

Л.В. Черная, Л.А. Ковальчук, Н.В. Микшевич

**Эссенциальные и токсичные металлы
тканей медицинских пиявок
(ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ АСПЕКТ)**



Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Институт экологии растений и животных УрО РАН
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Уральский государственный педагогический университет»

Л.В. Черная, Л.А. Ковальчук, Н.В. Микшевич

**Эссенциальные и токсичные металлы тканей
медицинских пиявок
(ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ АСПЕКТ)**

Монография

Екатеринбург 2019

УДК 595.143.6:577.118
ББК Е691.444+Е660.80
Ч49

Рекомендовано Ученым советом федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования
«Уральский государственный педагогический университет»
в качестве научного издания (Решение № 80 от 13.11.2019)

Ответственный редактор:

Большаков В.Н., д-р биол. наук, профессор, академик РАН, Заслуженный деятель науки РФ

Рецензент:

Юшков Б.Г., д-р мед. наук, профессор, член корреспондент РАН, Заслуженный деятель науки РФ

Черная, Л. В.

Ч49 Эссенциальные и токсичные металлы тканей медицинских пиявок (Эколого-физиологический аспект): монография / Л. В. Черная, Л. А. Ковальчук, Н. В. Микшевич; Институт экологии растений и животных УрО РАН; Уральский государственный педагогический университет. – Екатеринбург: [б. и.], 2019. – 320 с.

ISBN 978-5-7186-1222-6

В основу монографии положены обобщенные результаты многолетних экспериментальных исследований авторов. Рассматриваются эколого-физиологические аспекты формирования микрэлементного состава тканей медицинских пиявок в водных экосистемах и в гирудокультуре биофабрик различных регионов России. Показана теоретическая возможность использования новых данных в экологическом мониторинге по оптимизации мер сохранения медицинских пиявок и восполнения их природных ресурсов. Обсуждаются вопросы экологической безопасности использования медицинских пиявок в гиудоформакологии.

Книга адресована специалистам в области экологии, гидробиологии, аквакультуры, природопользования, восстановительной медицины и фармакологии, а также студентам и преподавателям естественнонаучных факультетов.

Работа выполнена в рамках государственного задания Института экологии растений и животных УрО РАН и инициативного традиционного научного сотрудничества кафедры анатомии, физиологии и безопасности жизнедеятельности Уральского государственного педагогического университета и Института экологии растений и животных УрО РАН.

УДК 595.143.6:577.118
ББК Е691.444+Е660.80

ISBN 978-5-7186-1222-6

© Черная Л. В., Ковальчук Л. А., Микшевич Н. В., 2019
© Институт экологии растений и животных УрО РАН
© ФГБОУ ВО «УрГПУ», 2019

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ПОЯСНЕНИЙ

ДО – данные отложения

БАС – биологически активные соединения

БЛП – большие ложноконские пиявки

БФ – биофабрика

ГК – гидрокультура

К_{БН} – коэффициент биологического накопления

МП – медицинские пиявки

МТ – металлотионеины

МЭ – макро- и микроэлементы

ПДК – предельно допустимые концентрации

ПП – природные популяции

ТМ – тяжелые металлы

РСА – анализ главных компонент

РС – главная компонента

«Биоэлементный статус (профиль, спектр, паттерн)» – общепринятые в биоэлементологии термины, как синонимы «микроэлементного состава»

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений и пояснений.....	3
Введение.....	6
Глава 1. Современное состояние проблемы.....	13
1.1. Экологические и физиологические особенности кровососущих и хищных гирудинид.....	13
1.2. Биологическая роль эссенциальных и токсичных микроэлементов.....	35
1.3. Технология выращивания медицинской пиявки.....	53
Глава 2. Материалы и методы исследования.....	61
2.1. Общая характеристика объектов исследования.....	61
2.2. Эколо-географическая характеристика мест обитания пиявок.....	64
2.3. Методы исследования.....	79
2.3.1. Методика определения основного обмена.....	79
2.3.2. Методика определения микроэлементов.....	80
2.3.3. Методика выделения слюнных желез и отбора секрета слюнных желез медицинских пиявок.....	81
2.3.4. Статистические методы обработки результатов.....	82
Глава 3. Аккумуляция тяжелых металлов челюстными пиявками в водных экосистемах естественных ландшафтов.....	84
3.1. Видовая и трофическая специфика микроэлементного спектра тканей медицинских пиявок.....	85
3.2. Географическая вариабельность содержания тяжелых металлов в тканях пиявок и в донных отложениях из мест их обитания.....	95
3.3. Закономерности биологической аккумуляции тяжелых металлов гирудинидами в водных экосистемах различных климатогеографических зон.....	117
Глава 4. Сезонная и возрастная изменчивость микроэлементного спектра в тканях медицинских пиявок из природных популяций.....	135
4.1. Сезонная динамика содержания микроэлементов в тканях медицинской пиявки <i>H. verbana</i>	135
4.2. Возрастные особенности микроэлементного спектра в тканях хищных и кровососущих пиявок.....	165
Глава 5. Формирование микроэлементного спектра тканей и секрета слюнных желез медицинских пиявок в гирудокультуре.....	173
5.1. Видовые, трофические и популяционные особенности основного обмена медицинских пиявок.....	174
5.2. Видовые и региональные особенности микроэлементного спектра тканей медицинских пиявок, выращенных в искусственно созданных условиях на биофабриках.....	178
5.3. Сравнительный анализ содержания МЭ в тканях медицинских пиявок из природных популяций и гирудокультуры.....	189
5.4. Возрастная динамика МЭ в тканях медицинских пиявок <i>H. verbana</i> в условиях ускоренного роста и развития на биофабрике.....	198
5.5. Формирование биоэлементного профиля секрета слюнных желез медицинской пиявки <i>H. verbana</i> в гирудокультуре.....	213

Глава 6. Влияние хронического голода на микроэлементный спектр тканей медицинских пиявок из природных популяций и гирудокультуры.....	233
6.1. Содержание биологически активных металлов в тканях сытых и голодных особей <i>H. verbana</i> и <i>H. sanguisuga</i> из природных популяций.....	233
6.2. Влияние хронического голода на микроэлементный состав тканей медицинской пиявки <i>H. verbana</i> из гирудокультуры.....	242
6.3. Сравнительный анализ влияния хронического голода на МЭ спектр тканей медицинских пиявок из природных популяций и гирудокультуры.....	258
Заключение.....	264
Практические рекомендации.....	269
Библиографический список.....	270

ВВЕДЕНИЕ

«Проблемы, которые занимают исследователя, все чаще не укладываются в рамки отдельной, определенной, сложившейся науки. Мы специализируемся не по наукам, а по проблемам».

В.И. Вернадский

Проблема сохранения редких и исчезающих видов имеет чрезвычайно важное значение для регионов с экстремальными условиями обитания, определяемыми как природными, так и антропогенными факторами. В связи с этим научный и практический интерес представляют охраняемые виды гидробионтов и их биоресурсный потенциал. Создание научных основ экологического мониторинга редких и промышлевых видов гидробионтов естественным образом полагает исследование адаптационно-компенсаторных механизмов, формирующихся в их организме при сочетанном влиянии абиотических и биотических факторов, поскольку прогрессирующее антропогенное загрязнение водных экосистем токсикантами, в том числе тяжелыми металлами, оказывает на них воздействие, сопоставимое с естественными изменениями среды обитания (климатические особенности, сезонные колебания температуры, трофическая обеспеченность и др.), а зачастую превосходит их (Филенко, 1988; Леонова, 2004; Петухова, 2005; Северцова, Северцов, 2007; Воробьев, 2008; Моисеенко, 2009; Габибов и др., 2009; Романова, Спирина, 2010; Алексина и др., 2010; Яковлев и др., 2012; Пряхин и др., 2012; Литвиненко и др., 2013; Мингазова и др., 2014; Микшевич, Ковальчук, 2014; Богатов и др., 2018; Насбулина, Курочкина, 2018).

Несомненна актуальность исследований, направленных на поиск и установление взаимосвязи между особенностями механизмов адаптации гидробионтов к стресс-факторам среды и эколого-физиологическими характеристиками отдельных видов. В исследованиях В. Н. Больщакова (1972), С. С. Шварца (1980), В. П. Казначеева, (1980), П. Д. Горизонтова (1981), Э. И. Колчинского (1990), Ф. З. Меерсона (1993), Д. З. Шибковой, А. В. Аклеева (2006), Г. И. Прониной (2012), Г. М. Чуйко (2017) и др. показано, что при воздействии стрессирующих

факторов внутренней и внешней среды организм мобилизует различные структурно-метаболические и молекулярные механизмы поддержания гомеостаза, снижая негативные последствия влияния факторов воздействия на патогенетические механизмы повреждения органов и систем. Это определяет актуальность исследований роли физиологических процессов в функционировании популяций, а именно, в поддержании их численности и определении характера микроэволюционных преобразований (Одум, 1975; Слоним, 1982; Тимофеев-Ресовский, 1996; Большаков и др., 1984, 1991, 2009; Северцов, 2008; Вершинин, 2009; Тимофеев, 2010; Морузи и др., 2012).

Проблема в полной мере относится к медицинским пиявкам, как значимому биологическому ресурсу России, широко используемому в медицине, ветеринарии, фармакологии и косметологии (Рассадина, Романова, 2008; Ковальчук, Черная, 2013; Каменев, Каменев, 2014; Никишов и др., 2015; Никонов и др., 2015). Эти гидробионты официально занесены в Государственный реестр лекарственных средств РФ, поскольку гирудотерапия показала свою эффективность в качестве, как самостоятельного метода, так и в комплексном лечении более чем 160 заболеваний (Каменев, Барановский, 2006; Никонов, 1992, 1998, 2007).

Из шести видов медицинских пиявок, известных для Палеарктики, на территории России обитают два – *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758 и *Hirudo verbana* Carena, 1820 (Utevsky et al., 2010; Saglam et al., 2016). Оба вида в настоящее время имеют природоохранный статус: лечебная *H. medicinalis* классифицируется как категория «находящаяся под угрозой исчезновения» в Красном списке МСОП, включенном в приложение III к Бернской конвенции, в приложение II к CITES (Utevsky et al., 2014; CITES, 2017); аптечная *H. verbana* отмечается как «редкий, уязвимый или низкого риска угрозы исчезновения вид» для Красных книг отдельных регионов России и Украины (Красная книга..., 2007; Червона книга..., 2009; Кустов, Шаповалов, 2012; Красная книга..., 2017). В указанных документах определены факторы, лимитирующие численность и распространенность медицинских пиявок: массовый вылов в коммерческих целях, загрязнение и уничтожение водоемов, снижение плотности популяции лягушек, служащих источником питания

для молодых пиявок, мелиоративные мероприятия, неблагоприятные условия на северной границе ареала; а также меры их охраны: выявление и сохранение биотопов, использование искусственного воспроизведения для восстановления природных популяций.

В настоящее время медицинские пиявки, используемые в практической медицине, выращиваются в искусственно созданных условиях на биофабриках, однако современная технология гирудокультуры требует регулярного изъятия полово-зрелых особей из природных популяций (Лукин, 1976; Рассадина, Романова, 2008; Кустов и др., 2014). Основные запасы природных медицинских пиявок, используемых в качестве маток-производителей на биофабриках, сосредоточены в водных экосистемах Юга России, Закавказья и Турции (*H. verbana*), в Украине и Молдавии (*H. medicinalis*), где наблюдается их высокая численность.

Тем не менее, несмотря на то, что на фармацевтический рынок поступают медицинские пиявки из гирудокультуры, это не сказывается на восстановлении их природных популяций на большей части ареалов, что обусловлено, помимо браконьерского промысла, усиливающейся антропогенной нагрузкой на пресноводные экосистемы, приобретающей в последние десятилетия глобальный характер (Михайлов, 2006; Каменев, 2007; Elliot, Kutschera, 2011; Saglam et al., 2016). Медицинские пиявки являются биоиндикаторами экологической чистоты водоемов, поскольку весьма чувствительны к химическому загрязнению водной среды (Романова, Климина, 2010; Романенко и др., 2010), в том числе и такими приоритетными поллютантами, как тяжелые металлы (Лапкина, Флеров, 1979, 1980; Флеров, 1989; Нохрина и др., 2009; Черная и др., 2009а; 2010).

В тоже время среди тяжелых металлов некоторые необходимы для жизнеобеспечения и относятся к так называемым биогенным или эссенциальным элементам (Fe, Cu, Zn, Mn, Co, Cr, Mo, Se, I), которые участвуют в процессах роста, развития и репродукции, и существенным образом влияют на метаболические процессы в организме. Однако, индивидуальная потребность гидробионтов в эссенциальных металлах невелика, а в концентрациях, превышающих предельно допустимые, они становятся для него биологически опасными, тогда как токсичные

тяжелые металлы (Cd, Pb, Hg, Al, Be, Ba, Ta), попадая в живой организм, приводят к его отравлению или гибели.

Опасность тяжелых металлов как загрязнителей усугубляется еще и тем, что они устойчивы и быстро накапливаются в гидробионтах, но медленно выводятся из организма, вызывая мутагенные эффекты при воспроизведстве потомства. Именно поэтому вопросы, относящиеся к состоянию и формированию микроэлементного состава тканей имеют важное значение. Следует отметить, что в современной научной литературе эти сведения для медицинских пиявок из природных популяций практически отсутствуют, а закономерности их аккумуляционных особенностей по отношению к тяжелым металлам, изучены недостаточно полно. Очевидно, что меры по сохранению природных популяций медицинских пиявок в современных условиях техногенного загрязнения водной среды должны иметь комплексный характер, включая экологический мониторинг не только их мест обитания, но и данные о фоновых концентрациях эссенциальных и токсичных элементов в тканях в зависимости от абиогенных и биогенных факторов среды.

Известно, 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 (Агаджанян, Скальный, 2001; Ковальчук, 2003; 2008; Оберлис и др., 2008; Нотова и др., 2011; Лебедев и др., 2013; Скальный и др., 2014). Это тем более важно, поскольку медицинские пиявки, выращенные в контролируемых условиях на биофабриках, являются потомками первого поколения особей-производителей из природных популяций. Несмотря на то, что экологическая безопасность использования медицинских пиявок из гирудокультуры в практических целях регламентируется сертификацией выращенных особей согласно санитарным нормативам их физиологических параметров, информация об уровне содержания в организме медицинских пиявок эссенциальных и токсичных металлов в сопроводительных документах отсутствует.

Несмотря на достаточную изученность биологии развития медицинских пиявок и их целебных качеств, в мировой литературе практически без внимания

остается вопрос об их эколого-физиологических особенностях, как в естественной среде обитания, так и в искусственно созданных условиях. Они остаются специфической и наименее изученной группой водных беспозвоночных в плане их способности к поддержанию гомеостаза и формированию адаптивных стратегий к стресс-факторам различного генеза. До настоящего времени проблема влияния экстремальных природных и антропогенных факторов на состояние микроэлементного обмена экологически и физиологически контрастных групп медицинских пиявок систематически не исследовалась. Вместе с тем видовая и возрастная специфика пиявок, а также экологические условия обитания (климат, сезоны года, искусственные условия разведения на биофабриках) могут существенно сказываться на их микроэлементном обмене.

Эти обстоятельства определили цель наших исследований, а именно, изучение закономерностей формирования микроэлементного состава тканей двух видов медицинских пиявок в условиях обитания природных популяций для функциональной оценки производителей при искусственном воспроизводстве на биофабриках. Для получения достоверных данных о влиянии искусственно созданных условий разведения на микроэлементный обмен особей *H. medicinalis* и *H. verbana*, используемых в практической медицине, необходимо определение фоновых концентраций эссенциальных и токсичных металлов в их организме при выращивании в гирудокультуре биофабрик, расположенных на территории различных регионов России.

Предлагаемая читателям монография является результатом обобщения 15-летних полевых и лабораторных исследований авторов по изучению эколого-физиологических особенностей двух видов медицинских пиявок из природных популяций и гирудокультуры. В работе представлены данные по видовой, трофической, географической, сезонной и возрастной изменчивости микроэлементного состава тканей медицинских пиявок. Проведена сравнительная оценка уровней содержания эссенциальных и токсичных металлов в тканях особей *H. medicinalis* и *H. verbana* из природных популяций и гирудокультуры. Исследованы особенности накопления и распределения тяжелых металлов в системе «ткань – слюнные железы»

зы – секрет слюнных желез» медицинской пиявки из гирудокультуры. Изучены закономерности формирования микроэлементного спектра тканей аптечных пиявок в условиях принудительного хронического голодания как одной из фаз существования организма.

Авторы посчитали целесообразным уделить в данной работе внимание эколого-физиологическим аспектам формирования микроэлементного состава тканей ближайшей родственницы медицинских пиявок – большой ложноконской пиявки *Haemopis sanguisuga* (Linnaeus, 1758), которая ведет хищнический образ жизни, характеризуется более широким ареалом и достаточно высокой резистентностью к экотоксикантам (Лукин, 1976; Флеров, 1989; Черная, Ковальчук, 2014). Кроме того в естественных ландшафтах этот вид гирудинид является фоновым для медицинских пиявок *H. medicinalis* и *H. verbana* в силу сходства их биологии развития. Есть мнение, что ложноконские пиявки могут быть использованы в качестве биологического маркера присутствия в водных экосистемах медицинских пиявок (Зиненко и др., 2012). На основании многолетних исследований авторами была показана принципиальная возможность использования большой ложноконской пиявки в качестве биоиндикатора загрязнения водной среды тяжелыми металлами (Ковальчук, Черная, 2003; Черная, Ковальчук, 2004; 2007а; 2009; 2014; Черная и др., 2017). Наш интерес к этой хищной пиявке обусловлен еще и тем, что она, по некоторым данным, является перспективным объектом аквакультуры с целью производства полноценного корма для промысловых рыб (Ceylan et al., 2017). Таким образом, наши результаты исследований закономерностей формирования микроэлементного состава тканей пиявок *H. sanguisuga* при влиянии абиотических и биотических факторов среды представляют интерес не только в научном плане, но могут быть полезны как дополнительные критерии при определении концентраций тяжелых металлов в организме при мониторинге водных объектов в случае использования ее в качестве вида биоиндикатора.

Результаты исследований авторов внедрены в производственные процессы искусственного выращивания медицинских пиявок на биофабриках «Междунан-

родный центр медицинской пиявки» (Московская область), «Гирудо-Мед.Юг» (Краснодарский край).

Авторы выражают искреннюю благодарность за оказанную помощь при сборе биологического материала коллегам: к.б.н. Нохриной Е. С., д.б.н. Утевскому С. Ю., к.б.н. Кузнецовой И. А., к.э.н. Ротовой В. Н., Гребенникову М. Е. Авторы глубоко признательны академику Большакову В. Н., д.б.н. Хохуткину И. М., д.б.н. Вершинину В. Л., д.б.н. Гилеву А. В., к.б.н. Николаевой Н. В. за профессиональный интерес к нашей работе, и за их ценные советы при обсуждении результатов данного исследования. Искреннюю признательность выражаем руководителям биофабрик: «Международный центр медицинской пиявки» – д.б.н. Никонову Г. И., «Гирудо-Мед.Юг» – Казиеву Н. Т., «СибМедПиявка» – Дегунцу М. П. за предоставленный материал и многолетнее сотрудничество.

Глава 1 СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ

1.1. Экологические и физиологические особенности кровососущих и хищных гирудинид

Интерес к образу жизни пиявок, условиям их существования издавна диктовался запросами практики, поскольку медицинские пиявки (МП) широко применялись при лечении различных заболеваний в течение многих столетий, в связи с чем условия, влияющие на рост и размножение МП и их распространение в природе представляли большой интерес для ученых и практиков. Первые экологические очерки и монографии, посвященные образу жизни МП, появились в XIX веке. В некоторых монографиях, помимо сведений о медицинской пиявке, можно найти данные об экологических особенностях других представителях класса *Hirudinea*, в том числе и о большой ложноконской пиявке *Haemopis sanguisuga* (Воскресенский, 1859; Кесслер, 1868). К началу прошлого столетия накопилось достаточно много сведений не только о фауне пиявок, но и об экологических особенностях этих червей (Воскресенский, 1859; Moquin-Tandon, 1846). Достаточно подробно описали отношение исследованных нами гирудинид к различным факторам среды отечественные и зарубежные ученые К. Mann (1962), К. Herter (1936, 1937, 1968), Г. Г. Щеголев (1949) и Е. А. Лукин (1976).

Изучению фауны пиявок, их биологии развития, зоогеографическим и морфофизиологическим особенностям посвящены работы (Воскресенский, 1859; Кесслер, 1868; Плотников, 1907; Зеленский, 1915; Лукин, 1957, 1958, 1968, 1976, 1977; Ливанов, 1937; Щеголев, 1946, 1948, 1949; Эпштейн, 1963; Догель, 1981; Autrum, 1958; Hoffman, 1960; Nesemann, Neubert, 1999; Kutschera, 2007; Utevsky et al., 2010; Elliott, Kutschera, 2011 и мн. др.), что дает значительную информацию, касающуюся эколого-физиологических особенностей кровососущих и хищных гирудинид.

Пиявки относятся к кольчатым червям (*Annelides*) и рассматриваются большинством зоологов как самостоятельный класс названного типа. Класс пиявок

(*Hirudinea*) разделяется на два подкласса: древние пиявки (*Archihirudinea*), к которым относятся два вида примитивного, но в некоторых отношениях специализированного рода *Acanthobdella*, и настоящие пиявки (*Euhirudinea*), к которым относятся остальные виды класса, принадлежащим к четырем семействам (Лукин, 1976).

Всего на земном шаре известно свыше 650 видов пиявок (Nesemann, Neubert, 1999). Точное число видов этих червей определить пока нельзя, так как, с одной стороны, многие описания недостоверны, а с другой – следует ожидать, что будет установлен еще целый ряд новых видов, есть предположение, что их число может достигать 1500 (Зоология ..., 2008). По данным Е. И. Лукина (1976) в Палеарктике распространено около 60 видов, из которых лишь несколько не встречается в пределах России и сопредельных государств.

Медицинские пиявки (*Hirudo* spp.) – наиболее изученные представители класса *Hirudinea*, что связано с их лечебными свойствами. Еще до конца прошлого века систематики относили МП к одному виду – *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758, а ее цветовые формы, приуроченные к определенным климатогеографическим зонам, разделяли на три подвида: *Hirudo m.medicinalis*, *Hirudo m.officinalis* и *Hirudo m.orientalis* (Иогансон, 1935; Herter, 1968; Лукин, 1976; Слока, 1983 и мн.др.). Однако современные молекулярно-генетические исследования ученых P. Trontelj et al. (2004), P. Trontelj and S.U. Utevsky (2005), M. E. Siddall et al. (2007) убедительно доказали, что вышеуказанные подвиды МП являются самостоятельными видами: *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758, *Hirudo verbana* Carena, 1820 и *Hirudo orientalis* Utevsky and Trontelj, 2005. Экспериментально показано, что гаплоидное число хромосом у трех видов медицинских пиявок различно: у *H. medicinalis* – 14, у *H. verbana* – 13 и у *H. orientalis* – 12 (Utevsky et al., 2009; Коваленко и др., 2007). Было установлено, что *H. orientalis* и *H. verbana* отличаются по видовому составу симбиотической микробиоты (Laufer et al., 2008), а результаты анализа белка и лизоцимной активности секрета слюнных желез медицинских пиявок показали существенные различия между *H. medicinalis*, *H. verbana* и *H. orientalis*, идентично предыдущим молекулярным филогенезам (Баскова и др., 2008; 2011).

Таксономический статус больших ложноконских пиявок (БЛП) остается неизменным и включает один вид – *Haemopis sanguisuga* Linnaeus, 1758, гаплоидное число хромосом у которого составляет, как и у *H. verbana* – 13 (Wendrowsky, 1928; Vitturi et al., 2002).

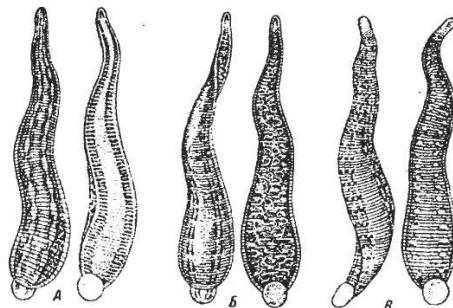
Морфологические особенности гирудинид

Медицинские и большие ложноконские пиявки принадлежат к одному семейству челюстных пиявок или гирудинид (Hirudinidae Whitman, 1886), и в морфофизиологическом аспекте имеют как сходства, так и различия.

Средняя длина взрослых особей МП составляет в 9-12 см, но может достигать при максимальном растяжении 25-30 см, ширина – около сантиметра. На габариты МП сильное влияние оказывает режим питания, в связи с чем величина пиявок не всегда зависит от их возраста. Так, в лабораторных условиях при интенсивном кормлении бычьей кровью за полтора года удалось вырастить особь *H. medicinalis* длиной 44 см (Щеголев, 1946). Масса тела МП также изменчива: средняя масса голодных половозрелых особей составляет 2,0-3,0 г, а после насыщения кровью – 10-15 г, а гигантский экземпляр Щеголева весил 38,8 г (Лукин, 1976; Стояновский, 2002). По данным британских зоологов P. J. Wilkin и A. M. Scofield (1991) медицинские пиявки в природных водоемах достигают максимального веса 7,1 г, а при оптимальных условиях в лабораториях, они могут вырасти до 23-29 г всего за 300-332 дня (Wilkin, Scofield, 1991; Davies, McLoughlin, 1996).

Взрослые особи большой ложноконской пиявки (БЛП) нередко достигают в длину 10 см, при ширине 1,5 см; иногда попадаются гигантские экземпляры – до 15-16 см в длину. Величина тела БЛП подвержена определенным географическим изменениям. Так, на Украине, в особенности на юге, часто встречаются крупные экземпляры, а на северо-востоке европейской части России, в Сибири и на Дальнем Востоке длина самых больших экземпляров едва достигает 5-7 см. Уплощенность тела выражена меньше, чем у МП. Поверхность тела гладкая, и мелких сосочков, которые имеются на коже МП, не бывает. Консистенция тела довольно мягкая, в отличие от более плотного тела медицинских пиявок (Лукин, 1976).

Окраска тела медицинских пиявок видоспецифична: у *H. verbana* на спине хорошо развиты оранжевые, желтые полоски (с перетяжками), брюхо без темных пятен с двумя широкими черными полосами в виде краевой каймы; у *H. medicinalis* спинные оранжевые полосы узкие с небольшими черными пятнами, правильно расположенными на этих полосах, брюшная сторона усеяна темными пятнами; у *H. orientalis* спина ярко-зеленая, на продольных оранжевых полосах есть четырехугольные темные пятна, брюхо почти сплошь черное (Лукин, 1977; Utevsky et al., 2009; Utevsky, Trontelj, 2005) (рис. 1.1.1).



А – аптечная *H. verbana*; Б – лечебная *H. medicinalis*; В – восточная *H. orientalis*

Рисунок 1.1.1 – Окраска тела медицинских пиявок (Лукин, 1976)

Окраска тела взрослых особей *H. sanguisuga* на спинной стороне черная, черно-коричневатая или черно-зеленоватая. При внимательном рассмотрении можно заметить разбросанные на спине черные пятна и пятнышки. По бокам тела у многих экземпляров тянутся продольные желтые ленты. Брюшная сторона чаще всего светло-серая, реже зеленовато-серая, иногда с небольшими черными пятнышками, разбросанными без порядка (Лукин, 1976).

Тело гирудинид покрыто кутикулой, под которой располагается железистый эпителий, продуцирующий слизь. Благодаря образующейся слизи, плотным покровам и наличием паренхимы, предохраняющим тело пиявок от пересыхания, гирудиниды способны длительное время пребывать на сушке и совершать сухопутные миграции (Лукин, 1976; Шарова, 2002). Довольно высокую мобильность пиявок обеспечивает способность к быстрому сокращению тела.

вок при плавании и «ходьбе» обеспечивает развитая мышечная система. Имеются данные, что по относительному объему своей мускулатуры (более 80%) гирудиниды занимают первое место среди беспозвоночных (Зенкевич, 1944; Gerry, Ellerby, 2011).

На переднем конце тела гирудинид имеется пять пар глаз, расположенных в виде дуги. В передней части глотки – три челюсти, вооруженные зубчиками. У медицинских пиявок число зубчиков на каждой челюсти 69–90 и расположены они в один ряд. У БЛП челюстные зубчики, мельче и тупее, чем у МП, расположены на каждой челюсти в два ряда, число их в каждом ряду колеблется от 7 до 18 (Лукин, 1976).

У медицинских пиявок довольно большое ротовое отверстие и очень мускулистая глотка, основная функция которой – высасывание крови из тела жертвы. Глотка переходит в огромный желудок, занимающий вместе с десятью парами его отростков большую часть тела. По бокам передних отростков желудка и глотки рассеяны многочисленные одноклеточные слюнные железы, протоки которых соединяются между собой и открываются между зубчиками челюстей. Желудок, как и у всех кровососущих пиявок, служит резервуаром для высосанной крови. Задне-проходное отверстие очень мало, поскольку в результате переваривания крови остается немного экскрементов в растворенном виде (Лукин, 1976).

Ротовое отверстие *H. sanguisuga* кажется небольшим, но способно сильно расширяться, что позволяет этой хищнице проглатывать крупные куски пищи. Большая, сильно мускулистая глотка, благодаря наличию продольных складок способна сильно растягиваться. Желудок очень велик и имеет только одну, заднюю пару отростков. Редукция остальных отростков желудка, характерных для МП, произошла в связи с тем, что БЛП не сосет крови своих жертв, а поедает их целиком или отрывая большие куски, и у них отпала необходимость иметь отростки для наполнения и хранения крови. Характер питания *H. sanguisuga* оказывается и на величине ее анального отверстия, которое в отличие от МП, велико и хорошо заметно (Лукин, 1976).

На брюшной стороне тела гирудинид открываются 17 пар метанефридиев, выполняющие выделительную функцию. Имеется лакунарная система целомического происхождения, по которой течет кровь, содержащая гемоглобин (Лукин, 1976; Давид, 1990; Титова, 2002; Шарова, 2002). Кожная ткань пиявок, обильно покрытая сетью капилляров, помимо защитной, выполняет дыхательную функцию (Стояновский, 2002; Титова, 2002).

Ареалы медицинских и больших ложноконских пиявок

Медицинские пиявки – эндемики Палеарктики и заселяют преимущественно ее Европейскую часть. Последние данные о распространении МП в Палеарктике, на основании собственных и литературных данных, обобщил С. Ю. Утевский с соавторами (2010).

Показано, что из всех видов медицинских пиявок *H. medicinalis* – самый северный, ее ареал достигает Норвегии и Швеции. Ширина ареала этого вида составляет более 5700 км, от Великобритании на западе до Алтайских гор на востоке. Находки *H. medicinalis* отмечены в 18-ти странах Европы и Азии: Норвегия, Швеция, Великобритания, Нидерланды, Франция, Германия, Польша, Литва, Латвия, Беларусь, Россия, Украина, Швейцария, Чехия, Австрия, Венгрия, Словения и Хорватия (Лукин, 1957; Remy, 1937; Bennike, 1943; Bazyluk, 1957; Hesse, 1920; Hecht, 1929; Zick, 1931; Dathe, 1934; Pawlowski, 1936; Sandner, 1951; Herter, 1937, 1968; Elliott, Tullett, 1984; Wilkin, 1989; Bratton, Elliot, 1991; Grosser, 2004; Elliott, 2008; Westendorf et al., 2008; Strakosova, Schenkova, 2011; Elliott, Kutschera, 2011; Saglam et al., 2016).

