



Original Research Paper

Effect of various hosts' blood on the reproductive efficiency of the eastern leech (*Hirudo orientalis*)

Pegah Kalatehjari, Mohammad Sudagar *, Hamed Paknejad

Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Key Words

Hirudo orientalis
Fish blood
Cattle blood
Poultry blood
Reproductive efficiency

Abstract

Introduction: Providing a desirable food diversity for therapeutic leeches is inevitable with their widespread commercialization and geographic expansion of their cultivation. In this research, the growth, survival, reproduction, and reproductive efficiency (RE) rates of the eastern leech, *Hirudo orientalis*, fed by a diet based on aquatic (Fish), mammalian (Cattle), and poultry (Broiler) blood were investigated.

Materials & Methods: At first, required blood sources for feeding leeches and also determining blood biochemical parameters were obtained from slaughterhouses and a fish farm. A total number of 135 mature leeches with an average weight of 3.93 ± 0.06 were triplicate fed in three various groups (i.e., fish, cattle, and poultry blood). Gravid leeches after 30 days were individually transferred into containers containing the substrate (sphagnum moss) and water for laying cocoons. Then, collected cocoons were placed into the same substrate for one month. The RE was finally determine.

Results: Statistical analysis illustrated that leeches were equally interested in feeding on fish and cattle blood compared to poultry blood ($p < 0.05$). Leeches that fed with cattle blood had the lowest mortality, the highest number of cocooning leeches and collected cocoons, as well as the heaviest and largest cocoons. The leeches fed by poultry blood could record the highest relative production of cocoons, as well as the highest total reproduction ($p < 0.05$). Leeches fed by fish blood despite the less significant efficiency had no remarkable difference in the calculations of relative production of cocoons, larvae, and total reproduction with the two other groups.

Conclusion: Poultry blood can have almost the same effect on the RE as cattle blood. Despite the lower RE of fish blood, it is recommended to utilize it as a source of fresh and available blood, considering the storage facilitation of the limited fish number in the water resource of leech farm.

* Corresponding Author's email: sudagar_m@yahoo.com

Received: 1 February 2023; Reviewed: 2 March 2023; Revised: 5 May 2023; Accepted: 7 June 2023

(DOI): 10.22034/AEJ.2023.397274.2972

مقاله پژوهشی

اثر خون میزبان‌های متفاوت بر کارایی تولیدمثلی زالوی شرقی (*Hirudo orientalis*)

پگاه کلاته جاری، محمد سوداگر*، حامد پاک‌نژاد

گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

کلمات کلیدی

هیروود اورینتالیس
خون ماهی
خون گاو
خون مرغ
کارایی تولیدمثلی

چکیده

مقدمه: هم‌زمان با تجاری و فراگیر شدن جغرافیایی پرورش زالوهای طبی، لزوم به کارگیری تنوع غذایی مطلوب و کارا برای آن‌ها به امری مهم تبدیل شده است. در این پژوهش، میزان رشد، بقا، زادآوری و کارایی تولیدمثلی زالوی شرقی، هیروود اورینتالیس، تحت رژیم غذایی خون آبزیان (ماهی)، پستانداران (گاو) و طیور (مرغ) بررسی شد.

مواد و روش‌ها: منابع خونی لازم برای تغذیه زالوها و همچنین تعیین فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون (تعداد=۵)، از کشتارگاه‌ها و مزرعه پرورش ماهیان گرمابی تامین گردید. تعداد ۱۳۵ قطعه زالوی مولد با میانگین وزن $0.6 \pm 93/3$ گرم بعد از طی مراحل سازگاری، در سه گروه تغذیه‌ای (خون ماهی، گاو و مرغ) با سه تکرار تغذیه شدند. بعد از طی ۳۰ روز و اطمینان از رسیدگی جنسی مولدین و ثبت تلفات، زالوهای باقی‌مانده از هر گروه تغذیه‌ای، جهت کوکون‌گذاری، به صورت انفرادی به ظروف حاوی بستر (خزه اسفانگوم) و آب منتقل شدند. سپس کوکون‌ها جمع‌آوری شده و به مدت یک‌ماه در بستر یکسان نگه‌داری شدند. در نهایت کارایی تولیدمثلی با شمارش تعداد کوکون، لارو و همچنین محاسبه چند فراسنجه تولیدمثلی تعیین گردید.

نتایج: بررسی آماری نشان داد که زالوها علاقه یکسانی به تغذیه از خون ماهی و گاو در قیاس با خون مرغ داشتند ($p < 0.05$). کم‌ترین تلفات، بیش‌ترین تعداد زالوهای کوکون داده و همچنین بیش‌ترین تعداد کوکون استحصال، از مولدین حاضر از تیمار خون گاو ثبت شد. سنگین‌ترین و بزرگ‌ترین کوکون‌ها به تیمار تغذیه شده از خون گاو تعلق داشتند، در صورتی که تیمار همتایان تغذیه شده با خون مرغ آن‌ها، توانست بیش‌ترین تولید نسبی کوکون، همچنین بالاترین باروری کل لاروی را به ثبت برساند ($p < 0.05$). تیمار خون ماهی علی‌رغم کارایی کم‌تری که در بیش‌تر شاخص‌ها نسبت به دو گروه دیگر داشت ($p < 0.05$)، در محاسبات تولید نسبی کوکون، لارو و باروری کل اختلاف عددی بالایی با دو تیمار دیگر نداشت.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که خون مرغ می‌تواند اثر بازدهی تولیدمثلی تقریباً یکسانی با خون گاو داشته باشد. از سوی دیگر، برخلاف کارایی تولیدمثلی کم‌تر خون ماهی، به جهت سهولت نگه‌داری تعداد محدودی از آن‌ها در مخازن آبی کارگاه پرورش زالو، استفاده از آن به‌عنوان منبع خونی تازه و همیشه در دسترس توصیه می‌شود.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: sudagar_m@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۲ بهمن ۱۴۰۱؛ تاریخ داوری: ۱۱ اسفند ۱۴۰۱؛ تاریخ اصلاح: ۱۵ اردیبهشت ۱۴۰۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۷ خرداد ۱۴۰۲

