

УДК 628: 595.143.6
DOI <https://doi.org/10.26661/2410-0943-2022-1-01>

Вплив «Coral-Mine» на життєздатність та розведення медичних п'явок (*Hirudo verbana* та *Hirudo orientalis*)

Амінов Р. Ф.

Запорізький національний університет

ORCID: 0000-0002-8471-1525

91_amin_91@ukr.net

Ключові слова: *Coral-mine*,
медичні п'явки, *Hirudo*
verbana, *Hirudo orientalis*.

«Coral-Mine» – це порошок, який отримують із глибоководних коралів склерактиній. Він містить комплекс мінеральних солей, кальцій, магній, калій, натрій, залізо, фосфор, сірка, кремній, хром, цинк, марганець та багато інших елементів. Здатний змінювати фізико-хімічні властивості води до лужної, адсорбувати токсичні речовини. Інтенсивне його використання може негативно вплинути на організм тварин. Оскільки не всі живі організми швидко адаптуються до будь-яких змін фізико-хімічного складу води. До них відносяться і медичні п'явки, які чутливі до будь-яких коливань в навколишньому середовищі, особливо у воді. Тому стало актуально проаналізувати, як «Coral-Mine» буде впливати упродовж тривалого часу на життєдіяльність та репродуктивну здатність п'явок. В експерименті було залучені 2-3 річні медичні п'явки двох видів: 300 МП аптечного виду (*Hirudo verbana* Carena, 1820) та 200 східного (*Hirudo orientalis* Utevsky & Trontelj, 2005). Проводилися 2 серії дослідів: 1 – з постійним знаходженням порошку «Coral-Mine» з тваринами; 2 – знаходження тварин після годинного очищення проточної води порошком «Coral-Mine». Отримані показники порівнювали з контрольними групами тварин, які знаходилися у проточній відстояній воді. У тварин упродовж цього часу фіксували смертність, поведінку, репродуктивну здатність, появу поясів плодючості, процес копуляції, відкладання коконів, фертильність і дефекти коконів та нитчаток. Застосування порошку «Coral-Mine» негативно впливає на життєдіяльність, репродуктивну здатність та імунну систему обох видів медичних п'явок: *Hirudo verbana* та *Hirudo orientalis*. Спостерігається значна смертність, поява дефектів на тілі у вигляді перетяжок, інтенсивне випльовування з'їденої крові, відкладання більшої частини не фертильних і дефектних коконів та нитчаток.

Ключові слова: *Coral-mine*, медичні п'явки, *Hirudo verbana*, *Hirudo orientalis*.

The influence of «Coral-Mine» on the viability and breeding of medicinal leeches (*Hirudo verbana* and *Hirudo orientalis*)

Aminov R. F.

Zaporizhia National University

ORCID: 0000-0002-8471-1525

91_amin_91@ukr.net

Key words: *Coral-mine*,
medicinal leeches, *Hirudo*
verbana, *Hirudo orientalis*.

“Coral-Mine” is a powder obtained from deep-sea scleractinium corals. It contains a complex of mineral salts, calcium, magnesium, potassium, sodium, iron, phosphorus, sulfur, silicon, chromium, zinc, manganese and many other elements. “Coral-Mine” powder can change the physical and chemical properties of water to slightly alkaline and adsorb toxic substances. Its intensive use may be a harm for animal, as not all living organisms can quickly adapt to changes of water quality. Medical leeches are highly sensitive to environmental fluctuations, especially to the water quality. Therefore, it became relevant to analyze how “Coral-Mine» will affect the vital activity and reproductive capacity of leeches over a long time. In our experiment, 2-3 year old medical leeches of two species were used: 300 individuals of *Hirudo verbana* Carena, 1820 and 200 of *Hirudo orientalis* Utevsky & Trontelj, 2005. Two series of experiments were conducted. In the first test, constant exposure of “Coral-Mine” powder to animals was used; in the second one, animals were kept in the running water after water exposure in an Coral-Mine powder during one hour. The obtained vital indicators of leeches used in the experiment were compared with control groups kept in flowing settled water. The following features were evaluated during the experiment: mortality, behaviour, reproductive capacity of the leeches, the appearance of fertility zones, the process of copulation, laying of cocoons, fertility and defects of cocoons and filaments. The use of “Coral-Mine” powder negatively affects the vital activity, reproductive capacity and immune system of both species of medical leeches: *Hirudo verbana* and *Hirudo orientalis*. The powder significantly increases the mortality rate of leeches, the appearance of defects on the body in the form of stretch marks, the intensity of spitting of eaten blood, the non-fertile and defective cocoons, and filaments.

Key words: *Coral-mine*, *medicinal leeches*, *Hirudo verbana*, *Hirudo orientalis*.

