

УДК: 595.143:595.324:572.7:591.1

ВПЛИВ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН КУЛЬТУРАЛЬНОЇ ВОДИ З-ПІД МЕДИЧНОЇ П'ЯВКИ НА МОРФОМЕТРИЧНІ ТА ФІЗІОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ ДАФНІЙ

Фролов О. К., д. м. н., професор, Литвиненко Р. О., к.б.н., викладач,
Попазова О.О. магістрант

*Запорізький національний університет, Україна, 69600, Запоріжжя, вул. Жуковського, 66
a_frolov@ukr.net*

В статті проводився аналіз культуральної води з-під біотехнології медичної п'явки.

Мета - з'ясувати вплив екзогенних біологічно активних речовин медичної п'явки у тесті гострої летальної токсичності на життєздатність та зміну морфометричних показників *Daphnia magna* Straus.

Методи. В умовах експериментальних дослідженнях були вивчені екзогенні БАР культуральної води з-під МП, їх вплив на токсичність, морфометричні та фізіологічні показники дафній, 90 екземплярів.

Результати та висновки. Виявили гостру токсичну дію біотехнологічної води з-під медичної п'явки на дафній, через 96 год, яка складала 53,9%, виявили цитотоксичність культуральної води, вже починаючи на другу добу, а через 96 год – 60% загинулих. Впродовж культивування спостерігалися збільшення розмірів тіла в контрольних і дослідних зразках. Проте інтенсивність збільшення почала перевищувати їх аналоги вже через 24 години та посилювалась до кінця культивування, причина збільшення дослідних дафній, порівняно з контролем, свідчить про наявність стимулюючих речовин в біотехнологічній воді з-під медичної п'явки, їх екскрементів та мікробіоту, які можуть слугувати джерелом додаткового харчування, а також через пряму стимулюючу дію окремих сполук на метаболізм дафній.

Ключові слова: медична п'явка, біологічно активні речовини, біотестування, гостра токсичність.

ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ВОДЫ ИЗ-ПОД МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ НА МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ДАФНИИ

Фролов А. К., Литвиненко Р. А., Попазова Е. А.

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

В статье проводился анализ культуральной воды из-под биотехнологии медицинской пиявки.

Цель - выяснить влияние экзогенных биологически активных веществ медицинской пиявки в тесте острой летальной токсичности на жизнеспособность и изменение морфометрических показателей *Daphnia magna* Straus.

Методы. В условиях экспериментальных исследований были изучены экзогенные БАР культуральной воды из-под МП, их влияние на токсичность, морфометрические и физиологические показатели дафний, 90 экземпляров.

Результаты и выводы. Обнаружили острую токсическое действие биотехнологической воды из-под медицинской пиявки на дафний, через 96год, которая составляла 53,9%, обнаружили цитотоксичность культуральной воды, уже начиная на вторые сутки, а через 96 ч - 60% погибших. В течение культивирования наблюдались увеличение размеров тела в контрольных и опытных образцах. Однако интенсивность увеличения начала превышать их аналоги уже через 24 часа и усиливалась до конца культивирования. Причина увеличения исследовательских дафний по сравнению с контролем, свидетельствует о наличии стимулирующих веществ в биотехнологической воде из-под медицинской пиявки, их экскрементов и микробиоту, которые могут служить источником дополнительного питания, а также через прямое стимулирующее действие отдельных соединений на метаболізм дафній

Ключевые слова: медицинская пиявка, биологически активные вещества, биотестирование, острая токсичность.

THE INFLUENCE OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF BIOTECHNOLOGICAL WATER ON THE MORPHOMETRIC AND PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF DAPHNIA

Frolov A.K., Lytvynenko R. O., Popazova O.O.

Zaporizhzhya National University, Ukraine, 69600, Zaporizhzhya, Zhukovskogo Street 66.

