого экстракта из тел медицинской пиявки для определения оптимальных иммуногенных концентраций. В результате экспериментальных исследований у доноров при действии различной концентрации антигенов медицинской пиявки было обнаружено, что в краткосрочной культуре лейкоцитов на 30 и 90 минутной инкубации малые и средние концентрации антигенов стимулировали фагоцитарную активность нейтрофилов, а большие подавляли, в том числе и их переваривающую способность. Лимфоциты крови преимущественно реагировали на антигены медицинской пиявки и дрожжи апоптическими реакциями, которые проявлялись увеличением малых и резким снижением больших лимфоцитов. Оптимальными дозами для фагоцитарной реакции нейтрофилов и реактивности лимфоцитов являются концентрации антигенов начиная с 20 мкг / мл и заканчивая конечной концентрации 80 мкг / мл. Концентрации доз 120 - 250 мкг / мл являются цитотоксическими.

Ключевые слова: гирудотерапия, биологически активные вещества, медицинская пиявка, лейкоциты, фагоцитоз, цитоморфометрия.

EFFECT OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF THE MEDICINAL LEECH ON THE IMMUNOLOGICAL REACTIVITY OF NEUTROPHILS AND LYMPHOCYTES IN HUMAN BLOOD CULTURE

Aminov R.F.

Zaporizhzhya national university, Ukraine, 69600, Zaporizhzhya, Zhukovskogo Street 66

Investigated the venous blood of four male donors with a history of various diseases and life. In which, *in vitro* studied the immunological reactivity of neutrophils and lymphocytes to baker's yeast on a background of different concentrations of biologically active substances saline extract of the bodies of the medicinal leech to determine the

optimal concentrations of immunogenic. Experimental studies from donors under the action of different concentrations of medicinal leech antigens has been found that the short leukocyte culture at 30 and 90 minute incubation, medium and small concentrations of antigens stimulate the phagocytic activity of neutrophils, and large suppressed, including their digestive capacity. Blood lymphocytes predominantly react to antigens of medicinal leeches and yeast apoptotic reactions that manifest increase small and sharp decline in large lymphocytes. Optimal dosages for a phagocytic response of neutrophils and lymphocytes reactivity are antigen concentration ranging from 20 mcg / ml and ending with a final concentration of 80 mcg / ml. Concentrations doses of 120 - 250 mcg / ml are cytotoxic.

INTRODUCTION

In recent decades, against a background of increasing allergization population growth in the number of complications and side effects of therapy, a steady increase in the number of chronic diseases [1,2] observed. Actively seek opportunities to use different methods of medication does not impact on the human body. Particular attention is drawn to methods that millennium successfully used by our ancestors. [3] One such method - hirudotherapy (GT) – use of medicinal leeches for medicinal purposes. Modern hirudotherapy based on studies of complex biologically medicinal leech, which provide a wide range of therapeutic effects. But the influence of BAS studied enough, and immunological action bar just beginning to be studied. Therefore, the aim of our work – in vitro study the immunological reactivity of neutrophils and lymphocytes in baker's yeast on a background of different concentrations of biologically active substances saline extract of the bodies of the medicinal leech for determining the optimal immunogenic concentrations.

MATERIALS AND METHODS OF THE RESEARCH

The material for the study was the venous blood of donors stabilized with heparin, which determine the number of white blood cells to assess the functional status of the immune system (intact sample). Then got leukokontsentrat makrometodom in 10% gelatin solution (1% / ml) measured output of leukocytes, which was 90-95%. Prepared suspension of cells in the culture mixture concentration of 4.0 million / ml.

We investigated the phagocytic activity of neutrophils and lymphocytes cytomorphometric figures, under the influence of different concentrations of antigen extract salt from the body received medicinal leech method [9]. Dosage antigens salt extract was carried out for protein content (determined by Lowry).

All blood samples except doslidzhuvalni intact incubated in an incubator for 90 min. at a temperature of +37 ° C. Smears were prepared at 30 and 90 minutes. [10]. These smears were fixed in 96% ethanol and stained by Papenheymom.

For comparison, these standards were tabulated healthy people this age. Also, compared with controls, all samples in which dobavlyalys different concentrations of the medicinal leech antigen.