(DOI): 10.22034/AEJ.2023.397274.2972

مقدمه

ضدالتهاب (هیروستاتین، اگلین، بدلین و مهارکننده تریپتاز)، ضد میکروبی (هیالورونیداز) که در پزشکی مدرن، بیوتکنولوژی و داروسازی کاربرد بسیار زیادی دارند، به خوبی شناخته و توصیف شده است (۱۴). با توجه به کاهش چشمگیر تعداد زالو در طبیعت و تقاضای روزافزون جهانی برای عرضه آن، پرورش زالو در کشورهای مختلف رونق بسیاری پیدا کرده است، به طوری که کشورهایی مانند روسیه، آلمان، ترکیه و فرانسه از جمله کشورهای هستند که در صنعت پرورش زالو سابقه چند دهه ساله دارند (۱). پرورش زالو در ایران نوپاست و تاکنون شکل صنعتی به خود نگرفته است. برای نخستین بار، شرایط تکثیر و پرورش گونه هیروود اورینتالیس، توسط Malek و همکاران، بهینه‌سازی و گزارش شد (۱۵). مطالعات نشان دادند که زالوهای طبی در زیستگاه‌های طبیعی خود از خون پستانداران، ماهی‌ها، خزندگان، پرندگان و دوزیستان تغذیه می‌کنند (۱۶، ۱۷). خون به عنوان یک منبع تغذیه‌ای سرشار از پروتئین‌های مختلف، چربی‌ها، ویتامین‌ها، آهن و عناصر ریزمغذی بوده که می‌توانند روی رشد و تولیدمثل زالو اثرگذار باشند. مطالعات کمی در ارتباط با چگونگی دستورالعمل تغذیه‌ای مشخص برای گونه‌های زالو به‌ویژه انواع طبی وجود دارند. جهت تغذیه زالو در شرایط پرورشی معمولاً از خون تازه گاو تهیه شده از کشتارگاه استفاده می‌شود (۱۸). اثربخشی خون بز نسبت به گوسفند (۱۹) هم‌چنین شتر نسبت به قورباغه (۲۰) بر رسیدگی جنسی، بازماندگی و میزان تولید کوکون در زالوی شرقی در مطالعات جداگانه به اثبات رسید. نتایج برآمده از مطالعه Taghavi Jelodar و همکاران، حاکی از آن بود که زالوها میل بیش‌تری به تغذیه از خون گاو نسبت به مرغ و قورباغه داشتند (۲۱). شکل کلی این روند در بررسی پارامترهای وزن و طول کوکون‌های به‌دست آمده از زالو اهلی تغذیه شده با منابع خونی مذکور، در میزان زادآوری، درصد بقا و درصد تغریخ مشاهده شد. Torabiyani و همکاران، اثر غذای خون جایگزین کازئین بر رشد، بقا و زادآوری زالوی هیروود اورینتالیس را بررسی نمودند (۲۲)؛ هم‌چنین اثر بسترهای محیطی متفاوت بر شرایط تولید مثلی و تلفات زالوی شرقی، در پژوهشی با عنوان "تأثیر دو محیط آب-خزه و خاک پیت ماس بر تعداد کوکون گذاری، وزن کوکون و تعداد تلفات"؛ توسط Bidmal و Sodagar انجام گرفت (۲۳). هم‌چنین بررسی راهبردهای اکولوژیکی ترجیحی زالوها در فرایند تولیدمثل، تحقیق نسبتاً جامعی بود که توسط Petruskienė و همکاران روی چندگونه‌های زالوهای طبی جنس هیروود، شامل هیروود و ربانا، هیروود مدیسینالیس و هیروود اورینتالیس انجام گرفت (۲۴). Ceylan و همکاران، بازدهی تولیدمثلی زالوی هیروود و ربانا را در شرایط کنترل شده مورد ارزیابی قرار دادند و اعلام نمودند که تضمین درصد بالای تکثیر تا حدود زیادی به وزن بالای اولیه مولدین بستگی دارد (۲۵). Ceylan و همکاران، کارایی تولیدمثلی زالوی صیدی (*Haemopsis sanguisuga*) جهت معرفی به عنوان منبع غذایی جایگزین، را بررسی

در طول تاریخ، جوامع انسانی جهت پیشگیری، درمان و بهبود سلامت خویش، آزمون و خطاهای گسترده‌ای را روی منابع طبیعی و محیطی در دسترس‌شان برای شناسایی ترکیبات مفید به انجام رسانیده‌اند، به طوری که تا بسیاری از عصاره‌های گیاهی، منابع حیوانی و دیگر موجودات را مناسب استفاده در پزشکی دانسته‌اند. به عنوان مثال استفاده از بی‌مهرگان که به طور معمول سهم ناچیزی از سبد غذایی‌شان را دارند، نقش پررنگی در طب سنتی بازی می‌کند (۱). یکی از جانورانی که نقش بسیار پررنگی در درمان خانگی بیماری‌های مختلف در تمدن‌های بشری سرتاسر جهان داشته است، زالو می‌باشد (۲). تاکنون گزارش‌های بسیاری در مورد اثر زالو درمانی بر بهبود حال مبتلایان به بیماری‌های مختلف گزارش شده است، که از آن جمله می‌توان به درمان سرطان (۳)، زخم پای دیابتی (۴)، زخم‌های پوستی (۵)، استئوآرتریت زانو (۶)، ماکروگلوسیا (۷)، بیماری‌های قلبی و عروقی (۸)، اختلالات پوستی (۹) و میگرن (۱۰) اشاره کرد. زالوها پراکنش بسیار گسترده جغرافیایی، در پهنه‌های آبی شامل: رودخانه، دریاچه، تالاب و دیگر آبگیرهای طبیعی جهان دارند. تنها حدود ۱۵ گونه از ۸۰۰ گونه زالویی که تا به حال شناسایی شده‌اند را می‌توان در ردیف گونه‌های موثر دارویی دسته‌بندی کرد (۱۱). بر اساس طبقه‌بندی، زالوهای دارویی در خانواده (*Hirudinidae*)، راسته *Arhynchobdellida*، زیرشاخه *Clitellata*، شاخه *Annelida* و دامنه (*domain*) یوکاریوت‌ها (*eukarya*) طبقه‌بندی می‌شوند. هیروود اورینتالیس، بی‌مهره‌ای خونخوار، با بدن بلند باریک و کمی استوانه‌ای شکل، پشت و شکم صاف، طول بدن ۹۰-۱۱۰ میلی‌متر، عرض بدن ۸-۱۰ میلی‌متر و دارای پنج جفت چشم است. پشت بدن به رنگ سبز چمنی، با دو نوار بسیار باریک نارنجی مایل به زرد است که بین آن‌ها با لکه‌های چهار گوش یا گرد سیاه احاطه شده و دارای نقاط راه‌راه نامنظم سیاه یا زرد روی شکم است. عدد کروموزوم آن ۱۲ می‌باشد. پراکنش آن‌ها عمدتاً در ایران، گرجستان و ازبکستان است (۱۱). جانورانی که از خون تغذیه می‌کنند، نیاز به رفع مشکل لخته شدن خون دارند. پروتئین‌های ضدانعقادی زالو، عموماً از سلول‌های بافت بزاقی ترشح می‌شوند که با اختلال در روند انعقاد خون در میزبان، به زالو اجازه می‌دهد تا به مدت نسبتاً طولانی تغذیه و هضم انجام دهد. زالوهای دارویی برای بلع و هضم خون میزبان، بیش از ۱۰۰ پروتئین و پپتید بزاقی را سنتز می‌کنند (۱۲، ۱۳). مولکول‌ها در طول تغذیه ترشح و مسیرهای فیزیولوژیکی درگیر در دفاع میزبان را هدف قرار می‌دهند. به عنوان مثال تاکنون ساختار و نقش ترکیباتی مانند: مهارکننده‌های کمپلمان، مهارکننده کربوکسی پپتیداز A، مسکن (کینیناز)، ضدانعقاد (هیرودین، دستایلاز، کالین، بازدارنده فاکتور Xa، ساراتین و آپیراز)،

