

Л.А. Ковальчук<sup>1,5</sup>, Л.В. Черная<sup>1,5</sup>, А.Э. Тарханова<sup>2,3,5</sup>, Е.С. Нохрина<sup>4,5</sup>  
**ОСНОВНОЙ ОБМЕН И СОДЕРЖАНИЕ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В ТКАНЯХ  
 МЕДИЦИНСКИХ ПИЯВОК (*HIRUDO MEDICINALIS* L.) ИЗ ПРИРОДНЫХ  
 ПОПУЛЯЦИЙ И ВЫРАЩЕННЫХ В ИСКУССТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ  
 БИОФАБРИКИ**

<sup>1</sup> Институт экологии растений и животных УрО РАН, Екатеринбург; <sup>2</sup> Уральская государственная медицинская академия, Екатеринбург; <sup>3</sup> Центральная городская клиническая больница № 1, Екатеринбург;  
<sup>4</sup> Областная детская клиническая больница № 1, Екатеринбург; <sup>5</sup> Лаборатория проблем адаптации  
 СУНЦ РАМН и Правительства Свердловской области

### Введение

Активный поиск новых соединений — иммуномодуляторов, которые могут использоваться при лечении различных заболеваний вновь заставил обратить внимание на природные средства, не вызывающие побочных реакций даже при длительном их применении. И метаболическая терапия, включающая естественные для организма соединения: аминокислоты, микроэлементы, витамины, образующиеся в процессе обмена веществ, не является исключением, а экзогенное введение комплекса аминокислот и микроэлементов с использованием медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis*) способно благоприятно повлиять на углеводный, липидный и белковый обмен, на состояние иммунитета, повышая неспецифическую резистентность организма [3, 6, 9, 18].

Лечебное действие медицинских пиявок обусловлено комплексным воздействием биологически активных веществ, продуцируемых пиявками и проявляется в противотромбическом, тромболитическом и гипотензивном действии;

репаративном воздействии на поврежденную стенку кровеносного сосуда; антиатерогенном действии, снижая уровень холестерина и триглицеридов в крови; антигипоксическом влиянии; иммуностимулирующем действии, проявляющемся в повышенной фагоцитарной активности крови [4, 5, 7, 8].

Внимания заслуживают и биологически активные вещества (БАВ), выделяемые медицинской пиявкой в кровотоки при кровососании, обладающие как анальгезирующим действием; так и обеспечивающие нейтрализацию агрессивного воздействия мутагенов за счет стимулирования эффекта суперметилирования ДНК [14]. Укусы пиявок вызывают возбуждение определенных рефлексогенных зон на поверхности тела, оказывающие благоприятное воздействие на организм больного.

Высокоспецифичный фермент секрета слюнных желез пиявок — дестабилаза, являясь ингибитором протеолитических ферментов, обладает выраженным нейротрофическим эффектом и, будучи прочным

белок-липидным комплексом (ММ 12,3 кДа), обладающим высокой агрегационной способностью, разрушает ранее образовавшиеся фибриновые сгустки [4, 17]. Ведутся исследования по неспецифической протеолитической активности у дестабилазы в присутствии DS-Na [5]. Имеются сведения о частичном и даже полном восстановлении функций, утраченных вследствие органического поражения нервной ткани при лечении медицинскими пиявками [9].

Эффективность лечения с использованием пиявок определяется и гуморальным действием секрета слюнных желез, представленным ингибиторами протеолитических ферментов [19]. Исследование действия секрета пиявки на реологические характеристики крови в норме и при развитии экспериментального липоидоза показали существенное снижение предельного напряжения сдвига крови и коэффициента агрегации [7]. Терапевтическая эффективность медицинских пиявок обусловлена и наличием в составе секрета гиалуронидазы, обеспечивающей проникновение и других компонентов в кровотоки. Учитывая этот факт, представляется возможным проанализировать эффект секрета слюнных желез при кожных аппликациях.

По мнению специалистов, медицинская пиявка является малоудобной лекарственной формой, требующей достаточного времени, и поэтому идет работа по созданию эффективных и удобных в применении лекарственных форм на основе биологически активных соединений, продуцируемых медицинской пиявкой [14, 15, 20]. Вместе с тем создаваемые на основе пиявки лекарственные препараты могут лишь упростить процессы гирудотерапии, но ни в коем случае не вытеснят медицинскую пиявку из клинической практики.

