

ЭЛЕМЕНТНЫЙ И АМИНОКИСЛОТНЫЙ СПЕКТР СЕКРЕТА СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ И ТКАНЕЙ МЕДИЦИНСКИХ ПИЯВОК. ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ ГИРУДОТЕРАПИИ

УДК 615.811.2 - 615.324/326-577.118:577.122.3

Ковальчук Л. А. - ведущий научный сотрудник, д.б.н.,

Черная Л. В. - старший научный сотрудник, к.б.н.

ФГБУН «Институт экологии растений и животных Уральского отделения РАН», г. Екатеринбург, Россия

ELEMENTAL AND AMINO ACID SPECTRUM OF A SECRET OF SALIVARY GLANDS AND FABRICS OF MEDICAL LEECHES. VALUE FOR A GIRUDOTERAPIYA

Koval'chuk L.A., Chernaja L.V.

Введение

На современном этапе развития медицины при выборе средств и методов лечения и профилактики заболеваний широко используется сочетание традиционных и нетрадиционных методов терапии. К числу последних относится гирудотерапия, имеющая опыт с практическими результатами отечественных и зарубежных клиницистов, и исследованиями по расшифровке механизмов местного и общего действия биологически активных соединений, продуцируемых медицинскими пиявками [1, 2, 3, 4, 5].

Однако, несмотря на достаточную изученность спектра биологически активных соединений, содержащихся в секрете медицинской пиявки, в литературе недостаточно данных о ее минеральном и аминокислотном составе. Учитывая важную роль эссенциальных макро- и микроэлементов (МЭ) и свободных аминокислот (АК) в процессах биосинтеза высокоактивных биологически соединений (белки, медиаторы, гормоны, эстрогены и др.), актуальность исследования их содержания в секрете слюнных желез (ССЖ) медицинской пиявки несомненна [6, 7]. Интерес представляет и подобные исследования тканей пиявок, поскольку их гомогенаты широко используются в фармацевтике и косметологии [8].

Основным параметром медицинской пиявки, как лекарственного средства является срок голодания, которым определяется наличие в составе ССЖ полностью сбалансированного комплекса биологически активных веществ. Показано, что оптимальная эффективность слюны пиявок наступает уже к трем месяцам голодания, причем, что эти гидробионты способны голодать больше года [9].

При исследовании динамики концентраций макро- и микроэлементов и свободных аминокислот в тканях медицинских пиявок на разных сроках голодания авторами было установлено, что оптимальным для использования гомогенатов тканей пиявок в промыш-

ленных целях является пятимесячный срок голодания, для которого характерны максимальные концентрации свободных АК, достаточно высокий уровень биохфильных МЭ и пониженное содержание тяжелых металлов [10].

В то же время нами было показано, что медицинская пиявка при ускоренном развитии и росте в искусственных условиях обладает потенциально высокой кумулятивной активностью, как к эссенциальным, так и к токсичным металлам, которая реализуется при высоком уровне загрязнения водной среды такими элементами [11, 12, 13]. С этих позиций представляет интерес уровень максимального содержания тяжелых металлов в ССЖ медицинских пиявок, и возможность риска поступления избыточного количества экотоксикантов со слюной кровососущих гирудинид в организм человека.

Данная работа посвящена исследованию уровней содержания макро- и микроэлементов и свободных аминокислот в тканях и в секрете слюнных желез медицинской пиявки, выращенных в искусственно созданных условиях.

Материалы и методы исследования

Для сравнительной оценки минерального состава и аминокислотного спектра тканей и секрета слюнной железы медицинских пиявок были использованы 100 взрослых особей *Hirudo verbana* Cargen, выращенных на производстве «Международный центр медицинской пиявки» (Московская обл., п. Удельная), период голодания которых составил пять месяцев.

Секрет слюнных желез получали по общепринятой методике: на голый кончик зафиксированной пиявки клали несколько кристалликов хлорида натрия и по истечении 1-2 минут вводили в ротовую полость силиконизированную пилетку, содержащую физиологический раствор, и отсасывали секрет, повторяя процедуру несколько раз [14].