گرفت. جداسازی سرم با سانتریفیوژ ۳۰۰۰ دور بر دقیقه برای خون ماهی (۱۰ دقیقه)، مرغ (۱۵ دقیقه) و گاو (۵ دقیقه) انجام گرفت (۲۹). نمونه‌های سرمی در دمای ۸۰- ذخیره شدند. محاسبات و اندازه‌گیری فراسنجه‌های خونی و بیوشیمیایی با پیروی از دستورالعمل‌های توصیه شده (۲۹) و کیت تشخیصی شرکت پارس آزمون انجام گرفت. شانس لخته شدن احتمالی خون‌های تغذیه‌ای، با به‌کارگیری حدود ۴ میلی‌لیتر هپارین سدیم که به‌میزان کم و آهسته به‌طرف حاوی خونی که پیوسته تکان داده می‌شد، از بین رفت. سپس خون‌ها بلافاصله با استفاده از یخچال قابل حمل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در طی حدود ۹۰ دقیقه به کارگاه منتقل شد. به جهت بهینه‌سازی شرایط تغذیه‌ای، خون‌های جمع‌آوری شده بعد از انتقال به کارگاه و جهت تغذیه نهایی به روده گاو وارد و توسط حمام آب گرم تا دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد گرم شدند. بعد از تغذیه، زالوها به‌مدت ۳۰ روز برای هضم نسبی غذا به گروه‌بندی‌های مذکور بازگردانده شدند. ارزیابی سلامت روزانه و تلفات احتمالی زالوها ثبت گردید. تعویض آب ۵۰ درصدی به‌صورت یک‌روز در میان انجام گرفت. برای اندازه‌گیری‌های مقرر در سراسر این آزمایش از کولیس دیجیتال با دقت ۱/۰ میلی‌متر و ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم (تعیین وزن) استفاده شد. تعیین وزن زالوها قبل و بعد از تغذیه صورت پذیرفت. بعد از ۳۰ روز و اطمینان از رسیدگی جنسی مولدین و ثبت تلفات، زالوهای باقی‌مانده از هر گروه تغذیه‌ای، با پیروی و اصلاح‌اندک‌روش کار مطالعه Manav و همکاران و هم‌چنین Petrauskienė (۲۸، ۲۹) در ظروف ۲ لیتر حاوی بستر (خزه اسفاگونوم) و آب که با توری پوشانده شده بودند (ممانعت از فرار زالوها)، با تراکم ۱ زالو قرار داده شدند. طی مدت دو ماهه کوکون‌گذاری، بررسی مداوم و هفتگی خزها به جهت جمع‌آوری پیلها صورت پذیرفت. کوکون‌های جمع‌آوری شده به‌مدت یک‌ماه (جهت خارج شدن لارو) در بستر یکسان خزهای با محیط قبلی، در شیشه‌های یک‌لیتری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. حفظ رطوبت که یکی از حیاتی‌ترین موارد نگهداری کوکون‌هاست، توسط اسپری مداوم آب در دوره‌های زمانی معین صورت پذیرفت. تعداد، وزن، طول و قطر کوکون به دقت بررسی و ثبت گردید. تعداد لاروهای برآمده از کوکون‌ها شمارش و میانگین آن‌ها ثبت گردید هم‌چنین پیل‌های حاوی لاروی که تخم‌گذاری طبیعی در آن‌ها صورت نگرفته بود، با دست باز شدند. با به‌کارگیری معادلاتی که در مطالعه Petrauskienė و همکاران، پیشنهاد شده بود چند فراسنجه تولیدمثلی شامل تعداد کل کوکون (تعداد کل کوکون‌های تولید شده در هر تیمار)، درصد بقا (تعداد زالوهای زنده/تعداد زالوهای اولیه هر تیمار $\times 100$)، تولید نسبی کوکون (تعداد کل کوکون در هر تیمار/تعداد زالوهای کوکون داده)، باروری کل (تعداد کل لاروهای تولیدی/تعداد کل زالوهای