RESULTS AND THEIR DISCUSSION

As a result of experimental studies of four different donors with a history of disease and life when exposed to different concentrations of the antigens of the medicinal leech leukocytes in short-term culture of yeast was investigated phagocytic activity of neutrophils and lymphocytes cytomorphometric changes. First, it was investigated the phagocytic activity of neutrophils was found that at 30 min. incubation phagocytic index in the control culture (without the medicinal leech antigen) is in the range of physiological values, amounting to $65,65 \pm 3,36\%$. With 90 minutes. incubation FI continues to grow, both in control and in the stress tests, but with a significant decrease in the maximum concentration (250 mcg / ml), indicating an inhibition of neutrophil phagocytic reaction. Phagocytic number by 30 minutes. Incubation in control and experimental values of the culture of leukocytes to the concentration of 120 mcg / ml were within $4,4 \pm 0,22 - 4 \pm 0,2$, illustrating their physiological significance and only the medicinal leech antigen dose of 250 mcg / ml is a reduce the number of phagocytic as a general inhibition of phagocytic neutrophils aktyvnosti, reduced the number of phagocytic and phagocytic index. In cell cultures to a concentration of 120 mcg / ml at 90 min. incubation of phagocytic number continues to rise, indicating that the inhibition of digesting ability fahosom neutrophils. Along with the phagocytic response of neutrophils in the same cultures of leukocytes, we studied the immunological reactivity of lymphocytes cytomorphometric method. Small and medium concentrations of antigens medicinal leech showed apoptotic and productive immunological reactions that exhibit small reduction while preserving large lymphocytes. Large concentrations of antigens medical leech 120-250 pg / ml induced apoptotic lymphocytes and cytotoxic reactions, which shows sharp increase in small lymphocytes by reducing the average lymphocyte.

CONCLUSIONS

1. Prolangovana production of neutrophils and phagocytic reaction tsitomorfometrchny method of dimensional analysis classes of lymphocytes are informative, objectively reflecting the state of immune cells at the time of the survey.
2. Increasing the level of small lymphocytes in the control culture and adding various concentrations of antigens medicinal leech indicates the predominance of apoptotic reactions over productive immunogenic. On the level of the past can be judged on the presence of large lymphocytes (immunoblast), which persist at high concentrations. Saving

productive immunogenesis lymphocyte cytokine probably provided support that occurs when phagocytic macrophages and macrophage reaction.

3. Reduction of small and medium-sized increase in lymphocytes at a dose of 80 mcg / ml can be regarded as Immunogenetic response to the overall apoptosis.

4. In analyzing the dynamics and distribution of phagocytic reaction cytomorphometric classes identified certain characteristics reflecting the state of the immune cells of blood at the time of analysis.

5. The optimal dose for the phagocytic response of neutrophils and lymphocytes reactivity is a concentration ranging from 20 mg / ml and ending with a final concentration of 80 mcg / ml. Concentrations doses of 120 - 250 mcg / ml is cytotoxic.

Key words: hirudotherapy, biologically active substances, medical leech, leukocytes, phagocytosis, tsytomorfometriya.

ВСТУП

В останні десятиліття на тлі наростаючої алергізації населення, зростання числа ускладнень і побічних ефектів фармакотерапії, неухильного збільшення кількості хронічних захворювань [1,2] відзначається активний пошук можливостей застосування різних не медикаментозних методів впливу на організм людини. Особливу увагу привертають методи, які тисячоліття успішно застосовувалися нашими нащадками [3]. Один з таких методів егірудотерапія (ГТ) - використання медичних п'явок у лікувальних цілях.

Основою лікувального ефекту гірудотерапії є слина п'явки, яка містить велику кількість біологічно активних речовин (БАР), що сприяють нормалізації внутрішнього гомеостазу. Разом зі слиною вона вводить в організм людини понад 150 біологічно активних ферментів. Чимало з них має білкову природу, тому стає об'єктом реакції імунної системи людини, зміни якої й зумовлюють більшість терапевтичних ефектів ГТ [4,5]. За даними Шишкіної І.Д. здатність поглинати мікроби (фагоцитарна активність) нейтрофілами при лікуванні п'явками підвищується в два - три рази внаслідок впливу секрету СЗ на систему комплементу [6,7]. Останні дані експериментів, проведених на цільній крові, підтвердили факт підвищення фагоцитарної активності лейкоцитів під дією антигенів (АГ) кільцеців, порівняно з такою без їх додавання [8].