Медицинская пиявка *H. verbana* распространена южнее *H. medicinalis*, обнаружена в 19-ти странах: Швейцария, Австрия, Германия, Италия, Словения, Хорватия, Босния и Герцеговина, Сербия, Черногория, Македония, Греция, Венгрия, Молдова, Украина, Россия, Турция, Узбекистан, Молдова и Армения (Лукин, 1976; Kasparek et al., 2000; Demirsoy et al., 2001; Juhasz et al., 2008; Utevsky et al., 2008; Gagiu, 2010; Kovalenko, Utevsky, 2011; Saglam et al., 2011). Предположитель-

но этот вид МП обитает также на юге Франции и в северной Испании. Протяженность ареала *H. verbana* с запада на восток – около 4600 км (Utevsky et al., 2010).

Ареал медицинских пиявок *H. orientalis* приурочен к азиатской территории, ограничен горными районами Кавказа, Средней Азии и Ирана. Присутствие *H. orientalis* было подтверждено в четырех странах: Азербайджан, Иран, Узбекистан и Казахстан (Klemm, 1982; Утевский и др., 2008; Utevsky et al., 2010). Скорее всего, этот вид МП обитает в Грузии, и, вероятно, в Армении, поскольку эти страны входят в Закавказье. Диапазон ареала *H. orientalis* значительно меньше, чем у *H. verbana* и *H. medicinalis*, и простирается на 2000 км от восточного Кавказа до Тянь-Шаня.

Границы ареалов трех видов медицинских пиявок практически не перекрываются. Из литературных источников известно, что МП *H. verbana* и *H. medicinalis* симпатричны крайне редко и к настоящему времени были встречены одновременно только в двух водоемах: в Венгрии и в Восточной Украине (Nesemann, Neubert, 1999; Kovalenko, Utevsky, 2011).

В отличие от зарубежной Европы, ареалы медицинских пиявок на территории России и сопредельных государств исследованы недостаточно полно, в настоящее время имеются лишь отдельные сведения о находках этих гирудинид в некоторых регионах России (Хатухов и др., 2001; Кустов и др., 2005, 2006; Михайлов, 2006; Михайлов, Ярошенко, 2005; Рассадина, 2006; Каменев, 2007; Кадастры..., 2007; Чужекова и др., 2008; Романова, Климина, 2010; Кучина, Антоненко, 2010; Алиев, Магомедов, 2012; Шаповалов и др., 2012). Достаточно подробное описание географического распространения медицинских пиявок в нашей стране приводится в монографии Е. И. Лукина (1976), на основании которой можно представить общую картину ареала этих гирудинид.

По данным Е. И. Лукина (1976) до XX века медицинские пиявки обитали на значительной территории России, включая водоемы северных регионов России. Имеются сведения по обнаружению МП в С.-Петербургской, Новгородской, Пермской, Тверской и Вологодской губерниях, а также на всей территории Западной Сибири, кроме Крайнего Севера (Воскресенский, 1859). Однако массовый выл-

лов этих ценных для медицины гидробионтов на протяжении XIX века привел к значительному сокращению их ареала (Лукин, 1976).

Граница сплошного распространения МП в Европейской части России не выявлена. Предположительно, начинаясь от северной половины Белоруссии (Pawlowski, 1936), она проходит между Московской и Смоленской областю, по Сармарской области, отклоняясь к югу по мере продвижения на восток. В Калининградской, Ярославской, Московской областях, в республиках Марий Эл и Татарстан отмечены спорадические находки МП (Лукин, 1976; Щеголев, 1949). О северной границе ареала МП судить трудно, однако эти гематофаги не найдены в Карелии, Архангельской, Вологодской, Ленинградской, Новгородской, Кировской областях, республике Коми, Пермском крае (Лукин, 1957, 1976).

Имеются сведения о нахождении медицинских пиявок в водоемах Башкирии, Челябинской, Оренбургской и Семипалатинской областей (Максимова, 1965; Баянов, Куссая, 1975; Лагунов, 2009). Для Восточной Сибири и Дальнего Востока находки МП никогда не упоминались.

Обитание медицинских пиявок в водоемах Западной Сибири до недавнего времени было спорным (Залозный, 1973, 1979, 1984). Однако, не так давно, были опубликованы данные о регулярной встречаемости *H. medicinalis* на протяжении ряда лет в водоемах Алтайского края (Кучина, Антоненко, 2010).

Медицинские пиявки широко распространены в южных районах России и в Закавказье (Воскресенский, 1859; Щеголев, 1949; Лукин, 1957, 1976; Хатухов и др., 2001; Михайлов, 2006; Шаповалов и др., 2012). Особенно многочисленны МП на Северном Кавказе, в Краснодарском и Ставропольском краях, в Ростовской области; на юге центральных областей России и в районе нижней Волги (Астраханская, Саратовская, Волгоградская области) встречается часто, нередки МП и на средней Волге (Самарская и Ульяновская области), но с невысокой численностью (Лукин, 1958; Ермохин, Евдокимов, 2006; Кадастр ..., 2007; Чужекова и др., 2008; Романова, Климина, 2010).

На Кавказе (Армения, Грузия, Азербайджан) МП ранее встречались в большом количестве (Кобахидзе, 1942, 1946; Тер-Григорян, 1950, Мешкова, 1956).

Сporадичные находки МП, с довольно низкой численностью, отмечены в регионах Казахстана, Киргизии, Таджикистана и Узбекистана (Лукин, 1976; Михайлов, 2006; Утевский и др., 2008). В Туркменистане МП не обнаружены (Щеголев, Щеголева, 1951; Лукин, 1976).

В большом количестве и повсеместно МП отмечены в южных районах Украины, Белоруссии и Молдавии. В водоемах Латвии и Литвы медицинские пиявки редки и малочисленны (Лукин, 1957; Запкувене, 1972; Слока, 1983).

К настоящему времени ареал медицинских пиявок и их численность на территории России существенно сократились. Это связано, в первую очередь, с хищническим выловом МП в естественных водоемах на фоне новой волны «пиявочно-го бума». Так, проводимый в условиях отсутствия соответствующей законодательной базы вылов МП в Краснодарском крае привел к сокращению их численности, по сравнению с серединой 90-х годов, приблизительно в 10 раз (Ярошенко и др., 2003; Михайлов, Ярошенко, 2005; Кустов и др., 2005; Стрельников, Каменев, 2007).

Большая ложноконская пиявка *H. sanguisuga*, как и МП, обитает только в водоемах Палеарктики, где она распространена весьма широко и с полным основанием может быть причислена к транспалеарктам. Она не обнаружена только на крайнем севере Европы и Азии, в северной части Коми, на Таймыре, Камчатке и Курильских островах. Она не упоминается в списках пиявок Японии, Китая и Монголии (Лукин, 1976; Oka, 1935; Moore, 1930).

Большая ложноконская пиявка встречается, но редко в Северной Африке, Палестине, Турции, Иране, Афганистане (Лукин, 1976; Nesemann, Neubert, 1999; Saglam et al., 2011).

На протяжении большей части Европы, в особенности на юге, *H. sanguisuga* обычна и многочисленна (Лукин, 1976; Nesemann, Neubert, 1999; Sket, Trontelj, 2008). К северу встречаемость БЛП снижается, но еще в Дании она попадается часто (Bennike, 1943; Monahan, Caffrey, 1996). В Шотландии, Финляндии и на Скандинавском полуострове этот вид редок (Warwick, 1961; Williams, 1961; Erseus et al., 1999).

В водных экосистемах России и сопредельных государств *H. sanguisuga* особенно многочисленна на юге европейской части. Она обычна в Украине и Закавказье, Поволжье, часто встречается в Средней Азии, но редка в Туркмении (Щеголев, Щеголова, 1951; Лукин, 1976; Хатухов и др., 2001; Романова, Климина, 2010; Вундштеттель, Кузнецова, 2012; Шаповалов и др., 2012).

В Европейской части России к северу и к северо-востоку *H. sanguisuga* становится все более редким компонентом гидрофаги, но она отмечена в Карелии, в бассейнах северных рек С.Двины, Ухта, Уса, М.Сосьвы (Герд, 1946; Загузова, 1989). Такая же картина наблюдается и на территории Урала и Сибири, хотя БЛП найдена даже в Якутии (Плотников, 1907; Баянов, Куссая, 1975; Залозный 1973, 1979; Лукин, 1976; Тарханов, Балахонова, 2005; Черная, Ковальчук, 2009; Chernaya, 2012; Kaygorodova, 2012).

Большая ложноконская пиявка очень редка в бассейне Амура (Лукин, 1968, 1976), где у нее появляется серьезный конкурент – челюстная хищная пиявка *Whitmania laewis* Baird, 1869, достигающая весьма крупных размеров на фоне высокой численности особей (Лукин, 1976). Виды *Whitmania* широко распространены в Китае, Японии и Южной Азии, где, как нами было упомянуто, *H. sanguisuga* не обнаружена.

Таким образом, *H. sanguisuga* распространена в Палеарктике намного шире, чем медицинские пиявки, ее ареал простирается от Великобритании до берегов Амура, что обусловлено, вероятно, эколого-физиологическими особенностями этой хищницы.

Экологические особенности гидрудинид

Медицинские и большие ложноконские пиявки – обитатели пресных вод.

Медицинские пиявки обитают преимущественно в прудах, рвах, болотах, небольших, медленно текущих реках и, как правило, не заселяют крупные водоемы и горные водотоки. Вместе с тем распространение МП спорадично: зачастую они не встречаются и там, где климатические условия для них вполне благоприятны. Вероятно, для обитания этих гематофагов необходим комплекс условий, кото-

рый имеется далеко не в каждом из перечисленных выше водоемов: чистая и насыщенная кислородом вода с достаточной прогреваемостью; наличие земноводных и посещение этого водоема млекопитающими; прибрежная полоса удобная для откладки коконов. МП могут совершать передвижение во влажном грунте, они переносят довольно значительную потерю воды, входящей в состав их тела. Для медицинских пиявок, имеющих южное происхождение, весьма опасно промерзание грунта. И в этом, должно быть, заключается основная причина, по которой МП не живут в пересыхающих водоемах в регионах с суровыми зимами (Лукин, 1976).

Пиявки *H. sanguisuga* чаще всего и нередко в массовом количестве встречаются, как и МП, в маленьких водоемах: в лужах с длительным стоянием воды и пересыхающих к концу лета или остающихся наполненными водой до самой зимы, в небольших стоячих водоемах поймы рек или находящихся за пределами последней. Отмечено, что БЛП, в отличие от МП, в значительном количестве обитает в горных потоках и в связанных с ними постоянных водоемах Карпат (Лукин, 1958; Pawlowski, 1936а).

Приуроченность *H. sanguisuga* к небольшим водоемам вполне понятна, если учесть амфибиотический характер этой пиявки, который выражается в способности довольно длительное время находиться в прибрежной полосе вне воды и переносить высыхание водоемов (дно которых остается достаточно влажным). В таких водоемах она находит благоприятные условия для питания и размножения. Однако те же особенности БЛП позволяют ей обитать в прибрежной полосе более крупных водоемов (рек, озер, водохранилищ), но здесь она встречается значительно реже и в количественном отношении уступает другим обычным видам пиявок. В то же время следует отметить, что в условиях сурового климата обитание *H. sanguisuga* в маленьких водоемах вследствие их сильного промерзания становится невозможным, и в таких местностях ее пристанищами являются более крупные водоемы, в которых она может мигрировать при наступлении холодов из прибрежной полосы в более глубокие места (Лукин, 1976).

В отличие от МП, *H. sanguisuga* индифферентна к химическому составу растворенных в воде веществ и к колебаниям содержания кислорода в воде (Лукин, 1929; Bennike, 1943). Поэтому она может одинаково встречаться как в сильно загрязненных, так и в практически чистых водах, и ее сапробная характеристика очень широка. Главными условиями обитания *H. sanguisuga* являются: наличие достаточного количества пищи и прибрежной зоны, пригодной для откладки яиц. Кроме того, в прибрежной зоне она может охотиться на дождевых червей и наземных моллюсков (Шиков, 2011).

Одним из важнейших факторов, влияющих на географическое распространение пиявок, их физиологические особенности и приуроченность к определенному типу водоема является температура.

Несмотря на то, что медицинские пиявки теплолюбивы, на них неблагоприятно действуют, как колебания, так и значительное повышение температуры воды (Воскресенский, 1859; Синева, 1944). Так, британскими учеными было установлено, что сезонные изменения температуры воды в природных водоемах с марта по ноябрь оказывают существенное влияние на плавательную активность *H. medicinalis*: температуры +11.9°C, +19.0°C и +22.9°C соответствовали 10%, 50 % и 90% активности пиявок (Elliott, Tullett, 1986).

Вопрос об оптимальном температурном режиме содержания медицинских пиявок достаточно полно изучен в лабораторных условиях. По данным Д. Н. Кобахидзе (1944) верхний термический порог для жизни МП, в зависимости от возраста, составляет +30°C–+35°C. Летальными для пиявок являются температуры в диапазоне от +39°C до +43.5°C (Kaiser, 1954).

В эксперименте по изучению влияния повышенной температуры на МП выявлено несколько стадий: «движение страха» при +39°C, «скручивание» при +41°C, «прекращение движения» при +42°C и «тепловое оцепенение», наступающее при +43,5°C (Herter, 1932). Показано, что медицинские пиявки способны переносить небольшое похолодание, причем взрослые особи переносят его лучше, чем молодые: первые погибают при температуре от -9°C до -10°C, а вторые – уже при -5°C...-7°C (Каменев, Каменев, 2003).

Условия температурного режима играют важную роль в репродуктивных процессах. Отмечено, что оптимальная температура для размножения пиявок находится в диапазоне от +22°C до +25°C (Синева, 1949; Дьюсбери, 1981). Хорошо изучено влияние температуры на размножение МП в лабораторных условиях профессором МГУ Г. Г. Щеголевым с сотрудниками (Щеголев, 1946, 1948; Щеголев, Федорова, 1955). Достаточно высокая температура (+22°C...+25°C) стимулирует половую активность МП, в то время как при температуре +15°C...+18°C совокупления практически отсутствуют. В лабораторных условиях при температуре +18°C...+22°C зимой и +24°C...+27°C летом МП размножаются круглогодично и откладывают коконы каждые 6-8 месяцев (Синева, 1944). По наблюдениям Е.В. Рассадиной (2006) при температуре +15°C...+16°C пиявки совсем не откладывают коконы.

При исследовании температурных предпочтений различных физиологических групп *H. verbana* было обнаружено, что голодные пиявки выбирают места с прохладной водой, не превышающей +12°C, а сытые особи, напротив, устремляются в более теплые воды (до + 24°C), тем самым сокращая затраты энергии на пищеварение (Petersen et al., 2011).

Высокие требования к температуре имеют важное значение для выживания медицинских пиявок. Предполагается, что во многих водоемах МП не могут обитать просто из-за низкой температуры воды (Elliott, Tullett, 1986).

Хищная пиявка *H. sanguisuga* принадлежит к эвритеческим организмам. Тот же факт, что в условиях сурового климата она встречается очень редко, объясняется, вероятно, ее чувствительностью к холodu, а, как уже упоминалось, неблагоприятными условиями для размножения, так как прибрежная полоса водоемов глубоко промерзает (Лукин, 1976).

Еще один абиогенный фактор, оказывающий значительное влияние на жизнедеятельность пиявок и их распространение, является кислородный режим водоемов. Способность пиявок, как и других гидробионтов, выживать в воде с низкими концентрациями кислорода зависит от их видовой принадлежности, физиологического состояния и условий внешней среды (Константинов, 1979). Имеются дан-

ные, что кровососущие и хищные гирудиниды способны переносить недостаток кислорода в воде (Лукин, 1976).

Несмотря на эвриоксибионтность, МП обычно обитают в водоемах, где дефицит кислорода незначителен. Данное явление обусловлено, в первую очередь, их биоценотическими связями: МП питаются кровью других животных – обитателей оксифильных водоемов (Лукин, 1976). Экспериментально было установлено, что концентрация растворенного кислорода в воде, где содержатся медицинские пиявки, должна быть не ниже 7 мг/л (Акимова и др., 2012).

Интенсивность дыхания пиявок, как и других животных, в значительной мере зависит от их физиологического состояния: подвижности, степени насыщения, возраста и т. д. Показано, что максимальное количество кислорода потребляют подвижные и голодные гирудиниды, а сытые и неподвижные нуждаются в большем количестве кислорода при повышении температуры воды (Herter, 1936). Установлено, что взрослые особи МП более устойчивы к недостатку кислорода, чем их молодь (Лукин, 1976).

Обнаружено, что потребление кислорода (млO₂/г·час на особь) у МП существенно повышалось после насыщения кровью, а затем скорость дыхания снижаясь, стабилизировалась через несколько дней на уровне, в 4-5 раз превышающем характерный для голодных особей (Febe et al., 1986).

Содержание ионов водорода в воде (pH), наряду с температурным и кислородным режимами, является одним из важнейших абиотических факторов среды для гидробионтов. Как правило, колебания pH, необходимые для нормальной жизнедеятельности большинства водных беспозвоночных, лежат в диапазоне от 6,5 до 8,5 (Дажо, 1975; Скальская, 1994; Иванов, 1995; Rutt et al., 1990).

Поскольку экспериментально было установлено, что ряд обычных видов пиявок может длительное время сохранять жизнеспособность при показателях pH: от 4,5 до 10,1, пиявок можно отнести к эврионным организмам (Bennike, 1943; Herter, 1968). По данным Н. А. Березиной (2001) медицинские пиявки обитают в водоемах с показателями pH от 6,4 до 9,0. Оптимальным для МП показатель pH находится в

пределах от 7,1 до 8,2 (Буданов и др., 2011; Зиненко и др., 2012). Большие ложноконские пиявки способны выживать в водоемах с рН = 4,6-5,1 (Bennike, 1943).

Для сытых особей кровососущих и хищных гирудинид отмечена тенденция к отрицательному фототаксису, то время как голодные особи проявляют ярко выраженный положительный фототаксис. Экспериментально было показано, что медицинские пиявки, выращенные в темноте до 298-дневного возраста, весили 1470 мг, при нормальном освещении – 1300 мг, а при круглосуточном – 808 мг (Запкувене, 1972). У взрослых гирудинид, менее нуждающихся в пище, чем их молодь, отрицательное отношение к свету выражено больше (Лукин, 1976).

По мнению некоторых исследователей, гирудиниды относятся к животным, предпочитающим водоемы с каменистым дном или заросшими макрофитами, поскольку они чаще всего передвигаются при помощи присосок и большую часть своей жизни находятся в прикрепленном состоянии (Herter, 1968; Лукин, 1976). Водная растительность служит пиявкам в качестве субстрата и одновременно убежищем от хищников и неблагоприятных условий (Кулаев, 1925).

Взаимоотношения гирудинид и других животных разнообразны и проявляются, главным образом, в трофических связях.

Медицинские пиявки – гематофаги, могут сосать кровь всех классов позвоночных, отдавая предпочтение земноводным, крупному рогатому скоту и человеку (Лукин, 1976; Merilä, Sterner, 2002; Kutschera et al., 2010; Зиненко и др., 2012). Однако методом серологических исследований было показано, что основными прокормителями медицинских пиявок в природных водоемах являются озерные лягушки *Rana ridibunda*, намного реже пиявки сосут кровь птиц, рыб и млекопитающих (Wilkin, Scofield, 1990).

Для медицинских пиявок характерна конкуренция за пищевые ресурсы. Голодные особи МП становятся более активными и начинают реагировать на стимулы, ассоциированные с пищей. Они становятся чувствительными к воздействиям из окружающей среды (повышенная реакция на шум, освещение, на запах организмов, кровью которых они питаются) (Дьюсбери, 1981). У голодных пиявок на-

блюдается агрессивное поведение, известны случаи каннибализма (Kutschera, Roth, 2005; Кучера, Рот, 2005).

В отличие от медицинских пиявок, *H. sanguisuga* принадлежит к числу весьма прокорливых хищников, заглатывающих свою добычу целиком или отрывая от нее куски значительных размеров. Сильная мускулатура, способность к плаванию, амфибиотический образ жизни обеспечивают эту хищницу разнообразной пищей, как в водоемах, так и в сырой прибрежной полосе. Она пожирает самых разных животных, которых может одолеть: червей (крупных олигохет, а также молодь пиявок), водных насекомых (большой частью их личинок), мягкотелых, небольших рыб, головастиков и т. д. (Лукин, 1976; Laurila et al., 2002).

Для поимки дождевых червей эта пиявка выползает на берег, где ее жертвами могут быть дождевые черви и наземные моллюски, например виноградные улитки (Elliott, Mann, 1979; Shikov, 2011). БЛП не гнушается и падалью, выполняя функции «санитаров» в водных экосистемах (Hoffman, 1960; Лябзина, Узенбаев, 2005; Лябзина, 2013). Сосать кровь своих жертв *H. sanguisuga* не может, даже в тех редких случаях, когда она случайно попадает в передние отделы пищеварительного тракта млекопитающих (Лукин, 1976).

Гирудиниды сами служат кормом для некоторых животных, поскольку их мускулистые тела содержат много ценных в пищевом отношении веществ. Круг животных поедающих пиявок достаточно широк: рыбы, водоплавающие птицы, околоводные млекопитающие (кутора, выхухоль, еж, ондатра) (Лукин, 1976; Reshetnikov, 2001).

Для молоди медицинской пиявки опасными врагами могут быть также крупные личинки насекомых и хищные пиявки *H. sanguisuga*. Имеют место случаи гиперпаразитизма, в частности хоботной пиявки *Helobdella stagnalis* на сытых особях *H. verbana* (Kutschera et al., 2010).

Физиологические особенности челюстных пиявок

Пиявки – гермафродиты, размножаются половым путем, но для спаривания необходимы как минимум две особи, так как они не способны к самооплодотворению.

В природе размножение медицинских и больших ложноконских пиявок происходит летом, а откладка коконов совершается лишь один раз в год (Лукин, 1976). По некоторым данным, при неблагоприятных условиях, коконы медицинских пиявок развиваются лишь на следующую весну (Pawlowski, 1936).

Гирудиниды откладывают коконы во влажной земле прибрежной полосы водоемов, немного выше уреза воды. Имеются сведения о нахождении коконов медицинских пиявок в гнездах околоводных птиц (Buczynski et al., 2011). Продолжительность развития зародышей гирудинид – примерно месяц, но зависит от ряда абиотических факторов (температура, влажность и т. д.).

Количество, размер и масса пиявок, вышедших из коконов (нитчаток) зависит от видовой принадлежности гирудинид.

Так, было показано, что из трех видов медицинских пиявок самая высокая плодовитость ($34,3 \pm 3,72$ нитчаток в коконе) наблюдалась у *H. verbana*, самая низкая – у *H. medicinalis* ($11,3 \pm 2,56$ нитчаток в коконе). Самые крупные нитчатки, массой $0,046 \pm 0,0005$ г, были у *H. medicinalis*, минимальный вес нитчаток ($0,032 \pm 0,0003$ г) характерен для *H. verbana*. Для *H. orientalis* отмечены промежуточные параметры – $21,6 \pm 3,39$ нитчаток в коконе при средней массе $0,038 \pm 0,0005$ г (Petrauskienė et al., 2011).

У *H. sanguisuga* по разным данным, в одном коконе содержится от 6 до 20 эмбрионов. Длина нитчаток около 20 мм, при ширине 1-1,5 мм (Moquin-Tandon, 1846; Bennike, 1943).

В природных условиях молодь гирудинид растет медленно (Лукин, 1976), достигая половой зрелости, как правило, на третий год жизни. Все зависит от интенсивности питания, температуры окружающей среды и др. (Herter, 1968; Лукин, 1976; Кустов и др., 2005). Однако при интенсивном выкармливании и специальном содержании в лаборатории удается достичь половой зрелости МП за 8-12 ме-

сяцев (Синева, 1944; Кустов, 2003). Продолжительности жизни гирудинид точно неизвестна, но есть предположение, что они доживают в среднем до пяти лет (Лукин, 1976).

Одной из адаптаций пиявок к неблагоприятным факторам среды (недостаток кормовых ресурсов, пересыхание временных водоемов, сезонное снижение температуры и т. д.), приобретенных в ходе эволюционного развития, является способность к длительному голоданию. Согласно литературным данным медицинская пиявка может обходиться без пищи до полутора лет, а хищная *H. sanguisuga* – семь месяцев (Herter, 1936). Молодь медицинских пиявок после выхода из коконов может обходиться без пищи в течение 7-10, иногда 20 дней, обеспечивая себя питательными веществами за счет остатков белка в желудочно-кишечном тракте (Михайлов, 2006). В опытах молодые пиявки после рождения обходились без пищи до четырех месяцев (125 дней), гибель нитчаток отмечалась отмечалась с 93-го дня и достигала максимума к 120-му дню (Запкувене, 1972).

Способность кровососущих пиявок длительное время обходиться без пищи отчасти объясняется тем, что в объемистом желудке этих червей помещается много крови, которая переваривается сравнительно медленно. Вещества, выделяемые слюнными железами кровососов, предохраняют кровь от гнилостных процессов. Вместе с тем было замечено, что МП могут переносить длительное голодание и после того, как запасы крови в их кишечнике утилизированы. К такому голоданию приспособлены и хищные виды. Скорее всего, сильное развитие паренхимы, богатой питательными веществами, обеспечивают пиявкам возможность долго обходиться без пищи (Herter, 1936; Лукин, 1976).

Класс Hirudinea возник в результате перехода их предков из класса Oligochaeta к питанию кровью, связанного с временным пребыванием на других животных. Новый образ жизни повлек за собой изменение всей организации и, в частности, редукцию целома и развитие паренхимы с запасными веществами, синтезируемыми за счет веществ высосанной червями крови. Поскольку хищные пиявки произошли от кровососущих, то они унаследовали основные черты организа-

ции последних, обеспечивающие, в том числе, и возможность длительного голода (Лукин, 1976).

Гирудиниды, благодаря исключительно крупным нейронам, служат удобными модельными объектами в нейробиологии. Установлено, что нервно-мышечные синапсы пиявок имеют холинергическую природу (Crips et al., 2002). У МП обнаружены идентифицирующие нейроны, в частности клетки Ретциуса, которые представляют собой модуляторные нейроны, влияющие на поведение посредством серотонина (Lent, Dickinson, 1987; 1988; Trueta et al., 2003). Составлены карты идентифицируемых клеток для сегментарных ганглиев кровососущих гирудинид, проводятся исследования, направленные на изучение связи нервной системы МП и их поведения (Rodriguez et al., 2004).

В последние десятилетия гирудотерапия (лечение медицинскими пиявками) претерпевает свой ренессанс. Богатый исторический опыт, результаты практической работы отечественных и зарубежных клиницистов, экспериментальная расшифровка механизмов местного и общего действия биологически активных соединений, продуцируемых медицинской пиявкой, свидетельствуют о целесообразности применения гирудотерапии во многих областях медицинской практики сегодня и предопределяют перспективы метода в будущем (Исаханян, 1991; Живогляд, 2001; Савинов, 2002; Жернов, Зубакина, 2004; Баскова, Исаханян, 2004; Геращенко, Никонов, 2005; Захарова и др., 2006; Каменев, Барановский, 2006; Никонов, 1992, 1998, 2007).

Фундаментальные медико-биологические исследования, проводимые в нашей стране и за рубежом в течение последних десятилетий, представили научное обоснование противотромботического, противовоспалительного, иммуностимулирующего, бактериостатического, анальгезирующего эффектов гирудотерапии (Markward, 1985; Баскова и др., 1989; Никонов, 1992; Завалова и др., 1994; Ascenzi et al., 1995; Григорян и др., 1995; Баскова, 1988, 1995; Budzinski, 1991; Чалисова и др., 1999; Roth, 2002; Michalsen, Abbas Zaidi et al., 2011).

Детальное изучение состава слюны пиявок дало такие результаты, которые в значительной степени вернули популярность медицинской пиявке в официальной

медицине и расширили наши знания в области фундаментальных наук. Значительный вклад в данные исследования внесла группа российский ученых под руководством профессора МГУ И. П. Басковой (Завалова и др., 1994; Патент..., 1995; Баскова, 1988, 1995; Баскова и др., 2008, 2008а, 2010, 2011).

Установлено, что секрет слюнных желез (ССЖ) медицинской пиявки содержит ингибиторы протеолитических ферментов: бделлины, эглины, гирудин, ингибитор калликреина плазмы крови, фактора Хагемана, ингибиторы компонентов системы комплемента. В его составе соединения, активирующие аденилатциклазу мембран тромбоцитов и повышающие уровень ц-АМФ, ферменты дестабилаза, коллагеназа, гиалуронидаза, дипаза и холестерин-эстераза (Патент..., 1995). В составе слюны МП обнаружен комплекс веществ, структурированный в липосому, которая, в зависимости от полярности растворителя, способна изменять свою пространственную ориентацию, чем обеспечивается беспрепятственное проникновение липосомы через мембрану клетки (Никонов, 2007). В ССЖ идентифицированы свободные стероидные гормоны (кортизол, прогестерон, тестостерон, андростендион, эстрадиол, дегидроэпикардиостерон) и важные нейромедиаторы серотонин и гистамин (Баскова и др., 2008).

Основным параметром для медицинских пиявок, как лекарственного средства, является срок голодаания, которым определяется наличие в составе секрета слюны желез сбалансированного комплекса биологически активных веществ. Показано, что оптимальная эффективность слюны пиявок наступает уже к трем месяцам голодаания (Шестаков и др., 2007).

Сегодня медицинские пиявки используются не только при гирудотерапии, но и гомогенаты ее тканей служат сырьем для фармацевтической и косметологической продукции (Селезnev, 1996; Самойлов, 2001). К настоящему времени в тканях МП обнаружено достаточно много биологически активных соединений белковой природы: гиалуронидаза, гистаминоподобное вещество, бделлины – ингибиторы трипсина и плазмина, эглины – ингибиторы химотрипсина, субтилизина, эластазы и катепсина G (Березовская и др., 2003; Никонов, 2007). Ведутся исследования минерального состава тканей медицинских пиявок (Chernaya, 2010; Chern-

naya et al., 2010; Chernaya, Kovalchuk, 2013; Maksimova et al., 2010; Pletneva et al., 2011).

В пищеварительной системе МП постоянно присутствует бактерия-симбионт *Aeromonas hydrophila* и является единственным симбионтом медицинской пиявки, в то время как другие виды пиявок содержат в пищеварительной системе ассоциаты из многих видов микроорганизмов (Лукин, 1976; Graf, 2002; Laufer et al., 2008). Обнаружено, что в пищеварительную систему кровососущих и хищных пиявок могут поступать трипаносомы, риккетсии, церкарии, микрофилиарии, личинки трематод, а также эритроцитарный вирус лягушек (Андреев, 1923; Herter, 1937; Dobrowolski, 1958; Paspaleff et al., 1961, 1963; Wisniewski, 1958).