Вступ

«Coral-Mine» – це продукт, який отримують із глибоководних коралів склерактиній і виробляється в Японії¹⁻⁴. 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. Подрібнені корали не розчинні у воді, але під час взаємодії з нею здатні змінювати фізико-хімічні властивості води (збільшення Рh до лужної та електропровідності)¹⁻⁴. Ефективність застосування коралів у воді, в більшості стосується саме адсорбуванню токсичних продуктів. Їхнє масивне використання також може і нашкодити живому організму^{1,2,5,6}. Оскільки не всі живі організми швидко адаптуються до змін фізико-хімічного складу води. Наприклад, медичні п'явки (МП), які є дуже чутливі до до зміни якості водного середовища^{7,8}. МП – це ектопаразитарні тварини, яких широко

використовують у ветеринарії та медицині⁹⁻¹⁵. Оскільки в їхньому організмі знаходиться більше 100 біологічно активних речовин, які володіють широким спектром терапевтичних ефектів⁹⁻¹⁵. 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 речовинами⁷⁻⁹. Наприклад, наявність у воді інсектицидів: дихлордифенілтрихлорметилметану, хлордану, дінексу¹⁶; пестицидів, нітратів та фосфорних добрив¹⁷; цинку, міді, паладію та кадмію¹⁸⁻²¹; сприяють зміні поведінкових реакцій та зростанню смертності МП^{16,18-21}. 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)^{9,15}. Також, слід відмітити, що заміна водного середовища де утримуються МП

потребує кожні 3-4 доби^{9,15}. Якщо не дотримуватися завчасній заміні водного середовища МП, то починає зростати їхня смертність^{9,15}. У більшості випадків на біофабриках та біофермах для утримання та розведення МП, використовують відстояну проточну воду^{9,15}, яка також може мати різний фізико-хімічний склад та впливати по різному 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** стало дослідження тривалого впливу «Coral-Mine» на життєздатність та подальшу репродуктивну здатність МП.

Матеріали та методи досліджень

У дослідженнях використовували, пакетований кораловий порошок «Coral-Mine», Виробник: Japan^{1,2,5}. В експерименті було задіяні 2-3 річних медичних п'явок двох видів: 300 МП аптечного виду (*Hirudo verbana* Carena, 1820) та 200 МП східного виду (*Hirudo orientalis* Utevsky & Trontelj, 2005), вирощених на базі навчально-науково-дослідної лабораторії клітинної та організмової 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.)^{9,15}.

Схема дослідження. 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 яких знаходилися у проточній відстояній воді, яка змінювалася 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, появу перетяжок на тілі поведінкові реакції, репродуктивну здатність (появу поясів плодючості, процес копуляції, відкладання коконів, фертильність і дефекти коконів та нитчаток).

Маніпуляції із тваринами проводилися із дотриманням усіх регламентованих норм і правил поводження з лабораторними тваринами: принципів біоетики, законодавчих норм та вимог,

Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження», Порядком проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах, Положення про Комітет з питань етики (біоетики)^{22,24}.

Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням параметричних статистичних методів (тест Хі-квадрат з використанням бутстреп підходу, тест Стьюдента), за допомогою пакету прикладних програм Microsoft XP «Excel» та Past 4.03. Відмінності вважали достовірними при рівні значимості $p < 0,05$.

Результати

У обох серіях дослідів порівняно з контрольними групами тварин спостерігається 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 дослідів, де дана речовина знаходилася разом із тваринами (в середньому *Hirudo verbana* смертність зросла у 6 разів та *Hirudo orientalis* у 3 рази $p \leq 0,05$) табл. 1. У другій серії дослідів гибель тварин спостерігалася у меншій мірі (в середньому *Hirudo verbana* та *Hirudo orientalis* збільшено в 3 рази $p \leq 0,05$).

Форми тіла МП, які загинули в перші тижні дослідів у більшості були без видимих дефектів табл. 1, але через півроку у виживших МП з'являлися дефекти форми тіла у вигляді перетяжок: у першій серії дослідів в середньому *Hirudo verbana* та *Hirudo orientalis* збільшено появу перетяжок у 6 разів у порівнянні з контрольними групами $p \leq 0,05$. У другій серії дослідів появу перетяжок збільшено у середньому *Hirudo verbana* та *Hirudo orientalis* в 4 рази ($p \leq 0,05$) табл. 1.

Слід відмітити, що виживші МП відклали більшість коконів не фертильні та з дефектами. У першій серії дослідів відкладання не фертильних коконів у середньому *Hirudo verbana* та *Hirudo orientalis* збільшено в 8 разів $p \leq 0,05$. У другій серії дослідів в середньому *Hirudo verbana* та *Hirudo orientalis* збільшено в 5 разів у порівнянні з контрольними групами ($p \leq 0,05$) табл. 1.