Introduction. The basis of the hirudotherapy effect is saliva of leech which contains a large amount of biologically active substances (BAS), which facilitate to the normalization of the internal homeostasis. Together with saliva, it inputs into the body more than 150 biologically active enzymes. Extract of the saliva of the medicinal leech is very similar to antibiotics, but it shows no side effects [1, 2]. BAS of medicinal leech outflow into the water space in which they are contained, with other waste products: urine, guano, mucus and desquamated cuticle. The biotechnological water from the medicinal leech includes: blood proteins of the breadwinner, hirudin, enzymes (hyaluronidase, triglyceridase, elastase, apyrase), amino acids (tryptophan, glutamic acid, alanine, lysine, leucine, etc.), biogenic elements (potassium, sodium, phosphorus) and microelements (iodine, bromine, sulfur, selenium). The presence of these components shows the high biological value of biotechnological water from the medical leech. Medical leech is a part of the aquatic and terrestrial ecological biocenoses. The impact of the medicinal leech on biotic relationships of these biocenoses has not yet been sufficiently studied [3, 4].

Aim of the study. The aim of the research was studying of the influence of exogenous biologically active substances, which were derived from biotechnological water of medicinal leech in acute lethal toxicity test on changes in morphometric characteristics *Daphnia magna* Straus.

Material and methods. The object of the study were daphnids' (*Daphnia magna* Straus). The research materials were exogenous BAS of biotechnological water from the ML. The analysis of daphnids' viability was determined in the following intervals: after 24, 48, 72, 96 hours from the start of the experiment. The experiment lasted 5 days. Carried out test for acute toxicity, counted the number of live *Daphnia* and morphometric parameters (length and width). In each of the experimental and control samples were placed the volume 100 ml and 10 daphnids aged up to 24 hours

In control and experimental samples counted the number of live *Daphnia* and determined the arithmetic that used to calculate the number of deaths in daphnids' experiment regarding control (test parameter indicator of acute toxicity, toxicity index) [5,6]. Statistical analysis of the results was performed by calculating the arithmetic mean, error of arithmetic mean, standard deviation using software SPSS v.21,0. Probability of differences between averages were evaluated using non-parametric statistical methods such as Wilcoxon T-test.

Results. Indicator of acute toxicity of biotechnological water from the medicinal leech without dilution, compared with controls: to 13,4% after 24 hours, to 33,3% after 48 hours, to 43,3% after 72 hours and after 96 hours — can be observed at acute toxicity— 53,9%. Acute toxicity to *Daphnia* is displayed by the evident set that can be observed visually: mortality rates, behavioral reflex response, slowing the heart rate rhythm. Perhaps the high acute toxicity of cultural water from the MP can be explained by the influence of dose-dependent action of BAS high concentrations. In addition, the high concentration of BAS CW can suppress microbiota, which is required for viability [7, 8, 9].

The number of alive specimens of *Daphnia* in the culture water from the biotechnology medicinal leech

Time of cultivation, hours	Control, M±m	The biotechnological water of medicinal leech	
		M ± m	A, %
24	9,67 ± 0,333	8,33 ± 0,333*	13,4
48	10 ± 0	6,67 ± 0,333*	33,3
72	10 ± 0	5,67 ± 0,333**	43,3
96	8,33 ± 0,333	4,0 ± 0,577**	53,9 ^{AT}

Note: A – the number of dead in the daphnia experiment relative to control (a measure of acute toxicity), %; M – mean; m – standard error mean * – reliable differences compared to control at $p \leq 0,05$; ** – reliable differences compared to control at $p \leq 0,01$, AT – acute toxicity,

Resizing of *Daphnia* body in experimental samples may be due to the fact that during the early stages of cultivation *Daphnia* are fed by available in biotechnological water from the medicinal leech extra food, trophic part, because during the research both experimental and control groups were not fed; second, direct stimulating effect of medicinal leech BAS on the metabolism of tissue cells *Daphnia*, including in immunocompetent cells is the proof of positive therapeutic effects of hirudotherapy in humans and in animals [10,11].