На основании проведенных исследований был сделан вывод, что *A. hydrophila* позволяет медицинским пиявкам поддерживать высосанную кровь в жидком состоянии, а также переваривать ее (Капусткина и др., 2007; Титова, Никонов, 2007). Благодаря бактериостатическим и бактерицидным свойствам бактерии-симбионта МП способны противостоять инфекции: при попадании чужеродных микроорганизмов в кишечник концентрация *A. hydrophila* увеличивается в несколько раз, создавая неблагоприятную среду для их развития (Шишкина, 1953; Indergand, Graf, 2000; Рассадина, 2006; Рассадина и др., 2007; Капусткина и др., 2007). Так, за три месяца голодаания у МП в пищеварительном тракте происходит полная ликвидация возбудителя лептоспироза (Капусткина и др., 2007).

Тем не менее, возможность передачи пиявками возбудителей от одного животного другому существует, в том случае, если пиявка после зараженного животного немедленно приставлялась к здоровому. Для того чтобы пищеварительный тракт природной пиявки очистился от чужеродных бактерий, должно пройти не менее 4-х месяцев (Никонов, 2007; Капусткина и др., 2007).

По некоторым данным, вода, в которой содержались медицинские пиявки («вода скопления»), обладает целебными свойствами и используется в медицине и ветеринарии (Никонов, 1998; Савинов, 2002). Микробиологические исследования показали, что «вода скопления» безопасна, поскольку она не содержит патогенной

микрофлоры, а тестирование на белых мышах подтвердило отсутствие ее токсичности (Рассадина, Романова, 2008).

Анализ состава «воды скопления» МП показал, что она по химическому составу существенно отличались от контроля: концентрация макроэлементов K, Na, P в «пиявочной» воде была выше контрольной в 1,9 раза, в 2,6 раза и в 1,3 раза соответственно. В воде, где содержались МП, было обнаружено более, чем в два раза, по сравнению с контрольной пробой, I, Br и S; кроме того в «пиявочной» воде содержался селен, отсутствующий в контроле (Рассадина, 2006). Среди метаболитов, продуцируемыми МП, выявлены альбумины, глобулины, гирудин, гиалуронидаза, триглицеридаза, эластаза, апираза – белковые соединения с высокой биологической активностью (Рассадина, Романова, 2008).

Биологически активные соединения, продуцируемые большой ложноконской пиявкой практически не изучены, известно лишь, что секрет слюнных желез *H. sanguisuga* не содержит гирудина (Лукин, 1976).

Медицинские и большие ложноконские пиявки широко используются в качестве тест-объектов в водной экотоксикологии. Показано, что *H.sanguisuga* проявляют большую устойчивость к токсическим соединениям органической и неорганической природы, нежели медицинские пиявки (Лапкина, Флеров, 1979, 1980; Флеров, 1989). Благодаря высокой чувствительности к химикатам, МП избегают мест обитания, подверженных техногенному загрязнению, и их используют в качестве биоиндикатора чистой воды (Романенко и др., 2010). Проводятся исследования влияния токсикантов органического и неорганического происхождения на ее организм (Каменев, 2007; Попов и др., 2010; Kazlauskine et al., 2010). По поведению пиявок оценивают токсичность воды и сedиментов, показана возможность их использования для идентификации отдельных экотоксикантов (Лапкина, Флеров, 1979, 1980; Флеров, 1989; Petrauskienė, 2003).

К настоящему времени МП находятся под угрозой исчезновения, и сохранение ресурсов медицинских пиявок и их рациональное использование в современных условиях высокого спроса является одной из актуальных проблем природопользования.

В настоящее время в практической медицине официально используются не природные, а искусственно выращенные на биофабриках пиявки, тем не менее, значительного восстановления популяции не происходит, что обусловлено массовым браконьерским отловом их из природных водоемов (Кустов и др., 2005, 2006; Каменев, 2007).

Значимый фактор, оказывающий влияние на численность МП, – осушение пастбищных заболоченных лугов (основные места обитания медицинской пиявки), который обуславливает снижение плотности популяций земноводных, являющихся главным источником питания для молодых пиявок (Wilkin, Scofield, 1990; Elliott, 2008).

Несомненно, наиболее сильным антропогенным фактором, оказывающим влияние на численность не только медицинских, больших ложноконских пиявок, но и многих других групп гидробионтов, является техногенное загрязнение пресноводных экосистем, приобретающее глобальный характер (Никаноров, Жулидов, 1991; Яковлев, 2002; Кустов и др., 2005; Каменев, 2007; Моисеенко, 2009; Elliot, Kutschera, 2011 и мн. др.).

Обзор научной литературы показал, что эколого-физиологические особенности кровососущих и хищных гирудинид имеют, как общебиологическое сходство, так трофическую и видовую специфику. Вместе с тем количество научных работ, посвященных медицинским пиявкам, значительно превосходит число сообщений о хищных пиявках *H. sanguisuga*, что, несомненно, связано с практической ценностью кровососущих гирудинид.

1.2. Биологическая роль эссенциальных и токсичных микроэлементов

Одним из важнейших и обязательных условий нормального функционирования организма является стабильность химического состава, а уровень биогенных и токсичных МЭ в организме определяется физиологическими процессами, в которых они участвуют. Эссенциальные металлы присутствуют в определенных ко-

личествах в ферментах, витаминах, гормонах, участвуют в синтезе белка, РНК и ДНК, влияя практически на все обменные процессы в организме (Войнар, 1960; Ковальский, 1982, 1983; Walsch et al., 1987; Скальный, 2004; Peca et al., 1999; Cairo, Pietrangelo, 2000; Burk et al., 2003).

Показано, что нарушение баланса биогенных и токсичных металлов, вызванное экологическими, климатогеографическими факторами может вызывать физиологические нарушения в организме и привести к срыву механизмов метаболической компенсации с проявлениями нарушений ряда функций в организме (Авцын и др., 1985, 1991; Бабенко, 2001; Агаджанян, Скальный, 2001; Oberleas, 1996; Биоэлементный статус..., 2011).

Антропогенные факторы в биогеохимическом обмене многих токсичных для организма соединений стали сегодня сопоставимы с природными экстремальными, а в некоторых ситуациях превосходят их по силе негативного влияния, пагубны для всех трофических звеньев и способствуют нарастанию явлений депопуляции. Многочисленные исследования показали, что к опасным поллютантам относятся тяжелые металлы (ТМ), поскольку организм отрицательным образом реагирует на их избыточное поступление в окружающую среду (Ковальчук, Микшевич, 1988; Ковальчук и др., 2002; Безель, 2006; Gama-Flores et al., 2007; Моисеенко, 2009; Bere, Tundisi, 2012).

В то время как экстремально высокие концентрации ТМ в природных средах приводят к видимым патологиям (поражение органов и тканей, изменение структуры популяции, снижение численности видов), их более низкое содержание зачастую вызывает скрытые хронические повреждения, которые могут быть идентифицированы только посредством оценки физиологического состояния животных (Майстренко и др., 1996; Агаджанян, Скальный, 2001; Рахманин и др., 2005; Моисеенко, 2009; Нохрина, 2010).

Также следует отметить, что с одной стороны, такие тяжелые металлы Cu, Zn, Mn, Fe относятся к жизненно важным биоэлементам, необходимым в определенных количествах для нормального функционирования обмена веществ в организме, а с другой, находясь в больших количествах в среде обитания и пище, они

могут оказывать пагубное влияние на жизнедеятельность животных (Школьник, 1959; Войнар, 1960; Underwood, 1977; Ковальский, 1983; Hambidge et al., 1986; Зенин, Белоусова, 1988; Borgmann et al., 1993; Schrauser, 1994; Wagoner et al., 1999; Heath, 2002; Anke et al., 2004; Han et al., 2005; Schröder et al., 2006; Иванов, 2011; Padovan et al., 2012).

К ТМ относят более 40 металлов периодической системы Д. И. Менделеева с атомной массой свыше 50 атомных единиц: V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, Cd, Sn, Hg, Pb, Bi и др. Практически все указанные ТМ, за исключением Pb, Hg, Cd, Bi, биологическая роль которых пока не выяснена, активно участвуют в метаболических процессах. Вместе с тем, для многих из них выявлена высокая степень токсичности для живых организмов в относительно низких концентрациях, и отмечена способность к биоаккумуляции и биомагнификации (Метелев и др., 1971; Реймерс, 1980; Химия ..., 1985; Лапенко, Виленский, 1986; Мур, Рамамурти, 1987; Самонова и др., 1988; Nielsen, 1988; Агрохимия, 1989; Никаноров, 1989; Spry, Wiener, 1991; Smith et al., 1996; Cadmium in ..., 1997; Cullota, Gitlin, 1999; McGeer et al., 2000; Wiesner et al., 2001; Yap et al., 2003; Егоршина и др., 2007; Thouvenin et al., 2007; Моисеенко, 2009).

Медь относится к незаменимым (эссенциальным) для организма микроэлементам, входит в состав многих металлоэнзимов и является активатором ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции, гидролитические процессы в организме. Она участвует в процессах тканевого дыхания, кроветворения, минерального и азотного обмена (Ковальский, 1982; Cullota, Gitlin, 1999). Недостаток Cu отрицательно влияет на синтез белков, жиров и витаминов, способствует нарушению репродуктивных функций организмов.

Вместе с тем избыточные концентрации Cu оказывают токсическое действие на живые организмы, приводят, в частности, к атрофии ряда органов и тканей, эндемической анемии, к нарушению процессов кроветворения, вызывают ряд нейрологических заболеваний (Wagoner et al., 1999). Для этого металла характерно синергическое действие в сочетании с Zn, Cd и Ni (Метелев и др., 1971). Вместе с

тем токсическое действие Cu снижается при комплексовании с органическим веществом вод и в присутствии Ca (Мур, Рамамурти, 1987).

Основным источником поступления Cu в природные воды являются подстилающие горные породы и сточные воды предприятий химической, металлургической промышленности, шахтные воды. Медь может появляться в результате коррозии медных трубопроводов и других сооружений, используемых в системах водоснабжения (Вредные..., 1984, 1989).

В природных водах наиболее часто встречаются соединения Cu(II). В воде фоновых биотопов Cu содержится в диапазоне 0,73-40,2 мкг/дм³, в загрязненных водах – 24,2-134 мкг/дм³, при максимально высоких значениях – 375 мкг/дм³. В донных отложениях концентрации Cu достигают: в фоновых водоемах – 4,0-50,0 мкг/г, в загрязненных – 200-500 мкг/г, при максимально высоких значениях – 1350 мкг/г (Никаноров и др., 1993).

Цинк является жизненно важным микроэлементом, по уровню биологического поглощения сопоставим с такими биогенными металлами, как K, Ca, Mg и др. Он входит в состав ряда металлоферментов и участвует во многих биохимических процессах (Cousins, 1979; Prasad, 1979; Eichhorn, 1984; Hambridge et al., 1986). Ряд важных метаболических процессов – гормональный метаболизм, стабилизация рибосом и мембранных клеток осуществляется с участием Zn (Скальный, 2004). В мировой литературе содержится больше сведений о вредных последствиях недостатка Zn, чем о его избытке. В то же время повышение концентрации многих соединений Zn токсичны, прежде всего, это сульфат и хлорид (Вредные..., 1989; Руководство..., 1977). Было показано, что токсичность Zn для гидробионтов во много раз сильнее, чем для теплокровных животных – у рыб, испытывающих интоксикацию Zn, наблюдается ряд физиологических и биохимических нарушений (Мур, Рамамурти, 1987; Моисеенко, 2009).

Цинк попадает в природные воды в результате протекающих в природе процессов разрушения и растворения горных пород и минералов, а также со сточными водами рудообогатительных фабрик и гальванических цехов, производств пергаментной бумаги, минеральных красок, вискозы и др.

В воде Zn существует главным образом в ионной форме или в форме его минеральных и органических комплексов. Иногда встречается в нерастворимых формах: в виде гидроксида, карбоната, сульфида и др. Содержание Zn в рудных и особенно в шахтных водах с низкими значениями pH может быть значительным. ПДК_в (лимитирующий признак вредности – общесанитарный) составляет 1 мг/дм³, ПДК_{вр} (лимитирующий признак вредности – токсикологический) – 0,01 мг/дм³ (Сборник..., 1991). В воде фоновых биотопов содержание Zn находится в диапазоне 0,04-4,8 мкг/дм³, в загрязненных водах – 5,4-144 мкг/дм³, при максимально высоких значениях – 983 мкг/дм³. В донных отложениях концентрации Zn достигают: в фоновых водоемах – 8,0-60,0 мкг/г, в загрязненных – 300-1200 мкг/г, иногда – 21100 мкг/г (Никаноров и др., 1993).

Марганец является элементом с высокой биологической активностью, участвует в обменных процессах азотного цикла, синтезе жирных кислот, оказывает влияние на рост (Ковалевский, 1982; Авцын, 1991; Орбелис и др., 2008). Марганец считается малотоксичным элементом, и имеются данные, что его присутствие снижает токсичность Cu при комплексном загрязнении водоемов в силу антагонистических свойств этих биогенных элементов (Musibono, Day, 1999; Моисеенко, 2009). Mn способствует переходу активного Fe (II) в Fe (III), что предохраняет клетку от отравления, ускоряет рост организмов и т. д.

В поверхностные воды марганец поступает в результате выщелачивания железомарганцевых руд и других минералов, содержащих Mn (пиролюзит, псиломелан, браунит, манганит, черная охра). Значительные количества Mn поступают в процессе разложения водных животных и растительных организмов, особенно сине-зеленых, диатомовых водорослей и высших водных растений.

Техногенный Mn выносится в водоемы со сточными водами марганцевых обогатительных фабрик, металлургических заводов, предприятий химической промышленности и с шахтными водами.

Концентрация Mn в поверхностных водах подвержена сезонным колебаниям. Существенное влияние на состояние Mn в природных водах оказывают органические вещества и процессы комплексообразования Mn с неорганическими и

органическими лигандами. Комплексные соединения Mn(II) с органическими веществами обычно менее прочны, чем с другими переходными металлами. К ним относятся соединения с аминами, органическими кислотами, аминокислотами и гумусовыми веществами. В речных водах содержание Mn колеблется обычно от 1 до 160 мкг/дм³, среднее содержание его в морских водах составляет 2 мкг/дм³, в подземных водах – $n \cdot 10^2$ - $n \cdot 10^3$ мкг/дм³. Для водоемов санитарно-бытового использования установлена ПДК_в (по иону марганца), равная 0,1 мг/дм³ (Сборник..., 1991). В донных отложениях фоновых пресноводных водоемов концентрации марганца достигают 400 мкг/г (Никаноров и др., 1993).

Железо наряду с Cu, Zn и Mn, является жизненно необходимым микроэлементом (Авцын, 1991; Орбелис и др., 2008; Моисеенко, 2009). Являясь биологически активным элементом, Fe в определенной степени влияет на интенсивность развития фитопланктона и качественный состав микрофлоры в водоеме. Концентрация Fe подвержена заметным сезонным колебаниям. Обычно в водоемах с высокой биологической продуктивностью в период летней и зимней стагнации заметно увеличение концентрации Fe в придонных слоях воды. Осенне-весеннее перемешивание водных масс (гомотермия) сопровождается окислением Fe(II) в Fe(III) и выпадением последнего в виде Fe(OH)₃ (Вредные..., 1989; Руководство..., 1977). Основной формой нахождения Fe(III) в поверхностных водах являются комплексные соединения его с растворенными неорганическими и органическими соединениями, главным образом гумусовыми веществами.

Главными источниками соединений Fe в поверхностных водах являются процессы химического выветривания горных пород, сопровождающиеся их механическим разрушением и растворением. Значительные количества Fe поступают с подземным стоком и со сточными водами предприятий металлургической, металлообрабатывающей, текстильной, лакокрасочной промышленности и с сельскохозяйственными стоками. Содержание Fe в воде выше 1-2 мг/л значительно ухудшает органолептические свойства, придавая ей неприятный вяжущий вкус, и делает воду малопригодной для использования в технических целях. ПДК_в железа составляет 0,3 мг/дм³, ПДК_{вр} для железа – 0,1 мг/дм³ (Сборник..., 1991). В донных отло-

жениях фоновых пресноводных водоемов концентрации Fe достигают 18000 мкг/г (Никаноров и др., 1993).

Никель в высоких концентрациях обладает канцерогенными, гонадотоксичными и эмбриотоксичными, а также кумулятивными свойствами, но играет важную роль в кроветворных процессах (Биоэлементный статус..., 2011). Считается, что свободные ионы никеля (Ni^{2+}), доля которых вырастает с кислотностью среды, примерно в 2 раза более токсичны, чем его комплексные соединения (Никаноров, 1989). Для гидробионтов Ni менее токсичен, чем Cu, Zn и Pb. Для Ni отмечен синергизм при совместном его воздействии с Cd и Zn (Bradley, Morris, 1986; Немова, Высоцкая, 2004; Моисеенко, 2009).

Прямое доказательство, что Ni является эссенциальным элементом для животных, получено относительно недавно (Underwood, 1977; Nielsen, 1988). Наиболее вероятные области воздействия – активация ферментов, гормональное действие, влияние на мембранные и молекулярную целостность. Никель обнаружен в очищенных препаратах ДНК и РНК, стабилизирует их от тепловой денатурации (Walsch, Orme-Johnson, 1987).

Присутствие Ni в природных водах обусловлено составом пород, через которые проходит вода: он обнаруживается в водных источниках и водоемах тяготеющих к месторождениям никельсодержащих руд. Другой путь поступления Ni в воду – из почв и из растительных и животных организмов при их распаде. Соединения Ni в водные объекты поступают также со сточными водами гальванических цехов, заводов синтетического каучука, шахтными водами и стоками обогатительных фабрик.

В поверхностных водах соединения Ni находятся в растворенном, взвешенном и коллоидном состоянии. Растворенные формы представляют собой главным образом комплексные ионы, наиболее часто с аминокислотами, гуминовыми и фульвокислотами, а также в виде прочного цианидного комплекса. Наиболее распространены в природных водах соединения Ni, в которых он находится в степени окисления +2.

В речных незагрязненных и слабозагрязненных водах концентрация Ni колеблется обычно от 0,8 до 10 мкг/дм³; в загрязненных она составляет несколько десятков микрограммов в 1 дм³ (Вредные..., 1990; Зенин, Белоусова, 1988; Руководство..., 1977). Содержание никеля в водных объектах лимитируется: ПДК_в составляет 0,1 мг/дм³, ПДК_{вр} – 0,01 мг/дм³ (Сборник..., 1991). В донных отложениях фоновых водоемов концентрации никеля достигают 15 мкг/г (Никаноров и др., 1993).

Кадмий – рассеянный элемент, считается самым опасным экотоксикантом в группе тяжёлых металлов, а антропогенное загрязнение окружающей среды в несколько раз превышает природную его концентрацию. Наряду с прямыми эффектами, в большей степени опасные свойства Cd связаны с его способностью аккумулироваться в живых организмах, вызывая патологические изменения в органах и тканях гидробионтов (Heath, 2002; Conto Cinier et al, 1997; Satarug et al, 2002). В то же время, по последним литературным данным, Cd, наряду с Ni и Pb, является серьезным кандидатом на эссенциальность, разумеется, в микродозах (Оберлис и др., 2008; Биоэлементный статус..., 2011). Кадмий активирует ряд ферментов, являющихся в норме цинкодержащими энзимами. В повышенных концентрациях Cd токсичен, особенно в сочетании с другими токсичными веществами (Вредные..., 1988; Руководство..., 1977). Из организма Cd выводится в течение длительного периода (около 30 лет) (Москалев, 1985).

В природные воды Cd поступает при выщелачивании почв, полиметаллических и медных руд, в результате разложения водных организмов, способных его накапливать. Соединения Cd попадают в поверхностные воды со сточными водами свинцово-цинковых заводов, рудообогатительных фабрик, ряда химических предприятий (производство серной кислоты), гальванического производства, с шахтными водами, а также при использовании фосфатных удобрений (Cadmium in Fertilizers..., 1997; Моисеенко и др., 2006).

В водных системах Cd связывается с растворёнными органическими веществами, особенно, если в их структуре присутствуют сульфогидрильные группы SH. Адсорбция ионов Cd донными осадками зависит от кислотности среды и в

нейтральных водах свободные ионы Cd значительно сорбируются частицами донных отложений (Никаноров и др., 1993).

В речных незагрязненных и слабозагрязненных водах Cd содержится в субмикрограммовых концентрациях, в загрязненных и сточных водах концентрация Cd может достигать десятков микрограммов в 1 дм³. ПДК_в составляет 0,001 мг/дм³, ПДК_{вр} – 0,0005 мг/дм³ (Сборник..., 1991). В донных отложениях концентрации Cd достигают: в фоновых водоемах – 0,1-1,2 мкг/г, в загрязненных – 4,0-10,0 мкг/г, при максимально высоких значениях – 375 мкг/г (Никаноров и др., 1993).

Свинец, как и кадмий очень токсичен для живых организмов, особенно на ранних стадиях развития. При неблагоприятных экологических условиях Pb кумулируется в организме и может оказаться причиной отравления (Underwood, 1977; Моисеенко, 2009). Свинец накапливается в скелете, замещая кальций. Выводится из организма очень медленно (Вредные..., 1988). При высоких концентрациях Pb в организме повреждается смешанная оксидазная система, нарушается синтез гемма, глобина, и индукции дефектов мембранные эритроцита, наблюдаются нарушения в биосинтезе белка (РНК).

Этот экотоксикант, как и другие металлы, связывается с протеиновыми ферментами, в частности с SH-группами, что приводит к разрушению клеточных органелл в результате снижения интенсивности синтеза протеиновых белков. Было установлено, что свинцовая интоксикация вызывает у рыб сдвиг азотистого обмена в сторону активизации процессов катаболизма, а его токсическое действие на гидробионтов усиливается при повышенных или пониженных температурах (Spry, Wiener, 1991; Немова, Высоцкая, 2004; Моисеенко, 2009).

Естественными источниками поступления Pb в поверхностные воды являются процессы растворения эндогенных (галенит) и экзогенных (англезит, церусцит и др.) минералов. Значительное повышение содержания Pb в поверхностных водах связано со сжиганием углей, применением тетраэтилсвинца в качестве антидетонатора в моторном топливе, с выносом в водные объекты со сточными водами рудообогатительных фабрик, металлургических заводов, химических произ-

водств, шахт и т. д. Существенными факторами понижения концентрации Pb в воде является адсорбция его взвешенными веществами и осаждение с ними в донные отложения.

В природных водах Pb находится в растворенном и взвешенном, в том числе и сорбированном, состоянии. В речных водах концентрация Pb колеблется от десятых долей до единиц микрограммов в 1 дм³. В незагрязненных поверхностных водах суши содержание Pb не превышает 3 мкг/дм³ (Мур, Рамамурти, 1987).

В воде фоновых биотопов Pb содержится в диапазоне 0,02-0,7 мкг/дм³, в загрязненных водах – 0,5-3,8 мкг/дм³, при максимально высоких значениях – 37,5 мкг/дм³. ПДК_в свинца составляет 0,03 мг/дм³, ПДК_{вр} – 0,1 мг/дм³ (Сборник..., 1991). В донных отложениях концентрации Pb достигают: в фоновых водоемах – 5,0-18,0 мкг/г, в загрязненных – 25,0-85,0 мкг/г, при максимально высоких значениях – 425 мкг/г (Никаноров и др., 1993).

Тяжелые металлы и их соединения являются постоянными компонентами природных водоемов и водотоков. При оценке способности экосистемы сопротивляться внешнему токсическому воздействию, принято говорить о буферной емкости экосистемы. По мнению А. М. Никанорова и А. В. Жулидова (1991) в основе буферной емкости пресноводных экосистем к ТМ лежит взаимосвязь нескольких важнейших факторов, определяющих распределение и миграцию металлов в абиогенных и биогенных компонентах: аккумулирующей способности гидробионтов, комплексообразующей способности органического вещества природных вод и депонирующей способности донных отложений (ДО). Считается, что наиболее биодоступны и токсичны ионные формы ТМ (Линник, Набиванец, 1986; Bradley, Morris, 1986; Вредные химические..., 1988, 1989; Gunn et al., 1989; Шляпников и др., 1990; Никаноров, Жулидов, 1991; Никаноров и др., 1985, 1993; Скурлатов и др., 1994; Campbell, 1995; Моисеенко, 2009).

Токсичность ТМ в пресноводных экосистемах существенно зависит от ряда факторов, таких как: комплексообразование с высокомолекулярным растворенным органическим веществом; pH природных вод (в кислой среде токсичность металлов повышается); температура воды (с ростом температуры токсичность ионов ТМ

возрастает, что связано, прежде всего, с активацией биологических процессов в экосистемах, в том числе процессами биоаккумуляции). Показано, что южные водные экосистемы, имеющие высокие концентрации органических соединений (гумусовые вещества, гуминовые кислоты, аминокислоты), способны к более эффективной природной детоксикации по сравнению с водными объектами северных регионов (Никаноров, Жулидов, 1991; Зверев, 1993; Никаноров и др., 1993; Дину, 2009).

Тяжелые металлы могут взаимодействовать как между собой, так и с другими биологически активными соединениями и факторами. Это взаимное влияние типа синергизма или антагонизма осуществляется в абиотической среде, пище, пищеварительном канале, а также в процессах тканевого и клеточного метаболизма (Ковальчук, 2008). Синергизм характерен, например, для Zn и Ca, Fe и Cu, Mn и Zn (Георгиевский и др., 1979; Mertz, 1985; Momciclovic, 1987; Musibono, Day, 1995). Антагонистами являются химические аналоги и гомологи, а также элементы, с одинаковой валентностью и способностью к образованию аналогичных комплексов. Так, снижение Pb в организме наблюдается в присутствии Ca, Zn, Mn; типичными антагонистами считаются Zn и Cd, Zn и Cu, Ca и Fe (Momciclovic, 1987; Goyer et al., 1997; Биоэлементный статус..., 2011; Скальный и др., 2014).

Влияние тяжелых металлов на жизнедеятельность гидробионтов

В последние десятилетия наблюдается тенденция к накоплению ТМ в водоемах, активному включению их в миграционные циклы, аккумуляции в различных компонентах экосистем, в том числе в гидробионтах, обусловленная антропогенным загрязнением, превышающим естественный вынос Pb, Cu, Zn, Cd в 12-13 раз (Филенко, Хоботьев, 1976; Chapman, 2001; Немова, Высоцкая, 2004; Степанова, Латыпова, 2005; Matteucci et al., 2005; Моисеенко, 2009; Даувальтер, Кашулин, 2010; Гронь и др., 2013).

Депонирующей компонентой различных соединений как органического, так и неорганического происхождения, осаждающихся из толщи воды служат донные отложения (ДО). Являясь аккумуляторами экотоксикантов, ДО очищают от по-

следних воду, но вместе с тем повышают концентрацию ТМ для внутриводоемных компонент. При изменении равновесия концентраций, депонированные ТМ способны повторно поступать из грунтов в воду и быть источниками вторичного загрязнения водной среды (Авакян и др., 1960; Брагин, 1986; Леонова, 2004; Линник и др., 2005; Степанова, 2008; Голубева, 2012; Ваганов, 2012; Бикташева, Латыпова, 2012). Накопление растворенных в воде соединений в донных осадках происходит также в результате процессов адсорбции (Степанова, Латыпова, 2005; Линник, 2010; Мартынова, 2010). Все это обуславливает высокую концентрацию токсичных соединений в ДО, значительно превышающую таковую в воде, в результате чего максимальному воздействию со стороны экотоксикантов подвергается макро-зообентос, в том числе и пиявки (Беличенко и др., 1987; Smith et al., 1996; Yap et al., 2003; Степанова и др., 2007; Романова, Климина, 2009; Нохрина, 2010; Лукашев, 2011; Padovan et al., 2012).

Глубокую связь между миграцией химических элементов и ролью в этом процессе живых организмов впервые установил В. И. Вернадский (1983). ТМ, находящиеся в воде и депонированные в отдельных звеньях пищевой пирамиды, оказывают прямое и косвенное токсическое воздействие на организм, приводящее в тяжелых случаях к массовой гибели гидробионтов. Наряду с прямым токсическим действием ТМ на организм они оказывают мутагенное, эмбриотоксическое, гонадотоксическое действия (Моисеенко, 2009).

Известно, что токсичность ТМ вариабельна для разных видов гидробионтов, зависит от природы токсиканта, времени года и физиологического состояния животных (Константинов, 1979; Балог, Шаланки, 1984; Яковлев и др., 2001; Яковлев, 2002; Щербакова, 2004; Кольчугина, 2010).

Так, обнаружено, что ртуть остротоксична для многих гидробионтов в концентрациях выше 1 мкг/л, свинец – при содержании более 0,1 мг/л, кадмий – при 1 мг/л. Исследование токсичности Hg, Zn и Cd для малощетинковых червей *Tubifex tubifex* и личинок комаров *Chironomus sp.* показало, что личинки комаров оказались более чувствительны к повреждающему действию металлов (Константинов, 1979).

Экспериментально было показано, что чувствительность медицинских пиявок к действию солей ТМ изменяется в ряду: Hg >> Cd > Cu >> Ni. При этом среднелетальная концентрация ртути ($ЛК_{50}$) составляла для пиявок 0.29 мкг/л, а никеля – более 1000 мкг/л. Сравнительная оценка токсичности солей ТМ для половозрелых и новорожденных пиявок не показала различий в чувствительности молоди и взрослых пиявок к токсическому действию Hg и Ni (Каменев, 2007).

Биоаккумуляция тяжелых металлов является одной из реакций гидробионтов на загрязнение воды экотоксикантами. По повышенному содержанию ряда соединений в органах и тканях животных возможно выявление зоны поступления токсических веществ в воду (Павлюк, Попов, 2001; Леонова, 2004; Гомбоева, Пронин, 2007; Клишко, 2008; Фальфушинская, 2008; Лукашев, 2011; Padovan et al., 2012).

Водная среда обеспечивает наилучшие условия для биоаккумуляции тяжелых металлов. В силу высокой аккумулирующей способности большинство гидробионтов сами становятся токсически опасными для животных более высоких трофических уровней, в том числе и человека. Коэффициенты биологического накопления (K_{BH}) порой достигают очень высоких значений.

Так, были рассчитаны K_{BH} у антарктической амфиподы *Paramoera walkeri* для Cd (150-630), Pb (1600-7000), Cu (1700-3800), Zn (670-2400) (Clason et al., 2003). Экотоксикологические исследования озера Балатон показали, что концентрация ТМ в зоопланктоне выше, чем в воде в 1000-8000 раз: Hg и Mn – $1 \cdot 10^3$; Cd и Zn – $2 \cdot 10^3$, Pb – $6 \cdot 10^3$; Fe – $7 \cdot 10^3$; Cu – $8 \cdot 10^3$ (Балог, Шаланки, 1984).

На примере брюхоногих моллюсков *Lymnaea pacifampla* было показано, что с усилением техногенной нагрузки на водные экосистемы диапазон аккумуляции ТМ в тканях лимнеид заметно возрастал. В мягких тканях моллюсков были обнаружены следующие концентрации ТМ: Mn – от 135 до 482 мкг/г; Zn – от 113 до 544 мкг/г; Pb – от 21 до 727 мкг/г; Cd – от 3,4 до 93 мкг/г сухого веса. При этом наблюдалось «затухание» кумулятивных процессов: при увеличении концентрации металлов в водной среде показатели K_{BH} снижались (Богатов, Богатова, 2009).

Показано, что в условиях экспериментальной токсической нагрузки зеленые мидии *Perna viridis* способны накапливать кадмий в концентрациях, превышающих контрольные значения в 10-30 раз (Yap et al., 2003).