نمودند. با تجاری شدن پرورش زالو و انتخاب روش‌های نیمه متراکم تا متراکم، اثر استرس ذاتی این انتخاب نمی‌تواند دور از ذهن باشد (۲۶). به‌همین جهت ارزیابی اثر تراکم مولدین بر میزان کارایی تولید مثلی زالوی جنوبی، هیروود و ربانا، توسط Ceylan و همکاران بررسی شد (۲۷). هم‌چنین بررسی مقایسه‌ای کارایی تولیدمثلی، میزان رشد و بقای گونه هیروود و ربانا تغذیه شده با خون گاو و طیور نشان داد که به‌طور کلی نوع منبع خونی، تاثیر متفاوت معنی‌داری بر رشد و بقای زالو نداشت، اما از نظر روند بارداری و بازدهی تولیدمثلی، زالوهای تغذیه شده با خون مرغ، برتری حدود ۲/۵ برابری نسبت به هم‌تایان تغذیه شده با خون گاو داشتند (۲۸). با توجه به مرور منابع ذکر شده در بالا، واضح است که بنابراین تحقیقات صورت گرفته بر روی تغذیه و رشد زالو خصوصاً با استفاده از خون طیور و ماهی علی‌رغم گستردگی بسیار بالایی که صنعت طیور و آبزیان در کشور ما دارند، در مقایسه با خون گاو تقریباً انجام نشده است این پژوهش با هدف پاسخگویی به این مسئله تمرکز یافت.

مواد و روش‌ها

به‌منظور به‌انجام رساندن اهداف این مطالعه، ۱۳۵ قطعه زالوی مولدگونه هیروود اورینتالیس از شرکت به‌گستران زیست‌بوم شاهرود خریداری و به مرکز تحقیقات آبی‌پروری شهید ناصر فضلی برآبادی در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل گردید. زالوها برای سپری نمودن دوره سازگاری، در ۹ ظرف ۱۰ لیتری که حاوی ۷ لیتر آب بدون کلر بودند، با تراکم ۱۵ زالو نگهداری شدند. به جهت شبیه‌سازی و بازنمایی شرایط طبیعی، دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد، هم‌چنین دوره تناوب نوری تحت رژیم ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در طی شبانه‌روز در نظر گرفته شد. فرآیند آزمایش با تقسیم زالوها در ۳ گروه تغذیه‌ای شامل خون ماهی (کپور معمولی *Cyprinus carpio*)، مرغ و گاو آغاز شد. خون لازم (حدود ۶۰۰ سی‌سی برای هر تیمار) برای تغذیه زالوها و هم‌چنین اندازه‌گیری فاکتورهای خونی از کشتارگاه‌های دام (۵ گاو)، طیور (۳۰ مرغ) و هم‌چنین مزرعه پرورش ماهیان گرمابی (۴۰ ماهی) مجاور شهرستان شاهرود و گرگان، تامین گردید. هم‌چنین خونگیری با استفاده از سرنگ غیرهپارینه برای سنجش فراسنجه‌های هماتولوژی و سرنگ غیرهپارینه به جهت سنجش شاخص‌های بیوشیمیایی شامل تعداد گلبول قرمز و سفید، هموگلوبین، هماتوکریت، پروتئین کل، هم‌چنین میزان گلوکز، تری‌گلیسیرید، کلسترول، کلسیم و فسفر، از کپورماهیان معمولی ۲ ساله، مرغ‌های گوشتی ۴۲ روزه و گاوهای کشتاری به‌ترتیب از سیاهرگ ساقه دمی ماهی، سیاهرگ بال مرغ و سیاهرگ و داج گاو در ۵ تکرار انجام

به زالوهای تغذیه شده با خون گاو بود، به طوری که درصد بقا در تیمارهای تغذیه شده با خون گاو، مرغ و ماهی به ترتیب ۹۷/۷۷، ۳۳/۹۳ و ۱۱/۹۱٪ به دست آمد. بررسی آماری نشان داد که زالوها علاقه یکسان معنی داری به تغذیه از خون ماهی و گاو در قیاس به خون مرغ داشتند ($p < 0.05$ ؛ جدول ۲). در این پژوهش بیشترین درصد فراوانی زالوهای کوکون داده از تیمار خون گاو با حدود نود درصد ثبت شد که به نسبت همتایان تغذیه شده با خون مرغ و ماهی میزان بیشتری بود. بیشترین تعداد کوکون استحصالی از مولدین حاضر از تیمار خون گاو ثبت شد، در حالی که تیمارهای ماهی و مرغ به ترتیب در رده دوم و سوم قرار گرفتند. کوکونهای تولید شده از زالوهای تیمار خون ماهی، متوسط وزن، قطر و طول، تولید نسبی لارو و متوسط وزن لاروی کمتری همراه با اختلاف معنی دار در مقایسه با تیمار خون گاو و مرغ داشتند ($p < 0.05$ ؛ جدول ۳). در مقابل کوکونهای تولیدی در تیمار خون گاو، بالاترین تعداد را دارا بودند. بیشترین تولید نسبی کوکون به ترتیب در زالوهای تغذیه شده با خون مرغ، گاو و ماهی مشاهده شد. کوکونهای حاصل از مولدین تغذیه شده با خون مرغ، تولید نسبی لارو بیشتری را نسبت به همتایان خود در گروههای تغذیه ای دیگر داشتند. نسبت تعداد کل لاروهای به دست آمده به تعداد کل مولدین اولیه (باروری کل) در تیمار زالوهای تغذیه شده با خون مرغ و گاو از بالاترین فراوانی برخوردار بود، به طوری که در قیاس با همتایان تغذیه شده با خون ماهی برتری محسوسی داشتند ($p < 0.05$ ؛ جدول ۲).

هر تیمار) و تولید نسبی لارو (تعداد کل لارو/تعداد کل کوکونها) محاسبه شد (۲۴).

بررسی آماری: از آنالیز واریانس یکطرفه گروهها (تیمارها) و مقایسه تفاوت در میانگین بین تیمارها استفاده شد. سپس مقایسه میانگینها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۲ (شیکاگو، ایلینویز، امریکا) انجام گرفت.