The morphometric parameters of *Daphnia*

hours	Control			Experiment		
	Length	Width	Tail	Length	Width	Tail
0	1,02 ± 0,02	0,56 ± 0,02	0,37 ± 0,01			
24	1,18 ± 0,05	0,63 ± 0,03	0,33 ± 0,03	1,27 ± 0,02	0,67 ± 0,03	0,34 ± 0,02
48	1,28 ± 0,04	0,66 ± 0,02	0,33 ± 0,03	1,42 ± 0,03*	0,78 ± 0,02*	0,36 ± 0,03
72	1,33 ± 0,04	0,67 ± 0,02	0,34 ± 0,01	1,46 ± 0,03*	0,81 ± 0,02**	0,35 ± 0,01
96	1,36 ± 0,03	0,74 ± 0,06	0,33 ± 0,02	1,53 ± 0,03**	0,87 ± 0,02**	0,4 ± 0,03

Note: * – reliable differences compared to control at $p \leq 0,05$; ** – reliable differences compared to control at $p \leq 0,01$.

Conclusions.

1. It was revealed, the acute toxic effects of biotechnological water from the medicinal leech on *Daphnia*. At the end of the first day (24 hours) is 13,4%, to 33,3% after 48 hours, to 43,3% after 72 hours and after 96 hours — can be observed at acute toxicity— 53,9%.
2. Showed cytotoxicity in culture, beginning on the second day, and after 96 hours - 60% mortality
3. During cultivation observed increase in body size as in control samples and in experimental. Indicates the presence of stimulating substances in biotechnological water from the ML, and substances that can serve as an additional source of food.
4. The cytotoxic effects of culture water from the medicinal leech were caused mortality in daphnids' manifested through the direct action of the individual components in the metabolism of cells and indirectly - through bacteriostatic effect on symbionts, thus negatively affecting from daphnids'

Key words: medical leech, biologically active substances, biological testing, acute toxicity.

ВСТУП

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 [1]. Екстракт слини медичної п'явки багато в чому подібний до антибіотиків, але не виявляє побічних ефектів. БАР медичної п'явки виділяються у водне середовище, в якому вони містяться, разом із іншими продуктами життєдіяльності: гуано, слиз, сеча та злучені залишки кутикули [2] До складу біотехнологічної води з-під медичної п'явки входять: білки крові годувальника, гірудин, ферменти (гіалуронідаза, еластаза), амінокислоти (триптофан, аланін, лізин, лейцин та ін.), біогенні елементи (калій, натрій, фосфор) та мікроелементи (бром, йод, селен). Наявність даних компонентів свідчить про високу біологічну цінність біотехнологічної води з-під медичної п'явки. [3, 4].

Медична п'явка входить до складу водного і наземного біоценозу. Вплив медичної п'явки на біотичні зв'язки в цих біоценозах ще не досить вивчений. Тому метою мого подальшого дослідження було дослідити вплив біологічно активних речовин біотехнологічної води з-під п'явок в штучних екосистемах на прикладі *Daphnia magna Straus*.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Експериментальні дослідження проводили на базі навчально-науково-дослідної лабораторії клітинної та організмової біотехнології біологічного факультету Запорізького національного університету (зав. лаб. д. м. н., професор Фролов О. К.). Об'єктом дослідження були дафнії (*Daphnia magna Straus*). Матеріалом дослідження були екзогенні БАР культуральної води з-під МП.

Для дослідження використовували: воду з централізованої мережі водопостачання, дехлоровану шляхом тридобового відстоювання (контроль); біотехнологічну воду після культивування

п'явок виду *Herudo Verbana*. Дослід ставили в трьох повторах, температура аналізованих проб становила 20 ± 2 °С, концентрація кисню напочатку тестування — не менше 6 мг/дм³ [5, 6].