Возрастающий спрос на медицинскую пиявку приводит к более интенсивному ее отлову из естественных водоемов. К настоящему времени подробно изучены фармакологические аспекты применения биологически активных соединений, продуцируемых медицинскими пиявками, однако отсутствуют сравнительные исследования физиологического состояния

медицинской пиявки из природных популяций и выращенных в искусственных условиях на биофабрике.

Поскольку различия в образе жизни и условиях содержания или обитания, несомненно, влияют на физиологию медицинской пиявки, это и определило цель наших исследований: дать сравнительную характеристику физиологическим особенностям медицинских пиявок из природной популяции и выращенных в искусственных условиях на биофабрике. Учитывая это, для нас представлял также интерес микроэлементный состав тканей пиявок, поскольку из всех токсиантов, поступающих в водную среду, одними из наиболее опасных для живых организмов являются тяжелые цветные металлы, так как они в сравнительно малых концентрациях могут оказывать токсическое воздействие на гидробионтов.

Некоторые из токсиантов, такие как свинец, оказывают явно выраженное воздействие на многочисленные органы, тогда как другие, например кадмий, имеют более ограниченную область токсического действия. В зависимости от форм и путей проникновения в организмы металлы могут проявлять и канцерогенные свойства. При этом для каждого металла существует свой механизм токсического действия, обусловленный конкуренцией между необходимыми и токсичными металлами за места связывания в белковых молекулах.

В водной среде основная часть тяжелых металлов концентрируется в донных отложениях и во всех звеньях трофических цепей. Биологические последствия этого проявляются прежде всего в прямом токсическом воздействии на гидробионтов [13].

## Материалы и методы

### *Общая характеристика экспериментального материала*

В экспериментах использованы 101 половозрелая особь *Hirudo medicinalis medicinalis* L. Сформированы 2 группы лечебных пиявок:

1 группа — пиявки природных популяций, отловленные в водоемах Тамбовской области (природные,  $n = 28$ )

2 группа — пиявки, выращенные на биофабрике (искусственные)

1.1. — голодные особи ( $n = 35$ )

1.2. — сытые особи ( $n = 38$ )

В природе медицинская пиявка может от случая к случаю сосать кровь представителей всех классов позвоночных, отдавая предпочтение лягушкам и млекопитающим (в том числе человек). Водоем, в котором были отловлены для эксперимента медицинские пиявки, населен большим количеством озерных лягушек, что позволяет предположить, что кровь лягушек в данном случае была основным кормом пиявок. Другая группа пиявок была взята на Балаковской биофабрике (Саратовская область). В лабораторных условиях пиявок после выхода из коконов держали в

банках с отстоянной водой и регулярно — один раз в месяц кормили кровью с бойни.

Животных для эксперимента отбирали без признаков заболеваний. В лабораторном помещении, где содержались пиявки, поддерживались определенная температура, влажность и освещение. Содержание и уход за пиявками полностью соответствовали правилам и требованиям экспериментальной физиологии. Выполнено 450 анализов.

### *Определение основного обмена*

Определение энергетического обмена животных проводили по потреблению кислорода с помощью оптико-акустического газоанализатора МН-5130. Пиявок перед началом эксперимента взвешивали на электронных весах типа KERN 442-432N ( $d = 0,1$  г) и помещали по одной в респираторную камеру газоанализатора на 20 минут при температуре воздуха  $22$  °С. Размеры респираторной камеры позволяли проводить эксперимент при нахождении животного в состоянии покоя. Потребление кислорода выражали в миллилитрах на грамм массы тела животного в течение одного часа.

Для сравнительного анализа использовали литературные данные о потреблении кислорода медицинскими пиявками из природных популяций [21].

### *Определение содержания микроэлементов (МЭ) в тканях медицинских пиявок*

Многолетние исследования показали, что в общую регуляторную систему организма на всех стадиях развития включена микроэлементная физиологическая система гомеостаза [1, 2, 12]. В основе функционирования которой лежит: 1) избирательное поглощение определенных микроэлементов; 2) избирательная концентрация их органами, тканями, органеллами клетки; 3) их селективная элиминация.