نتایج

اندازه گیری و شمارش فراسنجههای خونی نشان داد که تعداد گلبول قرمز در خون گاو حدود دو و چهار برابر بیشتر از خون مرغ و ماهی بود ($p < 0.05$ ؛ جدول ۱). همچنین خون ماهی بیشترین میانگین غلظت هموگلوبین و درصد هماتوکریت را دارا بود. بیشترین پروتئین کل از خون گاو و سپس خون مرغ و ماهی گزارش شد ($p < 0.05$ ؛ جدول ۱). بیشترین غلظت گلوکز به ترتیب در خون مرغ، ماهی و گاو تعیین شد. خون ماهی، مرغ و گاو به ترتیب حاوی بیشترین میزان کلسترول و تری گلیسرید بود. خون مرغ حاوی بیشترین میزان کلسیم بود در حالی که بالاترین میزان فسفر از خون ماهی گزارش شد ($p < 0.05$ ؛ جدول ۱). جداول ۲ و ۳ نتایج اثر متفاوت منابع تغذیه ای (خون ماهی، گاو و مرغ) بر کارایی تولیدمثلی و فراسنجههای تعریف شده را در گونه هیروود اورینتالیس نشان می دهد. یافته های به دست آمده از فراسنجههای مربوط به زالو مولد، لارو و کوکون به ترتیب و تفکیک در جداول ۲ و ۳ نشان داده شده اند. کمترین تلفات مربوط

جدول ۱: شاخصهای خونی و سرمی در خون ماهی کپور معمولی، گاو و مرغ (میانگین \pm انحراف معیار)

خون مرغ	خون گاو	خون ماهی	
$3/96 \pm 0/46^b$	$8/01 \pm 0/57^a$	$1/8 \pm 0/05^c$	10^6mm^3 گلبول قرمز
$10/02 \pm 0/23^b$	$9/62 \pm 0/09^a$	$11/19 \pm 0/18^a$	هموگلوبین g/dl
$37/20 \pm 0/83^b$	$36/4 \pm 1/51^b$	$41/8 \pm 0/44^a$	هماتوکریت %
$24/38 \pm 1/16^a$	$9/09 \pm 1/49^c$	$21/78 \pm 0/46^b$	10^3mm^3 گلبول سفید
$4/15 \pm 0/31^b$	$6/24 \pm 0/59^a$	$3/07 \pm 0/08^c$	پروتئین تام g/dl
$230/82 \pm 10/7^a$	$93/31 \pm 4/02^c$	$145/26 \pm 8/54^b$	گلوکز mg/dl
$128/43 \pm 11/4^b$	$55/80 \pm 8/52^c$	$163/79 \pm 10/68^a$	کلسترول mg/dl
$108/80 \pm 4/43^b$	$50/25 \pm 6/61^c$	$174/46 \pm 7/92^a$	تری گلیسرید mg/dl
$13/19 \pm 1/57^a$	$8/05 \pm 0/66^c$	$10/59 \pm 0/72^b$	کلسیم mg/dl
$2/02 \pm 0/12^b$	$2/57 \pm 0/18^b$	$13/35 \pm 2/15^a$	فسفر mg/dl

حروف معنی دار متفاوت در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی داری بین تیمارهای آزمایشی است ($p < 0.05$)

جدول ۲: فراسنجه‌های تولیدمثلی در مولدین و لاروهای زالوی شرقی، هیروود اورینتالیس تغذیه شده با خون ماهی کپور معمولی، گاو و مرغ (میانگین \pm انحراف معیار)

تیمار خون مرغ	تیمار خون گاو	تیمار خون ماهی	
۴۵	۴۵	۴۵	تعداد کل زالو مولد
۹۳/۳۳	۹۷/۷۷	۹۱/۱۱	درصد بقا
۳۸	۴۲	۳۵	تعداد زالوهای کوکون داده
۵۹۸	۵۸۱	۴۰۲	تعداد کل لارو
۱۳/۲۸	۱۲/۹۱	۸/۹۳	باروری کل (تعداد)
$۰/۰۳۶ \pm ۰/۰۱۱^a$	$۰/۰۳۶ \pm ۰/۰۰۹^a$	$۰/۰۳۵ \pm ۰/۰۰۴^a$	میانگین وزن لارو (گرم)
$۳/۹۰ \pm ۰/۰۴^a$	$۳/۹۷ \pm ۰/۳۰^a$	$۳/۹۴ \pm ۰/۳۳^a$	وزن زالوها قبل از تغذیه (گرم)
$۹/۰۱ \pm ۰/۳۶^b$	$۱۱/۴۳ \pm ۱/۰۸^a$	$۱۰/۷۸ \pm ۰/۵۹^a$	وزن زالوها بعد از تغذیه (گرم)

حروف معنی‌دار متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی است ($p < ۰/۰۵$)

جدول ۳: فراسنجه‌های تولیدمثلی مربوط به کوکون، در زالوی شرقی، هیروود اورینتالیس تغذیه شده با خون ماهی کپور معمولی، گاو و مرغ (میانگین \pm انحراف معیار)

تیمار خون مرغ	تیمار خون گاو	تیمار خون ماهی	
۹۵	۱۰۱	۷۶	تعداد کل کوکون
$۱۲/۷۵ \pm ۱/۰۶^a$	$۱۲/۹۷ \pm ۱/۱۶^a$	$۱۰/۱۳ \pm ۱/۰۴^b$	قطر (میلی‌متر)
$۲۰/۵۱ \pm ۲/۱۹^a$	$۲۰/۹۳ \pm ۲/۱۴^a$	$۱۵/۹۸ \pm ۱/۲۷^b$	طول (میلی‌متر)
$۱/۰۲ \pm ۰/۰۳^a$	$۱/۰۴ \pm ۰/۰۱^a$	$۰/۸۶ \pm ۰/۰۴^b$	وزن (گرم)
۲/۵۰	۲/۴۱	۲/۱۷	تولید نسبی کوکون
۶/۲۹	۵/۷۵	۵/۲۸	تولید نسبی لارو در ازای کوکون

حروف معنی‌دار متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی است ($p < ۰/۰۵$)