Дафній було отримано методом ациклічного партеногенезу щонайменше в третьому поколінні. Вихідну популяцію дафній годували раз на добу — суспензією зелених водоростей (хлорели — *Chlorella vulgaris Beijer*), вирощених на 10% середовищі Тамія, і раз на тиждень — суспензією пекарських дріжджів. В дослідних пробах визначали гостру токсичну дію відібраних зразків, процедура біотестування тривала 96 годин. Аналіз життєздатності дафній проводили в наступні проміжки часу: через, 24, 48, 72, 96 годин від початку експерименту. Близько 30 дафній с вивідними камерами брались для закладки, а на наступний день відсажували новонароджених в воду медичної п'явки по 10 дафній в кожному банку для досліду та контролю. Дослід тривав 5 днів. Для порівняння брали контроль, тобто дафній поміщали у звичайну відстоювану воду. Також порівнювали з контролями всі зразки, а саме порівнювалась довжина та ширина дафній, як саме впливає вода з-під медичної п'явки. У кожному з дослідних і контрольних проб об'ємом 100 мл вміщували по 10 екземплярів дафній віком до 24 годин, яких годували за 2 – 3 години до початку тестування.

У контрольних та дослідних зразках підраховували кількість живих дафній та визначали середні арифметичні, які використовували для розрахунку кількості загиблих дафній у досліді відносно контролю (тест-параметр, показник гострої токсичності, індекс токсичності) за формулою:

$$A=(X_k - X_d) \times 100 / X_k, \%$$

де: А — кількість загиблих дафній у досліді відносно контролю (індекс токсичності), %; X_k — середнє арифметичне кількості живих дафній у контролі, екземпляри; X_d — середнє арифметичне кількості живих дафній у досліді, екземпляри. Похибка паралельних вимірювань коливалася в межах 5 – 10%. Проби води вважались такими, що мають гостру летальну токсичність, якщо показник А становив 50% і більше. [2, 3].

Статистичну обробку експериментальних даних проводили за допомогою пакету прикладних програм SPSS v. 21,0, використовували непараметричні методи статистики, а саме Т-критерій Вілкоксона.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На початку та після експерименту в досліджуваних пробах визначали: водневий показник (рН) та вміст розчиненого кисню, які на початку досліду становили в контрольних зразках: рН 7,3, кисень — 8,5 мг/дм³, в дослідних: рН 8,1, кисень — 7,1 мг/дм³; в кінці експерименту: в контрольних зразках: рН 7,6, кисень — 8,2 мг/дм³, в дослідних: рН 8,0, кисень — 6,6 мг/дм³ [8, 7]. Тестування вважається коректним, так як отримані показники підпорядковуються вимогам методики. Спостерігалось зменшення кількості живих екземплярів в дослідних зразках в порівнянні з контрольними, що відбувалось вже через 24 години та продовжилось до 96 години та достовірно відрізнялась ($p \leq 0,05$; 0,01). За результати визначення гострої токсичності біотехнологічної води з-під медичної п'явки на нижчих ракоподібних (*D. magna Straus*) можна зробити узагальнення у вигляді таблиці 1. Відповідно, показник гострої токсичності біотехнологічної води з-під медичної п'явки порівняно з контролем, вже на перший день досліду (24 години) становить 13,4%, на другий день (48 годин) вже зростає він становить 33,3%, через 72 години — 43,3%, а через 96 годин — відмічається гостра токсичність — 53,9,0%.

Гостра токсичність при тестуванні біотехнологічної води з-під медичної п'явки без розведення становила понад 50%, відповідно до методики, проводили кількісну оцінку токсичності біотехнологічної води у розведенні 1 : 3 (біотехнологічна вода : відстоювана

водопровідна вода). При такому розведенні спостерігалась мінімальна летальна токсичність, при цьому розведенні дафнії виглядали жвавими та здоровими, порівняно з контролем, що, можливо, вказує на стимулюючу дію токсикантів у низьких концентраціях [7].