Содержание меди, цинка, железа, марганца, кальция, свинца и кадмия в тканях пиявок определяли методом атомной абсорбции на спектрофотометре ААС-3 в пламени пропан-бутан после обработки проб методом «мокрого» озоления в смеси азотной ( $\text{HNO}_3$ ) и хлорной ( $\text{HClO}_4$ ) кислот [16]. Пробоподготовку образцов проводили в соответствии с требованиями МАГАТЭ, методическими рекомендациями, утвержденными МЗ РФ в 1999 году.

Исследовали ткани медицинских пиявок из природы и выращенных на биофабрике. Для сравнительного анализа уровня содержания МЭ использовали литературные данные о концентрациях тяжелых металлов у кровососущих пиявок из фоновых и загрязненных водоемов России [13].

### *Статистические методы обработки полученных результатов*

Весь экспериментальный материал обработан стандартными методами математической статистики с

использованием программ Statistica и MS Excel 2000. Различия между сравниваемыми выборками считали достоверными при  $P < 0,05$ .

### Результаты исследований и обсуждение

#### Сравнительный анализ энергетического обмена медицинской пиявки в различных физиологических состояниях

Морфометрический анализ показал, что масса сытых медицинских пиявок превышает вес голодных особей более чем в 5 раз: средняя масса голодных пиявок составила  $0,79 + 0,23$  г, сытых —  $4,33 + 0,87$  г. В опыте (при расчете на особь) наблюдалось повышение потребления кислорода у сытых пиявок. Известно, что общее потребление кислорода растет с размером животного, но потребление на единицу веса при этом падает [11]. Интенсивность потребления кислорода у медицинских пиявок зависит от физиологического состояния особей. Так, уровень основного обмена голодных пиявок, выращенных на биофабрике, достигает  $0,64 + 0,035$  мл  $0,2/г$  час, что превышает интенсивность потребления кислорода сытых пиявок ( $0,09 + 0,009$  мл  $0,2/г$  час) в 7 раз ( $P = 0,01$ ). Аналогичные достоверные различия по основному обмену между голодными и сытыми особями медицинской пиявки наблюдаются и в природных популяциях.

Показатели газообмена сытых пиявок из естественных водоемов в 2 раза ниже, чем у голодных особей ( $P = 0,01$ ). Данный факт можно объяснить усиленной подвижностью голодных особей, направленной на поиск жертвы. Интенсивность дыхания гидробионтов в сильнейшей степени зависит от их физиологического состояния: подвижности, половой зрелости, насыщения и т.д. [10].

Известно, что период голодания медицинской пиявки может достигать двух лет. Отчасти это объясняется тем, что в объемистом желудке этих червей помещается много крови, которая сравнительно медленно переваривается. Вещества, выделяемые слюнными железами кровососов, предохраняют кровь от гнилостных процессов. Однако эти пиявки могут переносить продолжительное голодание и тогда, когда запасы крови их в кишечнике уже исчерпаны. Вероятно, морфофизиологические особенности, в основном сильное развитие паренхимы, богатой запасными веществами, обеспечивают пиявкам возможность долго обходиться без пищи на фоне высокого метаболизма. Сравнительный анализ показал, что пиявки, выращенные в искусственных условиях, потребляют кислород интенсивнее, на порядок выше, чем пиявки из природных популяций в обоих физиологических состояниях

Действие на животный организм разного рода экстремальных факторов всегда сопряжено с энергетическими затратами отдельных систем и целого организма. Условия содержания пиявок в искусственных условиях можно считать экстремальными: круглого-

дичный постоянный температурный режим, отсутствие зимней спячки, регулярное частое кормление без права выбора жертвы, качество отстоянной водопроводной воды, искусственное освещение и т.д. В таком режиме медицинские пиявки достигают половой зрелости не в 3 года, как в природе, а за 12–18 месяцев.

Таким образом, по нашему мнению, досрочному половому созреванию особей медицинских пиявок, выращиваемых на биофабриках, помимо прочих условий, способствует повышенный уровень энергетического обмена.