При исследовании уровня содержания ТМ в донных отложениях и тканях двух видов пиявок из водотоков Ульяновской области, было обнаружено, что тканевые концентрации Cu, Zn, Cd, Pb значительно превышали грунтовые. При этом пиявки-полифаги *Haemopis sanguisuga* отличались от кровососов *Glossiphonia complanata* повышенной аккумуляционной активностью к Cu, Zn и Pb (Романова, Климина, 2009). Подобные результаты получены при исследовании биоаккумуляционных возможностей разных видов пиявок: показано, что хищные *H.sanguisuga* и *Erpobdella octoculata* отличаются от *Theromyzon tessulatum* (кровосос птиц) повышенной активностью к меди, но пониженной – к кадмию (Smith et al., 1996).

Показатели $K_{БН}$ характеризуют видоспецифичность различных групп гидробионтов и общие закономерности аккумуляции эссенциальных и токсичных металлов: животных разделяют на макроконцентраторов ($K_{БН} > 2$), микроконцентраторов ($K_{БН}$ от 1 до 2) и деконцентраторов ($K_{БН} < 1$) (Никаноров и др., 1993; Яковлев, 2002).

В работе В. А. Яковлева (2002) показано, что в условно-фоновых водоемах личинки хирономид являются макроконцентраторами по отношению к Zn и микроконцентраторами для Pb и Cd; в загрязненных водоемах они, как и личинки ручейников – преимущественно деконцентраторы ТМ (за исключением Zn). Значения $K_{БН}$ в организмах личинок хирономид и ручейников максимальны для Zn и Cd и минимальны для Ni (Яковлев, 2002).

Как правило, существует прямая связь между концентрацией ТМ в окружающей среде, пище и уровнем их содержания в организмах гидробионтов. Так, при исследовании накопления ТМ в системе: «вода – ил – макрофиты – млекопитающие» фонового и загрязненного водоема было показано, что в условиях загрязнения накопление ТМ в звеньях цепи происходит интенсивнее, чем в фоновом водоеме, а концентрации ТМ повышаются при движении по трофическим цепям (Егоршина и др., 2007).

Важную роль в трофических цепях водных биоценозов играют бентосные организмы. Как консументы первого и второго порядков, они являются ключевым звеном переноса вещества и энергии на более высокие трофические уровни (Черная, Ковальчук, 2009а). В условиях даже незначительного загрязнения водной экосистемы токсичными МЭ, бентосные организмы активно аккумулируют ТМ. Так, было отмечено достоверное увеличение концентрации Cu в гаммаридах из условно-фонового участка р. Енисей по сравнению с концентрацией этого элемента в звене первичных продуцентов – перифитоне, а также Cd в личинках ручейников относительно водного мха. Вместе с тем накопления Cd, Cu, Pb, Zn в пищевых цепях (от перифитона к рыбе) не наблюдалось, что свидетельствует о наличии механизмов регуляции этих ТМ в организме исследуемых гидробионтов (Анищенко и др., 2009).

Группой британских исследователей было показано, что концентрации Cu и Cd в воде на три порядка ниже, чем в донных осадках и биоте. При этом в цепи «вода – донные осадки – макрозообентос» наблюдалась их биомагнификация (Smith et al., 1996).

Экотоксикологический подход к исследованию сопряженной системы «вода – донные отложения – бентос» довольно объективно отражает состояния, как гидробионтов, так и среды их обитания. Показано, что донные беспозвоночные, как один из ключевых элементов водных экосистем, могут служить надежным и объективным биогеохимическим индикатором загрязнения придонных вод и донных отложений (Чеботина и др., 2007; Черная, Ковальчук, 2007, 2010; 2010а; Клишко, 2008; Яковлев и др., 2012). В качестве индикаторов загрязнения водной среды тяжелыми металлами служат различные группы бентосных организмов: моллюски, кольчатые черви, губки и мн. др. (Smith et al., 1996; Reynoldson et al., 1996; Chapman, 2001; Яковлев, 2002; Yap et al., 2003; Кавун, Шулькин, 2005; Schröder et al., 2006; Степанова и др., 2007; Лукашев, 2015; Padovan et al., 2012).

Следует отметить высокую биохимическую активность ТМ по отношению ко всем группам белков и аминокислот (Щербань, 1977; Tabata, 1969; Bordas et al., 1976; Briggs, Baron, 1979; Servisi, Marteus, 1978; Halatcheva, Nikolova, 1980; Kass-

chau et al., 1980; Loeb, Zakour, 1980; Pecon, Powell, 1981; Lewis, McIntosh, 1986; Шемякина и др., 1998; Трудникова и др., 2006; Цветков, 2009; Моисеенко, 2009; Черкесова, 2013). Обнаружено, что у позвоночных и беспозвоночных животных при сходстве физиологии и топологии, транспорт ионов происходит при участии разных групп белков (Dykes et al., 2004).

При исследовании содержания и состава Cd-связывающих белков в тканях мидии *M. edulis* были идентифицированы два класса веществ: с высоким содержанием цистеина и низким содержанием глутаминовой кислоты; с высоким содержанием серина. При этом во всех фракциях отмечено высокое содержание глицина (Frazier, 1986).

В лабораторном эксперименте было установлено, что наличие в воде гуминовых кислот и аминокислот снижает интенсивность накопления ТМ в тканях пресноводного моллюска *L. stagnalis* (Никаноров, Жулидов, 1991).

Наряду с аминокислотами и гуминовыми кислотами двухвалентные металлы образуют комплексы с биологически активными низкомолекулярными соединениями, содержащими аминокислоту цистеин (около 30%), металлотионеинами (МТ).

Основная роль МТ состоит, как в связывании токсичных (Pb, Cd и др.) и регуляции эссенциальных (Zn и Cu) металлов, так и в способности защищать организм от окислительного стресса. Экспериментально доказано, что увеличение концентраций МТ в организме является одной из форм адаптивного ответа животных, направленного на повышение устойчивости к действию экотоксикантов (Бауман, 1977; Данилин и др., 2002; Мищук, Михайлов, 2003; Нюкканов, 2004; Павловская, Шестакова, 2004; Столляр и др., 2004; Данилин, Павловская, 2006; Павловская, 2007; Van Campenhout et al. 2003; Данилин, 2010).

Так, у двустворчатых моллюсков *C. grayanus* из импактных водных объектов обнаружено повышенное количество металлотионеин-подобных белков, образующих комплексы с токсичным Cd (Подгурская, 2006).

Экспериментально установлено, что беззубки *Anodontia cygnea* на фоне эффективной аккумуляции Zn, Mn, Cu и Pb, повышают в тканях уровень содержания

МТ. При этом регистрировалась избирательная зависимость состояния МТ и системы антиоксидантной защиты организма от наличия ионов Cu (Столяр и др., 2004).

В мировой литературе приводятся результаты лабораторных экспериментов по исследованию влияния ТМ на биохимические показатели водных беспозвоночных. Выявленные при этом изменения в обмене веществ позволяют оценить границы адаптационных возможностей гидробионтов, а также степень их чувствительности и устойчивости к повреждающим агентам.

Так, показано, что сублетальные концентрации ионов Cd приводят к повышению общих липидов, сдвигу липидных фракций, активизации процессов перекисного окисления липидов и снижению антиоксидантов в сыворотке крови, тканях печени, селезенки и почек карпа. Установлена зависимость исследованных показателей от продолжительности экспозиции и тканевой специфики (Силкина, Микряков, 2006).

Обнаружено, что при действии ртути в диапазоне концентраций 0,001-0,01 мг/л количество глюкозы в гемолимфе гаммарид возрастает, а содержание гликогена в тканях уменьшается (Гаранина, 1984).

В исследованиях И. Л. Головановой (2011) было установлено, что ионы ТМ оказывают ингибирующий эффект на амилолитическую активность в тканях личинок хирономид и моллюсков. При этом ферменты хирономид, по сравнению с моллюсками, оказались более устойчивы к действию ТМ (Голованова, 2011).

Основным механизмом повреждающего действия токсикантов является отравление системы ферментов. Так, Hg, Cu и Ag, имея высокое сродство с амино- и -SH группами, ингибируют многие реакции, а Zn в концентрации 0,065 мг/л блокирует фосфорилирующее дыхание (Константинов, 1979).

Показано, что активность ферментов изменяется в зависимости от природы токсиканта, его концентрации, стадии развития и видовой принадлежности гидробионтов (Немова и др., 1994).

При исследовании острого эффекта ионов Cu, Cr и их смесей в течение 96-ти часов *in vivo* на самок крабов *Carcinus maenas* наблюдалось подавление активно-

сти ацетилхолинэстеразы в гемолимфе, лактатдегидрогеназы в яичниках и глутатион-S-трансфераз в гепатопанкреасе. При этом тестируемые растворы ионов отдельных металлов оказывали менее выраженный эффект, чем их сочетанное воздействие (Elumalai et al., 2002).

Экспериментально доказано, что низкие концентрации ионов Cu, Zn, Cd повышают активность антиокислительных ферментов (супероксиддисмутаза) в гепатопанкреасе краба. При этом отмечено более сильное повреждающее действие ТМ в жабрах, нежели в гепатопанкреасе (Pan et al, 2004).

Аналогичные результаты были получены при экспериментальной оценке влияния ионов Cu и Ca на функциональные особенности супероксиддисмутазы, эстеразы и пероксиддисмутазы в печени устрицы: низкие концентрации металлов стимулируют активность исследуемых ферментов, а высокие – подавляют (Wei et al., 2004).

При исследовании активности каталазы, глутатионредуктазы, супероксиддисмутазы в тканях моллюсков *Crenomytilus grayanus*, искусственно трансплантированных из районов с различной степенью загрязненности, выявлены тканеспецифические изменения с выраженным адаптационным характером. Обнаружено, что в тканях *C. grayanus* из загрязненного района содержание как первичных, так и конечных основных продуктов, характеризующих многоэтапный процесс окислительного распада липидов, существенно выше, чем в тканях особей из относительно чистых территорий. При проведении эксперимента в тканях трансплантированных мидий было отмечено интенсивное накопление продуктов перекисного окисления липидов (Довженко и др., 2004).

Несмотря на обширный фактический материал о роли эссенциальных и токсичных тяжелых металлов в жизнедеятельности гидробионтов, в научной литературе недостаточно сведений о микроэлементном составе медицинских пиявок, отсутствуют данные о характере поступления, распределения и выведения тяжелых металлов тканями пиявок. Таким образом, влияние эссенциальных и токсичных металлов на метаболизм медицинских пиявок остается практически неизученным.

1.3. Технология выращивания медицинской пиявки

Из всех известных видов Hirudinea только медицинские пиявки содержат целый комплекс биологически активных соединений (БАВ), оказывающих разностороннее благотворное воздействие на организм человека и животных (Баскова, Исаханян 2004; Никонов, 2007). В связи с высокой эффективностью при лечении широкого спектра заболеваний, а также в результате практически полного истребления природных популяций медицинских пиявок, возникла необходимость их искусственного разведения.

История применения пиявок в лечебных целях насчитывает более двух тысяч лет. Сведения об их использовании в лечебных целях встречаются в священных книгах разных религий – в Библии и Коране. Пиявок можно увидеть на настенных рисунках, найденных в гробнице 18-ой династии фараонов (1567-1308 до н.э.). Родоначальником лечебного метода, названного гирудотерапией, считается греческий поэт Никандр из Колофона (Nikandros), который еще во II веке до н.э. наряду с лечением укусами змей и насекомых, впервые описал полезные свойства пиявки. Название метода произошло от латинского слова *hirudina*, что означает «пиявка». Первые методики гирудотерапии были описаны Галеном (130-200) и Авиценной (980-1037).

Кровопускание стало очень модным в восемнадцатом и девятнадцатом веках, особенно во Франции, и потребность в медицинских пиявках была огромна. В этот период МП импортировались в основном из Турецкой империи, России, Великобритании, Германии и Испании (Elliott, Kutschera, 2011).

Применение пиявок стало настолько популярным, что наступила угроза исчезновения МП как вида на территории Европы. Только в 1833 году французские врачи импортировали почти 42 млн. пиявок, а ежегодное потребление доходило до 100 млн. особей. Постоянно растущий спрос резко взвинтил цены на пиявок, и французское правительство учредило награды компаниям, которые могли усовершенствовать технологию добычу пиявок путем разработки новых ресурсов (болов-

та, ручьи и пруды). Сбор пиявок стал популярным способом зарабатывания денег (Whitaker et al., 2004).

Из Германии ежегодно экспортировалось до 30 млн. пиявок в США, и немецкие власти обеспокоились возможностью страны в удовлетворении внутренних потребностей. Европейские пиявки были предпочтительнее их американских родственниц *Hirudo decora*. Это обусловлено тем, что американская пиявка производит надкус кожи не таким глубоким, и при этом наблюдается меньший отток крови. В США возникали определенные сложности в импорте медицинских пиявок из Европы, и в 1835 году была учреждена денежная награда в 500 долларов для тех, кому бы удалось заняться размножением европейского вида пиявок в США (Whitaker et al., 2004). Было предпринято несколько попыток выращивание *H. medicinalis* за океаном, но без положительных результатов (Elliott, Kutschera, 2011).

Когда в XIX веке медицинская пиявка стала менее доступной, в США был открыт доступ к импорту других видов медицинских пиявок из-за пределов Западной Европы. В это же время появляются свидетельства о создании «пиявочных хозяйств» во Франции и Германии. Не позднее 1890 года пиявочные хозяйства вблизи Хильдесхайм в Германии производили от трех до четырех млн. особей в год (Herter, 1937).

В России на начало 1830-х годов объемы вылова МП составляли порядка 50 млн. особей в год. К середине XIX века эта цифра выросла до 70 млн., при этом на внутреннее использование приходилось до 30 млн. пиявок ежегодно. Однако реальный расход пиявок внутри России, с учетом смертности пиявок при добыче, транспортировке и хранении, достигал 40 млн. особей в год (Жаров, 2003).

Разведением медицинской пиявки в России начали заниматься в первой половине XIX века, что было связано с почти полным ее исчезновением в результате перепромысла. Пионером отечественного пиявководства стал Г. Парман, основавший в 1825 году в Москве специализированное пиявочное хозяйство, где одновременно содержалось до 700 тысяч особей. В этот период пиявок разводили в обыкновенных прудах, и данная отрасль являлась частью прудовых хозяйств. Ко-

личество пиявочных ферм постоянно росло, они появились в Петербурге, Черниговской губернии, на Урале (Жаров, 2003).

Однако перспективы у данной отрасли в тот период времени не было, поскольку медицинские учреждения практически полностью отказались от применения медицинских пиявок. Этому способствовало развитие медицинских наук, в особенности открытии и впоследствии промышленное производство антибиотиков, а также других средств и методов, позволивших частично заменить гирудотерапию.

Тем не менее, в конце XIX века началась реорганизация гирудокультуры. На основе современных достижений в гирудологии были созданы основы технологии разведения медицинской пиявки в искусственных условиях. Процесс становления гирудокультуры в ее современном виде закончился в 1920-1930-х годах созданием в России первой в мире гирудологической лаборатории, в которой была разработана система правил, до сих пор применяемая на биофабриках (Жаров, 2003).

После Октябрьской революции все пиявочные хозяйства были национализированы. На медицинскую пиявку распространялся такой же госзнак, как и на все другие товары. Для эффективного развития гирудокультуры был необходим поиск оптимальных методов разведения пиявок. С этой целью была проведена серия экспериментов по выращиванию и размножению медицинской пиявки в искусственно созданных условиях (Синева, 1944, 1949).

В настоящее время на территории России официально действует шесть биофабрик по выращиванию медицинских пиявок: Международный центр медицинской пиявки (Московская область, п. Удельная), Научно-внедренческая фирма «Гируд И.Н.» (Саратовская область, г. Балаково), Компания Народной Медицины «Биофабрика» (г. Санкт-Петербург), компания «Гирудо-Мед» (Московская область, г. Люберцы), компания «Гирудо-Мед.Юг» (Краснодарский край, ст. Каневская), корпорация «СибМедПиявка» (Алтайский край, г. Барнаул).

Среди европейских предприятий, специализирующихся на выращивании медицинских пиявок, следует отметить наиболее крупные: Biebertaler Blutegel-

zucht GmbH (Германия), Biorica (Франция), Biopharm Leeches (Великобритания), «Гірудо Мед» (Украина), Leeches Turkey / Ustunay Pzarlama (Турция).

Медицинская пиявка является довольно простым в содержании и разведении объектом. Свообразие питания медицинских пиявок, принимающих пищу через относительно большие промежутки времени, способность к длительному голоданию и неприхотливость к условиям содержания позволяют одновременно выращивать на небольшой площади значительное количество особей.

В России уже с середины прошлого века медицинских пиявок выращивают на биофабриках по методике, разработанной Г. Г. Щеголевым с сотрудниками (Синева, 1944; Щеголев, 1948). Суть метода заключается в том, что медицинских пиявок отлавливают из природных водоемов, доставляют на биофабрику, где их кормят кровью крупного рогатого скота и обеспечивают им необходимые условия для размножения. Тонкости биотехнологии воспроизведения пиявок не разглашаются и являются собственностью каждой биофабрики. Как правило, весь цикл выращивания медицинских пиявок занимает 8-12 месяцев, в то время как в природе, они достигают нужных размеров только на третий год жизни (Лукин, 1976; Никонов, 2007).

Основными этапами технологии разведения являются сортировка особей на матку, спаривание «маточного» поголовья пиявок, откладка коконов, выборка молоди из коконов и ускоренное ее раскармливание до размеров готовой продукции (рис. 1.3.1).

Процесс сортировки МП на матку сводится к тому, что после кормления природных особей бычьей кровью ведут выборку здоровых особей весом более трех грамм. Впоследствии эти особи рассаживаются в 3-литровые стеклянные соуды на спаривание, для чего им создаются благоприятные условия – повышенная температура, круглосуточное освещение и учащенная смена воды, стимулирующая процесс спаривания.

Совокупление у медицинских пиявок может быть как односторонним, так и взаимным, которое чередуется одно с другим без какой либо закономерности (Синева, 1949). Роль самца или самки при этом может выполнять любой из партнеров,

независимо от величины. Совокупление практически всегда происходит в воде, изредка – над водой, продолжительность одного акта составляет от 15 минут до 2-х часов (Запкувене, 1972). Стадия спаривания у пиявок длится 1-2 месяца в зависимости от температуры и условий содержания.



Рисунок 1.3.1 – Условия содержания и основные этапы выращивания медицинских пиявок на биофабриках (фото предоставлены «Международным центром медицинской пиявки»)

По мере появления маток с поясками оплодотворения производят их закладку в инкубатор. В качестве основного субстрата для закладки в инкубатор используется кусковой торф. Его тщательно моют в полиэтиленовых баках с раствором марганцовокислого калия, затем промывают чистой водой и оставляют на 2-5 суток в воде для увлажнения, после чего дают ему стечь и заполняют им 3-х литровые сосуды на 2/3 их емкости. В 3-х литровые сосуды с торфом маток весом 3-15 грамм помещают по 5 особей. Впоследствии сосуды накрывают бязевыми салфетками, обвязывают резиновым жгутом, отмечают химическим карандашом дату закладки, после чего устанавливают на стеллажи. Сосуд поверх салфетки накрывают

стеклянной крышкой для сохранения в нем влаги. Для закладки маток выделяют специальное помещение, которое должно быть круглосуточно затемнено. Следует исключить также возможность посторонних воздействий: шумов и запахов. Процесс кладки длится в течение 2-х месяцев. В отложенных пиявкой коконах развитие молоди продолжается в течении 28-29 дней при температуре 22-26°C, а при температуре 18-20°C оно затягивается до 35-45 дней (Синева, 1949). Одна матка обычно откладывает от 1 до 5 коконов, в каждом коконе содержится в среднем от 7 до 15-20 яиц. В среднем одна матка может отродить 30-40 пиявок. По выходе из кокона молодые пиявки (нитчатки) способны вести самостоятельный образ жизни. Их вес колеблется от 20 до 30 мг (Запкувене, 1972). Однако если среда в месте нахождения кокона сухая, или окружающая температура ниже 20°C, пиявки из коконов практически не выходят. Для стимуляции их выхода необходимо увеличить влажность и повысить температуру до 26°C.

После закладки маток на откладку коконов проводят тщательную подготовку помещений, оборудования и инвентаря к приему нитчаток, проверяют коконы на созревание, для чего их просматривают на свет. Зрелые коконы характеризуются скоплением черной массы нитчаток у одного из своих полюсов, при нажатии они кажутся пустыми, из них не выступает белковая жидкость. Если большая часть коконов зрелая, приступают к массовому их разбору. Незрелые коконы плотные и полностью темные, оставляют в торфе на две-три недели для дозревания.

Затем выбирают из торфа коконы, просчитывают их и размещают в 3-х литровые стеклянные сосуды, в которых проводилась кладка коконов. На следующий день коконы перемещают в чистые сосуды, заполняя его на 0,5 л водой. Молодь, вышедшую из коконов, оставляют в первом сосуде, слив из него старую воду и налив свежую. На третий день коконы перемещают в таз, последовательно один за другим разрывают и выбирают из них оставшуюся молодь.

Молодь, выбранную из коконов и торфа, размещают в 3-х литровые сосуды по 400 особей, сосуд накрывают бязевой салфеткой, обвязывают резиновым жгутом. Сосуды с пиявками, ставят на стеллажи и последующие три дня меняют воду,

затем через каждые три дня промывают до первого кормления. При содержании молодых пиявок нельзя допускать резких скачков температуры. Сразу после выхода из коконов нитчатки не нуждаются в кормлении не протяжении 10-20 дней, т. к. их пищеварительный тракт еще наполнен белком. По истечении этого срока рекомендуется начинать кормление. Челюсти нитчаток слабы и могут прокусывать только кожу земноводных. Оптимально для первого кормления использовать озерных лягушек, однако в промышленных условиях это непросто, поэтому в гирудокультуре нитчаток кормят кровью млекопитающих, предпочтительно говяжьей.

Кормление молодняка осуществляется свежей кровью, которая приобретается на скотобойнях. Для полноценного откорма используется исключительно кровь здоровых животных. Вся поступающая на биофабрику кровь подвергается ветеринарно-санитарной экспертизе. Кормление пиявок осуществляется с помощью специально разработанного аппарата, представляющего собой металлический цилиндр, с одной стороны которого натягивается два слоя говяжьей синюги. Кратность кормления пиявок составляет один месяц, до достижения ими массы три грамма.

Откорм молоди пиявок продолжается в течение 6 месяцев. После окончания периода откорма подрашенные пиявки переводятся в цех готовой продукции, где выдерживаются без пищи три месяца, затем пиявки могут быть реализованы для лечебных целей.

Выбранную из торфа матку несколько раз промывают чистой водой и содержат неделю на карантине, ежедневно меняя воду, после чего сортируют и готовят к кормлению. В условиях лаборатории или производства возможно повторное или даже третичное использование маточного стада. Однако для получения достаточного количества жизнеспособного потомства матке необходимо пройти период реабилитации, для чего рекомендуется провести 2-3 кормления и дать ей отдохнуть после первой кладки 5-6 месяцев.

Пиявки, выращиваемые в искусственных условиях, подвергаются многочисленным внешним влияниям, воздействию биотических и абиотических факторов

среды, которые зачастую отрицательно влияют на гомеостаз. Медицинским пиявкам свойственны различные болезни (Лукин, 1976). Как правило, они вызываются чрезмерным кормлением или же кормлением некачественной кровью и содержанием в загрязненных сосудах. При содержании в загрязненной воде наступает металлическая болезнь, характеризующаяся появлением на теле пиявок вздутий, сужений и т. п. (Стояновский, 2002). Смерть обычно наступает на 11-й день. Желтуха пиявок – болезнь, сопровождающаяся их вздутием и дряблостью тела. Инициируется при содержании в воде с высокой температурой (выше 30°C). Однако всех этих болезней можно избежать при правильном содержании и нормальном режиме кормления здоровой и свежей кровью.

В силу высокого спроса медицинских пиявок, как лечебного средства, в последние десятилетия в России проводятся многочисленные исследования по оптимизации и усовершенствованию технологии их воспроизведения для повышения поставок, как на внутренний, так и на внешний фармацевтический рынок (Кустов, 2003; Михайлов, 2005; Рассадина, Романова, 2008; Салтыков, 2012; Никишов и др., 2015).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Общая характеристика объектов исследования

В работе использованы материалы многолетних (2003-2017 гг.) полевых и лабораторных исследований по изучению влияния естественных и антропогенных факторов на состояние микроэлементного обмена у трех видов челюстных пиявок: гематофагов медицинских пиявок *Hirudo medicinalis* (Linnaeus, 1758) и *Hirudo verbana* (Carena, 1820) различных эколого-физиологических групп (из природных популяций и гирудокультуры); и хищной большой ложноконской пиявки *Haemopis sanguisuga* (Linnaeus, 1758) (рис. 2.1.1).

Всего в исследованиях было использовано 843 особи пиявок. Из них 120 особей *H. medicinalis* (60 из природных популяций и 60 выращенных на биофабрике), 578 пиявок *H. verbana* (130 из природных популяций и 448 из гирудокультуры), 145 экземпляров *H. sanguisuga*.

Пиявки были отловлены в девяти водных объектах России и Украины и приобретены на четырех биофабриках России (рис. 2.1.2).

Для исследования уровня содержания тяжелых металлов (ТМ) в среде обитания пиявок практически во всех изучаемых водных объектах (исключая р. Тогул, Алтайский край) проводили отбор донных отложений (120 проб).

Для изучения межвидовой и географической изменчивости микроэлементного обмена кровососущих и хищных пиявок исследовано восемь водных объектов различных регионов России и Украины, в шести из которых отловлены особи лечебной пиявки *H. medicinalis*: оз. Горелое (Харьковская обл.1), р. Уды (Харьковская обл.2), оз. Глубокое (Луганская обл.), р. Лесной Воронеж (Тамбовская обл.), оз. Дамба (Алтайский край 1), р. Тогул (Алтайский край 2); в трех – особи аптечной пиявки *H. verbana*: оз. Горелое, ерик Судомойка (Волгоградская обл.), р. Челбас (Краснодарский край); в шести – особи ложноконской пиявки *H. sanguisuga*: оз. Горелое, р. Уды, оз. Глубокое, р. Лесной Воронеж, ер. Судомойка, р. Челбас.



Hirudo medicinalis

Hirudo verbana



Haemopis sanguisuga

Рисунок 2.1.1 – Медицинские и большие ложноконские пиявки,
используемые в исследованиях авторов



Рисунок 2.1.2 – Картосхема регионов мест отлов и приобретения пиявок:
кружками обозначены водные объекты, звездами – биофабрики

Характер и уровень биологической аккумуляции гирудинид оценивали с помощью значений коэффициента биологического накопления ($K_{БН}$), рассчитанных по отношению тканевых концентраций микроэлементов (МЭ) к концентрациям ТМ в донных отложениях.

Сезонную и возрастную изменчивость МЭ, а также влияние хронического голодаия (в течение семи месяцев у медицинских пиявок и пять месяцев у больших ложноконских пиявок) на микроэлементный обмен пиявок изучали с использованием особей аптечной пиявки *H. verbana*, отловленных в р. Челбас (Краснодарский край) и ложноконских пиявок *H. sanguisuga* из вдхр. Белоярское (Свердловская обл.).

Особей лечебной пиявки *H. medicinalis* из гирудокультуры приобретали на биофабриках: «ГирудИ.Н.» (Саратовская область, г. Балаково) и «СибМедПиявка» (Алтайский край, г. Барнаул); особей аптечной пиявки *H. verbana* – на биофабриках «Международный центр медицинской пиявки» («МЦМП», Московская область, Раменский район, ст. Удельная), «Гирудо-Мед.Юг» (Краснодарский край, Каневской район, хутор Орджоникидзе), «СибМедПиявка» (Алтайский край, г. Барнаул).

Для исследования микроэлементного обмена на разных этапах развития и роста особи аптечной пиявки *H. verbana* («нитчатки», вышедшие из коконов, и пиявки в возрасте один, три, пять, семь и девять месяцев) были предоставлены администрацией биофабрики «МЦМП».

Слюнные железы и секрет слюнных желез отбирали у взрослых особей *H. verbana*, выращенных на биофабрике «МЦМП».

Влияние хронического голодаия (в течение трех, пяти, семи, девяти и двенадцати месяцев) на динамику содержания эссенциальных и токсичных макро- и микроэлементов в тканях аптечной пиявки *H. verbana* исследовали у особей, выращенных на предприятии «Гирудо-Мед.Юг».

Методика и время отлова пиявок в естественных водоемах

Для отлова медицинских пиявок использовали стандартный ударный способ их привлечения (Каменев, 2007). Производили 5 сильных ударов по воде 1-метровой палкой с интервалом в 2 секунды. Затем в течение 3-х минут привлеченные пиявки вылавливались сачком, а также собирались руками со всех предметов, находящихся вблизи. Вышеописанный цикл в течение 10 минут повторялся трижды. Для отлова больших ложноконских пиявок использовали ручной сбор в литоральной части водных объектов (Лукин, 1976).

Пробы донных отложений (ДО) отбирали цилиндрическим пробоотборником из верхнего 10-см слоя дна на участках, где толщина водного слоя составляла 50-100 см.

Для исследования географической изменчивости микроэлементного спектра тканей все три вида пиявок были отловлены в первую (регионы европейской части России и Восточной Украины) и последнюю (Алтайский край) декады мая. Для изучения сезонных особенностей микроэлементного обмена использовали взрослых особей *H. verbana* и *H. sanguisuga*, отловленных в мае, августе и ноябре.

Отлов и 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).

2.2. Эколого-географическая характеристика мест обитания пиявок

Харьковская область

Харьковская область расположена в северо-восточной части Украины, на водоразделе рек систем Дона и Днепра, в степной и лесостепной зонах. Поверхность – волнистая равнина, расчлененная речными долинами, оврагами и балками. Климат умеренно континентальный. Средняя температура января от -7,2 до -8,4°C, июля 20-21,4°C. Среднегодовая температура составляет 8,1°C. Среднегодо-

довоев количества осадков от 457 мм на востоке до 536 мм на западе. Самые большие реки – Северский Донец и его приток Оскол; кроме того, в Северский Донец впадают: Уды, Мжа, Берека, Балаклейка, Волчья, Великий Бурлук. Имеются озера: Лиман, Боровое, Чайка, Лебяжье и др. Созданы 2 крупных водохранилища – Печенежское (380 млн. м³) на Северском Донце и Краснооскольское (480 млн. м³) на Осколе; около 1150 прудов. Преобладают черноземные почвы, в долинах рек почвы дерново-малоподзолистые, лугово-чернозёмные, болотные и др. Под лесами и кустарниками занято 9,2% территории области. Основные лесные массивы – в северо-западной части (Большая ..., 1978).

Горелая долина – урочище, расположеннное в Змиевском районе Харьковской области в бассейне реки Северский Донец, в четырех километрах юго-восточней озера Лиман, на третьей надлуговой террасе. Эта территория уникальна как единственное изолированное местонахождение солончаков в области и самая северная точка солончаков в Европе (Гамуля, 1994). Главными экологическими факторами, определяющими качественный состав и структуру биоценозов долины, является водный режим, степень засоления почвы и воды, способ хозяйственного использования. Водоемы, расположенные на территории урочища, относятся к выделенному Е. И. Лукиным (1979) типу водоемов (луж) с длительным сроком стояния воды, или пересыхающих не каждый год. Основными источниками питания водоемов являются атмосферные осадки (дождевые и снеговые) и подземные воды. Самый крупный водоем урочища **озеро Горелое**, имеет смешанное питание, при этом в засушливые периоды питается грунтовыми водами (родниковыми), которые доминируют и выполняют основную роль, а в весенний и осенний период преобладает питание атмосферными осадками (Гамуля, 1994).