Таблиця 1. Кількість живих екземплярів *Daphnia magna* Straus в культуральній воді з-під біотехнології медичної п'явки

Термін культивування, години	Контроль, 3повтори M ± m	Культуральна вода при біотехнології медичної п'явки, 3 повтори	
		M ± m	A, %
24	9,67 ± 0,333	8,33 ± 0,333*	13,4
48	10 ± 0	6,67 ± 0,333*	33,3
72	10 ± 0	5,67 ± 0,333**	43,3
96	8,33 ± 0,333	4,0 ± 0,577**	53,9 ^{ТГ}

Примітки: А — кількість загинувших у досліді дафній відносно контролю (показник гострої токсичності), %; * — відмінності достовірні, порівняно з контролем, при $p \leq 0,05$; ** — відмінності достовірні, порівняно з контролем, при $p \leq 0,01$; ТГ — результат визначення — гостра токсичність; М — середнє значення; m — стандартна статистична похибка.

Гострий токсичний ефект у дафній проявляється сукупністю проявів, що можна спостерігати візуально: показники летальності (осідання на дно посуду, судоми, іммобілізація, смерть), рефлекторно-поведінкові реакції (обертання навколо своєї осі, невпорядковані рухи), сповільнення частоти серцевого ритму. Імовірно висока гостра токсичність культуральної води з-під МП можна пояснити дозозалежною дією БАР високих концентрацій. Окрім того, висока концентрація БАР КВ може пригнічувати мікробіоту, що необхідна для життєздатності.

Морфологічні ознаки дафній після біотестування фіксували під мікроскопом, використовували скельця з лунками. Наприкінці біотестування (через 96 годин) для морфологічного дослідження було доступно: 37 із 40 дафній, 24 із 40 дафній, які культивувались у біотехнологічній воді з-під п'явок. В дослідних пробах порівняно з контролем візуально було помітні відмінності в розмірах, руховій активності тест-організмів, тому окрім показника гострої токсичності, аналізували морфологічні ознаки дафній: розміри тіла (довжина, ширина, мм), рухову активність, наявність їжі. Вже через дві доби біотестування було виявлено збільшення розмірів дафній у дослідних пробах.

В таблиці 2. наведені загальні результати всіх днів досліджень. Тому можна сказати, що тенденція до збільшення морфометричних показників почала посилюватись через 48 годин, збільшились довжини дафній та їх ширина досягала відмінностей в досліді в порівнянні з контролем. Напрямок росту розмірів посилювався через 72 години, в цей період довжина достовірно відрізнялась ($p \leq 0,05$), а ширина ($p \leq 0,01$) збільшення розмірів продовжилось і через 96 годин та зберігалась достовірною різниця як в довжині, так і ширині. Щодо довжини хвоста у дафній, то він коливався в незначних межах та різниця між контролем достовірно не встановлена.

Таблиця 2. Загальні морфометричні показники дафній

год	Показники контрольної групи			Показники дослідної групи		
	Довжина	Ширина	Хвіст	Довжина	Ширина	Хвіст
0	1,02 ± 0,02	0,56 ± 0,02	0,37 ± 0,01			
24	1,18 ± 0,05	0,63 ± 0,03	0,33 ± 0,03	1,27 ± 0,02	0,67 ± 0,03	0,34 ± 0,02
48	1,28 ± 0,04	0,66 ± 0,02	0,33 ± 0,03	1,42 ± 0,03*	0,78 ± 0,02*	0,36 ± 0,03
72	1,33 ± 0,04	0,67 ± 0,02	0,34 ± 0,01	1,46 ± 0,03*	0,81 ± 0,02**	0,35 ± 0,01
96	1,36 ± 0,03	0,74 ± 0,06	0,33 ± 0,02	1,53 ± 0,03**	0,87 ± 0,02**	0,4 ± 0,03