Содержание макро- и микроэлементов в тканях (мкг/г влажной ткани) и в ССЖ (мкг/мл) пиявок опреде-

ляли методом атомно-абсорбционной спектрометрии на спектрофотометре ААС-3 и на приборе Analyst-100 фирмы Perkin Elmer. Концентрации свободных аминокислот (АК, мкмоль/100г влажной ткани; мкмоль/100мл % от суммарного фонда) в кожно-мышечной ткани и в ССЖ пиявок исследовали методом ионообменной хроматографии с помощью автоматического анализатора аминокислот ААА-389 (Microtechna, Чехия).

Весь экспериментальный материал обработан стандартными методами математической статистики с использованием программы Statistica. Различия между сравниваемыми параметрами считали достоверными при $p < 0,05-0,001$.

Результаты и их обсуждение

Обнаружено, что суммарные концентрации изучаемых МЭ в тканях Н. verbae в 6,4 раза превосходят их общее содержание в ССЖ ($p < 0,01$) (табл.).

Показано, что Концентрации исследуемых макро- и микроэлементов в тканях пиявок располагаются в ряду: $Ca > Fe > Mg > Zn > Cu > Ni > Pb > Co > Mn > Cd > Sr$. Для ССЖ подобный ряд выглядит иначе: $Ca > Mg > Zn > Fe > Sr > Cu > Mn > Pb > Ni > Co > Cd$.

Из представленных данных видно, что в концентрации элементов приоритетными элементами тканевой являются эссенциальные МЭ: кальций, железо, магний и цинк, суммарное процентное содержание которых составляет 98,1%. Основу минерального пула ССЖ Н. verbae (98,8%) составляют кальций, магний и цинк, причем 87,5% приходится на высокобиофильный макроэлемент – кальций (табл.).

Обнаружено, что слюна медицинских пиявок, по сравнению с их тканями, значительно обеднена железом, содержание которого в гомогенатах составляет 31,7%, а в ССЖ – только 0,76%. Подобное отмечено и для содержания токсичных металлов. Так, на суммарную долю никеля, кадмия и свинца в тканях пиявок приходится 0,90%, в то время как их общее процентное содержание в слюне в 22,5 раза меньше и составляет всего 0,04%, что свидетельствует о барьерной и депонирующей функциях тка-

ней при формировании микроэлементного профиля слюнной жидкости пиявок.

Наименьшие различия концентраций МЭ в тканях и в ССЖ характерны для биофильных металлов (стронция и кальция), содержание которых (мкг/мл) в слюне в 1,19 и 2,6 раза меньше, чем в тканевых гомогенатах (мкг/г): далее следуют эссенциальные МЭ магний (в 14,3 раза), марганец (в 25,2 раза), цинк (в 28,2 раза) и медь (в 32,2 раза) ($p < 0,01$) (табл.).

Обнаружено, что содержания токсичных металлов (Ni, Co, Pb) в ССЖ медицинских пиявок на два порядка ниже, чем в тканях ($p < 0,001$) (табл.). Так, концентрации свинца в слюне Н. verbae в 99 раз ниже, чем в тканях, никеля – в 209 раз, кадмия – в 443 раза ($p < 0,001$). Самые большие различия выявлены для кобальта – содержание его в тканях в 958 раз превышает таковое в ССЖ ($p < 0,001$) (табл.).

Сравнение аминокислотных спектров тканей и ССЖ медицинских пиявок также показало их существенные различия. Суммарные концентрации свободных АК в тканях Н. verbae (1993,1 ± 62,3 мкмоль/100г) были в 3,6 раза выше, чем в секрете слюнной железы (553,2 ± 3,69 мкмоль/100мл) ($p < 0,01$).