#### Особенности биоаккумуляции медицинской пиявки из природной популяции и выращенной в искусственных условиях биофабрики

Спектрофотометрический анализ показал, что в тканях медицинских пиявок из природной популяции больше всего содержится цинка —  $27,1 + 1,5$  мкг/г сырого веса (рис.). Цинк — биофильный элемент. Будучи связанным с ферментами, гормонами и витаминами, цинк значительно влияет на основные жизненные процессы: кроветворение, размножение, рост и развитие организма, обмен углеводов, белков и жиров, окислительно-восстановительные реакции, энергетический обмен [1]. После кальция и магния цинк является металлом с наибольшей внутриклеточной концентрацией [12].

Концентрации меди в тканях у «природных» пиявок составляют  $0,22 + 0,014$  мкг/г сырого веса. Медь является незаменимым микроэлементом, необходимым для нормальной жизнедеятельности человека и животных. Она — важная составная часть металлопротеидов, регулирующих окислительно-восстановительные реакции клеточного дыхания, усвоения молекулярного азота. Входя в состав гормонов, медь влияет на рост, развитие, воспроизведение, обмен, процессы гемоглобинообразования, фагоцитарную активность лейкоцитов.

Свинец у пиявок данной группы присутствует в количестве  $0,11 + 0,023$  мкг/г сырого веса. Его содержание в органах и тканях животных (от 2,3 до 35 мкг/г) на 4–5 порядков выше, чем в морской воде ( $0,0003$  мкг/мл) и воде рек ( $0,005$  мкг/мл), и коррелирует со средним содержанием этого элемента в почве ( $1$  мкг/г), что может рассматриваться как указание на поступление этого элемента в организм преимущественно с продуктами питания [11, 12].

По данным наших исследований, в природе медицинская пиявка не накапливает остротоксичные кадмий. Кадмий не является жизненно необходимым микроэлементом и не установлено его специфического биологического значения, кроме влияния на обмен физиологически важных химических элементов, таких как Zn, Cu, Fe.

Уровень накопления Cu, Zn и Pb в тканях пиявок из природной популяции не превышает концентрации

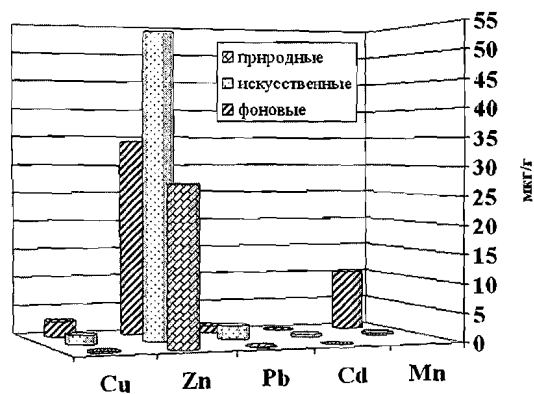


Рис. 1. Содержание микроэлементов (мкг/г) в тканях медицинских пиявок из природных популяций и выращенных на биофабрике

этих тяжелых металлов у кровососущих пиявок из фоновых водоемов. Этот факт обусловлен экологическими особенностями пиявок изучаемой группы. Водоем, в котором обитали исследованные нами особи медицинской пиявки, окружен со всех сторон лесом, расположен в 40 км от автотрассы и 80 — 100 км от источников техногенного загрязнения (промышленные предприятия г. Липецка).

Содержание исследуемых тяжелых металлов в тканях медицинских пиявок из естественного водоема можно расположить в ряд  $Zn > Cu > Pb$ .

Пиявки, выращенные на биофабрике, отличаются от пиявок из природной популяции по способности к биоаккумуляции изучаемых микроэлементов (рис.). Так, концентрации тяжелых металлов в тканях «искусственных» пиявок изменяются в ряду  $Zn > Pb > Cu > Cd$ . Особи медицинской пиявки, выращенные на биофабрике, отличаются от «природных» пиявок достоверно высоким содержанием всех исследованных микроэлементов ( $P < 0,05$ ).

Самые высокие концентрации характерны для цинка:  $52,9 \pm 3,77$  мкг/г сырого веса, что почти в два раза превышает содержание этого микроэлемента в тканях «природных» пиявок (различия достоверны при  $P < 0,05$ ). Известно, что белковая диета способствует всасыванию цинка. Поскольку пиявок на биофабрике выращивают в режиме интенсивного кормления, можно предположить, что это способствует достаточно высокому накоплению цинка в их тканях.

