

Нохрина Екатерина Сергеевна

**ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МЕДИЦИНСКОЙ
ПИЯВКИ (*HIRUDO MEDICINALIS L.*) ИЗ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ И
ВЫРАЩЕННОЙ НА БИОФАБРИКЕ**

03. 02. 08 – экология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Екатеринбург – 2010

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте экологии растений и животных Уральского отделения РАН

- Научный руководитель:** доктор биологических наук
Ковальчук Людмила Ахметовна
- Официальные оппоненты:** доктор биологических наук
Вершинин Владимир Леонидович
доктор биологических наук, профессор
Бароненко Валентина Александровна
- Ведущая организация:** ГОУ ВПО «Челябинский государственный педагогический университет»

Защита состоится «21» декабря 2010 г. в 13:00 часов на заседании диссертационного совета Д 004.005.01 при Институте экологии растений и животных УрО РАН по адресу: 620144, г. Екатеринбург, ул. 8 Марта, 202.

E-mail: dissovet@ipae.uran.ru

Адрес сайта института: <http://www.ipae.uran.ru>

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Института экологии растений и животных УрО РАН.

Автореферат разослан « » ноября 2010 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук



Золотарёва Н.В.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Проблема сохранения редких и исчезающих видов чрезвычайно важна для регионов с экстремальными условиями обитания, определяемыми как природными, так и антропогенными факторами. В исследованиях В.Н. Большакова (1972), С.С. Шварца (1980), В.П. Казначеева, (1980), П.Д. Горизонтова (1983), Э.И. Колчинского (1990), Ф.З. Меерсона (1993), Е.А. Коваленко (2000), Д.З. Шибковой, А.В. Аклеева (2006), показано, что организм при воздействии стрессирующих факторов внутренней и внешней среды мобилизует различные структурно-метаболические и молекулярные механизмы аварийного регулирования систем поддержания гомеостаза, снижая негативные последствия их влияния на патогенетические механизмы повреждения органов и систем.

В этом аспекте несомненна актуальность исследований роли физиологических процессов в функционировании экологических групп животных, в поддержании численности, структуры вида и определении характера микроэволюционных преобразований в популяциях животных (Тимофеев-Ресовский, 1958; Одум, 1975; Слоним, 1982; Большаков и др., 1984, 1991, 2009; Вершинин, 2009).

Указанная проблема в полной мере приложима к медицинской пиявке (*Hirudo medicinalis* L.), на которую распространяется действие международной конвенции CITES. Медицинская пиявка – значимый биологический ресурс России, широко применяется в практической медицине. Используется она и как сырьё для получения лекарственных препаратов и пищевых биодобавок (Исаханян, 1991; Селезнев, 1996; Самойлов, 2001; Живогляд, 2001; Березовская и др, 2003; Геращенко, Никонов, 2005; Каменев, Барановский, 2006; Никонов, 2007).

Сохранение ресурсов медицинской пиявки в России и ее рациональное использование в современных условиях высокого спроса является одной из актуальных проблем природопользования. Спрос на медицинскую пиявку на фармацевтическом рынке, неконтролируемый браконьерский отлов, а также глобальное загрязнение привели к тому, что к настоящему времени медицинская пиявка является исчезающим видом (Каменев, 2007). Одним из факторов, приводящих к сокращению численности, а в итоге к исчезновению отдельных видов гидробионтов, считается и техногенное загрязнение водной среды такими поллютантами, как тяжёлые металлы (ТМ) – Cu, Zn, Cd, Pb (Майстренко, 1996; Агаджанян, Скальный, 2001; Рахманин, Русаков и др., 2005; Безель, 2006).

Исследованиями Н.А. Агаджаняна, А.В. Скального (2001), Д. Оберлис и др. (2008) показано, что в общую регуляторную систему организма на всех стадиях развития включена микроэлементная физиологическая система гомеостаза, определяющая реакцию организма на аккумуляцию загрязнителей изменениями в процессах метаболизма. Это тем более важно, так как медицинскую пиявку для лечебных целей выращивают в контролируемых условиях на биофабриках, изначально используя пиявок-маток из природных популяций.

Литературный обзор показал, что к настоящему времени подробно изучены фармакологические аспекты применения биологически активных соединений, продуцируемых медицинскими пиявками, тем не менее, комплексные сведения, касающиеся физиологического состояния медицинской пиявки из природных популяций и выращенной на биофабрике, практически отсутствуют. Нет полного представления о содержании микроэлементов (МЭ) в тканях пиявок, в том числе и о влиянии солей ТМ на жизнеспособность и лечебное действие медицинской пиявки. Исследования в эколого-физиологическом сравнительном аспекте медицинской пиявки из природных популяций и выращенной на биофабрике практически отсутствуют как на популяционном, организменном, так и на клеточном уровне, в то время как оценка физиологического состояния с позиции оптимального аминокислотного баланса в организме способна пролить свет и на резервные адаптивные возможности пиявок в перманентно изменяющихся условиях среды обитания.

Различия в образе жизни и в условиях содержания или обитания влияют на физиологию медицинской пиявки, а, следовательно, и на выбор правильной стратегии выживания. Актуальность и состояние вопроса об экологии, физиологии и адаптивных возможностях представителей гирудофауны – двух подвидов медицинской пиявки в современных условиях обитания в природных популяциях и при их воспроизводстве на биофабриках, предопределило цели и задачи нашего исследования.

Цель исследования: изучить эколого-физиологические особенности двух подвидов медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis* L.): аптечной (*Hirudo medicinalis officinalis*) и лечебной (*Hirudo medicinalis medicinalis*) из природных популяций и выращенных на биофабрике.