В тканях медицинских пиявок не обнаружено таурина, пролина, цитруллин и триптофана, содержание которых в ССЖ составили 1,42%, 1,76%, 0,07% и 0,43% соответственно. Выявлены достоверные различия в процентном содержании практически всех свободных АК в слюне и тканях медицинских пиявок ($p < 0,05$).

Основную часть пула заменимых аминокислот (3АК) в тканях Н. verbae (87,2% от суммарного фонда) составляют аспарагиновая, глутаминовая кислоты и глутамин с аланином. В ССЖ пиявок заменимые аминокислоты (61,2%) представлены в основном за счет глутамата и его амида: серина, глицина и аспарагиновой кислоты (рис.).

В гомогенатах тканей пиявок содержание аспарагиновой кислоты (в 3,7 раза) и аланина (в 1,8 раза) превышало таковое в ССЖ, но было значимо меньше для серина (в 3,1 раза), глицина (в 1,4 раза), цистеина (в 1,2 раза) и тирозина (в 1,3 раза) ($p < 0,05$) (рис.).

Таблица. Содержание макро- и микроэлементов (МЭ) в тканях (мкг/г) и в секрете слюнных желез (ССЖ, мкг/мл) медицинских пиявок

| Элемент | Ткань (мкг/г) | ССЖ (мкг/мл) | Отношение (ткань/ССЖ) | Ткань (мкг/г) | ССЖ (мкг/мл) | Отношение (ткань/ССЖ) |
|----------|---------------|--------------|-----------------------|---------------|--------------|-----------------------|
| Cu | 3,38 ± 0,016 | 0,61 | 0,103 ± 0,0023 | 0,12 | 32,2 | |
| Zn | 58,4 ± 1,84 | 10,62 | 2,07 ± 0,042 | 2,42 | 28,2 | |
| Mn | 0,68 ± 0,02 | 0,12 | 0,025 ± 0,0016 | 0,03 | 25,2 | |
| Fe | 174,2 ± 1,74 | 51,7 | 0,65 ± 0,023 | 0,76 | 268 | |
| Ca | 197,3 ± 1,54 | 35,9 | 75,1 ± 2,343 | 87,5 | 2,6 | |
| Mg | 109,5 ± 2,72 | 10,9 | 7,65 ± 1,04 | 8,92 | 14,3 | |
| Co | 1,15 ± 0,021 | 0,21 | 0,0012 ± 0,00006 | 0,001 | 958 | |
| Sr | 0,25 ± 0,032 | 0,05 | 0,21 ± 0,012 | 0,29 | 1,19 | |
| Ni | 2,51 ± 0,08 | 0,46 | 0,012 ± 0,0005 | 0,014 | 209 | |
| Cd | 0,31 ± 0,011 | 0,06 | 0,0067 ± 0,00008 | 0,0008 | 443 | |
| Pb | 2,08 ± 0,024 | 0,36 | 0,021 ± 0,0015 | 0,026 | 99 | |
| Сумма МЭ | 549,7 ± 8,03 | 100 | 55,81 ± 2,57 | 100 | 6,4 | |