На территории урочища Горелая долина обитает редкие виды пиявок, занесённые в Красную книгу Украины: *Fadejewobdella quinqueannulata* (Lukin, 1929), *Hirudo medicinalis* (Linnaeus, 1758) и *Hirudo verbana* (Carena, 1820) (Утевский, 1998; Сидоровский и др., 2010; Сидоровский, 2011, 2012).

В озере Горелое (49°41'с.ш.; 36°21'в.д.) нами были отловлены все три вида изучаемых гирудинид.

Район бассейна реки Уды (правый приток Северского Донца) расположен на юго-западных отрогах Среднерусской возвышенности в пределах водораздела Днепр-Дон. Поверхность бассейна р. Уды равнинная. Преобладают эрозионные формы рельефа – долины, балки и овраги. Большая часть бассейна распахана. Лесистость составляет 10%, заболоченность – 1%. Леса и болота приурочены в основном к поймам рек и балок. В среднем и нижнем течении наблюдаются озёра-старицы и заболоченные участки; иногда встречается кустарниковая растительность. Речное русло слабо извилистое, шириной от 6 до 8 м, на отдельных участках – 20-35 м, глубиной 0,1-0,8 м (на плёсах до 1,0 м). Дно русла в основном твёрдое, песчаное, иногда илистое. Берега высотой от 0,2 до 1,5 м, местами крутые и обрывистые, составлены супесями и суглинками. Питание реки в основном снеговое. Во время весеннего половодья уровень реки поднимается на 1,5-2 метра. В летнее время (до 3-4 месяцев) река в верховьях часто пересыхает (Каталог річок України, 1957; Демченко, 1971). Бассейн реки Уды занимает территорию центрального экономического региона Харьковской области, региона с широко развитой обрабатывающей и лёгкой промышленностью, промышленностью строительных материалов и машинно-строительного комплекса. Река протекает по территории пяти административных районов Харьковской области и Харькова с общим населением более 2.0 млн. человек. Класс качества воды реки до г. Харькова соответствует 3 «умеренно-загрязненная», а ниже г. Харькова после принятия сточных вод класс качества воды реки изменяется до 5 «грязная» (Схема охраны..., 1985; Правила использования..., 2010).

Наши исследования проходили на участке реки Уды в окрестностях пос. Боровой ($49^{\circ}23' с.ш.$; $37^{\circ}37' в.д.$). Отловлены особи медицинских пиявок *H. medicinalis* и хищных *H. sanguisuga*.

Луганская область

Луганская область расположена на востоке Украины. Поверхность области представляет собой волнистую равнину, повышающуюся от долины Северского Донца к северу (высота до 200 м и более) и к югу, где расположен Донецкий кряж.

Луганская область богата высококачественным каменным углем; две трети составляют антрациты и другие энергетические угли, треть – коксующиеся угли. Угольные месторождения являются частью Донецкого угольного бассейна, сосредоточены в Антрацитовском, Краснодонском, Лутугинском, Перевальском и других районах, расположенных в южной части области (Гвоздецкий, 1969; Большая..., 1978).

В пойме реки Северский Донец на левом берегу, на северо-восток от Луганска находится Станично-Луганский филиал Луганского национального заповедника НАН Украины. В его состав входит часть Кондрашевского лесничества с семью пойменными озерами, пригодными для поселения и воспроизведения редчайшего мехового реликтового зверька – выхухоли. Территория заповедника вытянулась узкой полосой, занимая пойму и часть боровой террасы. В почвенном покрове заповедных территорий преобладают обычные черноземы с содержанием гумуса от 5 до 7%. Климат здесь умеренно континентальный со среднегодовой температурой воздуха около +8.5°C. Температура воздуха наиболее холодного месяца в среднем составляет -9°C (январь), наиболее тёплого – +20°C (июнь), хотя максимальная может достигать +34°C. Зима в заповеднике холодная, с невысоким снежным покровом (10-20 см). Весна продолжительная, прохладная, с частыми заморозками, а лето сухое и жаркое. Температура, превышающая +10°C, удерживается на протяжении 160-175 дней. Вокруг русла, занимая значительную часть поймы вдоль Северского Донца и вдоль стариц, по берегам озер и в котловинах раскинулись леса из вербы белой и тополя черного. Они занимают в заповеднике свыше 10% территории. В переходной зоне к центральной части поймы растут вязовые леса. Далее, в притеррасной части поймы, на илисто-болотистых грунтах, распространены ольховые леса. На заповедной территории Станично-Луганского филиала более всего распространены пойменные дубовые и вязово-дубовые леса. На песчаных холмах боровой террасы в послевоенные годы высажены монокультуры сосны обыкновенной с отдельными экземплярами сосны крымской (Сова, 2008; Боровик, 2012).

В Луганской области развита добыча угля (Донбасс), металлургия, тяжелое машиностроение, химическая промышленность и сельское хозяйство.

Отлов медицинских пиявок *H. medicinalis* и хищных *H. sanguisuga* проводили в прибрежной части озера Глубокое, расположенного на территории Луганского заповедника в 500 м от станицы Луганская, на границе лесной и лесостепной зон ($48^{\circ}40'c.ш.$; $39^{\circ}28'v.д.$).

Тамбовская область

Тамбовская область находится в центре Восточно-Европейской равнины и занимает центральную часть Окско-Донской равнины. Плоские водоразделы чередуются с широкими речными долинами; средние высоты 110-115 м. На востоке (водораздел рек Цны – Вороны) заходят отроги Приволжской возвышенности (высота до 214 м). Развиты овраги и балки (бассейн рек Цны, Вороны). Климат умеренно континентальный. Средняя температура января -10.5°C на юго-западе, -11.5°C на востоке; июля 19.5°C на севере и 20.5°C на юге. Среднегодовая температура составляет 6.1°C . Осадков выпадает на юге и юго-востоке до 450 мм, на севере около 500 мм в год; максимум их (до 70%) приходится на апрель-октябрь. Продолжительность вегетационного периода 178 суток на севере и 185 суток на юге (Большая ..., 1978). Зажатая между Среднерусской и Приволжской возвышенностями, Тамбовская равнина имеет вид желоба, по которому на юг легко скатывается холодный арктический воздух. Поэтому заморозки на почве с понижением температуры до -2 , -4°C возможны до середины мая и уже в конце сентября. Также легко проникают в Тамбовскую область и «горячие» сухие ветры с юго-востока, из Нижнего Поволжья. Почвы в области представлены в основном черноземами. На их долю приходится 87% от общей площади сельскохозяйственных угодий. Леса занимают около 10% территории (Большая ..., 1978; Раковская, Давыдов, 2001). На территории Тамбовской области находится Воронинский заповедник (Абрамова, Кузьмина, 2010).

По территории области протекает около 1400 рек, речек и ручьёв. Наиболее значительные реки Цна (бассейн Волги), Ворона, Битюг, Воронеж и Савала (бас-

сейн Дона). Водные ресурсы включают также порядка 900 прудов и водохранилищ с общим объемом воды 534.5 млн. м³ (Гвоздецкий, 1969). Типичная равнинная река **Лесной Воронеж** берет начало у деревни Пушкино Ухоловского района Рязанской области на высоте 152 м над уровнем моря, далее впадает в р. Воронеж, длина которой составляет 520 км. Важнейший водоохраный объект города Ми-чуринска, определяющий качество воды в низовье реки Лесной Воронеж и верховье реки Воронеж – Мичуринские городские очистные сооружения. Очистка сточных вод, содержащих простые и комплексные ионы высокотоксичных тяжелых металлов, точнее недоочистка, создавала определенную экологическую напряженность. Случаи повышенного загрязнения стоков отмечаются периодически и главным образом из-за того, что неэффективно работают локальные очистные сооружения (Вигдорович, Цыганкова, 1996).

Приоритетным направлением развития Тамбовской области является развитие агропромышленного комплекса.

Наши исследования проходили на участке с медленным течением реки Лесной Воронеж ($52^{\circ}38'с.ш.$; $40^{\circ}15'в.д.$), расположенным выше г. Мичуринска (30 км), вдали от населенных пунктов, автомобильных и железных дорог (не менее 10 км). Отловлены медицинские пиявки *H. medicinalis* и хищные *H. sanguisuga*.

Волгоградская область

Волгоградская область расположена на юго-востоке Восточно-Европейской равнины. Делится рекой Волгой на 2 части: западную – правобережную и восточную – Заволжье. Правобережье более возвыщенно, сильно расчленено оврагами и балками. Здесь находятся южная часть Приволжской возвышенности (высота до 358 м – максимальная отметка области), северная часть Ергеней, юго-восточная часть Калачской возвышенности и восточная часть Донской гряды, а также Хопёрско-Бузулукская и Сарпинская низменности. Заволжье – низменная равнина. Между Волгой и ее левым рукавом Ахтубой находится Волго-Ахтубинская пойма, изобилующая ериками, озерами. Климат континентальный, с холодной, малоснежной зимой и продолжительным, жарким, сухим летом. Средняя температура января на

юго-западе -8°C , на северо-востоке -12°C , июля на северо-западе 22°C , на юго-востоке 24°C . Среднегодовая температура составляет $8,8^{\circ}\text{C}$. Осадков на северо-западе 450 мм в год, на юго-востоке 270 мм. Продолжительность вегетационного периода на севере 150 дней, на юге – до 175 дней. По области протекают Волга и Дон с притоками. Густота речной сети и водность рек уменьшаются с северо-запада на юго-восток. Для рек характерны весенне половодье и летняя межень. С созданием Волгоградского и Цимлянского водохранилищ зарегулирован сток Волги и Дона, улучшились судоходные условия этих рек. Вода из водохранилищ используется на орошение и обводнение. В Заволжье – соленые озера Эльтон, Боткуль, Горько-Солёное; широко распространены естественные и искусственные лиманы. Более 83% территории области расположено в степной зоне. Северо-западная часть ее занята черноземами (обыкновенными и южными), в остальной части распространены темно-каштановые, каштановые почвы. Степь преимущественно разнотравно-злаковая. Юго-восток области находится в полупустынной зоне, занятой светло-каштановыми почвами разной степени солонцеватости с пятнами солончаков, лугово-каштановых почв. В растительном покрове сочетаются белая и черная польнь со степными злаками и разнотравьем. По речным долинам развиты пойменно-дерновые почвы с луговой и древесно-кустарниковой растительностью. Леса занимают 4% всей площади (дуб, клён и др.). В области большое внимание уделяется профессиональному лесоразведению (четыре государственные лесополосы, много полезащитных лесополос) (Большая ..., 1978).

Волго-Ахтубинская пойма, на территории которой проводились наши исследования, расположена в бассейне реки Волги на территории Среднеахтубинского, Ленинского и Светлоярского районов Волгоградской области. С одной стороны Волго-Ахтубинскую пойму ограничивает река Волга, с другой – Ахтуба. Пойма тянется полосой шириной в несколько десятков километров. Со всех сторон она окружена степями. Пойма осуществляет важнейшие биосферные функции планетарного масштаба. Водные экосистемы рек Волги, Ахтубы, озер, ериков и других водных объектов включают интразональные водно-болотные экосистемы, пойменные луга, парковые дубравы, галерейные пойменные леса. Состав фауны водных беспо-

звеночных животных насчитывает более чем 1200 видов, относящихся к 19 классам и более чем 60 отрядам. Подавляющая часть фауны – виды, обычные для пресных вод Европейской части России (ООПТ..., 2010).

Основные отрасли промышленности Волгоградской области: машиностроение и металлообработка; топливная (добыча нефти, газа), нефтеперерабатывающая, химическая, нефтехимическая, черная и цветная металлургия.

Пиявки *H. sanguisuga* и *H. verbana* были отловлены в ерике Судомойка ($48^{\circ}35'с.ш.$; $45^{\circ}02'в.д.$), расположенного в северной части Волго-Ахтубинской поймы, на левом берегу реки Волга, в 45 км от г. Волгограда.

Краснодарский край

Краснодарский край находится на юге России, в юго-западной части Северного Кавказа. Территория края омывается водами Азовского на северо-западе и Черного на юго-западе морей. Край делится рекой Кубань на две части: северную – равнинную (2/3 территории), расположенную на Кубано-Приазовской низменности, и южную – предгорную и горную (1/3 территории), расположенную в западной высокогорной части Большого Кавказа (Гвоздецкий, 1969). Главная река Краснодарского края – Кубань, принимающая слева много притоков (Уруп, Лаба, Белая и др.). Основную часть почвенного покрова степной зоны края составляют предкавказские карбонатные и выщелоченные чернозёмы. Общая земельная площадь Краснодарского края составляет 7,5 миллионов гектаров, из них пашни – 3,9 млн. га. Это основной пахотный фонд края, отличающийся высоким плодородием (Горшенев, 1983).

Каневской район, на территории которого мы проводили полевые исследования, расположен в северо-западной части Краснодарского края. Через лиманы имеет выход к Азовскому морю. Западная часть района равнинная и включает плавни и озера, а восточная – слегка всхолмлена, изрезана балками, руслами реки Челбас с ее притоками и другими небольшими речками. Район расположен в зоне умеренно-континентального климата. Безморозный период продолжается 183-195 дней. Самый холодный месяц – январь, самый теплый – июль. Лето жаркое с преобладанием

ясной и сухой погоды. Среднегодовая температура составляет 11,9°С. Сумма осадков за период активной вегетации составляет 270-300 мм. Осадки летнего периода в условиях высоких температур и низкой относительной влажности (62-65%) усиленно испаряются. В центральной части района прослеживается хорошо разработанная долина реки Челбас с пологими и сильнопокатыми склонами. В ней явно выражена широкая заболоченная пойма с многочисленными старицами, озерами, плесами. Река относится к категории типичных равнинных степных рек Кубано-Приазовской низменности. Челбас – самая большая река Каневского района. Длина реки Челбас 288 км, водосборный бассейн имеет площадь 3950 км² (Парахода, 2005). В настоящее время дно рек Каневского района выстлано гумусированными отложениями мощностью от 30-40 см в верховьях и до 150-200 см в низовьях. На дне реки Челбас накоплен слой ила толщиной 5-7 м. На реке Челбас и ее притоках имеется много прудов, частично используемых для орошения, рыболовства и как зоны отдыха. Сильно заросшая камышом, тростником, осокой заиленная река Челбас является ярким примером реки, находящейся в состоянии «старости» и угасания (Власова и др., 2007).

Ведущее место в структуре промышленности Краснодарского края принадлежит перерабатывающим производствам. В экономике России край выделяется как важнейший сельскохозяйственный регион страны.

Для отлова медицинских пиявок *H. verbana* и хищных *H. sanguisuga* нами был выбран участок реки Челбас, расположенный в 10 км восточнее станицы Каневская (46°04'с.ш.; 38°58'в.д.).

Свердловская область

Свердловская область расположена в основном на восточных склонах Среднего и частью Северного Урала и на прилегающих территориях Западно-Сибирской равнины (Зауралье); на юго-западе заходит на западные склоны Среднего Урала. Около $\frac{1}{4}$ площади области занято горными хребтами Урала. На Северном Урале наиболее высокие вершины области – Конжаковский Камень (1569 м), Денежкин Камень (1492 м); Средний Урал сильно сглажен, более возвышены западные пред-

горья (средняя высота 300-500 м); на востоке располагается холмистая меридиональная полоса Зауральского пенеплена (средняя высота 200-300 м). На юго-западе небольшую площадь занимают увалисто-холмистое и слабо всхолмлённое Предуралье (средняя высота 250-300 м), части Уфимского плато и Сылвинского кряжа. До $\frac{1}{3}$ территории Свердловской области на северо-востоке и востоке составляют плоские участки Западно-Сибирской равнины (средняя высота 100-200 м и менее). Свердловская область – одна из самых богатых полезными ископаемыми частей Урала (железные и медные руды, уголь, асбест, тальк, мрамор, золото, платина, драгоценные и поделочные камни). Климат континентальный. Зима холодная, продолжительная. Средняя температура января на равнинах Зауралья от -20°C на севере до -17°C на юго-востоке и -15°C на юге. Лето умеренно теплое; на юго-востоке жаркое. Средняя температура июля 16°C на севере и 1 °C на юго-востоке. Среднегодовая температура составляет 2,3°C. Продолжительность вегетационного периода до 130 суток. Осадков на равнинах Зауралья от 500 на севере до 350-400 мм в год на юго-востоке, больше осадков на юго-западе и в горах (до 500-600 мм и более) (Большая ..., 1978). Большая часть области лежит в лесной зоне; на юго-востоке и местами на юго-западе – лесостепь. В горах (особенно на севере) – высотная поясность. Подзолистые почвы занимают 36,7% площади, подзолисто- и торфяно-болотные и заболоченные почвы – 18,2%, дерново-подзолистые – 14,8%, серые лесные и дерново-луговые – 12,9%, черноземные и лугово-черноземные (на юго-востоке и юго-западе) – 11,3%. Покрыто лесом 61% территории, в том числе хвойным – $\frac{2}{3}$ (Большая ..., 1978). Территория Свердловской области характеризуется устойчивым сезонным промерзанием поверхности земли. Южный контур зоны многолетнемерзлых пород проходит за границей области. Промерзание почвы в зимнее время в среднем составляет 1,1 м, при максимуме 1,9 м (Прокаев, 1976).

На территории области развита густая речная сеть, много озёр и искусственных водоёмов – прудов и водохранилищ. Гидрографическая сеть области представлена реками Обь-Иртышского и Волго-Камского бассейнов. К Обь-Иртышскому бассейну (речная система Тобола – левого притока Иртыша) принадлежит большая часть рек (Тавда, Тура, Исеть). На юге, юго-западе области проте-

кают реки Волго-Камского бассейна, притоки Камы (Чусовая и Косьва) и Белой (Уфа). Главный водораздел между ними на Северном Урале проходит по осевым хребтам Уральских гор, а на юге Среднего Урала, южнее истоков реки Тагил, постепенно смещается в восточные предгорья. Реки Уфа и Чусовая прорезают горную полосу и несут воды на запад. В конце октября – первой половине ноября реки покрываются льдом на 5-6 месяцев до середины – конца апреля. В области насчитывается более 2,5 тысяч озёр с площадью зеркала 1100 км². На реках построено 122 водохранилища с объемом более 1,0 млн. м³ каждое, с общим суммарным объемом воды 2445 млн. м³. Имеется также более 400 прудов с объемом от 50 до 900 тыс. м³. Начало их строительства уходит в XVIII век, когда интенсивно развивалась горнозаводская промышленность. Крупнейшие водохранилища были построены в 1940-1970-х годах: Белоярское, Волчихинское, Рефтинское и др. (Среднеуральская...[Электронный ресурс]).

Свердловская область является основным горнometаллургическим центром России, на территории которого располагается большое количество промышленных городов, заводских поселков. Развитый комплекс горнорудной, химической, металлургической и машиностроительной промышленности оказывает масштабное и интенсивное воздействие на водный бассейн. Большинство водных объектов хронически загрязнены тяжелыми металлами, нефтепродуктами, радионуклидами (Государственный доклад..., 2010).

Между тем на Урале сохранились в достаточном количестве заповедные, охранные, антропогенно ненарушенные экосистемы, на территории которых изучение и сохранение биоразнообразия являются приоритетными задачами.

Водохранилище Белоярское расположено в 60 км к востоку от г. Екатеринбурга. Водоем образован в 1959-1963 гг. путем зарегулирования русла р. Пышмы, в 75 км от ее истока. Протяженность водоема около 20 км, ширина около 3 км. Глубина по фарватеру р. Пышмы достигает 15-20 м, средняя глубина 8-9 м. Зеркало водоема составляет 47 км². В водоем впадают речки Пушкириха, Черемшанка, Черная, Марья, Липовка и др. Берега водоема преимущественно пологие, местами каменистые, в основном заняты лесом, кое-где встречаются кус-

тарниковые болота и пастбищно-луговые угодья. По качеству воды водоем можно отнести к гидрокарбонатно-кальциевому типу со средней степенью минерализации и слабощелочной реакцией среды (Чеботина, Николин, 2003; Трапезников, Трапезникова, 2012).

Белоярское водохранилище находится в начальной стадии формирования, поэтому водные растения чаще можно встретить в заливах, чем в центральной его части. Преобладающий тип донных отложений в водоеме – илистый сапропель, кроме него встречаются затопленная почва, песчано-илистый, илисто-песчаный и песчаный грунты. В 7 км к северу от плотины водоема-охладителя на левом берегу расположена Белоярская атомная станция (БАЭС). Здесь осуществляется частичный сброс слаборадиоактивных жидких стоков в водоем-охладитель. Еще ниже расположен водосбросный (теплый) канал, с помощью которого вода после прохождения через системы охлаждения сбрасывается в водоем. В зоне подогрева температура воды в летний период в среднем на 6-7°C выше, чем за ее пределами. Наличие зоны с повышенной температурой воды и слабощелочная реакция среды создают благоприятные условия для обитания рыб и других гидробионтов. В водоеме наблюдается нормальный кислородный режим – 10,4 мг/л (Чеботина, Николин, 2003; Чеботина и др., 2007).

По последним данным, концентрация радионуклида ^{137}Cs за последние 16 лет уменьшилось в воде в десятки раз, в донных отложениях – в 5-19 раз, в ихтиофауне – в 18-24 раз, одновременно снизилось и валовое содержание грунтовых концентраций ТМ. Это обусловлено тем, что после 1987 г. I и II энергоблоки БАЭС были выведены из эксплуатации, а III блок БН-600 на быстрых нейтронах, работающий с 1980 г., оказывает значительно меньшее воздействие на экосистему Белоярского водохранилища (Трапезников, Трапезникова, 2012).

Для исследований больших ложноконских пиявок *H. sanguisuga* отлавливали на южном берегу Белоярского водохранилища вблизи биофизической станции ($56^{\circ}49' \text{с.ш.}; 61^{\circ}19' \text{в.д.}$).

Алтайский край

Алтайский край расположен на юго-востоке Западной Сибири. Территория края делится на две неравные части – равнинную и горную. Северо-западная часть территории, занимающая $\frac{3}{5}$ всей площади, – юго-восточная окраина Западно-Сибирской равнины. Наиболее крупные ее части – Кулундинская степь и Приобское плато на левобережье Оби, предгорья и склоны Салаирского кряжа – на правобережье. Почти $\frac{9}{10}$ территории Алтайского края орошаются реками бассейна Оби и ее истоков – Бии и Катуни, остальные реки принадлежат бессточному бассейну Кулундинской степи. В равнинной части края все крупные реки транзитные, берут начало в горах Алтая. Гидрографическая сеть равнины редкая; мелкие реки, начинающиеся в пределах равнины, мелководны, с медленным течением. Крупнейшие озера на равнине – Кулундинское, Кучукское и Михайловские, в горах – Телецкое.

В равнинной части климат умеренный, резко континентальный с продолжительной холодной и малоснежной зимой, с жарким и часто засушливым летом. Средняя температура января -19°C , июля $18,9^{\circ}\text{C}$. Среднегодовая температура составляет $2,6^{\circ}\text{C}$. Годовое количество осадков 250-350 мм. Продолжительность безморозного периода 122-127 дней. Климат горной части характеризуется большой неравномерностью, горы получают значительно больше осадков (до 1500-3000 мм/год). В межгорных котловинах и долинах количество осадков составляет 150-200 мм/год. Зональными для равнинной части края являются черноземные почвы; широко развиты главным образом в западной части края засоленные почвы солонцово-солончакового ряда. В горах наибольшие площади занимают различные варианты горно-подзолистых почв, покрывающих склоны хребтов. Только межгорные котловины и долины крупных рек имеют различные почвы чернозёмного типа. Почти $\frac{1}{3}$ территории края покрыта лесом. Равнинную часть занимают зоны степи и лесостепи. Степная растительность почти не сохранилась, большая часть территории распахана. Сохранились сосновые боры и березовые колки; во многих местах – полезащитные лесные полосы. Склоны гор заняты лесами из лиственницы, сибирской пихты и сибирской кедровой сосны. Растительность долин и меж-

горных котловин меняется от полупустынь Юго-Восточного Алтая до красочных луговых степей в районах предгорий. В горах за пределом верхней границы распространения лесов располагается пояс альпийских и субальпийских лугов и высокогорных тундр. В юго-восточной части края расположен Алтайский заповедник (Большая ..., 1978).

В крае присутствуют почти все природные зоны России – степь и лесостепь, тайга и горы. Равнинная часть края характеризуется развитием степной и лесостепной природных зон, с ленточными борами, развитой балочно-овражной сетью, озёрами и колками (Горбатова, 1998). Многообразие зональных и интразональных ландшафтов Алтайского края способствует видовому разнообразию животного мира. В фауне края насчитывается более 320 видов птиц и 90 видов млекопитающих. Здесь произрастает около 2000 видов высших сосудистых растений, что составляет две трети видового разнообразия Западной Сибири. Среди них есть представители эндемических и реликтовых видов. Лесной фонд занимает 26% площади края (Ревякин, Пушкарев, 1989).

Основными загрязнителями водных объектов края являются предприятия химии и нефтехимии, машиностроения, теплоэнергетики. Особую проблему представляет охрана малых рек от обмеления и загрязнения. За счёт сокращения лесистости происходит увеличение водной эрозии, вызывающей обмеление русла. Многочисленные мелкие озёра подвергаются загрязнению хозяйствственно-бытовыми стоками населённых пунктов и животноводческих комплексов. Ряд населённых пунктов края официально признан пострадавшим от воздействия радиации в результате испытания ядерного оружия на полигоне под Семипалатинском. Над территорией края проходят траектории пусков ракет-носителей с космодрома Байконур, а продукты ракетного топлива и части сгоревших в атмосфере ступеней попадают на поверхность (Лысенкова, 2010).

Озеро Дамба, в котором нами были отловлены *H. medicinalis* и *H. sangui-suga*, располагается в Косихинском районе, вблизи села Красилово, в 75 км к югу от г. Барнаула (53°21'с.ш.; 84°38'в.д.). Водоем небольших размеров, неглубокий (максимальная глубина не более 2 м), со стоячей водой, находится на границе су-

ходольного луга и смешанного леса. Озеро располагается на дне оврага, и его берега достаточно высокие практически по всей длине водоема. Эта особенность позволяет предполагать, что в зимнее время не происходит промерзания береговой части, из-за больших снежных заносов. Озеро имеет илистый грунт и густую растительность по берегам, и низкую антропогенную нагрузку – используется местным населением для водопоя скота. В водоеме в большом количестве водятся озерные лягушки. Данные условия оптимально подходят для обитания в озере медицинских пиявок, распространение которых в Сибири крайне редко (Кучина, Антоненко, 2010).

Река Тогул ($53^{\circ}26'с.ш.; 85^{\circ}54'в.д.$) – правый приток р. Уксусная, берет свое начало на осевой части кряжа. Протекает по сильно затаеженной местности. Уровневый режим реки характеризуется не очень быстрым подъемом во время весеннего половодья. Это связано с замедленным таянием снега в тайге. Осенне-летний паводок также выражен не сильно, из-за регулирующего воздействия таежной растительности на поверхностный сток (Открывая Алтай..., 2006).

Медицинские пиявки *H. medicinalis* из оз. Дамба отловлены лично авторами, а особи из реки Тогул были любезно предоставлены администрацией биофабрики «СибМедПиявка».

2.3. Методы исследования

2.3.1. Методика определения основного обмена

В целях получения представлений о закономерностях видовой, популяционной и трофической вариабельности энергетических и морфофизиологических параметров гирудинид, связанных с экологическими особенностями условиями обитания или содержания, проводили анализ основного обмена двух видов медицинских пиявок: лечебной *H. medicinalis* и аптечной *H. verbana* и фонового для них вида – большой ложноконской пиявки *H. sanguisuga*.

В эксперименте использовали: 35 экземпляров аптечных медицинских пиявок *H. verbana*, отловленных в мае-месяце в реке Челбас (Краснодарский край, Каневской район) и 68 особей (30 голодных и 38 сытых) этого вида, выращенных на биофабрике Гирудо-Мед.ЮГ (Краснодарский край, Каневской район); 30 голодных особей лечебных медицинских пиявок *H. medicinalis*, выращенных на биофабрике ГирудИ.Н. (Саратовская область, г. Балаково); 20 особей больших ложноконских пиявок *H. sanguisuga*, отловленных в мае-месяце в реке Челбас (Краснодарский край, Каневской район).

Параметры основного обмена исследовали по потреблению кислорода с помощью газоанализатора МН-5130. Пиявок перед началом эксперимента взвешивали на электронных весах типа KERN 442-432N ($d = 0,1$ г) и по одной помещали в респираторную камеру газоанализатора на 20 минут при температуре воздуха +22°C. Размеры респирационной камеры позволяли проводить эксперимент при нахождении животного в состоянии покоя (рис. 2.3.1).

Расчёт количества кислорода, потребляемого пиявками, проводили по формуле:

$$60 \frac{V \cdot pO_2}{P} \text{ мл/г·час, где,}$$

pO_2 – разница между нормальным содержанием кислорода в воздухе и экспериментально полученной величиной;

P – масса пиявки в граммах;

V – объем газовой смеси, мл;

60 – пересчтный коэффициент на один час.

Потребление кислорода выражали в миллилитрах на грамм массы тела пиявки в течение одного часа.



Рисунок 2.3.1 – Медицинская пиявка *H. verbana* в респираторной камере

2.3.2. Методика определения микрэлементов

Пробоподготовку образцов проводили в соответствии с требованиями МА-ГАТЭ и методическими рекомендациями, утверждёнными МЗ РФ в 1999 году. Пробы донных отложений (ДО) высушивали в сушильном шкафу при температуре 105°C, после чего измельчали в фарфоровой ступке до порошкообразного состояния. Для подготовки образцов тканей, пиявок, доставленных в лабораторию, освобождали от содержимого кишечника, промывали дистиллированной водой, высушивали при комнатной температуре (в полевых условиях) или в сушильном шкафу при температуре 65°C до воздушно-сухой массы.

Валовое содержание тяжелых металлов Cu, Zn, Fe, Mn, Ni, Cd, Pb в донных отложениях и в тканях пиявок исследовали методом атомно-абсорбционной спектрометрии на спектрофотометре AAS-3 (основная погрешность по оптической плотности не превышает $\pm 5\%$ от диапазона измерения) в пламени пропан-бутан и

на приборе Analyst 100 фирмы Perkin Elmer (Хавезов, Цалев, 1983; Никаноров и др., 1985; Майстренко и др. 1996; Другов, Родин, 2009) в сертифицированной лаборатории Федерального государственного бюджетного учреждения «Уральское управление по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды». У медицинских пиявок *H. verbana*, выращенных на биофабрике, при исследовании микроэлементного обмена в тканях, слюнных железах и слюнной жидкости дополнительно определяли концентрации Ca, Mg, Co, Sr.