Задачи исследования:

1. исследовать состояние основного обмена лечебной (*H.m.medicinalis*) и аптечной (*H.m.officinalis*) пиявок, обитающих в естественных условиях и выращенных на биофабрике;

2. определить содержание микроэлементов (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Cd, Pb) в тканях медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis L.*) из природных популяций и выращенной на биофабрике;

3. изучить состояние фонда свободных аминокислот в тканях лечебной и аптечной пиявок различных физиологических групп;

4. экспериментально, в контролируемых условиях, провести сравнительный анализ хронического воздействия экотоксикантов на динамику их накопления и состояние аминокислотного пула в тканях пиявок из природных популяций и выращенных на биофабрике.

Научная новизна исследования

Впервые на единой методологической (эколого-физиологической) основе проведены комплексные полевые и экспериментальные исследования энергетического обмена, аминокислотного фонда, микроэлементного состава тканей двух подвидов *Hirudo medicinalis*: аптечной и лечебной из природных популяций Тамбовской, Луганской областей, Краснодарского края и выращенных на биофабриках: ГирудИ.Н. (Саратовская область), «Международный Центр медицинской пиявки» (Московская область) и «Гирудо-Мед.Юг» (Краснодарский край).

Показаны особенности основного обмена лечебной и аптечной пиявок, обитающих в природных водоёмах и выращенных на биофабрике.

Выявлены внутривидовые и географические различия в содержании микроэлементов МЭ (Cu, Zn, Mn, Fe, Cd, Pb, Ni) в тканях медицинских пиявок из природных популяций. Ранговый корреляционный анализ выявил статистически значимые положительные связи между содержанием в донных отложениях Cu, Fe, Cd, Pb, Ni и их биоаккумуляцией в тканях медицинских пиявок из природных популяций ($r = 0,8 - 0,95$, при $p < 0,0001$). Медицинские пиявки в условиях искусственного разведения аккумулируют в своих тканях Cu, Cd, Pb и Ni в более высоких концентрациях, чем пиявки из природных популяций.

Установлено, что зависимость концентраций свободных аминокислот от времени воздействия ТМ указывает на их активное участие в процессах детоксикации и адаптации пиявок к избыточному присутствию токсикантов в водной среде и, соответственно, в тканях. В модельном эксперименте установлено, что пиявки, выращенные на биофабрике, обладают более высокой резистентностью к воздействию экстремально высоких концентраций ТМ.

Теоретическая и практическая значимость работы

Оценка физиологической валентности вида и подвидов медицинской пиявки даёт возможность по новому подойти к решению практических и теоретических задач экологии, связанных как с рациональным использованием биологических ресурсов, так и с возможностью глубокого и всестороннего понимания закономерностей эволюционного процесса.

Полученные экспериментальные результаты, дополняя данные других исследователей, показали, что ткани медицинских пиявок содержат высокие концентрации свободных аминокислот – жизненно необходимых биологически активных соединений, что является дополнительным показанием к использованию гомогенатов *H.m.officinalis* и *H.m.medicinalis* в фармацевтике и косметологии при условии сохранения их численности и видового разнообразия в естественной среде обитания.

Материалы научных исследований используются в учебно-педагогическом процессе на кафедре биологии и медицинской генетики Уральской государственной медицинской академии г. Екатеринбурга. Результаты исследований внедрены в практическую работу лаборатории «Проблемы адаптации» при ГУ Средне - Уральского научного центра Российской академии медицинских наук и Правительства Свердловской области.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Основной обмен лечебной (*H.m.medicinalis*) и аптечной (*H.m.officinalis*) пиявок, обитающих в природных водоёмах и выращенных в условиях биофабрики, предопределяется биогеохимической обстановкой экосистем и существенно зависит от популяции и физиологического состояния гидробионтов.

2. Характер накопления и распределения микроэлементов в тканях аптечных и лечебных пиявок различен, зависит от природы и продолжительности воздействия фактора. Медицинские пиявки проявляют высокую кумулятивную активность по отношению к биофильным элементам и к ксенобиотикам.

3. Фонд свободных аминокислот достоверно различен у аптечной и лечебной пиявок из природных популяций и выращенных на биофабрике. В тканях медицинских пиявок, выращенных на биофабрике, повышено содержание свободных аминокислот, участвующих в процессах детоксикации высоких концентраций ТМ.

4. Медицинские пиявки, выращенные в контролируемых условиях биофабрики, обладают механизмами защиты от повреждающего хронического воздействия смеси экотоксикантов.

Апробация работы. Материалы диссертационного исследования представлены на различных научных форумах международного, республиканского и региональных уровней:

Всероссийские конференции молодых ученых (Екатеринбург, 2005, 2006, 2008, 2009, 2010); I Съезд физиологов СНГ (Сочи, Дагомыс, 2005); IX Всероссийский популяционный семинар «Особь и популяция – стратегии жизни» (Уфа, 2006); II Международная научно-практическая конференция «Адаптация биологических систем к естественным и экстремальным факторам среды» (Челябинск, 2008); VIII молодежная научная конференция «Физиология человека и животных: от эксперимента к клинической практике» (Сыктывкар, 2009); Симпозиум «Эколого-физиологические проблемы адаптации» (Москва, 2009); Всероссийская научно-практическая конференция «Экология в высшей школе: синтез науки и образования» (Челябинск, 2009); IV съезд физиологов Урала (Екатеринбург, 2009); XXII Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина» (Санкт-Петербург, 2009). 4th International FESTEM Symposium on Trace Elements and Minerals in Medicine and Biology (St. Petersburg, 2010); Первые Международные Беккеровские чтения (Волгоград, 2010); XXI Съезд Физиологического общества им. И.П.Павлова (Калуга, 2010); XI Международная научно-практическая экологическая конференция «Видовые популяции и сообщества в естественных и антропогенно трансформированных ландшафтах: состояние и методы его диагностики» (Белгород, 2010); Международная конференция «Наука, природа и общество» (Миасс, 2010).