Примітки: - показники, що достовірно відрізняються від даних між контролем та дослідом одного дня при ($p \leq 0,05$) *, ($p \leq 0,01$) **

Зміна розмірів тіла дослідних зразків дафній може бути обумовлена тим, що на початкових етапах культивування дафнії харчуються наявним у біотехнологічній воді з-під медичної п'явки додатковим харчуванням, трофічною складовою (детритом, бактеріями, розчиненими органічними речовинами), адже слід зазначити, що на протязі експерименту ні дослідну, ні контрольну групу не годували; по-друге, прямим стимулюючим ефектом БАР медичної п'явки на метаболізм клітин тканин дафній, в тому числі й на імунокомпетентні клітини, що є доказом позитивної терапевтичної дії гірудотерапії у людини так і у тварин. Стимулюючий ефект БАР при підвищенні дози змінюється на інгібуючий, одночасно з цим спостерігається відмирання дафній. Також встановлено, що дозозалежна і пролонгована дія БАР змінюється гострою токсичністю, що також дозволяло гинути особинам. Токсичні ефекти, які реєструються методом біотестування, передбачають оцінку всіх інгредієнтів, що негативно впливають на фізіологічні, біохімічні та генетичні функції тест-організмів [10, 11]. Враховуючи багатокомпонентність впливу різноманітних речовин, які містяться в біотехнологічній воді з-під п'явки, важко розмірковувати про природу збільшення розміру дафній на етапах біотестування.

ВИСНОВКИ:

1. Виявлено гостру токсичну дію біотехнологічної води з-під медичної п'явки на дафній. На кінець першої доби досліді (24 години) становить 13,4% і в подальшому зростає, через 48 годин — 33,3%, через 72 години — 43,3%, а через 96 годин — відмічається гостра токсичність — 53,9%.
2. Цитотоксичність культуральної води, що виявлено через смертність частини дафній, починаючи на другу добу, так через 96 год — 60% загинилих.
3. Цитотоксичний ефект культуральної води з-під медичної п'явки, яка спричинила смертність на дафній проявлялась за рахунок прямої дії окремих компонентів на метаболізм клітин та опосередковано — через бактеріостатичну дію на симбіонтів, і тим самим негативно впливають на гілковусих рачків.
4. Впродовж культивування спостерігалися збільшення розмірів тіла як в контрольних зразках, так і в дослідних. Однак інтенсивність збільшення почала перевищувати їх аналоги вже через 24 години та посилювалась до кінця культивування.

ЛІТЕРАТУРА

1. Каменев О. Ю. Лечение пиявками – теория и практика гирудотерапии / О. Ю. Каменев, А.Ю. Барановский. – СПб. : Весь, 2010. – 302 с.
2. Башкирцева Н. А. Лечимся пиявками / Н. А. Башкирцева. – СПб. : Крылов, 2008. – 128 с.
3. Рассадина Е. В. Экологически обоснованная биотехнология воспроизводства *Hirudo medicinalis* L. в лабораторных условиях: Дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23, 03.00.16. Ульяновск. 2006. – 199 с.
4. Роит А. Основы иммунологии /А. Роит; [пер. сангл.Сметнев А.С].— М.: Мир.— 1991.-346 с.
5. Шуберт Р. Биоиндикация загрязнителей наземных экосистем / Под ред. Р. Шуберта. – М.: Мир, 1988. – 350 с.
6. Визначення гострої летальної токсичності на *Daphnia magna* Straus та *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg (Cladocera, Crustacea) (ISO 6341:1996, MOD) ДСТУ 4173:2003. [Чинний від 2004-01-01]. - К.: Держспоживстандарт України - 2004. – С. 13.
7. Гойстер О. С., Хмельницький Г. О. Взаємозв'язок метаболічної активності деяких водних організмів з умовами люмінесцентного екотоксикологічного біотестування // Біотехнологія. 2009. - Т. 2. -№ 1. - С. 35–45.
8. Абакумова В. А. Руководство по гидробиологическому мониторингу пресноводных экосистем / под ред. В. А. Абакумова. - СПб.: Гидрометеиздат, 1992. - 318 с.
9. Porshinsky B. S., Saha S., Grossman M. D., et al. Clinical uses of the medicinal leech: A practical review [serial online] // J. Postgrad. Med. - 2011. - Vol. 57. - P. 65-71.
10. Унифицированные методы исследования качества вод: б. Ч.3. – Методы биологического анализа вод. – 1983. – 356 с.
11. Frolov A. K., Kopeyka V. V., Fedotov E. R., Litvinenko R. A. Influence of biologically active substances of medicinal leech on opportunistic and saprophytic microflora // European Science and Technology: materials of the III international research and practice conference. Munich. Publishing office Vela Verlag Waldkraiburg–Munich–Germany, 2012. - Vol. II. - P. 570-575.