* различия достоверны, $p < 0,05$

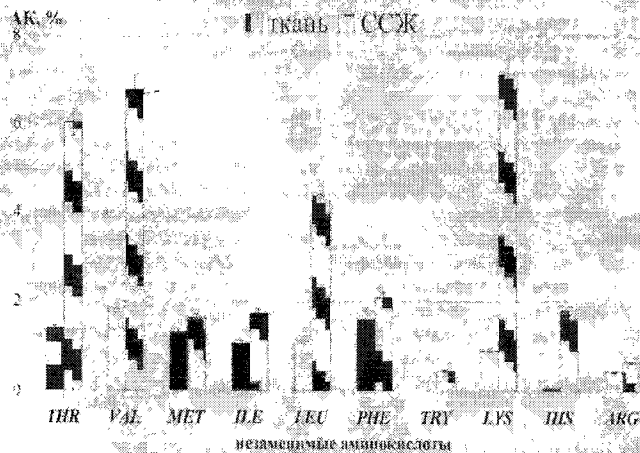
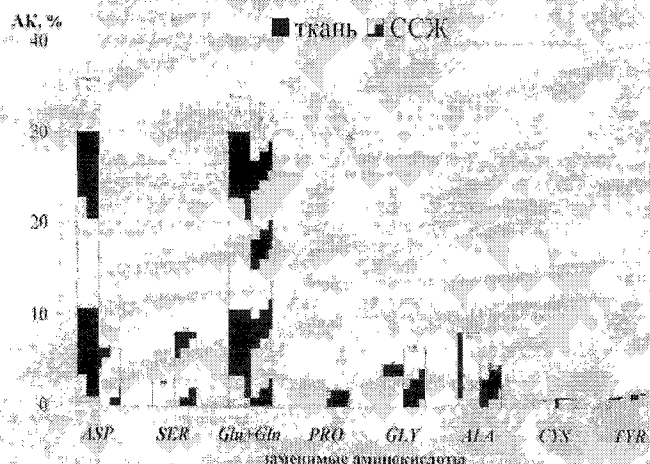


Рисунок. Содержание свободных аминокислот (% от суммарного фонда АК) в тканях и в секрете слюнных желез (ССЖ) медицинских пиявок

Незаменимых аминокислот в ССЖ пиявок - 32,7%, что в 3,3 раза больше, чем в их тканях (9,9%).

Наибольший вклад в формирование пула незаменимых АК (НАК) тканей пиявок вносят валин, фенилаланин, треонин, метионин и лейцин (рис.). В секрете слюнных желез *H. verreauxi* основу фонда НАК составляют лизин, валин, треонин и лейцин; при этом процентное содержание всех незаменимых АК элоны превышает их доли в тканях (рис.). Наибольшие различия отмечены для лизина (в 8 раз), треонина (в 4,3 раза), лейцина (в 3,9 раза) и валина (в 3,7 раза).

Выводы

Проведенные исследования показали, что в тканях медицинских пиявок суммарное содержание макроэлементов в 6,4 раза выше, чем в секрете слю-

нных желез; а для суммарного фонда свободных аминокислот значение этого показателя равно 3,6.

При формировании элементного состава ССЖ медицинских пиявок приоритеты принадлежат эссенциальным металлам (Ca, Mg, Zn), а содержание экотоксикантов (Co, Cd, Ni, Pb) благодаря депонирующей функции тканей, возрастает в ССЖ сотые доли процентов от их общего количества. Установлено, что аминокислотный пул секрета слюнных желез медицинских пиявок, в сравнении с тканевым характеризуется более высоким содержанием незаменимых аминокислот.