گاوها در مقابل هم‌تایان کروی شکل خود در پرندگان و هم‌چنین بیضی و بادامی شکل خود در ماهی کپور معمولی، باعث افزایش مساحت سطح آن‌ها در حجم برابر می‌شود که این امر را شاید بتوان در روند هضم و اثر آنزیم‌های دخیل در آن موثر دانست. هم‌چنین بعضی محققین میزان پروتئین کل منبع غذایی، که یکی از شاخص‌های احتمالی موثر بر کارایی تولیدمثلی زالوی طبی است را در خون گاو و مرغ به ترتیب تقریباً ۶/۶ و ۴ گرم بر دسی‌لیتر گزارش کرده‌اند (۲۸) که تا حدودی با نتایج این مطالعه که به ترتیب ۲۴/۶ و ۱۵/۴ بود، مطابقت داشت. ضمناً این فاکتور در خون ماهی (۳/۰۷ گرم بر دسی‌لیتر) اختلاف قابل ملاحظه‌ای با دیگر منابع خونی داشت. از سویی دیگر غلظت هموگلوبین، درصد هماتوکریت و غلظت فسفر در خون ماهی نسبت به دو منبع خونی دیگر بیش‌ترین بود. بررسی میزان گلوکز که امروزه به یکی از فاکتورهای مهم در بحث انرژی‌زایی منبع خونی تبدیل شده است (۳۴) نشان داد که خون مرغ با حدود تقریبی ۲۳۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر به‌طور چشمگیری از خون ماهی (۱۴۵ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) و گاو (۹۳ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)، از ذخایر گلوکزی بالاتری برخوردار بود. بالاتر بودن میزان گلوکز در ماهی‌ها و

بحث

خون مکیده شده که به‌واسطه ترکیبات ضدانعقادی مترشحه از غدد بزاقی، لخته نشده است مستقیماً به مری و معده و سپس روده برای هضم طولانی مدت فرستاده می‌شود (۳۰). در آنجا آنرومونات هیدروفیلا که یکی از مهم‌ترین باکتری‌های هم‌زیست زالو است فرایند هضم و تخریب گلبول قرمز را تسهیل می‌کند (۳۱) و در ادامه در روده هموگلوبین محلول و پروتئین به‌طور کامل جذب شده به جریان خون زالو وارد می‌شود. هم‌چنین بخش‌های فاقد پروتئین گلبول قرمز به شکل مدفوع از مخرج به بیرون هدایت می‌شود (۳۲). فاکتورهای بیوشیمیایی خون در رده‌های مختلف جانوری مانند: پرندگان، پستانداران و ماهی‌ها، متفاوت می‌باشد. به‌عنوان مثال محققان میانگین تقریبی تعداد گلبول قرمز در پستانداران را ۶۰ تا ۱۰۰ درصد بیش‌تر از پرندگان، و ۲ تا چند برابر بیش‌تر از ماهی‌ها دانسته‌اند (۲۹)، که این الگو تقریباً با نتایج این پژوهش مطابقت داشت. البته این امر می‌تواند به دلیل کوچک و بی‌هسته بودن این گلبول‌ها در پستانداران در مقایسه با دو رده دیگر باشد (۳۳). گلبول قرمز صفحه‌ای و قرصی شکل در

پرنندگان را بی ارتباط به نیازشان به انرژی زیاد برای تولید تخم، زرده و فرزندان فراوان ندانسته‌اند (۳۴). برتری میزان عددی میانگین گلوکز در خون مرغ به گاو در مطالعه‌ای که در ترکیه انجام گرفته، به اثبات رسیده است (۲۸). میزان تری‌گلیسرید، خون ماهی نسبت به مرغ و گاو بیش‌تر بود به طوری که با ثبت عددی تقریبی ۱۷۴ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر برای آن، حدود ۳ برابر نسبت به خون گاو و ۶۰ درصد بیش‌تر از خون مرغ بود. برتری عددی میزان تری‌گلیسرید خون مرغ نسبت به گاو در مطالعه Manav و همکاران، نیز گزارش شده است (۲۸). از سویی دیگر پیش‌ساز بودن کلسترول در تولید بسیاری از هورمون‌ها از جمله کورتیزول و هم‌چنین ویتامین D به اثبات رسیده است. بررسی نتایج میزان کلسترول نشان داد که خون ماهی، مرغ و گاو به ترتیب حاوی بیش‌ترین میزان کلسترول بودند که رتبه دوم و سوم خون مرغ و گاو می‌تواند متأثر از بالا بودن احتمالی میزان هورمون کورتیزول ناشی از استرس و ازدحام قبل از کشتار در آن‌ها باشد. Manav و همکاران، گزارش کردند که خون مرغ و گاو به ترتیب حاوی بیش‌ترین میزان کلسیم و فسفر بودند (۲۸) که نتایج با این مطالعه بدون در نظر گرفتن خون ماهی هم‌سو بود. بالاترین میزان فسفر از خون ماهی گزارش شد. با توجه به بدیهی بودن تفاوت انرژی منابع خونی تغذیه‌ای، زالوها کارایی رشد و تولیدمثلی متفاوتی را در مواجهه با آن‌ها پدیدار می‌سازند. Davies و McLoughlin سرعت رشد پایین‌تر در زالوهای گونه هیروود و ربانای تغذیه شده با خون دوزیستان در مقایسه با خون پستانداران را ناشی از سطح انرژی کم‌تر منبع خونی دانسته‌اند (۳۵). البته محققان در مطالعه‌ای دیگر اثر متفاوت معنی‌داری بر رشد زالوهای تغذیه شده با خون گاو و مرغ را مشاهده نکردند (۲۸). با توجه به به‌کارگیری زالوهای مولد در این تحقیق، تلفات بعد از تغذیه در مولدین بسیار ناچیز بود، به طوری که درصد بقا در هر ۳ تیمار بالای ۹۱٪ ثبت شد، که با نتایج Ceylan و همکاران (۲۵) هم‌خوانی داشت. قی کردن خون توسط زالو که در برخی منابع حتی تا حدود ۶۰ روز بعد از تغذیه وقوع آن را محتمل دانسته‌اند، به شدت بر کیفیت آب‌تاثیر گذاشته و در صورت عدم تعویض به موقع کافی باعث تلفات می‌شود (۱۸) هم‌چنین تنظیم فشار اسمزی خصوصاً بعد از تغذیه از خون با همه پیچیدگی‌های بیوشیمیایی آن، زالو را بر آن می‌دارد که تا در بازه حدود ۷ تا ۹ ساعت بعد تغذیه، ترشح ادرار داشته باشد (۳۶)، که این امر نیز بر نامطلوب شدن کیفیت آب بسیار موثر است. در این پژوهش، مولدین تمایل معنی‌دار بیش‌تری به تغذیه از هر سه منبع خونی نشان دادند، به طوری که افزایش ۲ تا ۳ برابری وزن را به ترتیب در تیمار خون مرغ، ماهی و گاو تجربه کردند. میانگین افزایش وزن در تیمار مرغ و گاو در پژوهش‌های دیگر هم گزارش شده بود (۲۱، ۲۸). ثابت شده است که زالوهای دارویی