Сучасна гірудотерапія базується на вивченні дії комплексу БАР медичної п'явки, які забезпечують широкий спектр терапевтичних ефектів. Але вплив БАР вивчено недостатньо, а імунологічна дія БАР тільки почала вивчатись.

Одна з причин цих недоліків полягає в нестачі об'єктивних методів, які характеризують функцію імунокомпетентних клітин. З таких імуногенезних методів є метод визначення фагоцитарної активності нейтрофілів і цитоморфометричний аналіз лімфоцитів, які характеризують реакції вродженого імунітету. Тому, мета нашої роботи - *in vitro* вивчити імунологічну реактивність нейтрофілів і лімфоцитів на пекарські дріжджі на фоні різної концентрації біологічно активних речовин сольового екстракту із тіл медичної п'явки (МП) для визначення оптимальних імуногенних концентрацій.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проводилися в навчально-науково-дослідній лабораторії клітинної та організменної біотехнології Запорізького національного університету (зав. лаб. д. м. н., професор Фролов О. К.). Обстежено 4 донори чоловічої статі: 1 - віком 20 років через 2 тижні після перенесення гострої респіраторної вірусної інфекції (ГРВІ), 2 - віком 43 роки через 3-4 тижні після ГРВІ, 3 - віком 57 років після інтенсивної гірудотерапії з приводу тромбофлебиту стегнової вени правої ноги, 4 - умовно здоровий, 23 роки. Матеріалом для дослідження була венозна кров стабілізована гепарином, в якій визначали кількість лейкоцитів для оцінки функціонального статусу імунної системи (інтактний зразок). Далі отримували лейкоконцентрат методом в 10% розчині желатину (1% / мл), визначали відсоток

виходу лейкоцитів, який становив 90-95%. Готували суспензію клітин на культуральній суміші концентрацією 4,0 млн / мл. Дозування антигенів сольового екстракту здійснювали за вмістом білка (визначали за Лоурі). Отриману лейкомасу, в якій заздалегідь ми визначили вміст лейкоцитів, у об'ємі по 50 мкл розлили в мікропробірки і додали відповідну дозу АГ МП. Початкова доза АГ становила 20 мкг / мл, а кінцева 250 мкг / мл суспензії лейкоцитів (20; 40; 80; 120; 250) та додавали по 50 мкл робочого розчину дріжджів. Охайно перемішували.

Після чого всі дослідні зразки крові інкубували в термостаті при +37° С протягом 90хв. Мазки готували на 30 та 90 хв.[10], фарбували за Папенгеймом(комбіноване фарбування за Май-Грюнвальдом 5 хвилин та Романовським - Гімза 25 хвилин).

Досліджували фагоцитарну активність нейтрофілів (ФІ, ФЧ) і цитоморфометричні показники лімфоцитів, під впливом різної концентрації антигенів сольового екстракту із тіл МП отриманим способом [9].

Результати порівнювали з референтними значеннями для даного віку. Дослідні зразки з відповідним вмістом АГ МП порівнювали з контролем (без АГ). Статистичну обробку результатів проводили методом обчислення середньої арифметичної, помилки середньої арифметичної, середнього квадратичного відхилення за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Office Excel 2010. Вірогідність відмінностей між середніми величинами оцінювали за критерієм Ст'юдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати експериментальних досліджень щодо фагоцитарної активності нейтрофілів та цитоморфометричних показників лімфоцитів під дією різної концентрації АГ МП представлені в таблицях 1 та 2, відповідно. Дані 4 донорів були усереднені так, як динаміка впливу АГ МП в різній концентрації на досліджувані показники була подібною незалежно від анамнезу. При дослідженні фагоцитарної активності нейтрофілів було виявлено, що при 30 хв. інкубації фагоцитарний індекс (ФІ) в контрольній культурі (без АГ МП) знаходиться в межах фізіологічних значення і дорівнював $65,65 \pm 3,36$ %. При 90 хв. інкубації ФІ продовжував зростати, як в контрольних, так і в навантажувальних тестах, але із значним зменшенням при максимальних концентраціях (250 мкг / мл), що свідчило про пригнічення фагоцитарної реакції нейтрофілів (ФРН), що відображені в таблиці 1.