Исследования проведены при поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН - «Фундаментальные науки - медицине», грант №12-П-4-1049.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Свириженко Л.С., Белова Е.П., Мачава А.Н. Гиперлипидемия в комплексном санаторно-курортном лечении больных ишемической болезнью сердца // Вопросы кардиологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. - 2008. - № 3. - С. 12-15.
- Кузнецова И.П., Кузнецов А.Т., Семенов Е.Н. Изменение показателя гемостаза у больных хронической сердечной недостаточностью под влиянием гирудотерапии // Физиотерапия, бальнеология и реабилитация. - 2011. - № 3. - С. 12-17.
- Жернов В.А. Немедикаментозная восстановительная коррекция при кардиальных состояниях кардиорегуляторной системы у пожилых людей // Вестник восстановительной медицины. - 2008. - № 5. - С. 28-32.
- Рябенко Г.И. Гирудотерапия: наука и практика // Вестник Медицинского центра медицинской науки Гирудотерапии и гирудиферолатерапии. - 2007. - Т. 1. - С. 8-22.
- Нисомы С. Medicina herbaria et nestam: miteme an ago-old gajaxy gajaxy // Alternative and Complementary Therapies. - 2005. - Т. 11. - № 1. - С. 12-16.
- Баскова И.П., Юдина Т.Г., Заварова Л.Л., Дудкина А.С. Белково-липидные комплексы секрета слюнных желез медицинской пиявки: их размеры и морфология // Биомедиа. - 2010. - Т. 7. - № 6. - С. 682-688.
- Баскова И.П., Харитонова С.В., Заварова Л.Л. Липидная активность секрета слюнных желез медицинской пиявки видов Hirudo verbana, H. medicinalis и H. orientalis // Биомедицинские науки. - 2011. - Т. 67. - № 5. - С. 511-519.
- Юдина Т.Г., Сагайдак А.В. Изучение действия препарата «Тивик» на систему гемостаза у больных диабетической ретинопатией // Казанский медицинский журнал. - 2011. - Т. 92. - № 4. - С. 518-519.
- Заварова Л.В., Юдина Т.Г., Заварова Е.А., Карулина Н.И., Юдина Т.Г. Метод определения качества медицинских пиявок // Вестник Международного центра медицинской пиявки Гирудотерапии и гирудиферолатерапии. - 2007. - Т. 5. - С. 247-285.
- Ковальчук Л.А., Черная Л.В., Нохрина Т.С. Элементный и аминокислотный состав тканей медицинских пиявок Hirudo medicinalis L. при хронической патологии // Вестник Самарской государственной медицинской академии. - 2011. - № 6. - С. 51-64.
- Chernaya L.V. Macro- and microelements in tissues of the medicinal leech Hirudo verbana Carenal, grown at a farm in the starvation conditions // In vivo biotechnology. - 2010. - Vol. 11. - № 2. - P. 6.
- Ковальчук Л.А., Черная Л.В., Заварова А.С., Юдина Т.Г. Основной обмен и содержание микроэлементов в тканях медицинских пиявок Hirudo medicinalis L. и гирудотерапия // Биомедиа и современные биотехнологические технологии в медицине. - 2007. - № 4 (16). - С. 49-55.
- Юдина Т.Г., Ковальчук Л.А., Черная Л.В. Динамика накопления тяжелых металлов в тканях медицинской пиявки Hirudo medicinalis L. в модельном эксперименте // Вестник Уральской медицинской академической науки. - 2009. - № 2 (26). - С. 145-148.
- Patent 2243954 РФ. Способ получения секретов слюнных желез кровососущих пиявок, обладающего способностью ингибировать агрегацию тромбоцитов, а также реологические свойства крови и оказывать иммуностимулирующее действие. Баскова, И.П. опублик. 20.10.1995. Бюл. № 51. - 3с.

Резюме

Проведена сравнительная оценка уровня содержания биологически активных соединений (макро- и микроэлементы, свободные аминокислоты) в секрете слюнных желез и в тканях медицинских пиявок Hirudo verbana Carena. Установлено, что в тканях пиявок суммарное содержание макро- и микроэлементов и свободных аминокислот выше, чем в секрете слюнных желез. Формирование биоэлементного спектра слюнной жидкости медицинских пиявок направлено на высокое процентное содержание эссенциальных металлов и незаменимых аминокислот. При этом уровень содержания токсичных металлов (Ni, Cd, Pb) в слюне медицинских пиявок на два порядка ниже, чем в их тканях.

Ключевые слова: медицинские пиявки, секрет слюнных желез, гомогенаты тканей, макро- и микроэлементы, свободные аминокислоты.

Abstract

We investigated the levels of macro- and trace elements and free amino acids in the salivary gland secretion and in the tissues of the medicinal leech *Hirudo verbana Carena*. We found that in the salivary fluid of leeches the percentage of biophytic metals and essential amino acids increased.

Keywords: medicinal leech, salivary gland secretion, tissues, macro- and trace elements, free amino acids.

Контакты:

Ковальчук Людмила Ахметовна. E-mail: kovachuk@pac.uran.ru, KLA@isnet.ru

Черная Людмила Владимировна. E-mail: Chernaya LV@mail.ru