Фертильні кокони, які мали все-таки нитчаток МП, частина з них гинула після першого годування кров'ю свійських тварин табл. 2. В середньому смертність зросла у *Hirudo verbana* та *Hirudo orientalis* у 2 рази в порівнянні з контрольною групою ($p \leq 0,05$) табл. 2. У більшості нитчаток МП після першого та наступних годувань з'являлися дефекти на тілі у вигляді перетяжок табл.2. У першій серії дослідів у середньому ці дефекти зросли у *Hirudo verbana* та *Hirudo orientalis* в 4 рази у порівнянні з контрольною ($p \leq 0,05$). У другій серії дослідів у середньому зросли у *Hirudo verbana* та *Hirudo orientalis* в 2 рази у порівнянні з контрольною групою ($p \leq 0,05$) табл. 2.

Таблиця 1 – Статевозрілі особини (матки) медичних п'явок *Hirudo verbana* та *Hirudo orientalis* за 2 роки, %

| Показники | Вид | | | | | |
|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|----------------------|----------------------|
| | <i>Hirudo verbana</i> | | | <i>Hirudo orientalis.</i> | | |
| | Контроль (n=100) | Дослід перший (n=100) | Дослід другий (n=100) | Контроль (n=70) | Дослід перший (n=65) | Дослід другий (n=65) |
| Смертність, % | 8,0 | 45,0 | 27,0 | 10,0 | 49,2 | 29,2 |
| p | - | 0,03* | 0,08 | - | 0,5 | 0,3 |
| Дефект на тілі (перетяжки), % | 4,0 | 26,0 | 15,0 | 4,3 | 27,7 | 16,9 |
| p | - | 0,2 | 0,03* | - | 0,2 | 0,01* |
| Інтенсивне випльовування з'їденої крові, % | 6,0 | 15,0 | 9,0 | 7,1 | 10,8 | 9,2 |
| p | - | 0,08 | 0,2 | - | 0,1 | 0,4 |
| Не фертильні та дефектні кокони, % | 5,0 | 37,0 | 20,0 | 5,7 | 40,0 | 29,2 |
| p | - | 0,01* | 0,4 | - | 1 | 0,02* |
| Загальний т-тест за чотирма ознаками (p) | - | 0,01* | 0,02* | - | 0,02* | 0,03* |

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

Таблиця 2 – Нитчатки медичних п'явок *Hirudo verbana* та *Hirudo orientalis*

| Показники | Вид | | | | | |
|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | <i>Hirudo verbana</i> | | | <i>Hirudo orientalis.</i> | | |
| | Контроль (n=100) | Дослід перший (n=100) | Дослід другий (n=100) | Контроль (n=100) | Дослід перший (n=100) | Дослід другий (n=100) |
| Смертність, % | 11,0 | 25,0 | 19,0 | 11,0 | 22,0 | 17,0 |
| p | - | 0,3 | 0,3 | - | 0,4 | 0,09 |
| Дефект на тілі (перетяжки), % | 9,0 | 33,0 | 18,0 | 9,0 | 35,0 | 20,0 |
| p | - | 0,006* | 0,6 | - | 0,005* | 0,5 |
| Інтенсивне випльовування з'їденої крові, % | 8,0 | 29,0 | 20,0 | 9,0 | 26,0 | 21,0 |
| p | - | 0,02* | 0,14 | - | 0,15 | 0,09 |
| Загальний т-тест за трьома ознаками (p) | - | 0,001* | 0,001* | - | 0,01* | 0,01* |

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

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.

Обговорення

«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^{1,2,6}. Відомо, що звичайна вода з порошком коралового кальцію змінює кислот-

но-лужний баланс у бік збільшення лужності: рН води збільшується до 9 залежно від концентрації розчину⁶. Окисно-відновний потенціал води зміщується в бік негативних показників, що є оптимальним показником для міжклітинних рідин, тканин організму тварин та людей. Порошок коралу є достатньо потужним сорбентом⁶. Доведено його позитивний вплив на ріст і розвиток кукурудзи та квасолі⁶.

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^{7,8}. Petrauskiene L. у своїх дослідженнях виявила зміну поведінкових реакцій МП (порушення рухливості, харчової активності, форми тіла, спроби вирватися із середовища) на забруднену воду важкими металами (цинк та мідь) та іншими токсикантами^{7,8,19}. 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 цинку¹⁸. У роботах Juliantara I.K.P. зі співавторами була доведена значна смертність МП у водоймах із наявними миючими засадами²¹. Згідно, отриманих експериментальних даних досліджень вищезгаданих учених можна пояснити прояв токсичності і «Coral-Mine» на МП у наших дослідках. Де у статевозрілих МП спостерігаються дефекти тіла у вигляді перетяжок, інтенсивне виділення з'їденої крові, зростання смертності.