Пригнічення ФРН нами підтверджено при аналізі фагоцитарного числа (ФЧ) - це середня кількість поглинутих дріжджів, захоплених одним нейтрофілом, що відображено в таблиці 1. ФЧ при 30 хв. інкубації в контрольних і дослідних значеннях культури лейкоцитів до концентрації 120 мкг / мл були в межах $4,4 \pm 0,22$ - $4 \pm 0,2$, що відповідає їх фізіологічним значенням і тільки доза АГ МП 250 мкг / мл має місце зменшення ФЧ, як загальне пригнічення ФАН, знижується ФЧ і ФІ. В контрольних культурах лейкоцитів без АГ МП перетравлююча здатність була в фізіологічних значеннях. Так ФЧ зменшився з $4,4 \pm 0,22$ при 30 хв. інкубації до $3,43 \pm 0,17$ при 90 хв. інкубації. Зменшення на 22,04%, що вказує $p \leq 0,05$. Але в культурах клітин з додаванням АГ МП до концентрації 120 мкг / мл при 90 хв. інкубації ФЧ продовжує підвищуватися, що свідчить про пригнічення перетравлюючої здатності фагосомнейтрофілів. Ці данні співпадають з даними літератури, про наявність в МП антиферментних компонентів (антитрепсин, антипепсин). Пригнічення ФЧ в 90 хв. культурі з концентрації 250 мкг / мл, як наслідок загального пригнічення ФАН.

Таблиця 1 - Фагоцитарна активність нейтрофілів чотирьох донорів при 30 і 90 хв. інкубації під дією різної концентрації АГ МП

Час культивування	Показник	Дози антигенів медичної п'явки					
		0	20	40	80	120	250
30 хв	ФІ	65,65 ± 3,36	65 ± 3,37	70,12 ± 3,24	67,27 ± 3,32	67,3 ± 3,32	67,5 ± 3,3
	ФЧ	4,4 ± 0,22	4,19 ± 0,21 *	4,26 ± 0,21	4,22 ± 0,21	4 ± 0,2 *	2,97 ± 0,15 *
90 хв.	ФІ	74,1 ± 3,1	70,4 ± 3,23	76,3 ± 3,01	73,2 ± 3,13	71,9 ± 3,18	64,2 ± 3,39 *
	ФЧ	3,43 ± 0,17 **	5,04 ± 0,25 *, **	4,96 ± 0,25 *, **	4,73 ± 0,24 *, **	4,12 ± 0,21 *	2,65 ± 0,13 *, **

Примітки:

- * - показники достовірно відрізняються від контролю ($p \leq 0,05$).
- ** - показники достовірно відрізняються від 30 хв. інкубації ($p \leq 0,05$).

Одночасно з фагоцитарною реакцією нейтрофілів в культурах лейкоцитів з різним вмістом АГ МП аналізували імунологічну реактивність лімфоцитів цитоморфометричним методом (таблиця 2).

В інтактній крові варіації малих (< 6,0 мкм), середніх (7 - 9 мкм) і великих (> 10 мкм) цитоморфометричних класів лімфоцитів (ЦКЛ) в сумі співпадали з їх кількістю у донорів даного віку. В контрольних (без АГ МП) культурах лейкоцитів відбувалися значні зміни в співвідношенні ЦКЛ: різке збільшення малих і значне зменшення великих лімфоцитів. Згідно до представленої концепції функціонального значення ЦКЛ: (більшість малих і великих лімфоцитів відносяться до активованих тому їх зміни є наслідком їх імунологічної реактивності). Збільшення малих ЦКЛ - є наслідком апоптичної реакції середніх і великих лімфоцитів.

Малі (20 мкг / мл) і середні (40 - 80 мкг / мл) концентрації АГ МП демонстрували апоптичні і продуктивні імунологічні реакції, які проявляють зменшенням малих ЦКЛ зі збереженням великих лімфоцитів. Ця динаміка особливо демонстративна в культурах з концентрацією АГ МП 80 мкг/мл, де відбувалось достовірне зменшення малих ЦКЛ і підвищення середніх ЦКЛ – демонстрація продуктивного імуногенезу перехід частини малих ЦКЛ в середні ЦКЛ після АГ - активації і початкової реакції бласттрансформації лімфоцитів. Великі концентрації АГ МП (120-250 мкг / мл) індукували на лімфоцити апоптичними і цитотоксичними реакціям, які проявлялись різким збільшенням малих лімфоцитів за рахунок зменшення середніх лімфоцитів.