Декларация личного участия автора. Автором самостоятельно собран в полевых условиях и обработан в лаборатории материал по двум подвидам медицинской пиявки: аптечной (*H.m.officinalis*) и лечебной (*H.m.medicinalis*) из природных популяций и выращенных на биофабрике. Определены концентрации микроэлементов: Cu, Zn, Mn, Fe, Cd, Pb, Ni, проведён сравнительный анализ содержания заменимых и незаменимых аминокислот в тканях. Проведён эксперимент по исследованию адаптационно-компенсаторных возможностей микроэлементной физиологической системы гомеостаза и фонда свободных аминокислот, определяющих реакцию

организма на аккумуляцию техногенных загрязнителей изменениями в процессах метаболизма.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 20 работ, в рецензируемых журналах – 6, из которых 3 – в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Объём и структура диссертации. Диссертация изложена на 195 страницах и включает введение, 4 главы, заключение, выводы, библиографический список. Работа иллюстрирована 27 рисунками и 33 таблицами. Список используемой литературы включает 305 работ, в том числе 87 работ иностранных авторов.

Благодарности

Выражаю искреннюю благодарность к.б.н. Л.В. Черной, к.х.н. Н.В. Микшевичу, Е.А. Басмаджян, за оказанную помощь при сборе и обработке биологического материала. Искренняя признательность руководителю «Международного центра медицинской пиявки» д.б.н. Г.И. Никонову и директору биофабрики «Гирудо-Мед.Юг» Н.Т. Казиеву за предоставленный материал. Автор считает своим долгом выразить признательность зав. лаборатории Эволюционной экологии д.б.н. А.Г. Васильеву, д.б.н. И.М. Хохуткину, к.б.н. Ю.Л. Вигорову, к.б.н. К.И. Бердюгину, к.б.н. Н.И. Маркову, к.б.н. М.В. Чибиряку, а также всем коллегам и сотрудникам Института экологии растений и животных УрО РАН за участие в обсуждении результатов исследований. Автор признателен к.б.н. Н.В. Николаевой за ценные советы и проявленный ею искренний интерес к настоящим исследованиям.

Автор чрезвычайно признателен академику РАН, д.б.н. В.Н. Большакову за постоянную поддержку и научный интерес к исследуемой проблеме.

Особая благодарность моему научному руководителю д.б.н. Л.А. Ковальчук, которой я глубоко признательна за общее руководство работой, за оказанную повседневную помощь при проведении исследований и обработке полученных результатов, за ценные советы и критические замечания.

Глава 1. Экологические и физиологические особенности гидробионтов класса *Hirudinea* (литературный обзор)

Приведён обзор и анализ литературных данных об экологии и физиологических особенностях гидробионтов класса *Hirudinea*. Изложены современные представления о роли микроэлементного обмена и участия

аминокислотного метаболизма в гомеостатических функциях организма в перманентно изменяющихся условиях среды обитания.

Глава 2. Материалы и методы исследования

В основу работы положены результаты экспедиционных и лабораторных исследований с 2003 по 2009 годы. Содержание животных, доставленных в лабораторию, осуществляли в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и научных целей (Европейская конвенция ..., 1986). Исследования проведены на 628 экземплярах медицинской пиявки, выполнено 7018 анализов.

Лечебные медицинские пиявки *H.m.medicinalis* отловлены в водных объектах Тамбовской области (Мичуринский район, река Лесной Воронеж) и Луганской области (Луганский национальный заповедник, озеро Глубокое) и приобретены на биофабрике «ГирудИ.Н.» (Саратовская область). Аптечные медицинские пиявки *H.m.officinalis* отловлены в Краснодарском крае (Каневской район, река Челбас) и приобретены на биофабриках «Гирудо-Мед.Юг» (Краснодарский край) и «Международный центр медицинской пиявки» (Московская область).

На основании анализа литературных источников дана краткая характеристика местообитаний исследованных нами лечебной (*H.m.medicinalis*) и аптечной (*H.m.officinalis*) пиявок, включающая описание водного режима, рельефа и их минерализации.

Параметры основного обмена исследовали по потреблению кислорода с помощью оптико-акустического газоанализатора МН-5130. Потребление кислорода выражали в миллилитрах на грамм массы тела животного в течение одного часа (млО₂/г·час).

Методика определения микроэлементов. Пробоподготовку образцов проводили в соответствии с требованиями МАГАТЭ и методическими рекомендациями, утверждёнными МЗ РФ в 1999 году. Содержание МЭ в донных отложениях и тканях пиявок исследовали методом атомно-абсорбционной спектрометрии на спектрофотометре ААС-3 и на приборе Analist 100 фирмы Perkin Elmer (Хавезов, Цалев, 1983; Никаноров, Жулидов, 1991; Майстренко и др. 1996; Другов, Родин, 2009). Концентрацию МЭ в биосубстратах определяли в мкг/г.

Пул свободных АК в кожно-мышечной ткани пиявок определяли методом ионообменной хроматографии (Казаренко, 1975) с помощью автоматического анализатора аминокислот ААА-339 М. (Микротехна, Прага). Концентрацию свободных АК в тканях пиявок выражали в мкмоль/л и в % от суммарного содержания.

В модельном эксперименте динамику накопления Cu, Zn, Cd, Pb (мкг/г сырой массы) и содержание свободных аминокислот (мкмоль/л; %) в тканях медицинских пиявок из природных популяций и выращенных на биофабрике, изучали на 7-е, 14-е и 21-е сутки нахождения их в водных растворах экстремально высоких концентраций меди (0,05 мг/л), цинка (0,5 мг/л), кадмия (0,025 мг/л), свинца (0,03 мг/л) и их смеси (Cu + Zn + Cd + Pb).