Пробы донных отложений и кожно-мышечной ткани пиявок готовили способом мокрой минерализации в смеси азотной (HNO_3) и хлорной (HClO_4) кислот (Никаноров и др., 1985). Ткани и донные отложения навеской 1 грамм помещали в колбу Кельдаля. Добавляли 10 мл HNO_3 и через 10-20 мин прибавляли 3 мл HClO_4 , медленно нагревали до завершения реакции, после чего повышали температуру до 200°C. Раствор осторожно выпаривали до объема 2-3 мл, охлаждали. Добавляли 10-15 мл H_2O . Фильтровали полученный раствор через стеклянный крупнопористый фильтр, предварительно промытый кислотой, в мерную колбу на 25-50 мл.

Концентрацию МЭ выражали в мкг/г (сухого вещества и влажной ткани).

В ходе исследований подготовлено 433 биологических образца, 120 проб донных отложений, проведено 4303 элементо-определений.

2.3.3. Методика выделения слюнных желез и отбора секрета слюнных желез медицинских пиявок

Закономерности формирования микроэлементного спектра тканей и его изменчивость в биологической системе организма медицинских пиявок «гомогенаты тканей – слюнные железы – секрет слюнных желез» изучали на примере модельного вида аптечной пиявки *H. verbana*, выращенной на предприятии «Международный центр медицинской пиявки» («МЦМП», Московская область, Раменский район, ст. Удельная). Период голодаания экспериментальных особей составил пять месяцев.

Слюнные железы медицинских пиявок сосредоточены в седьмом, восьмом и девятом сегментах тела (Лукин, 1976). Для выделения слюнных желез использовали 60 особей *H. verbana*, у которых отрезали переднюю часть тела (12 сомитов), включающую головной, предпоясочный и поясочный отделы. Отсеченную часть тела пиявок освобождали от кожно-мышечной ткани и половых желез и промывали дистиллированной водой. Для анализа в химически чистые чашки Петри отбирали паренхиму с сосредоточенными в ней слюнными железами.

Секрет слюнных желез (ССЖ) получали согласно общепринятой методике (Патент..., 1995). На головной конец зафиксированной пиявки клади несколько кристаллов хлористого натрия для стимулции слюноотделения (1-2 минуты). В ротовую полость пиявки вводили силиконированную пипетку, содержащую физиологический раствор и отсасывали секрет этой же пипеткой, многократно повторяя процедуру (рис. 2.3.2).

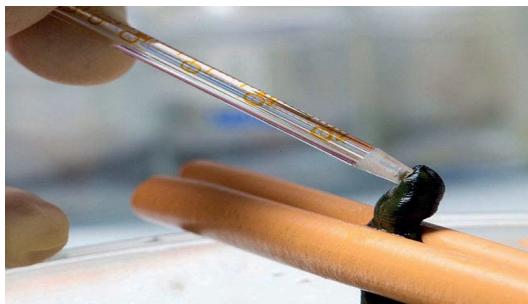


Рисунок 2.3.2 – Отбор секрета слюнных желез у медицинской пиявки

Для исследования микроэлементного состава ССЖ было использовано 100 особей аптечных пиявок *H. verbana*.

2.3.4. Статистические методы обработки результатов

Экспериментальные данные обрабатывали с использованием пакета лицензионных прикладных программ «Statistica 7.0» (StatSoft, Inc., 1984–2001) и «Microsoft Excel».

Данные представлены как среднее арифметическое (\bar{x}), стандартная ошибка (SE), доверительный интервал [95%CI].

При статистической обработке использовали однофакторный дисперсионный, регрессионный и корреляционный анализы; исходные показатели концентраций тяжелых металлов предварительно преобразовывали в логарифмическую форму (lg).

При сравнении исследуемых групп использовали F-критерий Фишера (One-way ANOVA – F-test), последующие межгрупповые сравнения (post-hoc) проведены с помощью теста Тьюки (Tukey HSD).

Зависимость концентраций микроэлементов в тканях пиявок от уровня содержания тяжелых металлов в донных отложениях выявляли при помощи уравнения линейной регрессии и коэффициента детерминации – R^2 . Характер и силу связей между изучаемыми параметрами оценивали посредством коэффициента линейной корреляции Пирсона – r . Корреляционные связи между уровнем содержания МЭ в тканях пиявок и их возрастом, а также продолжительностью голодания оценивали с помощью рангового коэффициента корреляции Спирмена – r_s .

Визуализация полученных результатов проведена методом главных компонент (PCA) в статистической среде R (R 3.1.2, пакеты "Vegan" и "Ade4") (Chessel et al., 2004).

Различия между сравниваемыми выборками считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Глава 3. АККУМУЛЯЦИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ ЧЕЛЮСТНЫМИ ПИЯВКАМИ В ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ ЕСТЕСТВЕННЫХ ЛАНДШАФТОВ

Многочисленные исследования показали, что уровни концентрации биофильных и токсичных металлов в тканях животных зависят от их видовых, трофических и физиологических особенностей, влияющих на процессы поступления, распределения, накопления и выведения тяжелых металлов (ТМ) из организма. Однако определяющими факторами процессов биоаккумуляции у гидробионтов являются климатогеографические и геохимические условия среды обитания, обусловливающие уровень содержания ТМ в абиотических компонентах водных экосистем (Добровольский, 1983; Никаноров и др., 1993; Яковлев, 2002; Моисеенко, 2009; Клишко, 2011; Лукашев, 2011, 2015; Черная и др., 2012, 2019; Богатов и др., 2018).

К настоящему времени в научной литературе практически отсутствуют сведения о микроэлементном составе тканей медицинских пиявок из природных популяций, тем более в географическом аспекте, а закономерности их аккумуляционных особенностей по отношению к ТМ изучены недостаточно полно. Вместе с тем, мероприятия по сохранению МП и восполнению их природных ресурсов должны, несомненно, включать комплексную оценку антропогенной трансформации мест их обитания и, что особенно важно, определение фонового уровня содержания ТМ в организме пиявок в отдельных частях ареалов, отличающихся большим разнообразием геохимических и климатических условий.

В данном разделе обсуждаются видовые, популяционные, географические особенности содержания биофильных (Cu, Zn, Mn, Fe) и условно эссенциальных, токсичных (Ni, Cd, Pb), металлов в тканях медицинских пиявок *H. medicinalis* и *H. verbana*, а также характер и степень аккумуляционных возможностей изучаемых видов к исследуемым ТМ и основные пути поступления МЭ в их организм.

Для оценки трофических особенностей микроэлементного обмена гирудидами нами представлены данные и по микроэлементному составу тканей хищной

пиявки *H. sanguisuga*, отличающейся от кровососущих медицинских пиявок более высокой резистентностью к экстремальным природным и антропогенным факторам среды. Следует отметить, что большая ложноконская пиявка служит одним из маркеров присутствия в водоеме медицинских пиявок, что связано с общностью биологии развития челюстных пиявок.

3.1. Видовая и трофическая специфика микроэлементного спектра тканей медицинских пиявок

Еще до конца прошлого века систематики относили медицинских пиявок, обитающих в Европе, к одному виду – *Hirudo medicinalis* (Linnaeus, 1758), а цветовые формы, приуроченные к определенным климатогеографическим зонам, разделяли на подвиды: лечебная *Hirudo m.medicinalis* и аптечная *Hirudo m.officinalis* (Иогансон, 1935; Herter, 1968; Лукин, 1976; Слока, 1983 и мн. др.).

Однако современные молекулярно-генетические исследования ученых P. Trontelj et al. (2004), P. Trontelj and S. U. Utevsky (2005), M. E. Siddall et al. (2007) убедительно доказали, что указанные подвиды медицинских пиявок являются самостоятельными видами: лечебная или европейская *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758, аптечная или средиземноморская (персидская) *Hirudo verbana* Carena, 1820. Экспериментально показано, что и гаплоидное число хромосом у медицинских пиявок различно: у *H. medicinalis* – 14, у *H. verbana* – 13 (Utevsky et al., 2009; Коваленко и др., 2007).

К настоящему времени в мировой литературе накоплен значительный фактический материал о видоспецифичности медицинских пиявок по ряду физиологических и биохимических параметров. Так, результаты анализа белка и лизоцимной активности секрета слюнных желез медицинских пиявок показали существенные различия между *H. medicinalis* и *H. verbana*, идентично выявленным молекулярным филогенезам (Баскова и др., 2008, 2011).

Установлено, что аптечные и лечебные пиявки отличаются по видовому составу симбиотической микробиоты (Laufer et al., 2008). Результаты исследования репродуктивных особенностей медицинских пиявок позволили предположить, что для них могут быть характерны различные экологические стратегии: *H. medicinalis* – К-стратег, а *H. verbana* – г-стратег (Petrauskiene et al., 2011).

Согласно зоogeографическим данным, ареалы *H. verbana* и *H. medicinalis* пересекаются крайне редко, и к настоящему времени синтопия двух видов медицинских пиявок отмечена только в двух водных объектах Венгрии и Восточной Украины (Nesemann, Neubert, 1999; Kovalenko, Utevsky, 2011). В одном из этих водоемов – в озере Горелое (Змиевский район Харьковской области) нами были отловлены особи обоих видов медицинских пиявок, что предоставило уникальную возможность оценить видовую специфику их микроэлементного статуса.

Спектрофотометрический анализ показал, что уровень содержания изучаемых микроэлементов в тканях *H. medicinalis* изменяется в ряду: Fe > Zn > Mn > Cu > Ni = Pb > Cd. Для *H. verbana* последовательность МЭ была несколько иная: Fe > Zn > Mn > Ni > Pb > Cu > Cd. Анализ последовательностей уровня содержания изучаемых металлов выявил видоспецифичность микроэлементного спектра тканей *H. medicinalis* и *H. verbana* в соотношении концентраций меди, никеля и свинца.

Из полученных рядов видно, что приоритетными биоэлементами для обоих видов пиявок являются железо, цинк и марганец, что вполне ожидаемо, поскольку эти эссенциальные металлы обладают высокой биологической активностью.

Железо входит в состав гемоглобина, протоплазмы всех клеток и в состав цитохромов, участвующих в процессах тканевого дыхания.

Цинк по уровню биологического поглощения сопоставим с такими биогенными металлами, как K, Ca, Mg и др. Он входит в состав ряда металлоферментов и участвует во многих биохимических процессах (Hambridge et al., 1986). Ряд важных метаболических процессов – гормональный метаболизм, стабилизация рибосом и мембранных клеток осуществляется с участием цинка (Биоэлементный статус..., 2011).

Цинк и железо принимают активное участие в репродуктивных процессах, что актуально для исследованных нами медицинских пиявок в период подготовки к размножению (апрель-май).

Марганец участвует в обменных процессах азотного цикла, синтезе жирных кислот, оказывает влияние на рост (Ковальский, 1983; Оберлис и др., 2008).

Меньше всего в тканях обоих видов пиявок содержится кадмий, который считается самым опасным экотоксикантом в группе тяжелых металлов. Наряду с прямыми эффектами, в большей степени опасные свойства Cd связаны с его способностью аккумулироваться в живых организмах, вызывая патологические изменения в органах и тканях гидробионтов (Heath, 2002; Conto Cinier et al., 1997; Satarug et al., 2002).

В то же время, в научной литературе появляются сведения о том, что Cd, наряду с Ni и Pb, является серьезным кандидатом на эссенциальность, разумеется, в микродозах (Оберлис и др., 2008; Биоэлементный статус..., 2011).

По некоторым данным, соединения Cd способны стимулировать рост, играют важную роль в процессе жизнедеятельности животных и человека, например, активирует ряд ферментов, являющихся в норме цинксодержащими энзимами (Kostial, 1986; Биоэлементный статус..., 2011).

При количественной оценке обнаружено, что лечебные и аптечные пиявки статистически значимо отличаются между собой по уровню содержания в их тканях цинка, железа, кадмия и никеля (табл. 3.1.1).

Так, в тканях *H. verbana*, в сравнении с *H. medicinalis*, отмечено превышение концентраций Zn в 1,13 раз, Fe в 1,07 раз, Cd в 1,08 раз, Ni в 1,12 раз ($p < 0.05$).

Между тканевыми концентрациями Cu, Mn и Pb двух видов МП не выявлено значимых различий, хотя у *H. verbana* отмечены тенденции к повышенному содержанию Pb и к пониженным концентрациям биофильной Cu ($p > 0,05$).

Таблица 3.1.1 – Видовая специфика микроэлементного состава тканей симпатричных видов медицинских пиявок (оз. Горелое)

MЭ, мкг/г	<i>H. medicinalis</i> лечебная n = 10	<i>H. verbana</i> аптечная n = 10	p Tukey HSD test
Cu	14,51±0,75 [12,81-16,22]	12,37±0,46 [11,38-13,46]	0,094
Zn	364,09±4,48 [353,96-374,23]	412,69±5,63 [399,95-425,44]	0,000
Mn	20,70±1,11 [18,20-23,20]	20,52±1,22 [17,75-23,29]	0,990
Fe	3799,52±48,90 [3688,90-3910,15]	4055,69±53,94 [3933,66-4177,74]	0,002
Cd	2,73±0,03 [2,67-2,80]	2,94±0,05 [2,82-3,05]	0,002
Pb	13,52±0,41 [12,59-14,43]	14,15±0,31 [13,44-14,86]	0,635
Ni	13,46±0,50 [12,37-14,65]	15,04±0,17 [14,62-15,37]	0,047

Использование анализа главных компонент (PCA) позволило визуализировать видовую специфику биоэлементного спектра тканей медицинских пиявок *H. verbana* и *H. medicinalis*: 40,11% общей дисперсии приходится на первую главную компоненту (PC1), 24,47% – на вторую главную компоненту (PC2) (рис. 3.1.1, табл. 3.1.2).

На рисунке показана четкая дифференциация биоэлементного спектра медицинских пиявок по первой компоненте (PC1). Отмечена существенная пространственная удаленность аптечной пиявки *H. verbana* от лечебной *H. medicinalis*, связанная с повышенным содержанием в ее тканях цинка, железа, кадмия и никеля. Коэффициенты корреляции этих металлов с первой компонентой составили -0,75, -0,76, -0,84 и -0,82, соответственно ($p = 0,000$).

Наибольший вклад в межвидовые различия биоэлементного спектра тканей *H. verbana* и *H. medicinalis* вносят токсичные металлы Cd (25,20%) и Ni (23,80%).

Для эссенциальных металлов Zn и Fe вклад в дисперсию данных, объясненной первой компонентой, составил 20,08% и 20,40%, соответственно (рис. 3.1.1, табл. 3.1.2).

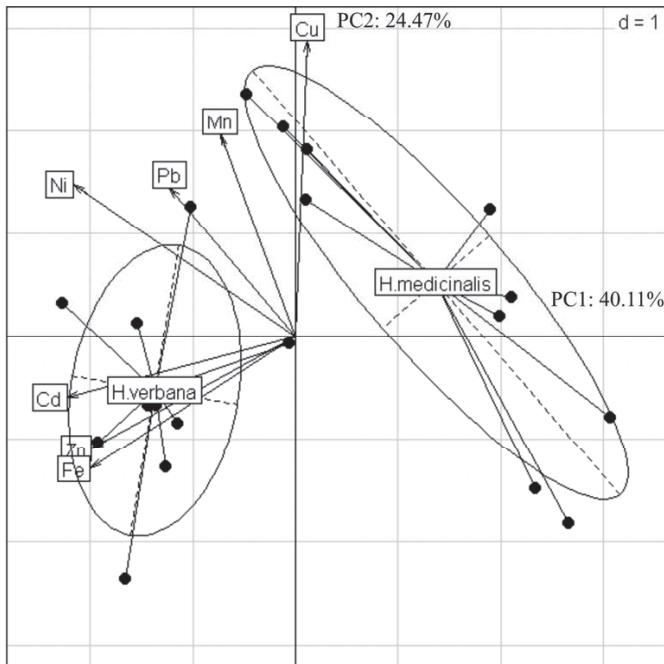


Рисунок 3.1.1 – Содержание эссенциальных и токсичных металлов в тканях медицинских пиявок *H. verbana* и *H. medicinalis* в пространстве главных компонент

Со второй главной компонентой (PC2), для которой не наблюдается значимой дистанции между двумя видами пиявок, статистически значимо коррелируют биофильные элементы Cu (0,85, $p = 0,000$) и Mn (0,58, $p = 0,01$), вклад которых в PC2 составил 42,12% и 19,67%, соответственно (рис. 3.1.1, табл. 3.1.2).

Таблица 3.1.2 – Результаты компонентного анализа микроэлементного спектра тканей двух видов медицинских пиявок

МЭ, lg мкг/г (i = 7)	Нагрузки (loadings, a_{ij})		Вклад в главную компоненту (Contribution = $(a_{ij}^2 * 100) / \lambda_j, \%$)	
	Главные компоненты (Principal Components – PC), j = 1,2			
	1	2	1	2
Cu	0,04	0,85***	0,07	42,12
Zn	-0,75***	-0,32	20,08	6,09
Mn	-0,28	0,58**	2,74	19,67
Fe	-0,76***	-0,38	20,40	8,5
Cd	-0,84***	-0,18	25,20	1,81
Pb	-0,47*	0,43	7,71	10,67
Ni	-0,82***	0,44	23,80	11,14
	Собственные значения (eigenvalues, λ_j) PC		Дисперсия, объясненная PC (%)	
	2,80	1,71	40,11	24,47

Примечание: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$

Таким образом, полученные нами эмпирические данные свидетельствуют о видоспецифичности микроэлементного обмена медицинских пиявок *H. verbana* и *H. medicinalis*, что может быть использовано в качестве дополнительного критерия таксономической самостоятельности этих видов.

Поскольку эссенциальные металлы играют ключевую роль в регуляции основных метаболических процессов, уровень микроэлементного обмена может быть интегральным показателем обмена веществ животных в целом. Авторами ранее был проведен сравнительный анализ основного обмена лечебных и аптечных медицинских пиявок из гирудокультуры, который показал наличие значимых межвидовых различий по потреблению кислорода. Так, в лабораторном эксперименте уровень основного обмена у особей *H. verbana* достигал $0,86 \pm 0,07$ $\text{млO}_2/\text{г}\cdot\text{час}$, что существенно выше этих показателей, обнаруженных у *H. medicinalis*, у которых он составлял $0,64 \pm 0,04$ $\text{млO}_2/\text{г}\cdot\text{час}$ ($p = 0,01$) (Ковальчук и др., 2007). Кроме того, нами были выявлены различия и между аминокислотны-

ми спектрами тканей аптечных и лечебных пиявок, выращенных в едином режиме питания и содержания: у особей *H. verbana* наблюдался более высокий уровень пула незаменимых аминокислот и аминокислот с разветвленной углеродной цепью (Черная и др., 2014).

Обобщая наши данные, полученные в ходе комплексных исследований, можно заключить, что аптечная пиявка *H. verbana* отличается от лечебной *H. medicinalis* более высоким уровнем метаболизма, что связано с ее эколого-физиологическими особенностями, обусловленными в свою очередь приуроченностью этой пиявки к обитанию в южных широтах.

Следующим этапом наших исследований был анализ микроэлементного спектра тканей медицинских пиявок в аспекте их трофических особенностей. Предварительные результаты показали, что большая ложноконская пиявка *H. sanguisuga*, отличается от медицинских пиявок более высоким уровнем обменных процессов: потребление кислорода в опыте у нее достигало $0,99 \pm 0,02$ мл $O_2/g\cdot час$, что кратно выше, чем у *H. verbana* из природных популяций – $0,41 \pm 0,03$ мл $O_2/g\cdot час$ ($p < 0,001$). Интенсивность метаболизма ложноконской пиявки мы связываем с особенностями ее пищевых пристрастий и поведения. Эта пиявка крайне прожорлива, и большую часть времени тратит на поиск жертвы. В ее рацион входит множество групп как водных, так и наземных беспозвоночных, и даже позвоночных (головастики, мальки рыб). Кроме того, пиявка *H. sanguisuga* не гнушиается падалью, являясь при этом санитаром водных и прибрежных экосистем. Сравнительная оценка показала, что хищные пиявки *H. sanguisuga*, в сравнении с совместно обитающими кровососущими медицинскими пиявками, содержат в своих тканях существенно больше Cu, Zn, Mn и Pb, но значительно меньше Fe, Ni и Cd ($p < 0,001$) (рис. 3.1.2).

Из рисунка видно, что содержание эссенциальной Cu ($38,53 \pm 1,97$ мкг/г) в тканях *H. sanguisuga* в 2,7 и в 3,1 раз превышает концентрации этого МЭ у *H. medicinalis* и *H. verbana*, соответственно ($p < 0,01$). Подобное превышение составило: для биогенного Zn ($630,06 \pm 7,81$ мкг/г) – 1,7 и 1,5 раз, для Mn ($47,62 \pm 3,22$ мкг/г) – 2,3 раз, для токсичного Pb ($17,61 \pm 0,91$ мкг/г) – 1,3 и 1,2 раз, соответ-

ственno ($p < 0,01$). Тканевые концентрации биофильного Fe у *H. sanguisuga* ($2639,61 \pm 23,32$ мкг/г), в сравнении с таковыми у *H. medicinalis* и *H. verbana*, понижены в 1,4 и 1,5 раз, соответственно ($p < 0,01$). Аналогичные отношения концентраций токсичных Ni ($11,60 \pm 0,42$ мкг/г) и Cd ($2,23 \pm 0,03$ мкг/г) составили – 1,2 и 1,3 раз, соответственно ($p < 0,05$).

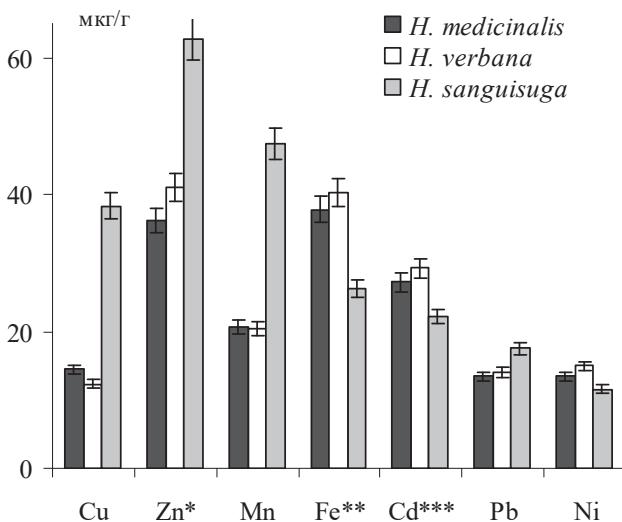


Рисунок 3.1.2 – Трофическая специфика микроэлементного спектра тканей медицинских и большой ложноконской пиявок при совместном обитании (оз. Горелое, Харьковская обл. 1).

Условные обозначения: * – концентрации МЭ уменьшены в 10 и 100 раз, соответственно; ** – увеличены в 10 раз

Таким образом, хищные пиявки отличаются от кровососущих в большей степени по содержанию в их тканях биогенных элементов, участвующих в нормальных физиологических процессах (Cu, Mn, Zn), нежели по концентрациям чужеродных металлов (Pb).

С помощью метода главных компонент представлена визуализация трофической специфики микроэлементного состава тканей медицинских и большой ложноконской пиявок (рис. 3.1.3, табл. 3.1.3).

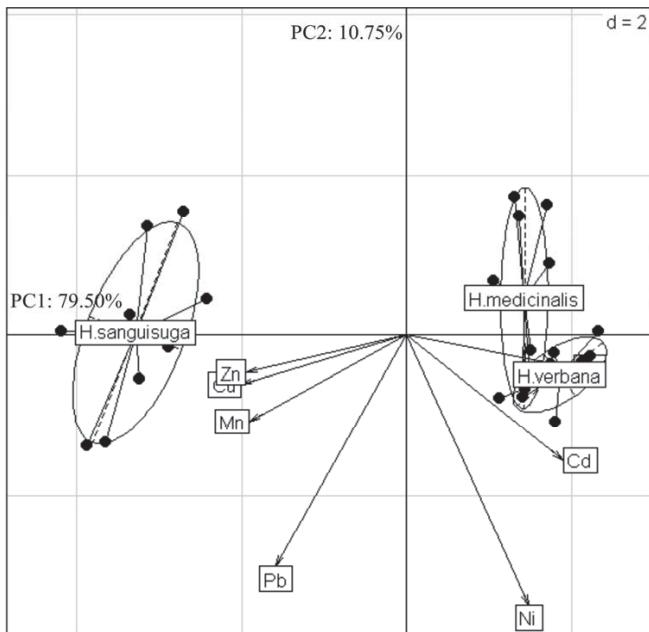


Рисунок 3.1.3 – Содержание микроэлементов в тканях большой ложноконской и медицинских пиявок в пространстве главных компонент

На рисунке показана дифференциация микроэлементного спектра тканей хищных и кровососущих пиявок по первой компоненте (PC1), которая объясняет 79,50% общей дисперсии. Наблюдается существенная пространственная удаленность большой ложноконской пиявки *H. sanguisuga* от *H. verbana* и от *H. medicinalis*, связанная с повышенным содержанием в ее тканях Cu, Zn, Mn, Pb и пониженным – Fe, Cd, Ni.

Таблица 3.1.3 – Результаты компонентного анализа микроэлементного спектра тканей медицинских и большой ложноконской пиявок

МЭ, lg мкг/г (i = 7)	Нагрузки (loadings, a_{ij})		Вклад в главную компоненту (Contribution = $(a_{ij}^2 * 100) / \lambda_j, \%$)	
	Главные компоненты (Principal Components – PC), j = 1,2			
	1	2	1	2
Cu	-0,97***	-0,11	16,89	1,58
Zn	-0,94***	-0,08	15,88	0,90
Mn	-0,92***	-0,19	15,22	4,85
Fe	0,98***	-0,07	17,15	0,68
Cd	0,92***	-0,28	15,10	10,17
Pb	-0,77***	-0,51*	10,54	34,66
Ni	0,72***	-0,60**	9,22	47,15
	Собственные значения (eigenvalues, λ_j) PC		Дисперсия, объясненная PC (%)	
	5,56	0,75	79,50	10,75

Примечание: *– $p < 0,05$, **– $p < 0,01$, ***– $p < 0,001$

Наибольший вклад (16,89%, 15,88%, 15,22%, 17,15% и 15,10%) в трофические различия микроэлементного спектра тканей челюстных пиявок вносят эссенциальные Cu, Zn, Mn, Fe и токсичный Cd, для которых выявлена очень сильная корреляция (-0,97, -0,94, -0,92, 0,98 и 0,92, соответственно) с первой главной компонентой ($p = 0,000$) (рис. 3.1.3, табл. 3.1.3). Со второй компонентой (PC2) статистически значимо коррелируют экотоксиканты Pb и Ni (-0,51 и -0,60), их вклад в общую дисперсию составляет 34,66% и 47,15%, соответственно.

Анализ видовых и трофических особенностей микроэлементного обмена кровососущих и хищных гирудинид показал существенные различия по уровню содержания в их тканях всех изученных металлов. Причем особи *H. sanguisuga*, в отличие от *H. medicinalis* и *H. verbana*, характеризуются более высокой аккумуляционной способностью по отношению к большинству исследуемых эссенциальных металлов, что согласуется с нашими данными об ее высоком уровне основного обмена. Более высокая аккумуляция токсичных металлов Cd и Ni, наблюдаемая

у медицинских пиявок, может быть обусловлена пониженными концентрациями в их тканях микроэлементов Cu, Zn, Mn, в силу антагонистических отношений этих элементов. Известно, что связывание, распределение и выведение металлов-ксенобиотиков в организме зависит, прежде всего, от обеспеченности его эссенциальными микроэлементами и состоянием их обмена (Ковалчук, 2008; Моисеенко, 2009; Kovalchuk et al., 2017). Предполагаем, что, более высокая резистентность большой ложноконской пиявки (в сравнении с медицинскими пиявками) к антропогенному загрязнению водной среды, отмеченная в ряде исследований (Лукин, 1976; Флеров, 1989; Черная, Ковалчук, 2014) обусловлена, наряду с прочими факторами, и высокой обеспеченностью ее организма эссенциальными металлами.

3.2. Географическая вариабельность содержания тяжелых металлов в тканях пиявок и в донных отложениях из мест их обитания

Медицинские пиявки – эндемики Палеарктики, обитают преимущественно в водоемах ее европейской части. Широтная протяженность их ареалов отличается большим разнообразием микроклиматических условий, зависящих как от формы рельефа и характера водоема, так и от повышенной континентальности климата. Изменения климатических условий в направлении понижения среднегодовых температур является основным лимитирующим фактором распространения и численности особей *H. medicinalis* и *H. verbana*. Для медицинских пиявок, имеющих южное происхождение, весьма опасно промерзание грунта, и высокие требования к температуре играют определяющую роль для их размножения и выживания (Лукин, 1976). Предполагается, что многие водоемы непригодны для них в качестве среды обитания именно из-за низкой температуры воды (Elliott, Tullett, 1984).

Для оценки влияния климатогеографического фактора на формирование биоэлементного спектра тканей гирудинид использованы взрослые особи пиявок и пробы донных отложений из водных объектов различных регионов России и Украины, отличающихся между собой широтной зональностью и среднегодовыми

температурами: река Лесной Воронеж (Тамбовская область, лесостепная зона, среднегодовая температура +6,1°C), озеро Горелое и река Уды (Харьковская обл., лесостепь, +8,1°C), озеро Глубокое (Луганский Национальный заповедник, Луганская обл., лесостепь, +8,5°C), ерик Судомойка (Волгоградская обл., степь, +8,8°C), река Челбас (Краснодарский край, степь, +11,9°C), озеро Дамба и река Тогул (Алтайский край, южная тайга, +2,6°C).

Исследуемые водные объекты были приняты как фоновые, поскольку они располагаются на значительном удалении от крупных населенных пунктов и не подвергаются прямому воздействию поллютантов. Вместе с тем, уровень антропогенной трансформации ландшафтов и геохимическая ситуация выбранных нами регионов неравнозначны, что связано, как с историческим развитием промышленности и сельского хозяйства на их территориях, так и особенностями формы рельефа и континентальности климата.

Необходимо отметить, что регионы Тамбовская область и Алтайский край, в силу климатических особенностей, ограничивают ареал лечебной пиявки *H. medicinalis* на севере и востоке, соответственно. А через Харьковскую область проходит северная граница ареала более теплолюбивой аптечной пиявки *H. verbana*.

Содержание тяжелых металлов в донных отложениях из мест обитания медицинских пиявок различных регионов России и Украины

Для медицинских пиявок донные отложения (ДО) представляют собой основную среду обитания, являются важнейшей составляющей биоценоза, химический состав которой определяет степень аккумуляции тяжелых ТМ и во многом регулирует микроэлементный обмен. Обладая не только высокой аккумулирующей способностью по отношению к ТМ, но и свойством «памяти», ДО отражают экологическое состояние биотопа за достаточно продолжительный период времени (Stumm, Morgan, 1996; Степанова и др., 2007).

В настоящее время в Российской Федерации не определены нормативы содержания ТМ в ДО, в силу отсутствия универсальных методов, позволяющих устанавливать критерии качества последних, которые могли бы войти в единую сис-

тему нормативов для включения их в стратегию охраны водных и биологических ресурсов в региональном масштабе. На сегодня наиболее распространенный подход заключается в сравнении полученных валовых концентраций ТМ со значением величин кларка литосферы, региональными фоновыми концентрациями или ранее полученными натуральными данными.

Результаты наших исследований показали, что, за исключением Cd, концентрации всех изучаемых ТМ в донных отложениях рассматриваемых водоемов значительно ниже их кларков по Виноградову (1962) и соответствуют показателям, указанным для фоновых водоемов европейской части бывшего СССР (Никаноров и др., 1993) (табл. 3.2.1, 3.2.2).