Заслугове уваги факт, що не тільки при малих і середніх концентраціях АГ МП, але і при великих концентраціях в культурі клітин зберігалась частина великих лімфоцитів. Збереження відповідного пула великих лімфоцитів свідчить про гетерогенність популяції лімфоцитів до факторів.

Таблиця 2 - Цитоморфометричні показники лімфоцитів при 30 хв. інкубації під дією різної концентрації АГ МП

Час культивування	Розмірність класів лімфоцитів, %	Дози антигенів медичної п'явки						
		інтакт	0	20	40	80	120	250
30 хв.	Малі КЛ ≤ 6 (<6,4)	18,25 \pm 3,86	39 \pm 4,88 *	35,75 \pm 4,79 *	37,5 \pm 4,84 *	28 \pm 4,49	48,75 \pm 5 *	54,66 \pm 4,98 *,**
	Середні КЛ 7-9 (6,5-9,4)	61 \pm 4,88	46,75 \pm 4,99 *	54 \pm 4,98	54,75 \pm 4,98	66,25 \pm 4,73 **	44 \pm 4,96 *	38,67 \pm 4,87 *
	Великі КЛ ≥ 10 (9,5<)	20,75 \pm 4,0	14,25 \pm 3,49	10,25 \pm 3,03 *	7,75 \pm 2,67 *	5,75 \pm 2,33 *	7,25 \pm 2,59 *	6,67 \pm 2,49 *
	Середній діаметр лімфоцитів, мкм	7,9 \pm 0,55	6,7 \pm 0,47	6,83 \pm 0,48	6,58 \pm 0,46	6,6 \pm 0,46	6,18 \pm 0,43 *	5,92 \pm 0,41*

Примітки:

- * - показники достовірно відрізняються від інтакту ($p \leq 0,05$).
- ** - показники достовірно відрізняються від контролю ($p \leq 0,05$).

ВИСНОВКИ

1. Пролонгована постановка фагоцитарної реакції нейтрофілів і цитоморфометричний метод аналізу розмірності класів лімфоцитів є інформативними тестами, які об'єктивно відображають стан імунокомпетентних клітин на момент обстеження.
2. Збільшення рівня малих лімфоцитів в контрольній культурі і при додаванні різної концентрації антигенів медичної п'явки свідчить про переважання апоптичних реакцій над продуктивними імуногенетичними. Про рівень останніх можна судити за наявністю великих лімфоцитів (імунобластів), які зберігаються і при великих концентраціях. Збереження продуктивного імуногенезу лімфоцитів ймовірно забезпечується цитокиновою підтримкою, яка реалізується при фагоцитарній реакції мікро- та макрофагів.
3. Зменшення малих і збільшення середніх лімфоцитів при дозі 80 мкг / мл можна розцінити, як імуногенетична реакція на фоні загального апоптозу.
4. Оптимальними дозами АГ МП для фагоцитарної реакції нейтрофілів і реактивності лімфоцитів є концентрації від 20 до 80 мкг / мл. Концентрації доз 120 – 250 мкг / мл є цитотоксичними.

ЛІТЕРАТУРА

1. Пухлик С. М. Назальные деконгестанты – за и против / С. М. Пухлик // Здоров'я України. – 2009. - №9/1. – С. 32-33.
2. Емельянов А. В. Эффективность и безопасность топических глюкокортикостероидов у больных с аллергическим ринитом / А. В. Емельянов, О. И. Краснощекова, Т. Е. Тренделева // Аллергология. – 1999. - №2. – С. 22-26.