Весь экспериментальный материал обработан стандартными методами математической статистики с использованием программ MS Excel 2003 и Statistica (версия 6.0). При оценке однородности групп и достоверности различий средних между группами использовали параметрический t-критерий Стьюдента и непараметрический U-тест Манна-Уитни, дисперсионный анализ ANOVA. Взаимозависимость между рядами оценивали с помощью рангового анализа сопряженности по Спирмену. Различия между сравниваемыми выборками считали достоверными при $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, $p < 0,0001$.

Глава 3. Экологические аспекты физиологического состояния медицинской пиявки из природных популяций и выращенной на биофабрике

У аптечных медицинских пиявок, выращенных на биофабрике («Гирудо-Мед.Юг»), уровень основного обмена достигает $0,86 \pm 0,069$ мл O_2 /г·час, что значительно выше, чем у лечебных пиявок («ГирудИ.Н.»), у которых он составляет $0,64 \pm 0,035$ мл O_2 /г·час. Уровень основного обмена аптечных пиявок, выращенных на биофабрике, вдвое превышает аналогичные показатели у этого же подвида пиявок из природных популяций. Интенсивность потребления кислорода у медицинских пиявок, выращенных на биофабрике, зависит и от физиологического состояния особей. Основной обмен лечебных пиявок в состоянии голода превышает интенсивность потребления кислорода сытых пиявок в 7 раз (Черная, Ковальчук, Нохрина, 2006; Нохрина, 2009).

Условия содержания пиявок на биофабрике можно считать экстремальными: круглогодичный постоянный температурный режим, искусственное освещение, отсутствие зимней спячки, регулярное частое кормление без права выбора жертвы, качество отстоянной водопроводной

воды, высокая плотность популяции и т.д., в силу чего в режиме искусственного разведения медицинские пиявки достигают половой зрелости не в 3 года, как в природе, а за 8-12 месяцев. Ускоренному половому созреванию особей медицинских пиявок, выращиваемых на биофабриках, помимо прочих условий, способствует повышенный уровень энергетического обмена.

При оценке уровня содержания ТМ в донных отложениях из мест обитания изучаемых подвидов пиявок выявлено, что во всех исследованных водных объектах концентрации МЭ располагаются в единый ряд: **Fe > Mn ≥ Zn > Ni > Pb ≥ Cu > Cd**. В донных отложениях исследованных водоёмов концентрации Cu, Zn, Mn, Fe, Pb, Ni соответствуют фоновому уровню.

Сравнительный анализ содержания МЭ в тканях медицинских пиявок двух подвидов различных географических популяций выявил существенные различия в характере их накопления (Нохрина, 2010). Так, лечебные пиявки из «тамбовской» популяции являются макроконцентраторами (коэффициент накопления КН>2) цинка и деконцентраторами (КН<1) всех остальных МЭ (табл.1). Представители этого же подвида пиявок *H.m.medicinalis*, обитающие в Луганской области, напротив, активно депонируют в своих тканях практически все изучаемые микроэлементы, являясь их макроконцентраторами; исключение составляют железо и марганец, по отношению к которому они – деконцентраторы. Аптечные пиявки, обитающие в Краснодарском крае, по отношению к меди, цинку, кадмию и свинцу являются макроконцентраторами, а к марганцу, железу и никелю – деконцентраторами (табл.1).

Таблица 1 – Коэффициенты накопления микроэлементов у медицинских пиявок из природных популяций

Подвид / регион	Cu	Zn	Mn	Fe	Cd	Pb	Ni
Аптечная / Краснодарский край	2,16	16,05	0,07	0,72	3,21	2,58	0,98
Лечебная / Луганская обл.	4,43	9,37	0,65	0,38	7,95	3,40	2,97
Лечебная / Тамбовская обл.	0,48	8,91	0,06	0,73	0,13	0,15	0,13

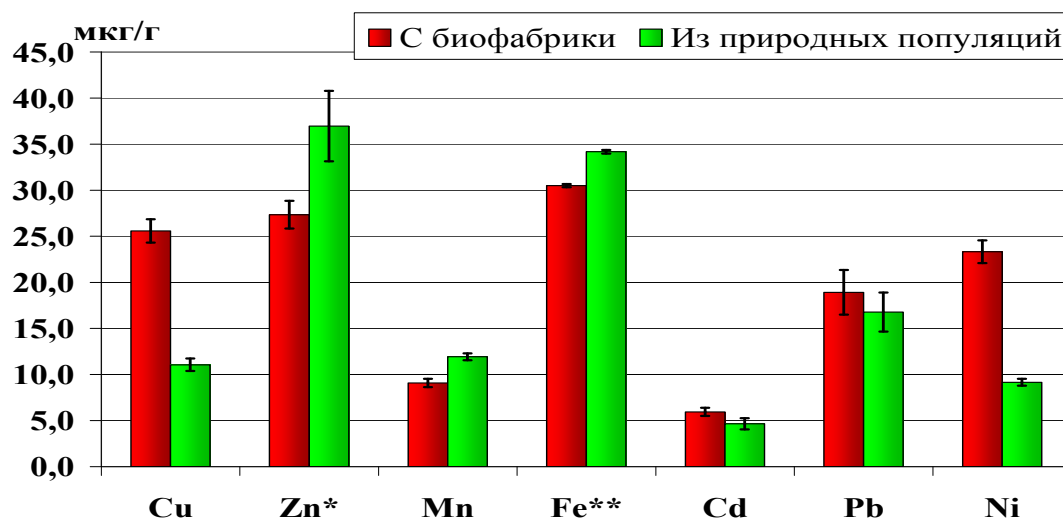
Поступление, распределение и усвоение тяжёлых металлов тканями пиявок находится в прямой зависимости от уровня их содержания в донных отложениях (табл. 2).