Таблица 3.2.1 – Концентрации тяжелых металлов (мкг/г сухого вещества) в донных отложениях фоновых водных объектов и их кларк в литосфере

Cu	Zn	Mn	Fe	Cd	Pb	Ni
Фоновые водные объекты (Никаноров и др., 1993)						
4-50	8-60	70-400	11000-18000	0,1-1,2	5-18	0,9-15
Кларк земной коры (Виноградов, 1962)						
47	83	1000	46500	0,13	16	58

Отмечено незначительное превышение фоновой концентрации Cd в ДО Луганской и Волгоградской области, Краснодарского края, что согласуется с литературными данными о высоком уровне накопления Cd за последние десятилетия в абиотических и биотических компонентах водных экосистем не только на импактных, но и на фоновых территориях. Последнее обусловлено глобальным характером техногенного загрязнения окружающей среды (Степанова и др., 2007; Моисеенко, 2009; Kovalchuk et al., 2017; Решетняк и др., 2017).

Концентрации ТМ в ДО исследуемых водных объектов, независимо от географического положения, располагаются в единой последовательности: Fe > Mn > Zn > Ni > Pb \geq Cu > Cd.

В то же время исследованные водоемы характеризуются значительной вариабельностью концентрации ТМ, что обусловлено разнообразием природных ус-

ловий и степенью антропогенной трансформации ландшафтов в изучаемых регионах (табл. 3.2.2).

Таблица 3.2.2 – Валовое содержание тяжелых металлов (мкг/г сухого вещества) в донных отложениях из водных экосистем различных регионов России и Украины

Cu	Zn	Mn	Fe	Cd	Pb	Ni
<i>1. р. Лесной Воронеж, Тамбовская область (n = 10)</i>						
4,6±0,03 [4,6-4,7]	30,7±0,42 ^{2,3,4} [29,8-31,7]	68,5±1,25 ^{2,5} [65,3-71,0]	1418,4±17,08 [1406,2-1430,6]	0,9±0,03 [0,9-1,0]	5,9±0,04 ² [5,8-6,0]	7,6±0,07 [7,5-7,8]
<i>2. оз. Горелое, Харьковская область 1 (n = 10)</i>						
5,1±0,08 ⁶ [4,9-5,2]	32,7±2,02 ^{1,3} [29,7-35,8]	69,6±2,43 ^{1,5} [64,1-75,1]	9169,4±34,1 [9092,3-9246,6]	1,1±0,02 [1,0-1,1]	6,3±0,22 ^{1,6} [5,9-6,6]	10,5±0,69 ⁶ [9,5-11,6]
<i>3. р. Уды, Харьковская область 2 (n = 10)</i>						
8,1±0,13 [7,8-8,4]	28,5±2,52 ^{1,2} [22,8-34,2]	80,8±3,11 ⁵ [73,8-87,9]	12187,2±94,16 [11974,2-12400,2]	1,3±0,02 ⁷ [1,2-1,3]	8,5±0,06 [8,3-8,6]	12,5±0,08 ⁴ [12,3-12,7]
<i>4. оз. Глубокое, Луганская область (n = 10)</i>						
6,2±0,14 [5,9-6,4]	37,8±2,97 ^{1,2,5} [33,3-42,3]	38,3±3,35 [33,0-43,2]	11680,1±71,49 [11518,4-11841,8]	1,7±0,03 ⁵ [1,6-1,7]	6,9±0,02 ^{5,6} [6,9-7,0]	14,4±0,75 ^{3,5} [13,3-15,5]
<i>5. ерик Судомойка, Волгоградская область (n = 10)</i>						
7,1±0,05 [6,9-7,2]	43,1±2,43 ⁴ [37,6-48,5]	74,1±2,76 ^{1,2,3} [67,9-80,3]	5881,0±70,68 [5721,2-6040,9]	1,7±0,02 ⁴ [1,7-1,8]	7,2±0,04 ⁴ [7,1-7,3]	15,6±1,19 ⁴ [12,9-18,3]
<i>6. р. Челбас, Краснодарский край (n = 10)</i>						
5,1±0,03 ² [5,1-5,2]	23,1±0,08 [22,9-23,3]	181,9±3,25 [174,6-189,3]	4751,4±17,93 [4710,8-4791,9]	1,5±0,02 [1,4-1,5]	6,5±0,10 ^{2,4} [6,3-6,7]	9,5±0,24 ² [9,1-9,8]
<i>7. оз. Дамба, Алтайский край I (n = 10)</i>						
15,5±0,20 [15,0-15,9]	76,8±1,15 [74,3-79,4]	281,4±2,98 [274,7-288,1]	17245,8±62,07 [17105,4-17386,2]	1,2±0,01 ³ [1,2-1,3]	15,5±0,46 [14,4-16,5]	22,5±0,75 [20,8-24,2]
$F_{6,63}(p)$, One-way ANOVA						
1368,5 (0,000)	63,5 (0,004)	386,9 (0,000)	1629,6 (0,000)	275,2 (0,000)	420,7 (0,000)	79,9 (0,000)

Примечание: надстрочными цифрами обозначены номера регионов, между которыми отсутствуют статистически значимые различия (Tukey HSD test, $p > 0,05$)

Наибольшая географическая изменчивость грунтовых концентраций выявлена для Fe и Cu ($p = 0,000$), наименьшая – для Zn ($p = 0,004$).

Отмечено, что в озере Дамба (Алтайский край) концентрации практически всех изучаемых ТМ в ДО, за исключением Cd, существенно выше, чем в изучаемых нами водоемах европейских регионов ($p = 0,001$).

Согласно литературным данным, в юго-западной части Алтайского края, где проводились наши исследования, имеются многочисленныерудопроявления и ореолы рассеяния полиметаллов, разрабатывается ряд месторождений, отмечается повышенное содержание Cu, Zn, Pb и Cd в объектах окружающей среды (Рождественская, 2003).

Кроме того, загрязняющие вещества поступают в регион посредством трансграничного переноса от индустриальных центров сопредельных территорий Казахстана и Кузбасса (Ковалев и др., 1993).

В изученных нами водоемах Украины и европейской части России также можно выделить случаи повышения концентрации ТМ, связанные с геохимическими особенностями и промышленной спецификой регионов (Лукашев, 2015; Еськов и др., 2015; Ёркина, 2016).

Так, высокое содержание Fe наблюдается в ДО водных экосистем Украины, Mn – в Краснодарском крае, Ni и Cd – в Волгоградской и Луганской областях.

С помощью метода главных компонент представлена визуализация географической специфики элементного спектра донных отложений из мест обитания медицинских пиявок: 62,12% общей дисперсии приходится на первую главную компоненту (PC1), 19,13% – на вторую главную компоненту (PC2) (рис. 3.2.1, табл. 3.2.3).

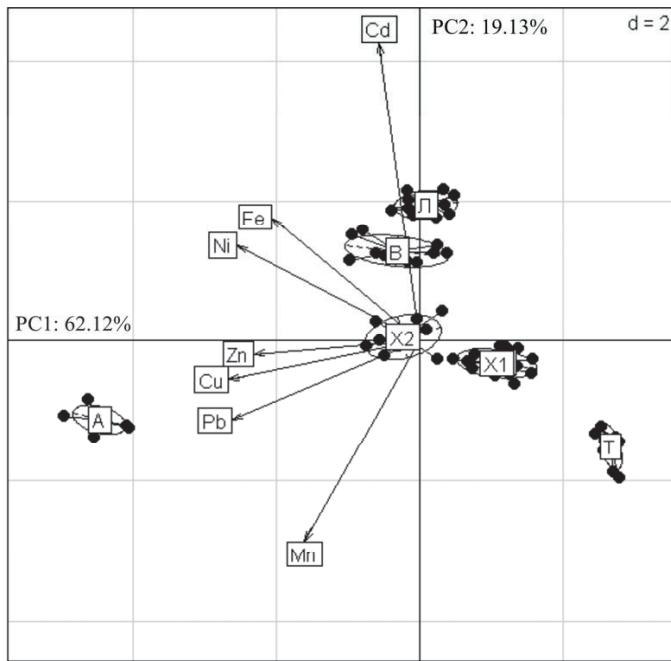


Рисунок 3.2.1 – Содержание тяжелых металлов в донных отложениях из водных экосистем различных регионов в пространстве главных компонент.
Условные обозначения: Т – Тамбовская область, Х1, Х2 – Харьковская область,
Л – Луганская область, В – Волгоградская область, К – Краснодарский край,
А – Алтайский край;

Как видно из рисунка, все экспериментальные наблюдения оформились в шесть групп, при этом отмечена существенная пространственная дифференциация донных отложений из водных экосистем, расположенных на восточной и северной границах ареала медицинских пиявок (Алтайский край и Тамбовская область), для которых характерны максимальные (исключая Cd) и минимальные концентрации исследуемых ТМ, соответственно.

Следует особо отметить пространственное объединение в общую группу донных отложений из озера Горелое (Харьковская обл. 1) и реки Челбас (Крас-

нодарский край), в которых не было выявлено различий по уровню содержания Cu, Pb, Ni (табл. 3.2.2) ($p > 0,05$).

На фоне высокой корреляции ($p = 0,000$) наибольший вклад в первую главную компоненту (PC1) вносят Cu, Pb, Ni (21,58%, 20,78%, 19,65%, соответственно), во вторую компоненту (PC2) – Mn и Cd (24,86 и 55,12%, соответственно) (табл. 3.2.3).

Таблица 3.2.3 – Результаты компонентного анализа
микроэлементного спектра донных отложений

МЭ, lg мкг/г ($i = 7$)	Нагрузки (loadings, a_{ij})		Вклад в главную компоненту (Contribution = $(a^2_{ij} * 100) / \lambda_j$, %)	
	Главные компоненты (Principal Components – PC), $j = 1, 2$			
	1	2	1	2
Cu	-0,97***	-0,11	21,58	0,95
Zn	-0,84***	-0,04	16,22	0,11
Mn	-0,58**	-0,58**	7,58	24,86
Fe	-0,75***	0,36*	12,96	9,47
Cd	-0,20	0,86***	0,96	55,12
Pb	-0,95***	-0,23	20,78	3,88
Ni	-0,92***	0,27*	19,65	5,61
	Собственные значения (eigenvalues, λ_j) PC		Дисперсия, объясненная PC (%)	
	4,35	1,34	62,12	19,13

Примечание: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$

В целом следует отметить, что анализ главных компонент подтверждает результаты, приведенные выше, и позволяет адекватно оценить массив статистических данных, приведенных в таблице 3.2.2.

*Географическая вариабельность микроэлементного состава тканей
медицинских и большой ложноконской пиявок*

Показано, что географический фактор оказывает существенное влияние на микроэлементный обмен медицинских пиявок. В тканях *H. medicinalis* установлено изменение содержания Cu, Zn, Mn, Fe, Cd, Pb, Ni в широком диапазоне (табл. 3.2.4).

Таблица 3.2.4 – Валовое содержание тяжелых металлов (мкг/г сухого вещества)
в тканях *H. medicinalis* из водных экосистем различных регионов

Cu	Zn	Mn	Fe	Cd	Pb	Ni
<i>I. р. Лесной Воронеж, Тамбовская область (n = 10)</i>						
2,2±0,09 [1,9-2,4]	272,9±10,27 [249,7-296,1]	4,1±0,07 [3,9-4,3]	1037,3±22,99 [985,3-1089,4]	0,12±0,01 [0,10-0,14]	0,92±0,04 [0,83-1,01]	0,98±0,05 [0,85-1,10]
<i>2. оз. Горелое, Харьковская область I (n = 10)</i>						
14,5±0,75 [12,8-16,2]	364,1±4,48 ⁴ [353,9-374,2]	20,7±1,11 ³ [18,2-23,2]	3799,5±48,90 [3688,9-3910,2]	2,7±0,03 [2,7-2,8]	13,5±0,41 ⁵ [12,6-14,4]	13,5±0,50 ⁶ [12,4-14,7]
<i>3. р. Уды, Харьковская область 2 (n = 10)</i>						
22,5±1,38 [19,4-25,6]	426,3±5,09 [414,8-437,9]	22,6±1,41 ² [19,4-25,8]	2367,7±49,69 [2255,3-2480,1]	4,2±0,03 ⁵ [4,1-4,2]	22,5±1,22 ⁴ [19,8-25,3]	16,6±0,41 ⁵ [15,6-17,5]
<i>4. оз. Глубокое, Луганская область (n = 10)</i>						
27,2±0,58 [25,9-28,5]	344,1±13,5 ² [313,5-374,6]	24,5±0,92 ³ [22,4-26,6]	4385,0±46,18 [4280,5-4489,4]	13,2±0,95 [11,0-15,3]	23,6±0,48 ³ [22,5-24,7]	42,4±1,69 [38,6-46,2]
<i>5. оз. Дамба, Алтайский край I (n = 10)</i>						
10,4±0,23 ⁶ [9,9-10,9]	669,6±4,56 [659,3-679,9]	5,8±0,21 ⁶ [5,4-6,3]	1427,7±13,94 [1396,2-1459,2]	3,9±0,05 ³ [3,8-4,1]	13,9±0,24 ² [13,3-14,4]	16,4±0,23 ³ [15,9-16,9]
<i>6. р. Тогул, Алтайский край 2 (n = 10)</i>						
11,5±0,23 ⁵ [10,9-12,0]	584,1±5,96 [570,7-597,6]	5,3±0,22 ⁵ [4,8-5,8]	1708,5±8,65 [1688,9-1728,07]	4,3±0,06 ³ [4,2-4,5]	18,6±0,30 [17,9-19,3]	13,8±0,18 ² [13,4-14,2]
$F_{5,54}(p)$, One-way ANOVA						
437,5 (0,000)	198,6 (0,000)	329,5 (0,000)	1417,7 (0,000)	847,4 (0,000)	1133,1 (0,000)	1463,8 0,000

Примечание: надстрочными цифрами обозначены номера регионов, между которыми отсутствуют статистически значимые различия (Tukey HSD test, $p > 0,05$)

Наибольшая географическая вариабельность концентраций характерна для Fe, Ni и Pb, наименьшая – для Zn ($p = 0,000$). Минимальное содержание всех ТМ выявлено в тканях особей *H. medicinalis* из реки Лесной Воронеж, протекающей по аграрной территории Тамбовской области, на северной окраине ареала ($p = 0,000$).

Ткани особей алтайских популяций характеризуются высокими содержаниями цинка ($p = 0,000$), а максимальное содержание Cu, Fe, Cd, Ni отмечено в тканях пиявок, обитающих на территории промышленного Донбасса (оз. Глубокое, Луганская обл.) ($p < 0,01$).

Для Mn и Pb характерны значимо высокие (относительно особей других популяций) концентрации в тканях пиявок из водоемов восточной части Украины (оз. Глубокое и р. Уды) ($p < 0,001$), что согласуется с литературными данными о существенном превышении фоновых показателей ТМ в тканях гидробионтов в этих регионах (Лукашев, 2015).

Следует особо подчеркнуть, что озеро Глубокое расположено в природоохранной зоне Луганского Национального заповедника, где отсутствуют источники прямого поступления поллютантов в водную среду, и выявленный нами повышенный уровень ТМ в абиотической и биотической компонентах обусловлен атмосферным переносом.

Использование анализа главных компонент (PCA) позволило визуализировать географические различия элементного спектра тканей МП *H. medicinalis* (рис. 3.2.2, табл. 3.2.5).

Как видно из рисунка, 73,12% общей дисперсии приходится на первую главную компоненту (PC1), 21,74% – на вторую главную компоненту (PC2).

Все экспериментальные наблюдения оформились в пять региональных групп пиявок, при этом отмечена существенная пространственная дифференциация географических популяций, обитающих на восточной и северной границах ареала (Алтайский край и Тамбовская область), для которых характер-

ны пониженное содержание Cu, Fe, Mn, Cd, Pb, Ni в тканях, а также высокие концентрации цинка у алтайских особей *H. medicinalis*.

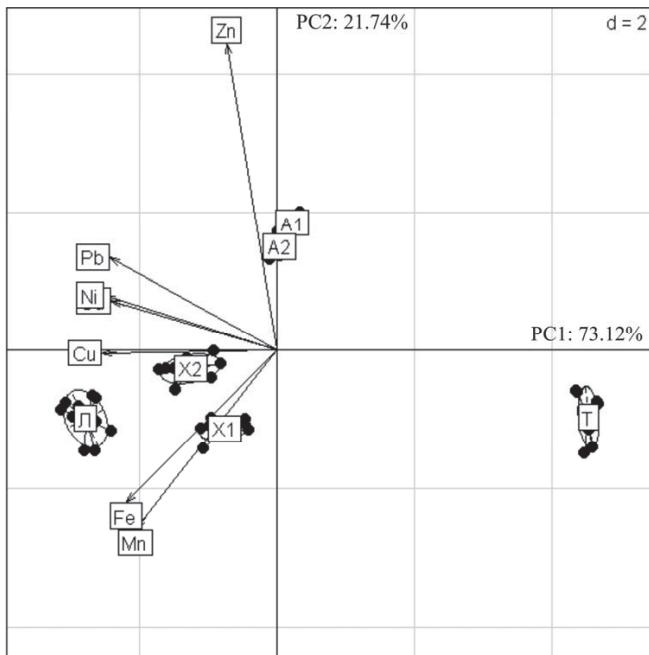


Рисунок 3.2.2 – Содержание тяжелых металлов в тканях МП *H. medicinalis* в пространстве главных компонент.

Условные обозначения: Т – Тамбовская область, X1, X2 – Харьковская область, Л – Луганская область, А1, А2 – Алтайский край;

Наибольший вклад в географическую изменчивость МЭ по PC1 вносят Cu (19,02%) и Ni (18,51%), по PC2 – Zn (57,72%), а их коэффициенты корреляции с главными компонентами составляют -0,99, -0,97 и 0,94, соответственно ($p = 0,000$).

Таблица 3.2.5 – Результаты компонентного анализа микроэлементов тканей медицинской пиявки *H. medicinalis*

МЭ, lg мкг/г (i = 7)	Нагрузки (loadings, a_{ij})		Вклад в главную компоненту (Contribution = $(a_{ij}^2 * 100) / \lambda_j, \%$)	
	Главные компоненты (Principal Components – PC), j = 1,2			
	1	2	1	2
Cu	-0,99**	-0,01	19,02	0,00
Zn	-0,28*	0,94**	1,56	57,72
Mn	-0,79**	-0,54**	12,33	19,50
Fe	-0,85**	-0,46**	14,08	14,17
Cd	-0,94**	0,15	17,16	1,48
Pb	-0,94**	0,28*	17,33	5,27
Ni	-0,97**	0,17	18,51	1,86
	Собственные значения (eigenvalues, λ_i) PC		Дисперсия, объясненная PC (%)	
	5,12	1,52	73,12	21,74

Примечание: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,001$

При сравнительном анализе микроэлементного состава тканей другого вида медицинских пиявок *H. verbana* также были выявлены существенные популяционные различия (табл. 3.2.6).

Наибольшая географическая вариабельность тканевых концентраций характерна, как и у лечебных пиявок *H. medicinalis*, для Fe и Ni, а также для Mn и Cd ($p = 0,000$), наименьшая – для Zn ($p = 0,01$).

Максимальные концентрации токсичных металлов Cd и Ni ($p = 0,000$), и минимальные – эссенциальных Zn, Mn, Fe ($p < 0,01$) обнаружены в тканях пиявок из водоема индустриально развитого региона (ер. Судомойка, Волгоградская обл.). Обратная картина характерна для особей *H. verbana*, обитающих также на промышленной территории, но на северной границе ареала (оз. Горелое, Харь-

ковская обл. 1): максимальные тканевые концентрации Mn, Fe ($p < 0,01$) и минимальные – Cd, Pb ($p = 0,000$) (табл. 3.2.6).

Таблица 3.2.6 – Валовое содержание тяжелых металлов (мкг/г сухого вещества) в тканях *H. verbana* из водных экосистем различных регионов

Cu	Zn	Mn	Fe	Cd	Pb	Ni
<i>1. оз. Горелое. Харьковская область I (n = 10)</i>						
12,4±0,46 ^{2,3} [11,4-13,5]	412,7±5,63 ³ [399,9-425,4]	20,5±1,22 [17,8-23,3]	4055,7±53,94 [3933,7-4177,7]	2,9±0,05 [2,8-3,1]	14,2±0,31 [13,4-14,9]	15,0±0,17 [14,6-15,4]
<i>2. ерик Судомойка. Волгоградская область (n = 10)</i>						
13,5±0,51 ¹ [12,3-14,6]	309,6±25,48 ³ [251,9-367,2]	9,3±0,12 [9,0-9,5]	3085,5±41,91 [2990,7-3180,3]	6,8±0,05 [6,7-6,9]	17,4±0,48 ³ [16,3-18,5]	20,7±1,13 [18,1-23,2]
<i>3. р. Челбас. Краснодарский край (n = 10)</i>						
11,1±0,45 ¹ [10,1-12,1]	371,5±25,61 ^{1,2} [313,5-429,4]	12,0±0,25 [11,4-12,6]	3435,3±14,37 [3402,8-3467,8]	4,7±0,23 [4,2-5,2]	16,8±0,61 ² [15,5-18,2]	9,2±0,25 [8,6-9,8]
$F_{2,27}(p)$, One-way ANOVA						
6,2 (0,006)	5,4 (0,01)	108,9 (0,000)	148,7 (0,000)	176,4 (0,000)	13,6 (0,001)	120,3 (0,000)

Примечание: надстрочными цифрами обозначены номера регионов, между которыми отсутствуют статистически значимые различия (Tukey HSD test, $p > 0,05$)

Методом главных компонент установлена, как и для *H. medicinalis*, четкая дифференциация трех географических популяций *H. verbana* по уровню содержания ТМ в тканях (рис. 3.2.3, табл. 3.2.7).

На первую главную компоненту (PC1) приходится 54,53% общей дисперсии, на вторую главную компоненту (PC2) – 20,12%.

На рисунке отражено повышенное содержание эссенциальных металлов Fe, Mn, Zn и пониженное – экотоксикантов Cd и Pb в тканях особей *H. verbana*, обитающих в неблагоприятных климатических условиях северной границы ареала (Харьковская область).

И отмечена обратная тенденция для пиявок из индустриального региона (Волгоградская область).

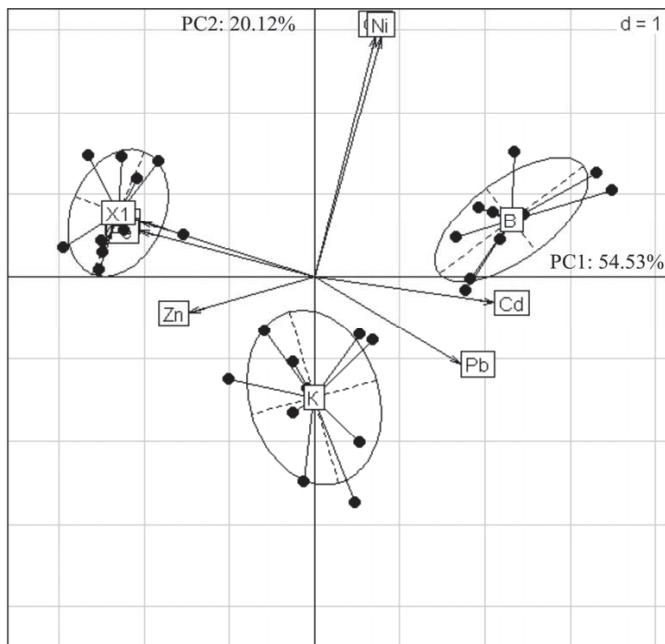


Рисунок 3.2.3 – Содержание тяжелых металлов в тканях МП *H. verbana* в пространстве главных компонент. Условные обозначения: X1 – Харьковская область, В – Волгоградская область, К – Краснодарский край

Наибольший вклад в географические различия по первой компоненте вносят Cd (23,36%), Fe (22,23%) и Mn (21,87%), их коэффициенты корреляции с PC1 составили 0,94, -0,92 и -0,91, соответственно ($p = 0,000$). С PC2 сильно коррелируют Cu (0,79) и Ni (0,79) ($p = 0,000$), пониженные концентрации которых выявлены у МП из Краснодарского края; их вклад в вариабельность ТМ составил 44,50% и 44,18%, соответственно (табл. 3.2.7).

Таблица 3.2.7 – Результаты компонентного анализа микроэлементов в тканях медицинской пиявки *H. verbana*

МЭ, lg мкг/г (i = 7)	Нагрузки (loadings, a_{ij})		Вклад в главную компоненту (Contribution = $(a_{ij}^2 * 100) / \lambda_j, \%$)	
	Главные компоненты (Principal Components – PC), j = 1,2			
	1	2	1	2
Cu	0,32	0,79**	2,63	44,50
Zn	-0,66*	-0,12	11,32	1,01
Mn	-0,91**	0,18	21,87	2,33
Fe	-0,92**	0,15	22,23	1,60
Cd	0,94**	-0,08	23,36	0,52
Pb	0,77**	-0,29	15,40	5,86
Ni	0,35	0,79**	3,20	44,18
	Собственные значения (eigenvalues, λ_j) PC		Дисперсия, объясненная PC (%)	
	54,53	20,12	3,82	1,41

Примечание: * – $p < 0,01$, ** – $p < 0,001$

В литературе приводятся данные о содержании ТМ в тканях большой ложноконской пиявки *Haemopis sanguisuga* (Никаноров и др., 1993; Романова, Климина, 2009), однако в географическом аспекте данный вопрос освещен недостаточно.

Спектрофотометрический анализ показал, что уровень содержания всех изучаемых МЭ в тканях хищной пиявки *H. sanguisuga* существенно зависит от экологических условий мест обитания ($p < 0,01$) (табл. 3.2.8).

Наибольшей географической изменчивости подвержены тканевые концентрации Fe, Cd, Ni ($p = 0,000$). Наименьшие различия характерны для концентраций Cu и Mn ($p < 0,01$) (табл. 3.2.8).

Показано, что в тканях *H. sanguisuga* из тамбовской популяции, как и в случае с медицинской пиявкой *H. medicinalis*, содержатся минимальные количества всех исследуемых МЭ ($p < 0,001$).

Таблица 3.2.8 – Валовое содержание тяжелых металлов (мкг/г сухого вещества) в тканях *H. sanguisuga* различных регионов России и Украины

Cu	Zn	Mn	Fe	Cd	Pb	Ni
<i>1. р. Лесной Воронеж, Тамбовская область (n = 10)</i>						
19,6±1,22 [16,83-22,36]	531,0±4,78 [520,2-541,8]	27,8±1,69 ⁴ [24,0-31,6]	631,4±11,03 [606,5-656,4]	1,4±0,02 [1,4-1,5]	10,5±0,44 [9,5-11,5]	4,7±0,05 [4,6-4,9]
<i>2. оз. Горелое, Харьковская область I (n = 10)</i>						
38,5±1,97 ^{4,6} [34,1-43,0]	630,1±7,81 ⁴ [612,4-647,7]	47,6±3,22 ^{5,6} [40,3-54,9]	2639,6±23,32 [2586,9-2692,4]	2,2±0,03 [2,2-2,3]	17,6±0,91 ⁶ [15,6-19,7]	11,6±0,42 ³ [10,6-12,6]
<i>3. р. Уды, Харьковская область 2 (n = 10)</i>						
56,9±2,28 ⁵ [51,7-62,0]	687,8±8,55 ⁵ [668,5-707,1]	71,0±2,37 [65,6-76,4]	1443,4±22,39 [1392,8-1494,1]	3,5±0,02 ⁶ [3,4-3,5]	25,6±0,95 ^{4,5} [23,5-27,8]	12,5±0,45 ² [11,5-13,6]
<i>4. оз. Глубокое, Луганская область (n = 10)</i>						
32,7±2,04 ² [28,1-37,3]	603,1±11,85 ² [576,3-629,9]	35,6±2,21 ^{1,5,6} [30,6-40,6]	1730,37±24,10 ⁶ [1675,9-1784,9]	6,4±0,22 ⁵ [5,9-6,9]	27,5±0,94 ^{3,5} [25,4-29,7]	35,6±1,57 [32,1-39,2]
<i>5. ерик Судомойка, Волгоградская область (n = 10)</i>						
49,7±2,34 ^{3,6} [44,5-55,0]	726,0±8,02 ³ [707,9-744,1]	42,6±2,44 ^{2,4,6} [37,1-48,1]	1032,1±26,41 [972,3-1091,8]	6,0±0,07 ⁴ [5,8-6,1]	24,0±1,06 ^{3,4} [21,6-26,4]	19,6±1,16 [16,9-22,2]
<i>6. р. Челбас, Краснодарский край (n = 10)</i>						
42,5±2,30 ^{2,5} [37,3-47,7]	563,3±5,59 [550,7-575,9]	37,8±2,21 ^{2,4,5} [32,8-42,8]	1632,7±23,58 ¹ [1579,4-1686,0]	3,5±0,05 ³ [3,4-3,6]	19,6±0,75 ² [17,9-21,3]	7,6±0,14 [7,2-7,9]
$F_{5,54}(p)$, One-way ANOVA						
49,0 (0,005)	84,0 (0,001)	29,8 (0,006)	853,7 (0,000)	877,1 (0,000)	70,7 (0,003)	320,8 (0,000)

Примечание: надстрочными цифрами обозначены номера регионов, между которыми отсутствуют статистически значимые различия (Tukey HSD test, $p > 0,05$)

Максимальные концентрации эсценциальных Cu и Mn отмечены в тканях особей из р. Уды (Харьковская обл. 2) ($p < 0,01$). Биофильтр Fe больше всего в биопробах обитательниц оз. Горелое (Харьковская обл. 1) ($p < 0,001$), а Zn – у волгоградских пиявок ($p < 0,01$).

Ткани *H. sanguisuga*, обитающих в оз. Глубокое (Луганская обл.), на фоне пониженных концентраций эсценциальных металлов Cu, Zn и Mn, содержат повышенные концентрации токсичных Ni, Cd и Pb, что свидетельствует о на-

рушении минерального баланса пиявок в водоеме с повышенным содержанием ТМ в среде обитания.

Отметим, что подобные тенденции наблюдались и для медицинских пиявок из луганских и волгоградских популяций, что указывает на общие закономерности накопления тяжелых металлов пиявками с различной трофической организацией.

Анализ содержания МЭ в тканях *H. sanguisuga* из водных экосистем России и Украины методом главных компонент показал, что 59,51% общей дисперсии приходится на первую главную компоненту (PC1) и 18,16% – на вторую (PC2) (рис. 3.2.4, табл. 3.2.9).

Из рисунка 3.2.4. видно, что экспериментальные данные по уровню содержания эссенциальных и токсичных металлов в тканях *H. sanguisuga* оформились в шесть региональных групп.

Как и в случае с медицинской пиявкой *H. medicinalis*, наблюдается существенная пространственная дифференциация особей тамбовской популяций, для которых характерны минимальные тканевые концентрации Cu, Zn, Mn, Fe, Cd, Pb, Ni.

Отмечено пространственное обособление волгоградской и луганской популяций большой ложноконской пиявки, в тканях которых обнаружено повышенное содержание экотоксикантов и пониженное – эссенциальных металлов.