3. Каменев О. Ю. Лечение пиявками – теория и практика гирудотерапии / О. Ю. Каменев, А. Ю. Барановский. – СПб. : Весь, 2010. – 302 с.
4. Башкирцева Н. А. Лечимся пиявками / Нина Анатольевна Башкирцева. – СПб. : Крылов, 2008. – 128 с.
5. Proteins and peptides of the salivary gland secretion of medicinal leeches *Hirudo verbana*, *H. medicinalis*, and *H. orientalis* / I. P. Baskova, E. S. Kostjukova, M. A. Vlasova [et al.] // *Biochemistry*. – 2008. – Vol. 73, № 3. – P. 315 – 320.
6. Фролов О. К. Вплив біологічно активних речовин кільцеців на кількісні показники крові щурів / О. К. Фролов, Д. А. Лемешко // Тез. I Міжнародної інтернет-конференції молодих учених і студентів. – Запоріжжя, 23-25 жовтня, 2012. – с. 17
7. Гирудотерапия. Руководство для врачей / под ред. В. А. Савинова. – М. : ОАО Медицина, 2004. – 432 с.
8. Фролов О. К. Вплив біологічно активних речовин медичної п'явки на ізольовані зразки крові під час гірудотерапії / О. К. Фролов, В. В. Копійка, Є. Р. Федотов // *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. – 2010. № 3. – с. 36-41.
9. Пат. 80665 Україна, (51) МПК (2013.01), А61К 38/00 А61К 39/00. Спосіб отримання антигенів із медичної п'явки / Фролов О. К., Литвиненко Р. О., Копійка В. В., Федотов Є. Р.; власник Державний вищий навчальний заклад «Запорізький національний університет» Міністерства освіти і науки, молоді та спорту України. — № у 2012 13751; заявл. 03.12.2012; опубл. 10.06.2013, Бюл. № 11.
10. Фролов О. К. Основи імунології : навч. посіб. для студ. біологічного факультету денної та заочної форм навчання / О. К. Фролов В. В. Копійка, Є. Р. Федотов. – Запоріжжя: ЗНУ, 2007. – с. 11-12

REFERENCES

1. Pukhlik S. M. Nasal decongestants - Pros and Cons / S. M. Pukhlik // *Health Protection of Ukraine*. - 2009. - № 9/1. - P. 32-33.
2. Emelyanov A. V. Efficacy and safety of topical corticosteroids in patients with allergic rhinitis / A. V. Emelyanov, A. I. Krasnoschokova, T. E. Trendeleva // *Allergology*. - 1999. - № 2. – P. 22 - 26.
3. Kamenev O. J. Treatment with leeches - Theory and Practice hirudotherapy / O. Kamenev, A. J. Baranowski. - St. Petersburg. : All, 2010. – 302 p.
4. Bashkirtseva N. A. Lechimsya leeching / N. A. Bashkirtseva. - St. Petersburg. : Krylov, 2008. – P. 128.
5. Proteins and peptides of the salivary gland secretion of medicinal leeches *Hirudo verbana*, *H. medicinalis*, and *H. orientalis* / I. P. Baskova, E. S. Kostjukova, M. A. Vlasova // *Biochemistry*. – 2008. – Vol. 73, № 3. – P. 315 – 320.
6. Frolov A. K. Influence of biologically active substances kilchetsiv on quantitative indicators of rat blood / A. K. Frolov, D. A. Lemeshko // *Proc. And the Internet - conference of young scientists and studentov*. – Zaporozhye, 23-25 October 2012. - P. 17
7. Hirudotherapy. Guide for Physicians / edited by V. A. Savinov. - Moscow: JSC Medicine, 2004. – 432 p.

8. Frolov A.K. Effect of biologically active substances of the medicinal leech into isolated blood samples during hirudotherapy / A.K. Frolov, V.V. Kopeyka E.R. Fedotov // Experimental and clinical physiology. - 2010. № 3. - P. 36-41.
9. Pat. 80,665 Ukraine (51) IPC (2013.01), A61K 38/00 A61K 39/00. Method for antigens of the medicinal leech /Frolov A.K., Litvinenko R.O., KopeykaV. V. Fedotov E.R.; owner of the State university "Zaporizhzhya National University" of the Ministry of Education, Youth and Sports of Ukraine. - № u 2012 13751; appl. 03/12/2012; publ. 06.10.2013, Bull.Number 11.
- 10.Frolov A.K. Fundamentals of Immunology: teach. guidances. for students. Biology Faculty full-time and distance learning / O. K. Frolov V.V. Kopeyka, E. R. Fedotov. - Zaporozhye: News, 2007. - P.11-12

Рецензенти: Сирцов В.К., д.м.н., професор кафедри гістології, цитології та ембріології ЗДМУ;
Копійка В.В., к.б.н., доцент кафедри імунології та біохімії ЗНУ.