Корреляционный анализ выявил статистически значимые положительные связи между содержанием в донных отложениях Cu, Fe, Cd, Pb, Ni и их концентрацией в тканях медицинских пиявок из природных популяций (корреляционный коэффициент Спирмена $r = 0,87-0,95$, при $p < 0,0001$). При этом не обнаружено связи между содержанием цинка, марганца в донных отложениях и в тканях пиявок ($r = -0,23$ при $p = 0,405$ и $r = -0,39$ при $p = 0,147$ соответственно), что свидетельствует о способности пиявок регулировать концентрации данных микроэлементов независимо от их содержания в окружающей среде (Нохрина, Черная, 2009; Chernaya, Kovalchuk, Nokhrina 2010).

Таблица 2 – Корреляционные связи между микроэлементами в донных отложениях и их содержанием в тканях пиявок

МЭ	r	p
Cu	0,90	<0,0001
Zn	-0,23	0,405
Mn	-0,39	0,147
Fe	0,95	<0,0001
Cd	0,87	<0,0001
Pb	0,89	<0,0001
Ni	0,90	<0,0001

В искусственных условиях разведения на биофабрике, аптечные пиявки, являющиеся потомками первого поколения особей из природных популяций, существенно активизируют свои биоаккумуляционные возможности по накоплению микроэлементов ($p < 0,05$) (рис.1) (Основной обмен ..., 2007; Нохрина, Ковальчук, Черная, 2009).



* - концентрации МЭ уменьшены в 10 раз, ** - в 100 раз

Рисунок 1 – Содержание микроэлементов в тканях аптечных пиявок из природных популяций и выращенных на биофабрике

Так, биофильной меди содержится в 2,3 раза больше, а никеля – в 2,5 раза ($p < 0,05$). Отмечена тенденция к возрастанию концентраций ксенобиотиков: свинца и кадмия – в 1,2 и в 1,3 раза соответственно, тогда как содержание физиологически необходимых МЭ в тканях пиявок на биофабрике достоверно снижается: цинка – на 26%, железа – на 11%, марганца – на 24%, ($p < 0,05$) (рис.2).

Аминокислотный фонд тканей медицинских пиявок представлен 22 свободными аминокислотами. Сравнительный анализ состояния аминокислотного спектра у двух подвидов медицинских пиявок природных популяций (время отлова – май) Тамбовской области (лечебные) и Краснодарского края (аптечные) показал достоверные различия по суммарным концентрациям АК ($4545,97 \pm 35,707$ мкмоль/л и $6020,57 \pm 59,37$ мкмоль/л соответственно при $p < 0,05$). Суммарная концентрация свободных АК в тканях аптечных пиявок выше на 32,4%, чем у лечебных.

Показана географическая изменчивость АК фонда тканей лечебных пиявок (время отлова – май): из Луганской области – $6489,2 \pm 54,99$ мкмоль/л, что в 1,4 раза выше, чем у «тамбовских» особей – $4545,97 \pm 35,707$ мкмоль/л.

Выявлена сезонная изменчивость АК спектра у обоих подвидов. Так, суммарные концентрации свободных аминокислот в тканях пиявок из весенних популяций, на выходе из зимнего анабиоза, более, чем в два раза превышают величину аминокислотного пула тканей летних особей: $1926,39 \pm 29,374$ мкмоль/л у лечебных (Тамбовская обл.) и $2692,44 \pm 60,75$ мкмоль/л у аптечных (Краснодарский край) ($p < 0,01$) (Нохрина, 2009).

В тканях аптечных пиявок, выращенных на биофабрике суммарное содержание свободных аминокислот ($3864,27 \pm 19,440$ мкмоль/л), достоверно превышает величину аминокислотного пула ($2692,44 \pm 60,747$ мкмоль/л) у пиявок из природных популяций (время отлова – август) ($p < 0,05$) (рис.2).

Показано, что ткани пиявок, выращенных в искусственных условиях, в сравнении с природными, содержат в 2 раза больше аминокислот, участвующих в процессах детоксикации, способных связывать тяжелые металлы в нетоксичные комплексы: метионина (0,64% и 0,32% соответственно), гистидина (0,12% и 0,06% соответственно), цистеина (0,32% и 0,15% соответственно), изолейцина (1,31% и 0,65% соответственно), что коррелирует с повышенным содержанием ксенобиотиков (Нохрина, 2009; Состояние микроэлементного ..., 2008).