9. **Shankar, K.P., Rao, S.D., Umar, S.N. and Gopalakrishnaiah, V., 2014.** A clinical trial for evaluation of leech application in the management of Vicarcikā (Eczema). *Ancient Science of Life*. 33(4): 236. DOI: 10.4103/0257-7941.147432
10. **Ansari, S., Nil, F., Jabeen, A., Sultana, A. and Khan, Q.A., 2019.** Post-auricular leech therapy reduced headache & migraine days in chronic migraine. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 9(1-s): 75-80. DOI: 10.22270/jddt.v9i1-s.2345
11. **Utevsky, S.Y. and Trontelj, P., 2005.** A new species of the medicinal leech (Oligochaeta, Hirudinida, *Hirudo*) from Transcaucasia and an identification key for the genus *Hirudo*. *Parasitology Research*. 98: 61-66. DOI: 10.1007/s00436-005-0017-7
12. **Hildebrandt, J.P. and Lemke, S., 2011.** Small bite, large impact—saliva and salivary molecules in the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*. *Naturwissenschaften*. 98(12): 995-1008. DOI: 10.1007/s00114-011-0859-z
13. **Baskova, I.P., Zavalova, L.L., Basanova, A.V., Moshkovskii, S.A. and Zgoda, V.G., 2004.** Protein profiling of the medicinal leech salivary gland secretion by proteomic analytical methods. *Biochemistry (Moscow)*. 69: 770-775. DOI: 10.1023/B: BIRY.0000040202.21965.2a
14. **Lemke, S. and Vilcinskis, A., 2020.** European medicinal leeches—new roles in modern medicine. *Biomedicines*. 8(5): 99. DOI: 10.3390/biomedicines8050099
15. **Malek, M., Jafarifar, F., Roohi Aminjan, A., Salehi, H. and Parsa, H., 2019.** Culture of a new medicinal leech: growth, survival and reproduction of *Hirudo orientalis* Utevsky and Trontelj, 2005 under laboratory conditions. *Journal of Natural History*. 53(11-12): 627-637. DOI: 10.1080/00222933.2019.1597200
16. **Tessler, M., Weiskopf, S.R., Berniker, L., Hersch, R., Mccarthy, K.P., Yu, D.W. and Siddall, M.E., 2018.** Bloodlines: mammals, leeches, and conservation in southern Asia. *Systematics and Biodiversity*. 16(5): 488-496. DOI: 10.1080/14772000.2018.1433729
17. **Wilkin, P.J. and Scofield, A.M., 1990.** The use of a serological technique to examine host selection in a natural population of the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*. *Freshwater Biology*. 23(2): 165-169. DOI: 10.1111/j.1365-2427.1990.tb00261.x
18. **Ceylan, M. and Erbatır, İ., 2012.** A study on nutrition of medicinal leech (*Hirudo verbana* Carena, 1820): Cannibalism? *Su Ürünleri Dergisi*. 29(4): 167-170. DOI: 10.12714/egejfas.2012.29.4.03
19. **Bidmal, H.R., Sudagar, M. and Shakouri, M., 2021.** 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*. 13(4): 301-306. DOI: 10.22034/AEJ.2020.232247.2268
20. **Bidmal, H., sudagar, M. and Shakouri, M., 2022.** The effect of different blood (camel and frogs) on sexual maturity, survival and the production of cocoons and larvae in oriental leech (*Hirudo orientalis*). *Journal of Aquaculture Development*. 16(1): 33-42. DOI: 10.52547/aqudev.16.1.33
21. **Taghavi Jelodar, H., Pazoki, J. and Khakshor, M.S., 2022.** Effect of blood type on reproduction rate in medicinal leech *Hirudo orientalis*. *Aquatics Physiology and Biotechnology*. 9(4): 125-139. DOI: 10.22124/japb.2021.19461.1425

هم‌سان دو منبع خونی علی‌رغم برتری منابع پروتئینی خون گاو نسبت به مرغ، احتمالاً می‌توان به سطوح بسیار بالاتر (بیش‌تر از دو برابر) گلوکز به‌عنوان یک منبع انرژی ثابت شده برای کارایی تولید مثلی و تولید لارو (۳۴) و هم‌چنین کلسیم (حدود ۶۰ درصد) به‌عنوان پیش‌ساز مهم دخیل در امر تولید کوکون و لارو مرتبط دانست. نتایج این مطالعه نشان داد که خون مرغ می‌تواند اثر بازدهی تولیدمثلی تقریباً یکسانی با خون گاو داشته باشد و توصیه می‌شود که به میزان بیش‌تری در کارگاه‌های پرورش زالو که امروزه گستردگی جغرافیایی فراوانی یافته‌اند، به‌کار گرفته‌شود. از سوی دیگر، علی‌رغم کارایی تولید مثلی کم‌تر خون ماهی، به جهت سهولت نگهداری تعداد محدودی از آن‌ها در مخازن آبی کارگاه پرورش زالو، استفاده از آن به‌عنوان منبع خونی تازه و همیشه در دسترس توصیه می‌شود. هم‌چنین به‌نظر می‌آید منابع خونی علی‌رغم سنجش فراسنجه‌های معمول، حاوی ترکیبات زیست فعال بی‌شماری هستند که لزوم سنجش افتراقی و بررسی نتایج آن‌ها در تغذیه زالو، احتمالاً به بهبود کارایی تولیدمثلی و خصوصاً ترکیبات بسیار ارزشمند بزاقی آن کمک شایانی نماید.