Отмечено высокое содержание свинца в тканях пиявок, выращенных в искусственных условиях:  $2,36 \pm 0,54$  мкг/г сырого веса. Это превосходит более чем в двадцать раз «природные» и в два раза фоновые концентрации (различия достоверны при  $P < 0,05$ ). На обмен свинца оказывает влияние множество факторов и прежде всего химические элементы, близкие к нему по физико-химическим свойствам: цинк, медь, и кадмий.

Концентрации Cu в тканях «искусственных» пиявок соответствуют фоновым значениям:  $1,58 \pm 0,24$  мкг/г,

но превышают содержание этого элемента в тканях пиявок из природных популяций более чем в семь раз (различия достоверны при  $P < 0,05$ ).

В отличие от пиявок из природы, пиявки с биофабрики аккумулируют кадмий, и в достаточно высоких концентрациях:  $0,43 \pm 0,03$  мкг/г сырого веса. Высокая токсичность кадмия связана с аккумулярованием его в тканях животных ввиду отсутствия гомеостатического механизма регулирования содержания. Тем не менее имеются сведения и о толерантности к кадмию [1, 12].

Итак, содержание Zn, Pb и Cd в тканях пиявок, выращенных на биофабрике, соответствуют концентрациям этих токсикантов у пиявок из загрязненных водоемов. Однако столь высокие концентрации металлов не оказывают патогенного влияния на организм пиявок, что позволяет предположить наличие у них механизмов аварийного регулирования к действию этих токсикантов; возможно, высокотоксичные элементы находятся в организме пиявок в связанной, нетоксичной форме.

Помимо содержания тяжелых металлов в тканях «искусственных» пиявок, нами получены данные о концентрациях в них биофильных элементов: кальция, железа и марганца. Эти микроэлементы аккумулируются пиявками в ряду  $Fe > Ca > Mn$  и достигают концентраций — 226,78 мкг/г, 154,22 мкг/г и 0,33 мкг/г соответственно.

Высокий уровень микроэlementного обмена у «искусственных» пиявок, вероятно, определяется как качеством водопроводной отстоянной воды, в которой содержатся пиявки, так и качеством и количеством крови крупного рогатого скота, которой они питаются. Вместе с тем обнаруженный нами высокий уровень основного обмена может способствовать более интенсивной и эффективной биоаккумуляции.

Следует отметить, что на биоаккумуляцию тяжелых металлов возраст пиявок не влияет, а определяющими факторами являются условия обитания (содержания) и качество потребляемого корма.

## Выводы

1. В результате проведенных исследований установлено, что основной обмен медицинской пиявки при искусственном разведении на биофабрике зависит от ее физиологического состояния. Уровень потребления кислорода голодных пиявок ( $0,64$  мл  $O_2$ /час) превышает интенсивность обмена сытых пиявок ( $0,09$  мл  $O_2$ /г час) в 7 раз.