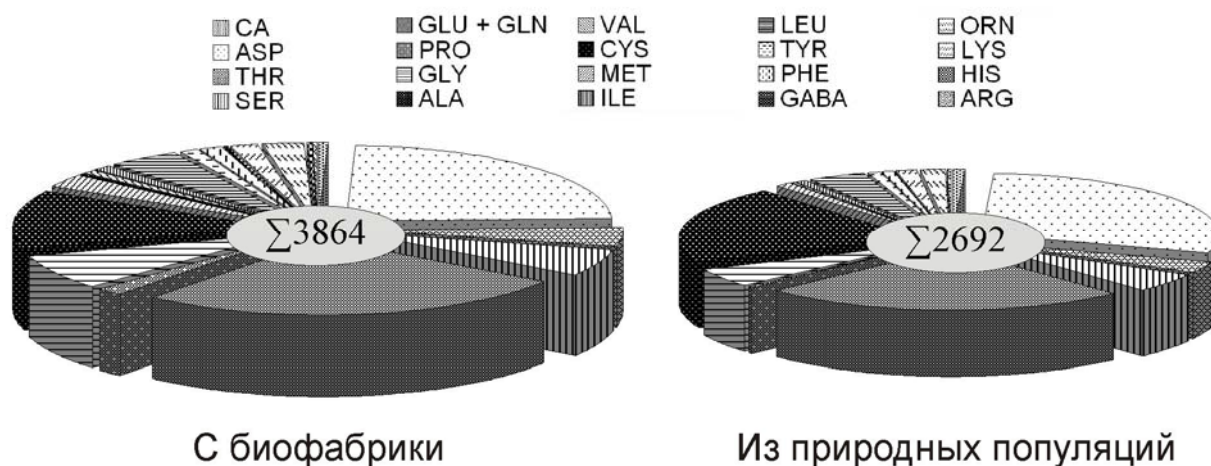


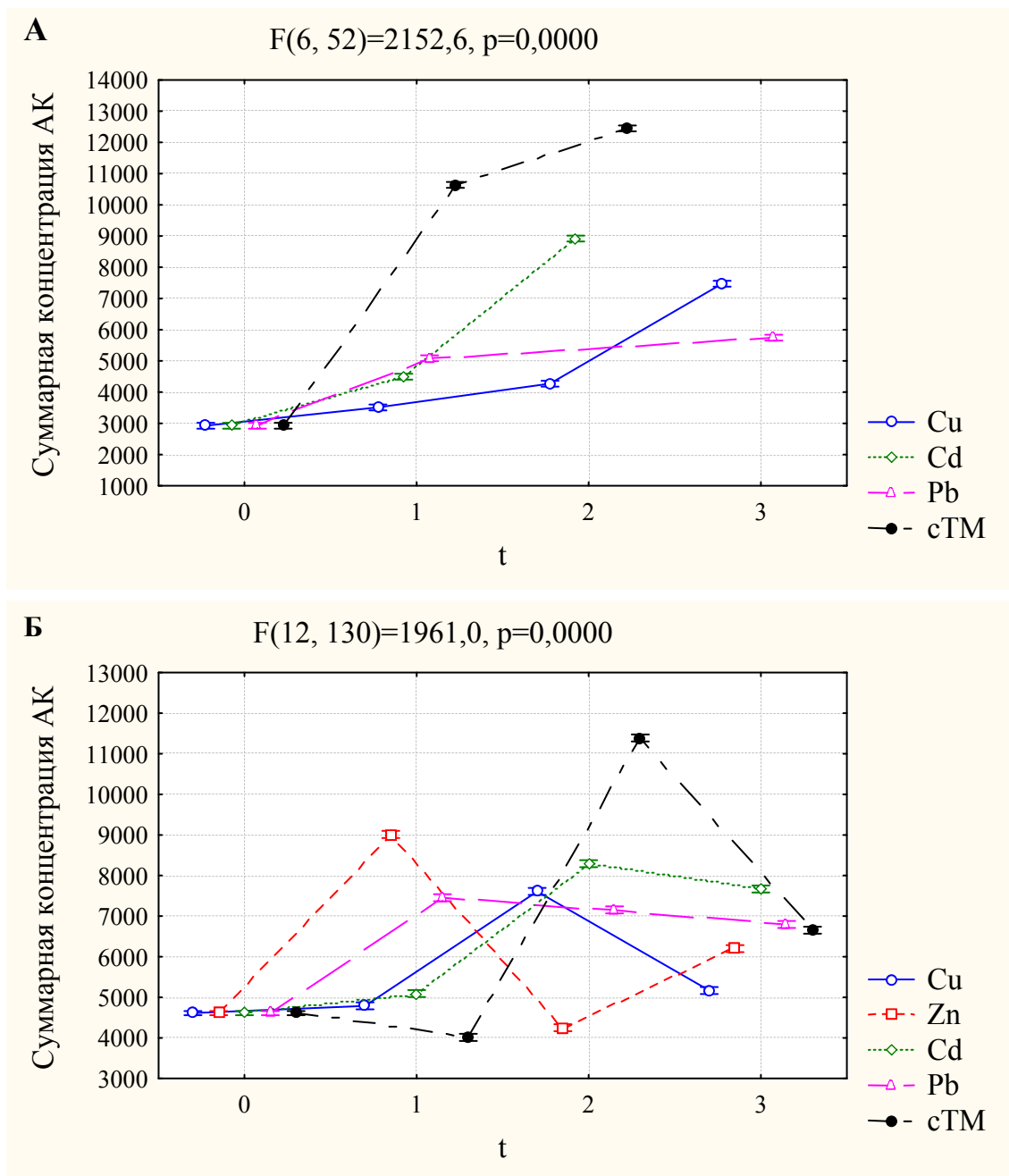
Рисунок 2 – Содержание свободных аминокислот (мкмоль/л) в тканях аптечных пиявок из природных популяций и выращенных на биофабрике

Глава 4. Оценка адаптационно-компенсаторных возможностей медицинской пиявки в условиях модельного эксперимента

Пиявки, выращенные на биофабрике, обладают более высокой резистентностью к воздействию экстремально высоких концентраций ТМ, чем особи из природных популяций.

Методом дисперсионного анализа показано, что на качественный и количественный состав свободных аминокислот в тканях наиболее значимое влияние оказывают Cd и смесь ТМ, а также продолжительность воздействия данных факторов на пиявок природных популяций и с биофабрики (Нохрина, Ковальчук, Черная, 2009). Показано, что в тканях пиявок обеих групп наибольшей дисперсией отличается аминокислотный фонд у пиявок с биофабрики ($F=1961,0$; $p<0,0001$) и у пиявок из природных популяций ($F=2152,6$; $p<0,0001$). Для обеих групп пиявок наибольший вклад после 14-го дня экспозиции в дисперсию аминокислотного пула вносит смесь ТМ ($p<0,05$) (рис.3).

Особи медицинской пиявки, выращенные в условиях биофабрики, отличаются от пиявок из природных популяций повышенным содержанием МЭ. Повышенный пул аспарагиновой и глутаминовой кислот, цистеина, гистидина, метионина, изолейцина – аминокислот, способных связывать ТМ в нетоксичные комплексы «металл-белок», обеспечивая им высокую резистентность к избыточному присутствию токсикантов, поступающих извне, участвуют в регулировании обменных процессов и обеспечивают высокий уровень биологически активных веществ.