منابع

1. **Sudagar, M. and Kalatehjari, P., 2018.** Review on optimum propagation and rearing conditions of medicinal leeches (*Hirudo* spp.) *Journal of Aquatic Caspian Sea*. 23: 45-54.
2. **Ünal, K., Erol, M.E. and Ayhan, H., 2023.** Literature review on the effectiveness of medicinal leech therapy in the wound healing. *www. ankaramedj. com*. 21: 150. DOI: 10.5505/amj.2023.20280
3. **Kalender, M.E., Comez, G., Sevinc, A., Dirier, A. and Camci, C., 2010.** Leech therapy for symptomatic relief of cancer pain. *Pain medicine*. 11(3): 443-445. DOI: 10.1111/j.1526-4637.2010.00800.x
4. **Amarprakash, P.D., 2012.** Case study of leech application in diabetic foot ulcer. *International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy*. 3(5). DOI: 10.7897/2277-4343.03536
5. **Darestani, K.D., Mirghazanfari, S.M., Moghaddam, K.G. and Hejazi, S., 2014.** Leech therapy for linear incisional skin-wound healing in rats. *Journal of acupuncture and meridian studies*. 7(4): 194-201. DOI: 10.1016/j.jams.2014.01.001
6. **Stange, R., Moser, C., Hopfenmueller, W., Mansmann, U., Buehring, M. and Uehleke, B., 2012.** Randomised controlled trial with medical leeches for osteoarthritis of the knee. *Complementary Therapies in Medicine*. 20(1-2): 1-7. DOI: 10.1016/j.ctim.2011.10.006
7. **Ramzan, M., Droog, W., Sleswijk Visser, S., van Roessel, E.W. and Meynaar, I.A., 2010.** Leech got your tongue? Haematoma of the tongue treated with medicinal leeches: a case report. *Neth. J. Crit. Care*. 14: 268-270.
8. **Kusnetsova, L.P., Lusov, V.A., Volov, N.A., Smirnova, N.A. and Bogdanova, L.S., 2008.** Hirudotherapy in complex treatment of chronic heart failure. *Russian Journal of Cardiology*. 28(2): 28-30.

36. Zerbst-Boroffka, I., 1973. Osmotic and volume regulation in *Hirudo medicinalis* following food intake. *Journal of Comparative Physiology*. 84: 185-204. DOI: 10.1007/BF00697606
37. Ma, C.J., Li, X. and Chen, H., 2021. Research progress in the use of leeches for medical purposes. *Traditional Medicine Research*. 6(2): 15. DOI: 10.12032/TMR 20200207159
38. Merilä, J. and Sterner, M., 2002. Medicinal leeches (*Hirudo medicinalis*) attacking and killing adult amphibians. In *Annales Zoologici Fennici*, Finnish Zoological and Botanical Publishing Board. 39(4): 343-346.
22. Torabiyan, A., Khoshkholgh, M. and Nazari S., 2021. Effects of casein blood substitute feed on growth, survival and reproduction of native Iranian medicinal leech, *Hirudo orientalis*. *Aquatic Animals Nutrition*. 7(3): 11-26. DOI: 10.22124/janb.2021.5790
23. Bidmal, H. and Sodagar, M., 2020. The effect of two environment water-moss and peat moss soil on the number of cocoons, the weight of the cocoon and the number of casualties of oriental leech (*Hirudo orientalis*). *Journal of Animal Physiology and Development*. 61(1): 39-48
24. Petrauskienė, L., Utevskas, O. and Utevsky, S., 2011. Reproductive biology and ecological strategies of three species of medicinal leeches (genus *Hirudo*). *Journal of Natural History*. 45(11-12): 737-747. DOI: 10.1080/00222933.2010.535918
25. Ceylan, M., Çetinkaya, O., Küçükçakara, R. and Akçimen, U., 2015. Reproduction efficiency of the medicinal leech *Hirudo verbana* Carena, 1820. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 15(3): 411-418. DOI: 10.4194/1303-2712-v15_2_27
26. Ceylan, M., Küçükçakara, R., Akçimen, U. and Yener, O., 2017. Reproduction efficiency of the horse leech, *Haemopsis sanguisuga* (Linnaeus, 1758). *Invertebrate Reproduction and Development*. 61(3): 182-188. DOI: 10.1080/07924259.2017.1318096
27. Ceylan, M., Küçükçakara, R. and Akçimen, U., 2019. Effects of broodstock density on reproduction efficiency and survival of southern medicinal leech, *Hirudo verbana* Carena, 1820. *Aquaculture*. 498: 279-284. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2018.08.016
28. Manav, M., Ceylan, M. and Büyükkapap, H.M., 2019. 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*. 206: 27-37. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2019.05.004
29. Mitruka, B.M. and Rawnsley, H.M., 1977. Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals. *Masson Publishing USA Inc.*
30. Sawyer, R.T., 1986. *Leech biology and behaviour*. Clarendon Press.
31. Mann, K.H., 2013. *Leeches (Hirudinea): their structure, physiology, ecology and embryology*. Elsevier.
32. Graf, J., 1999. Symbiosis of *Aeromonas veronii*, *Biovar sobria* and *Hirudo medicinalis*, the medicinal leech: a novel model for digestive tract associations. *Infection and Immunity*. 67(1): 1-7. DOI: 10.1128/IAI.67.1.1-7.1999
33. FScanes, C.G., Witt, J., Ebeling, M., Schaller, S., Baier, V., Bone, A.J., Preuss, T.G. and Heckmann, D., 2022. Quantitative comparison of avian and mammalian physiologies for parameterization of physiologically based kinetic models. *Frontiers in Physiology*. 428 p. DOI: 10.3389/fphys.2022.858386
34. Karataş, E., Ceylan, M. and Dernekbaşı, S., 2022. Effects of mammalian blood with different glucose levels on reproduction, growth and survival of the southern medicinal leech, *Hirudo verbana* Carena, 1820. *Animal Reproduction Science*. 243: 107030. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2022.107030
35. Davies, R. and McLoughlin, N.A., 1996. The effects of feeding regime on the growth and reproduction of the medicinal leech *Hirudo medicinalis*. *Freshwater Biology*. 36(3): 563-568. DOI: 10.1046/j.1365-2427.1996.00121.x