2. При оценке содержания микро- и макроэлементов в тканях медицинских пиявок выявлено, что особи, выращенные на биофабрике, отличаются от пиявок из природных популяций достоверно повышенным содержанием исследованных макро- и микроэлементов, как эссенциальных, так и ксенобиотиков — свинца и кадмия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авцын А.П., Жворонков А.А., Риш М.А., Строчкова Л.С. Микроэлементы человека. М.: Медицина, 1991, 496 с.
2. Агаджанян Н.А., Скальный А.В. Химические элементы в среде обитания и экологический портрет человека. М.: КМК, 2001. 83 с.
3. Баранова Ф.С., Калашникова Е.А. Иммунодепрессивные свойства пиявиты. // В кн.: Лечение медицинскими пиявками и препаратами из них. М.: 1998. С. 59 — 60.
4. Басанова А.В., Баскова И.П., Завалова Л.Л. Регуляторы тромбоцитарно-сосудистого и плазменного звеньев гемостаза из кровососущих // Биохимия. — 2002, т. 67., вып. 1. С. 167 — 176.
5. Баскова И.П., Завалова Л.Л. Ингибиторы протеолитических ферментов медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis*) // Биохимия. — 2001, т. 66, вып 7. С. 869 — 882.
6. Геращенко Л., Никонов Г. Вам поможет медицинская пиявка: энциклопедия гирудотерапии: лечение без лекарств. М.: АСТ: Астрель: Транзиткнига, — 2005. 334 с.
7. Григорян С.С., Соколова И.А., Шахназарова А.А., Сергеев С.Н., Давыдов Д.В., Никонов Г.И., Титова Е.А., Фирсов Н.Н. Влияние медицинской пиявки на реологические показатели крови крыс в норме и при развитии экспериментального липоидоза // Физиология. — 1995. Т. 340. № 6. С. 830 — 831.
8. Живогляд Р.Н. Гирудотерапия эндометриоза, гиперпластических процессов эндометрия и хронического сальпингоофорита в стадии обострения по инфекционно-токсическому типу: Автореф. дисс.... канд. мед. наук. — Казань. — 1999. — 24 с.
9. Исаханян Г.С. Гирудотерапия в клинике внутренних болезней. — Ереван: Айастан — 1991. — 175 с.
10. Ковальчук Л.А. Интенсивность дыхания и окислительного фосфорилирования в онтогенезе бесхвостых амфибий // Докл. АН СССР, т. 227. № 1. — 1977. С. 216 — 219.
11. Константинов А.С. Общая гидробиология: Учебник. — М.: Высшая школа. — 1979. 480 с.
12. Москалев Ю.И. Минеральный обмен. — М.: Медицина. — 1985. 288 с.
13. Никаноров А.М., Жулидов А.В. Биомониторинг металлов в пресноводных экосистемах. — Л.: Гидрометеиздат. — 1991. 312 с.
14. Никонов Г.И. Биологически активные вещества, продуцируемые медицинскими пиявками, и механизмы их действия // Асклепейон. — 1998. № 1 — 4. С. 29 — 41.
15. Симакова Т.Г. Клинико-патогенетическое обоснование применения гирудотерапии и фитопрепарата «Гингитек» в комплексном лечении парадонтита Автореф. дисс.... канд. мед. наук. — М.: Моск. гос. мед.-стомат. ун-т. — 2001. — 24 с.

16. Хавезов И., Цалев Д. Атомно-абсорбционный анализ: Пер. с болг. Г. А. Шейниной / Под ред. С.З. Яковлевой. — Л.: Химия. — 1983. 144 с.

17. Чалисова Н.И., Журавский С.Г., Пенниайнен В.Л., Бережной С.Н., Артамонова И.И., Завалова Л.Л., Баскова И.П. Стимулирующее влияние дестабилизатора компонента секрета слюнных желез медицинской пиявки, на рост нейритов чувствительных нейронов в органотипической культуре // Цитология. — 1999. Т. 41. № 1. — С. 48 — 52.

18. Щеголев Г.Г., Федорова М.С. Пиявка и ее применение. М.: Медгиз. — 1955. 68 с.

19. Ascenzi P., Amiconi G., Bode W., Bolognesi M., Coletti M., Menegatti E. Protease inhibitors from European medicinal leech *Hirudo medicinalis*, structural and biomedical aspects // Mol. Aspect Med. — 1995. vol. 1. — P. 215 — 313.

20. Crisp Kevin M., Klukas Kathleen A., Gilchrist Laura S., Nartyey Adelrita J., Mesce Karen A. / Distribution and development of dopamine— and octopamine synthesizing neurons in the medicinal leech // J. Comp. Neurol. — 2001. — 442. № 2. — P. 115 — 129.

21. Herter K. Der medicinische Bluteigel und seine Verwandten. A. Zeinsen Verlag. Wittenberg Lutherstadt — 1968. — 199 S.

*Kovalchuk L.A., Chernaya L.V., Tarkhanova A.E., Nokhrina E.S.*

## BASAL METABOLISM AND CONTENT OF TRACE ELEMENTS IN THE TISSUES OF MEDICAL LEACHES (*HIRUDO MEDICINALIS* L.) FROM NATURAL POPULATIONS AND THOSE BRED AT THE BIOFACTORY

The paper reports on the results of a research on the physiological state of medicinal leaches from a natural population and those bred at the biofactory. Intensive oxygen consumption was observed in the artificially grown leaches. Their high level of energy metabolism promotes a more intensive and effective accumulation of xenobiotics. Estimation of trace elements contents in their tissues showed that they differed from the leaches from natural populations in a significantly higher contents of Pb and Cd, the investigated essential and xenobiotic trace elements.

Key words: basal metabolism, trace elements.

Поступила 19 ноября 2007 г.