0 – контроль, 1 – 7 суток; 2 – 14 суток; 3 – 21 день

Рисунок 3 – Динамика аминокислотного фонда в тканях пиявок (А – из природных популяций, Б – с биофабрики) при хроническом воздействии Cd, Cu, Pb, Zn и их смеси ТМ (Cd+Cu+Pb+Zn) в условиях эксперимента

Установлено принципиальное значение положительных и отрицательных связей между основными системами азотистого и микроэлементного обмена при поддержании динамического равновесия этой системы в экспериментальных условиях. Особую роль с точки зрения межсистемной кооперации в процессах роста, развития и детоксикационных процессов выполняет аминокислотный обмен. Аминокислоты, являясь регуляторами

функций организма, обеспечивают развитие защитных реакций и поддержание гомеостаза при различных воздействиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Особый научный интерес представляют отдельные виды гидробионтов, которые интегрируют неблагоприятные эффекты комплекса биотических и абиотических воздействий, и могут быть использованы как индикаторы состояния водных экосистем.

Актуальность исследований состоит в необходимости изучения влияния современных биогеохимических условий среды на медицинскую пиявку *Hirudo medicinalis* L. и получения данных об эколого-физиологических параметрах двух подвидов медицинских пиявок, обитающих в разных регионах, с целью функциональной оценки производителей при искусственном воспроизводстве различных подвидов для эффективного воспроизводства и восполнения биологических ресурсов медицинской пиявки России.

В работе проведены комплексные полевые и экспериментальные исследования энергетического обмена, аминокислотного фонда и микроэлементного состава тканей двух подвидов медицинской пиявки: аптечной и лечебной.

Показано, что медицинские пиявки из природных популяций отличаются от своих потомков – пиявок, выращенных на биофабриках, по всем изученным параметрам. Выявлены внутривидовые особенности пиявок из природных популяций различных географических зон, и выращенных на биофабриках различных регионов России.

Модельный эксперимент по оценке адаптационно-компенсаторных возможностей медицинской пиявки показал, что пиявки, выращенные на биофабрике, обладают большей устойчивостью к токсической нагрузке, нежели пиявки из природных популяций. Выращивание пиявок в искусственных условиях биофабрик можно считать периодом акклимации или предадаптации к стресс-факторам среды. Высокой резистентности выращенных особей, по нашему мнению, способствует повышенный исходный уровень основного, аминокислотного обменов, который в свою очередь является результатом интенсивного питания, роста и развития в экстремальных условиях.

ВЫВОДЫ

1. Проведены комплексные полевые и экспериментальные исследования энергетического обмена, аминокислотного фонда и микроэлементного состава тканей двух подвигов медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis* L.): аптечной (*H.m.officinalis*) и лечебной (*H.m.medicinalis*) из природных популяций Тамбовской и Луганской областей и Краснодарского края и, выращенных в искусственных условиях на биофабриках: ГирудИ.Н. (Саратовская область), «Международный Центр медицинской пиявки» (Московская область) и «Гирудо-Мед.Юг» (Краснодарский край).

2. Показано достоверное различие по основному обмену пиявок *H.m.officinalis* и *H.m.medicinalis*. Потребление кислорода интенсивнее у пиявок, выращенных в условиях биофабрики, при этом, уровень потребления кислорода голодных пиявок превышает интенсивность обмена сытых в 7 раз.

3. Выявлены внутривидовые и географические различия в содержании микроэлементов (Cu, Zn, Mn, Fe, Cd, Pb, Ni) в тканях лечебных и аптечных пиявок. Корреляционный анализ выявил статистически значимые положительные связи между содержанием в донных отложениях Cu, Fe, Cd, Pb, Ni и их биоаккумуляцией тканями медицинских пиявок из природных популяций ($r = 0,87-0,95$, при $p < 0,0001$).

4. Установлено, что медицинские пиявки, выращенные на биофабрике, и из природных популяций, проявляют кумулятивную активность по отношению к биофильным элементам и к ксенобиотикам.

5. Показаны достоверные внутривидовые различия по содержанию свободных аминокислот в тканях аптечных и лечебных пиявок, наиболее четко проявляющиеся в условиях биофабрики. Установлено наличие статистически значимой ($p < 0,0001$) связи между содержанием микроэлементов и показателями аминокислотного обмена в тканях исследуемых групп пиявок. Регуляторные связи в системе метаболических процессов микроэлементного и азотистого обмена в условиях перманентного воздействия тяжёлых металлов на организм подвержены и качественным, и количественным изменениям.

6. Экспериментально показано, что повышенный пул свободных АК (аспарагиновая и глутаминовая кислоты, цистеин, гистидин, метионин, изолейцин), способных связывать тяжелые металлы в нетоксичные комплексы «металл-белок», обеспечивает аптечным пиявкам, выращенным на биофабрике, высокую резистентность к избыточному присутствию тяжёлых металлов.

Список основных работ по теме диссертации

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Основной обмен и содержание микроэлементов в тканях медицинских пиявок из природных популяций и выращенных в искусственных условиях биофабрики / Л.А. Ковальчук, Л.В. Чёрная, А. Э. Тарханова, **Е. С. Нохрина** // Вестн. Урал. мед. акад. науки. – 2007. – № 4. – С. 49-53.

2. Оценка состояния аминокислотного пула в тканях медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* L. при хроническом голодании / Л.В. Черная, Л.А. Ковальчук, Н.Т. Казиев, **Е.С. Нохрина** // Вестн. Урал. мед. акад. науки. – 2009. – № 2 (25). – С. 240-241.

3. **Нохрина Е.С.**, Ковальчук Л.А., Черная Л.В. Динамика накопления тяжелых металлов в тканях медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* L. в модельном эксперименте // Вестн. Урал. мед. акад. науки. – 2009. – № 2 (23). – С. 145-146.