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. 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 і іншими вченими^{15,25}.

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

Висновки

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

Первинні дані

Додаткова таблиця Д1. Первинні дослідницькі дані спостережень за медичними п'явками

Література

- (1) Корал Майн - опис продукту і його властивості. URL: <https://coralstatus.com/ua/products/coral-mine>
- (2) Coral Mine product description and its features. URL: <https://coralstatus.com/en/products/coral-mine>
- (3) 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.
- (4) 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. DOI: [https://doi.org/10.21272/eumj.2021;9\(1\):39-45](https://doi.org/10.21272/eumj.2021;9(1):39-45).
- (5) Погребенник, В.Д.; Цілінко, А.В. Вплив коралового кальцію на водневий показник та питому електропровідність питної води. URL: <http://ir.lib.vntu.edu.ua/bitstream/handle/123456789/18725/%D0%92%D0%BF%D0%BB%D0%B8%D0%B2%20%D0%BA%D0%BE%D1%80%D0%B0%D0%BB%D0%BE%D0%B2%D0%BE%D0%B3%D0%BE%20%D0%BA%D0%B0%D0%BB%D1%8C%D1%86%D1%96%D1%8E%20%D0%BD%D0%B0%20%D0%B2%D0%BE%D0%B4%D0%BD%D0%B5%D0%B2%D0%B8%D0%B9%20%D0%BF%D0%BE%D0%BA%D0%B0%D0%B7%D0%BD%D0%B8%D0%BA%20%D1%82%D0%B0%20%D0%BF%D0%B8%D1%82%D0%BE%D0%BC%D1%83.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- (6) Неведомська, Є.О. Вплив коралової води на живі організми. *International Scientific and Practical Conference "WORLD SCIENCE"* **2016**, 2(6), 3, 6-10.
- (7) Petrauskiene, L. Water and sediment toxicity assessment by use of behavioural responses of medicinal leeches. *Environ Int* **2003**, 28(8), 729-736. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0160-4120\(02\)00118-6](https://doi.org/10.1016/s0160-4120(02)00118-6).
- (8) Petrauskiene, L. The medicinal leech as a convenient tool for water toxicity assessment. *Environ Toxicol* **2004**, 19(4), 336-341. DOI: <https://doi.org/10.1002/tox.20039>.
- (9) Амінов, Р.Ф. Природний імуномодулятор із тіл медичних п'явок: отримання та застосування: монографія. – Запоріжжя : Запорізький національний університет, 2022. с. 11-35.
- (10) Curcio, A.; Lloyd, C.M. Leech me alone! Atraumatic hemarthrosis after hirudotherapy. *Cureus* **2020**, 12(2), e6915. DOI: <https://doi:10.7759/cureus.6915>
- (11) Akalin, Ç.; Ekmen, N. Non-occlusive mesenteric ischemia due to hirudotherapy: a case report. *Cureus* **2020**, 12(7), e9467. DOI: <https://doi:10.7759/cureus.9467>.
- (12) Sudhadevi, M. Leech therapy: A holistic treatment. *International Journal of Advance Research in Nursing* **2020**, 3(1), 130-132
- (13) Grafkskaia, E.N.; Nadezhdin, K.D.; Talyzina, I.A.; Polina, N.F.; Podgorny, O.V.; Pavlova, E.R. Medicinal leech antimicrobial peptides lacking toxicity represent a promising alternative strategy to combat

- antibiotic-resistant pathogens. *Eur J Med Chem* **2019**, *180*, 143-153. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.080>
- (14) 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.
- (15) 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.
- (16) Kimura, T.; Keegan, H.L. Toxicity of some insecticides and molluscicides for the asian blood sucking leech, *Hirudo nipponia whitman*. *American journal of tropical medicine and hygiene* 1966, *15*(1), 113–115. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1966.15.113>
- (17) Saglam, N. The effects of environmental factors on leeches. *Advances in Agriculture and Environmental Science* 2018, *1*(1), 1–3. DOI: <https://doi.org/10.30881/aaeoa.00001>.
- (18) 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. DOI: <https://doi.org/10.22392/actaquatr.874241>.
- (19) 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>.
- (20) 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. DOI: <https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v54.i5.60>.
- (21) Juliantara, 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.
- (22) Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження». URL: <http://zakon4.rada.gov.ua/laws/show/3447-15>.
- (23) Порядок проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах. Офіційний вісник України. Офіц. вид. (Нормативний документ Міністерства освіти, науки, молоді та спорту України. Наказ від 01.03.2012 № 249). URL: <https://ips.ligazakon.net/document/RE20729?an=1>
- (24) 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) URL: <http://www.mon.gov.ua/ua/activity/63/64/normativno-pravova-baza/>.
- (25) 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.