REFERENCES

1. Kamenev O. U. Lechenie piyavkami – teoriya i praktika girydoterapii / O. U. Kamenev, A.U. Baranovskii. – SPb. : Ves, 2010. – 302 s.
2. Bashkirceva N. A. Lechimsya piyavkami / N. A. Bashkirceva. – SPb. : Krilov, 2008. – 128 s.
3. Rassadina E. V. Ekologicheskii obosnovannaya biotehnologiya vosproizvodstva *Hirudo medicinalis* L. v laboratornih usloviyah: Dis. ... kand. biol. nayk: 03.00.23, 03.00.16. Ylyanovsk. 2006. – 199 s.
4. Roit A. Osnovi immynologii /A. Roit; [per. sangl.Smetnev A.S].— M.: Mir.— 1991.-346 s.
5. Shybert R. Bioindikaciya zagryaznitelei nazemnih ekosistem / Pod red. R. Shyberta. – M.: Mir, 1988. – 350 s.
6. Vznachennya gostroї letalnoї toksichnosti na *Daphnia magna* Straus ta *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg (Cladocera, Crustacea) (ISO 6341:1996, MOD) DSTY 4173:2003. [Chinnii vid 2004-01-01]. - K.: Derjspoivstandart Ykraїni, 2004. – S. 13.

7. Goister O. S., Hmelnickii G. O. Vzaemozv'yazok metabolichnoï aktivnosti deyakih vodnih organizmiv z umovami luminescentnogo ekotoksikologichnogo biotestyvannya // Biotehnologiya. 2009. - T. 2. -№ 1. - S. 35–45.
8. Abakymova V. A. Rykovodstvo po gidrobiologicheskomy monitoringy presnovodnih ekosistem / pod red.. V. A. Abakymova. - SPb.: Gidrometeoizdat, 1992. - 318 s.
9. Porshinsky B. S., Saha S., Grossman M. D., et al. Clinical uses of the medicinal leech: A practical review [serial online] // J. Postgrad. Med. - 2011. -Vol. 57.- P. 65-71.
10. Ynificirovanniie metodi issledovaniya kachestva vod: b. Ch.Z. – Metodi biologicheskogo analiza vod. – 1983. – 356 s.
11. Frolov A. K., Kopeyka V. V., Fedotov E. R., Litvinenko R. A. Influence of biologically active substances of medicinal leech on opportunistic and saprophytic microflora // European Science and Technology: materials of the III international research and practice conference. Munich. Publishing office Vela Verlag Waldkraiburg–Munich–Germany, 2012. - Vol. II. - P. 570-575

Рецензенти: Сирцов В.К., д.м.н., професор, зав. каф. гістології, цитології та ембріології ЗДМУ;
Копійка В.В., к.б.н., доцент кафедри фізіології, імунології і біохімії з курсом цивільного захисту та медицини ЗНУ.