Публикации в рецензируемых журналах

4. Состояние микроэлементного и азотистого обмена при адаптации медицинских пиявок (*Hirudo medicinalis* L.) к условиям искусственного разведения на биофабрике / **Е.С. Нохрина**, Л.А. Ковальчук, Л.В. Черная, А.Э. Тарханова // Микроэлементы в медицине. – 2008. – Т.9, вып.12. – С. 26-27.

5. Черная Л.В., Ковальчук Л.А., **Нохрина Е.С.** Оценка микроэлементного обмена медицинских пиявок *Hirudo medicinalis officinalis* // Микроэлементы в медицине. – 2008. – Т.9, вып.12. – С. 33-34.

6. Chernaya L.V., Kovalchuk L.A., **Nokhrina E.S.** Peculiarities of microelement metabolism in the medical leech (*Hirudo medicinalis* L.) tissues from natural populations // Trace elements in medicine. – 2010. – Vol. 11, No.2. – P. 6.

Статьи и тезисы, опубликованные в других научных изданиях

7. Черная Л.В., Ковальчук Л.А., **Нохрина Е.С.** Изучение свободных аминокислот в тканях медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* из природной популяции // Научные труды I съезда физиологов СНГ. – М., 2005. – Т.2 – С. 15.

8. Сравнительная характеристика физиологических особенностей медицинских пиявок (*Hirudo medicinalis*) из природных популяций и выращенных в искусственных условиях биофабрики / **Е.С. Нохрина**, Е.А. Басмаджян, Л.В.Черная, Л. А Ковальчук // Экология в меняющемся мире: материалы конф. молодых ученых. – Екатеринбург, 2006. – С. 170-171.

9. Черная Л.В., Ковальчук Л.А., **Нохрина Е.С.** Энергетический обмен медицинской пиявки в различных физиологических состояниях // Особь и

популяция – стратегии жизни: материалы докладов IX Всерос. популяционного семинара. – Уфа, 2006. – С. 276-278.

10. Черная Л.В., Ковальчук Л.А., **Нохрина Е.С.** Роль свободных аминокислот в адаптации медицинских пиявок (*Hirudo medicinalis* L.) к экстремально высоким концентрациям тяжелых металлов в водной среде // Эколого-физиологические проблемы адаптации: сб. док. симпозиума. – М.: РУДН, 2009. – С. 442-444.

11. **Нохрина Е.С.** Обменные процессы медицинской пиявки в различных физиологических состояниях // Физиология человека и животных: от эксперимента к клинической практике: III Молодежная научная конференция Института физиологии Коми НЦ УрО РАН: тез. док. – Сыктывкар, 2009. – С. 144-146.

12. **Нохрина Е.С.**, Черная Л.В. Эколого-физиологические особенности двух подвидов медицинских пиявок *Hirudo medicinalis* из природных популяций // Экология в высшей школе: синтез науки и образования: сб. материалов Всерос. науч.-практ. конф.: в 2 ч. – Челябинск, 2009. – Ч.1. – С. 86-90.

13. **Нохрина Е.С.** Сезонная изменчивость аминокислотного состава тканей медицинских пиявок *Hirudo medicinalis* L. из природных популяций // Эволюционная и популяционная экология (назад в будущее): материалы конф. молодых ученых. – Екатеринбург, 2009. – 147-148.

14. **Нохрина Е.С.** Свободные аминокислоты в тканях медицинских пиявок из природных популяций и выращенных на биофабрике // Фундаментальная наука и клиническая медицина: материалы XXII Всерос. мед.-биол. конф. молодых исследователей. – СПб. 2009. – С.47-48.

15. Черная Л.В., Ковальчук Л.А., **Нохрина Е.С.** Адаптационно-компенсаторные возможности медицинских пиявок к экстремально высоким концентрациям тяжелых металлов в модельном эксперименте // Проблемы экологии: тез. докл. Междунар. науч. конф. и Междунар. шк. для молодых ученых. – Иркутск, 2010. – С. 479.

16. **Нохрина Е.С.**, Ковальчук Л.А., Черная Л.В. Оценка физиологического состояния медицинских пиявок (*Hirudo verbana* Carena), выращенных в условиях интенсивного питания и роста // XXI Съезд Физиологического общества им. И.П.Павлова: тез. докл. – М.– Калуга, 2010. – С. 446.

17. Черная Л.В., Ковальчук Л.А., **Нохрина Е.С.** Сравнительный анализ состояния аминокислотного пула хищных и кровососущих пиявок // XXI Съезд Физиологического общества им. И.П.Павлова: тез. докл. – М.– Калуга, 2010. – С. 672.

18. **Нохрина Е.С.** Оценка физиологического состояния медицинских пиявок *Hirudo medicinalis* L., обитающих в Луганском национальном заповеднике // Видовые популяции и сообщества в естественных и антропогенно трансформированных ландшафтах: состояние и методы его диагностики: материалы XI Междунар. науч.-практ. экол. конф. – Белгород, 2010. – С. 175.

19. **Нохрина Е.С.**, Ковальчук Л.А., Черная Л.В. Сравнительная оценка содержания свободных аминокислот в тканях медицинских пиявок, выращенных на биофабриках различных регионов России // Первые Международные Беккеровские чтения: сб. науч. трудов: в 2 ч. – Волгоград, 2010. – Ч.1. – С. 471-473.

20. **Нохрина Е.С.** Микроэлементный и аминокислотный статус медицинских пиявок (*Hirudo medicinalis* L.) в водоемах, не подверженных активному воздействию антропогенных потоков тяжёлых металлов // Наука, природа и общество: материалы Междунар. конф. – Миасс; Екатеринбург, 2010. – С. 169-172.