Обращает на себя внимание близость расположения на рисунке региональных групп пиявок из р. Челбас (Краснодарский край) и оз. Горелое (Харьковская область), которые показали сходство по уровню содержания в тканях Cu, Mn, Pb. Интересно, что аналогичная картина наблюдалась нами и при визуализации географической вариабельности концентраций ТМ в донных отложениях этих водоемов (рис. 3.2.1).

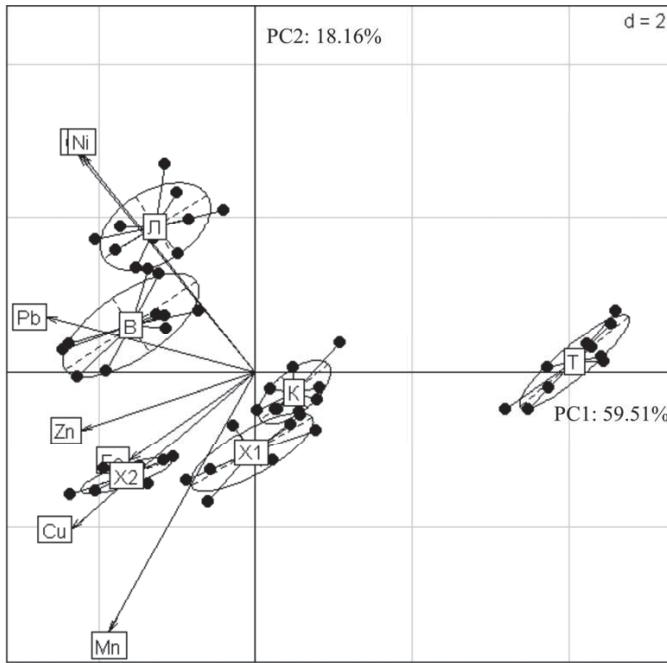


Рисунок 3.2.4 – Содержание ТМ в тканях *H. sanguisuga* в пространстве главных компонент. Условные обозначения: Т – Тамбовская область, Х1, Х2 – Харьковская область, Л – Луганская область, В – Волгоградская область, К – Краснодарский край

Наибольший вклад в географическую изменчивость микроэлементного спектра тканей ложноконских пиявок вносят преимущественно токсичные металлы: по первой главной компоненте (PC1) – Pb (21,17%), по второй (PC2) – Mn (33,34%), Cd (23,60%), и Ni (23,65%) (рис. 3.2.4, табл. 3.2.9).

Таблица 3.2.9 – Результаты компонентного анализа микроэлементов тканей хищной пиявки *H. sanguisuga*

МЭ, lg мкг/г (i = 7)	Нагрузки (loadings, a_{ij})		Вклад в главную компоненту (Contribution = $(a_{ij}^2 * 100) / \lambda_j, \%$)	
	Главные компоненты (Principal Components – PC), j = 1,2			
	1	2	1	2
Cu	-0,83**	-0,40*	16,40	12,30
Zn	-0,78**	-0,14	14,76	1,65
Mn	-0,66**	-0,65**	10,35	33,34
Fe	-0,56**	-0,22	7,67	3,90
Cd	-0,79**	0,55**	15,13	23,60
Pb	-0,94**	0,14	21,17	1,56
Ni	-0,77**	0,55**	14,53	23,65
	Собственные значения (eigenvalues, λ_j) PC		Дисперсия, объясненная PC (%)	
	4.17	1.27	59.51	18.16

Примечание: * – $p < 0,01$, ** – $p < 0,001$

Сравнительный анализ микроэлементного состава тканей медицинских и большой ложноконской пиявок различных географических популяций позволил установить, что трофическая специфика, выявленная нами у трех видов гирудинид из озера Горелое, в целом сохраняется на биотическом уровне (во всех случаях совместного обитания *H. sanguisuga* с *H. medicinalis* или с *H. verbana*) (рис. 3.2.5 и 3.2.6).

Из рисунков видно, что практически во всех водоемах уровень содержания Cu, Zn, Mn, Pb в тканях медицинских пиявок существенно ниже, чем у ложноконских пиявок, а концентрации Fe, Cd, Ni – статистически значимо выше ($p < 0,05$).

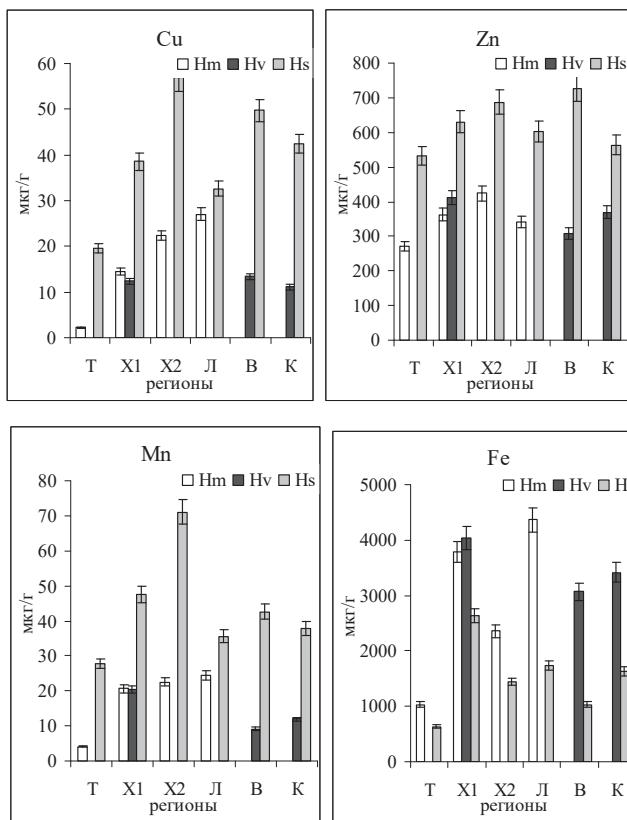


Рисунок 3.2.5 – Содержание эсценциальных металлов (мкг/г сухого вещества) в тканях кровососущих и хищных пиявок в водных экосистемах различных регионов России и Украины. Условные обозначения: Т – Тамбовская область, X1, X2 – Харьковская область, Л – Луганская область, В – Волгоградская область, К – Краснодарский край; Hm – *H. medicinalis*, Hv – *H. verbana*, Hs – *H. sanguisuga*

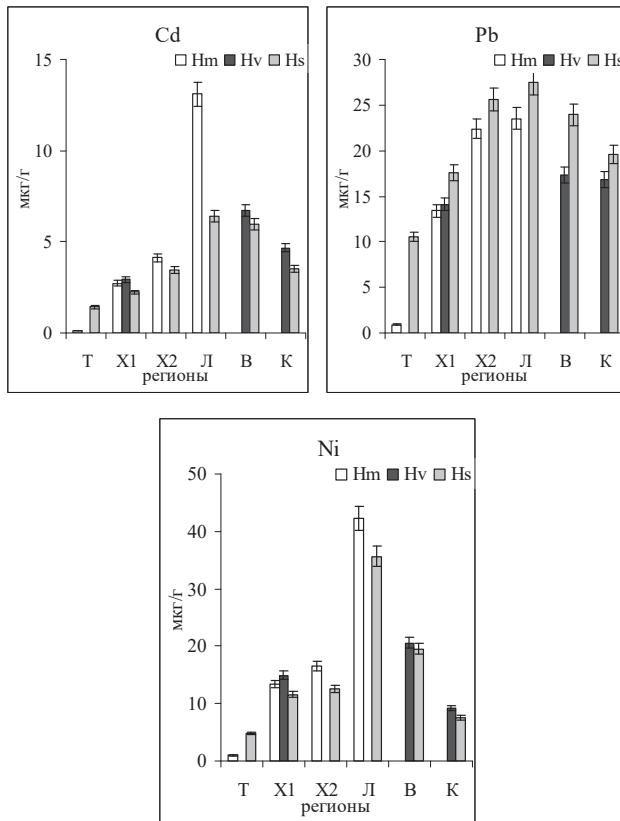


Рисунок 3.2.6 – Содержание токсичных металлов (мкг/г сухого вещества) в тканях кровососущих и хищных пиявок в водных экосистемах различных регионов России и Украины. Условные обозначения: Т – Тамбовская область, X1, X2 – Харьковская область, Л – Луганская область, В – Волгоградская область, К – Краснодарский край; Hm – *H. medicinalis*, Hv – *H. verbana*, Hs – *H. sanguisuga*

Сравнительная оценка биоэлементных спектров тканей *H. medicinalis*, *H. verbana* и *H. sanguisuga*, проведенная методом главных компонент, показала четкую дифференциацию кровососущих и хищных пиявок по изучаемым параметрам (рис. 3.2.7, табл. 3.2.10).

Показано, что 60,04% общей дисперсии приходится на первую главную компоненту (PC1) и 29,60 % – на вторую (PC2).

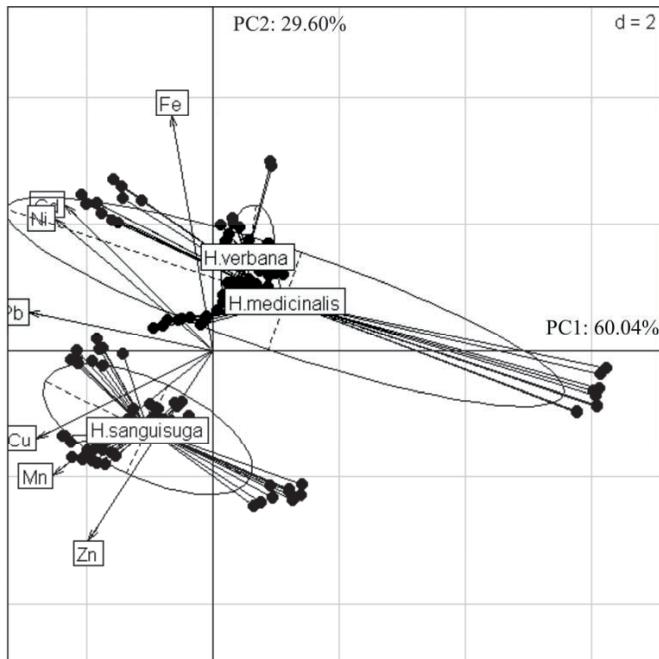


Рисунок 3.2.7 – Содержание МЭ в тканях медицинских и большой ложноконской пиявок в пространстве главных компонент

Представляется особенно важным, что в географическом аспекте микроэлементный спектр тканей медицинских пиявок *H. medicinalis* и *H. verbana* теряет видовую специфику, выявленную при их совместном обитании.

На рисунке отражено пространственное объединение двух видов кровососущих пиявок в одну группу, что указывает на определяющую роль трофической специфики гирудинид при формировании микроэлементного спектра их тканей, независимо от экологических условий среды обитания.

На фоне высокой корреляции ($p < 0,001$) наибольший вклад в первую главную компоненту (PC1) вносят Cu, Mn, Pb, Ni (20,13%, 16,53%, 21,90%, 16,20%, соответственно), во вторую компоненту (PC2) – Zn, Fe и Cd (23,28%, 35,62% и 13,71%, соответственно). В целом следует отметить, что метод главных компонент подтверждает результаты, приведенные выше, и позволяет дать адекватную оценку микроэлементного обмена кровососущих и хищных гирудинид.

Таблица 3.2.10 – Результаты компонентного анализа микроэлементного спектра большой ложноконской и медицинских пиявок

МЭ, lg мкг/г ($i = 7$)	Нагрузки (loadings, a_{ij})		Вклад в главную компоненту (Contribution = $(a_{ij}^2 * 100) / \lambda_j$, %)	
	Главные компоненты (Principal Components – PC), $j = 1, 2$			
	1	2	1	2
Cu	-0,92**	-0,32**	20,13	4,96
Zn	-0,65**	-0,69**	10,00	23,28
Mn	-0,83**	-0,46**	16,53	10,21
Fe	-0,21*	0,86**	1,09	35,62
Cd	-0,77**	0,53**	14,15	13,71
Pb	-0,96**	0,14	21,90	0,96
Ni	-0,83**	0,48**	16,20	11,25
	Собственные значения (eigenvalues, λ_i) PC		Дисперсия, объясненная PC (%)	
	4.20	2.07	60.04	29.60

Примечание: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,001$

В результате проведенных исследований определен диапазон фоновых концентраций Cu, Zn, Fe, Mn, Cd, Pb, Ni в тканях двух видов медицинских пиявок *H. medicinalis* и *H. verbana* (а также фонового для них вида *H. sanguisuga*) и в донных

отложениях мест их обитания, как в оптимальных климатогеографических условиях, так и на восточной и северной границах ареала. Выявлена высокая географическая вариабельность изучаемых параметров, а также видовая и трофическая специфика микроэлементной структуры тканей изучаемых видов пиявок.

3.3. Закономерности биологической аккумуляции тяжелых металлов гирудинидами в водных экосистемах различных климатогеографических зон

Закономерности биологической аккумуляции тяжелых металлов пиявками оценивали с помощью коэффициента биологического накопления ($K_{БН}$), рассчитанного по отношению средних значений тканевых концентраций тяжелых металлов к их концентрациям в донных отложениях. По характеру и степени кумуляционных способностей гидробионтов принято разделять на три группы: макроконцентраторы ($K_{БН} > 2$), микроконцентраторы ($K_{БН}$ от 1 до 2) и деконцентраторы ($K_{БН} < 1$) (Никаноров и др., 1993; Яковлев, 2002).

Согласно полученным данным, медицинские пиявки *H. medicinalis*, независимо от места обитания, являются макроконцентраторами Zn ($K_{БН} > 2$) и деконцентраторами Mn и Fe ($K_{БН} < 1$) (табл. 3.3.1). Выявлена неоднозначная кумулятивная способность к ТМ у МП различных географических популяций.

Так, пиявки из Тамбовской области отличаются от особей *H. medicinalis* остальных регионов наибольшей аккумуляционной активностью к Fe и наименьшей – к Cu, Cd, Pb, Ni, по отношению к которым они являются деконцентраторами ($K_{БН} < 1$). Для МП из р. Уды (Харьковская обл. 2) характерна наибольшая аккумуляция Zn. У особей *H. medicinalis* из заповедного озера Глубокое (Луганская обл.) выявлена самая высокая кумулирующая способность к Cu, Mn, Cd, Pb и Ni.

Обратная картина наблюдается у пиявок из алтайского водоема, в котором было отмечено повышенное содержание ТМ в ДО: показатели $K_{БН}$, практически

для всех ТМ, за исключением Cd, более низкие, чем у европейских МП. Уровень биоаккумуляции Cu, Zn, Mn, Ni, Pb алтайских особей, обитающих в неблагоприятных климатических условиях (короткий безморозный период, суровые зимы, глубокое промерзание грунта), на восточной границе ареала, сопоставим только с накопительными способностями пиявок из близкой по географической широте тамбовской популяции (северная окраина ареала).

Низкой кумулятивной активности сибирских пиявок способствует в первую очередь, более слабая и менее продолжительная прогреваемость воды в силу климатических особенностей региона, поскольку общеизвестно, что интенсивность накопления ТМ напрямую связана с температурным фактором (Моисеенко, 2009).

Кроме того, ранее нами были получены данные о высоком содержании в тканях МП данной географической популяции свободных аминокислот, способствующих функционированию физиологических механизмов детоксикации и элиминации избыточного количества экотоксикантов в условиях повышенного содержания ТМ в окружающей среде (Chernaya et al., 2016).

Установлено, что пиявки *H. verbana*, независимо от места обитания, являются макроконцентраторами Zn, Cd, Pb ($K_{БН} > 2$) и деконцентраторами Mn и Fe ($K_{БН} < 1$) (табл. 3.3.1).

Обнаружено, что особи *H. verbana* из волгоградской популяции проявляют не самую высокую кумулятивную активность к Cu, Ni и Pb, однако максимально накапливают в тканях токсичный Cd, который, в свою очередь, ингибирует депонирование необходимого количества эссенциального Zn, поскольку является его антагонистом.

Наибольшая аккумуляционная активность к Cu, Mn и Ni, на фоне наименьшей – к Cd и Pb, наблюдались у особей *H. verbana* из Харьковской области. Максимальная накопительная способность по отношению к Zn, Fe и Pb и минимальная – к Mn и Ni характерна для краснодарских пиявок (табл. 3.3.1).

Таблица 3.3.1 – Показатели коэффициентов биологического накопления ($K_{БН}$) тяжелых металлов у медицинских пиявок *H. medicinalis* и *H. verbana* различных географических популяций

Регион / ТМ	Cu	Zn	Mn	Fe	Cd	Pb	Ni
<i>H. medicinalis</i> (n = 50)							
Тамбовская область	0,48	8,88	0,06	0,73	0,13	0,15	0,13
Харьковская область 1	2,88	11,13	0,30	0,41	2,57	2,16	1,28
Харьковская область 2	2,79	14,96	0,28	0,19	3,32	2,66	1,32
Луганская область	4,42	9,10	0,65	0,38	7,94	3,40	2,95
Алтайский край	0,67	8,73	0,02	0,08	3,24	0,91	0,73
<i>H. verbana</i> (n = 30)							
Харьковская область 1	2,46	12,61	0,29	0,44	2,77	2,26	1,43
Волгоградская область	1,91	7,19	0,13	0,52	3,92	2,43	1,32
Краснодарский край	2,16	16,07	0,07	0,72	3,22	2,59	0,97

При исследовании биоаккумуляционных способностей хищницы *H. sanguisuga* установлено, что БЛП, независимо от географической приуроченности, являются макроконцентраторами Cu, Zn ($K_{БН} > 2$) и деконцентраторами Mn и Fe ($K_{БН} < 1$) (табл. 3.3.2).

По отношению к экотоксикантам Cd и Pb особи *H. sanguisuga* всех географических популяций (за исключением тамбовских пиявок), являются макроконцентраторами. Практически во всех водных экосистемах отмечена невысокая кумулятивная активность хищных гирудинид к Ni.

Исключение составили пиявки из луганской популяции, для которых характерны самые высокие показатели $K_{БН}$ как Ni, так и Mn, Cd, Pb и минимальные – Zn. Кроме того, особи этой группы пиявок отличаются невысокой накопительной способностью к эссенциальным Cu и Fe. Напомним, что подобные тенденции были обнаружены и у медицинских пиявок *H. verbana* из волгоградских популяций.

Таблица 3.3.2 – Показатели коэффициентов биологического накопления тяжелых металлов у большой ложноконской пиявки *H. sanguisuga* в водных экосистемах различных регионов России и Украины

Регион / ТМ	Cu	Zn	Mn	Fe	Cd	Pb	Ni
Тамбовская область	4,22	17,28	0,41	0,45	1,54	1,77	0,62
Харьковская область 1	7,61	19,26	0,68	0,29	2,81	2,10	1,10
Харьковская область 2	7,06	24,13	0,88	0,12	2,77	3,03	1,00
Луганская область	5,31	15,94	0,93	0,15	3,86	3,97	2,48
Волгоградская область	7,03	16,86	0,57	0,18	3,46	3,35	1,25
Краснодарский край	8,26	24,36	0,21	0,34	2,42	3,02	0,80

Известно, что поглощение металлов является, в основном пассивным процессом, и его регуляция осуществляется после проникновения металла в организм гидробионтов (Никаноров, 1991).

Особенно интенсивно в организме накапливаются микроэлементы, необходимые для его жизнедеятельности и активно участвующие в физиологобиохимических процессах, где металлы выполняют свои биокатализитические функции как необходимые компоненты сложных белковых молекул и, прежде всего, ферментов, дыхательных пигментов, витаминов и других биологически активных соединений. Предполагается, что животные способны регулировать поглощение только необходимых для метаболизма металлов (таких как Cu, Zn и Mn) (Wright, 1980).

Регрессионный анализ показал, что концентрации Zn ($r = 0,07; p = 0,67$) и Mn ($r = -0,22; p = 0,17$) в тканях лечебной пиявки *H. medicinalis* европейских популяций не зависят от уровня их содержания в ДО, что свидетельствует о наличии у пиявок механизмов регуляции процессов накопления этих эссенциальных металлов (рис. 3.3.1).

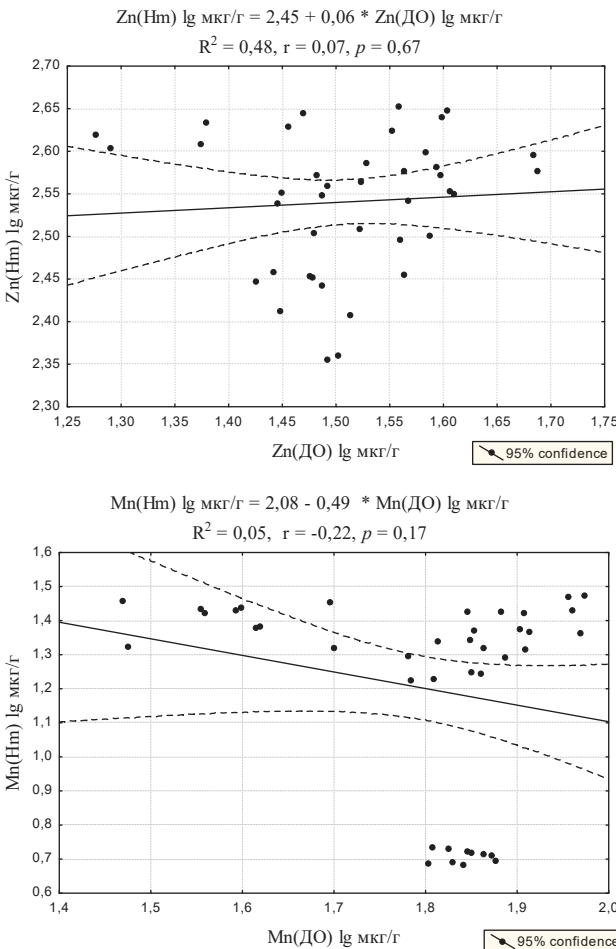


Рисунок 3.3.1 – Зависимость содержания эсценциальных металлов Zn и Mn ($\lg \text{мкг/г}$ сухого вещества) в тканях лечебной пиявки *H. medicinalis* (Hm) от их концентраций в донных отложениях (ДО)

Выявлена статистически значимая корреляционная связь между уровнем содержания Cu, Fe, Cd, Pb, Ni в тканях *H. medicinalis* и их концентрациями в донных отложениях ($p < 0,001$) (рис. 3.3.2-3.3.4).

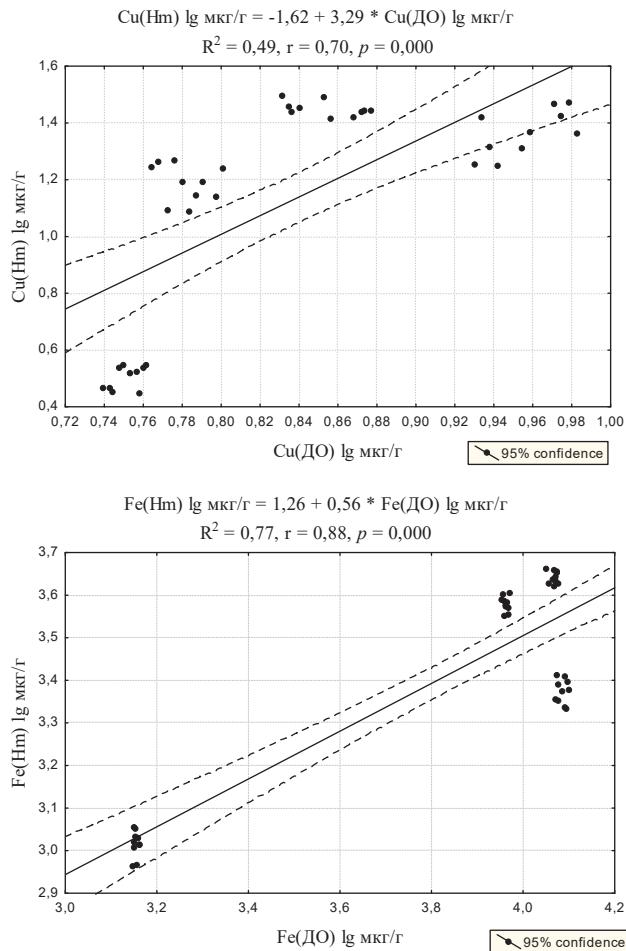


Рисунок 3.3.2 – Зависимость содержания эссенциальных металлов Cu и Fe (lg мкг/г сухого вещества) в тканях лечебной пиявки *H. medicinalis* (Hm) от их концентраций в донных отложениях (ДО)

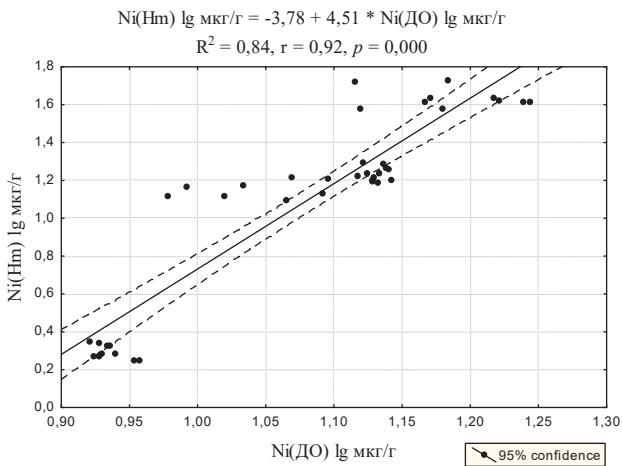
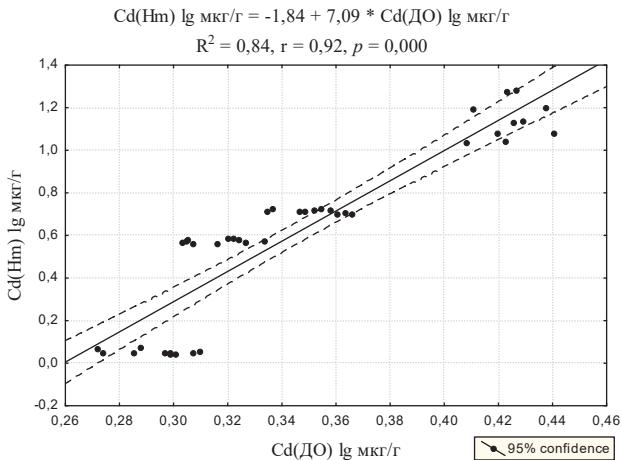
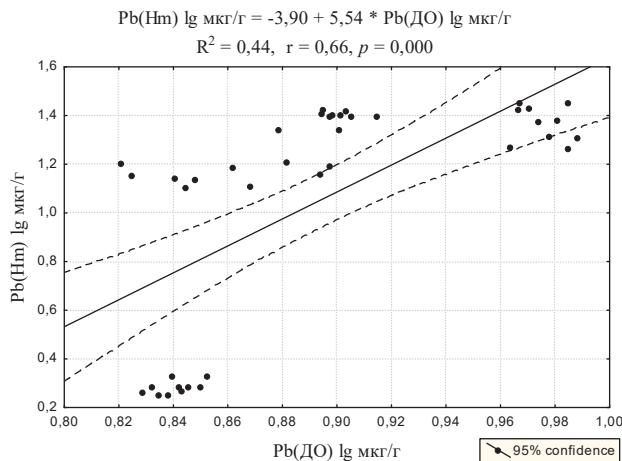


Рисунок 3.3.3 – Зависимость содержания токсичных металлов Cd и Ni ($\lg \text{мкг/г}$ сухого вещества) в тканях лечебной пиявки *H. medicinalis* (Hm) от их концентраций в донных отложениях (ДО)

Высокая степень корреляционной связи выявлена для эссенциальных металлов Cu ($r = 0,70$; $p = 0,000$) и Fe ($r = 0,88$; $p = 0,000$) и очень высокая – для экотоксикантов Cd ($r = 0,92$; $p = 0,000$) и Ni ($r = 0,92$; $p = 0,000$). Для ксенобиотика Pb связь между изучаемыми параметрами характеризуются как сопряженность средней силы ($r = 0,66$; $p = 0,000$).



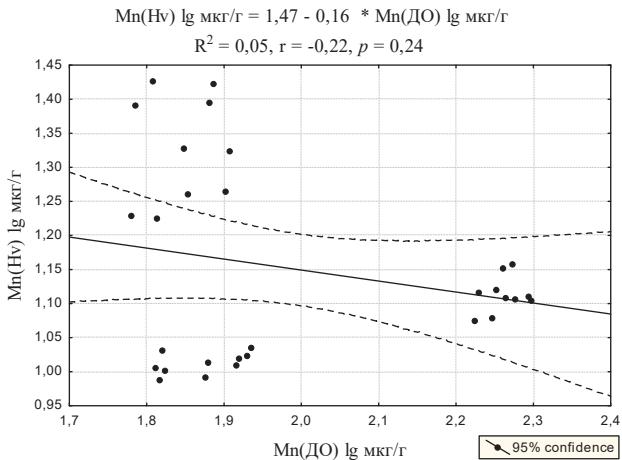
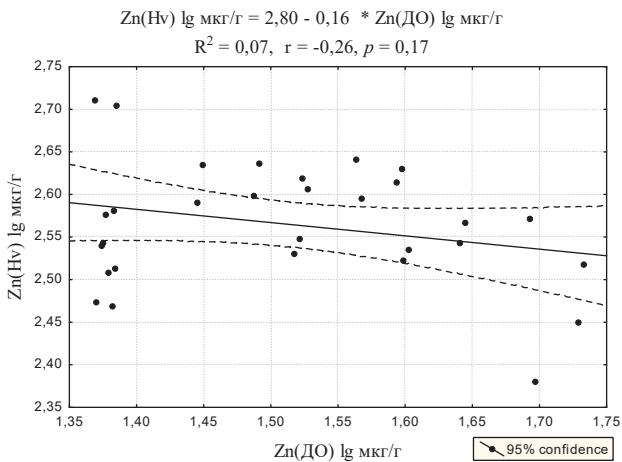


Рисунок 3.3.5 – Зависимость содержания эссенциальных металлов Zn и Mn (lg мкг/г сухого вещества) в тканях аптечной пиявки *H. verbana* (Hv) от их концентраций в донных отложениях (ДО)

Для Cu, Ni и Pb связь между изучаемыми параметрами характеризуются как сопряженность средней силы ($r = 0,51; p = 0,004$, $r = 0,63; p = 0,000$ и $r = 0,56$;

$p = 0,001$, соответственно). Высокая степень связи выявлена для Fe ($r = 0,71; p = 0,000$) и очень высокая – для Cd ($r = 0,94; p = 0,000$) (рис. 3.3.6 – 3.3.8).

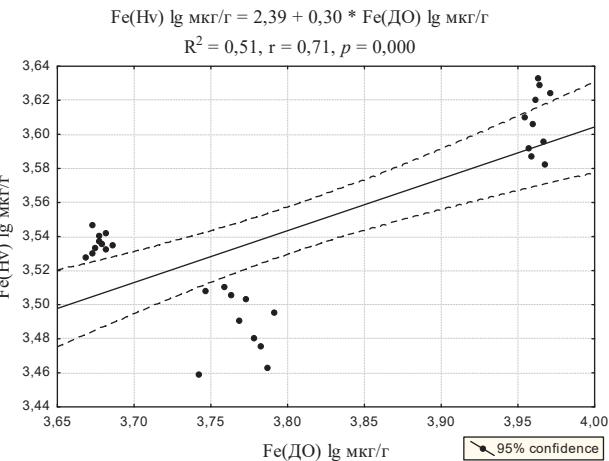
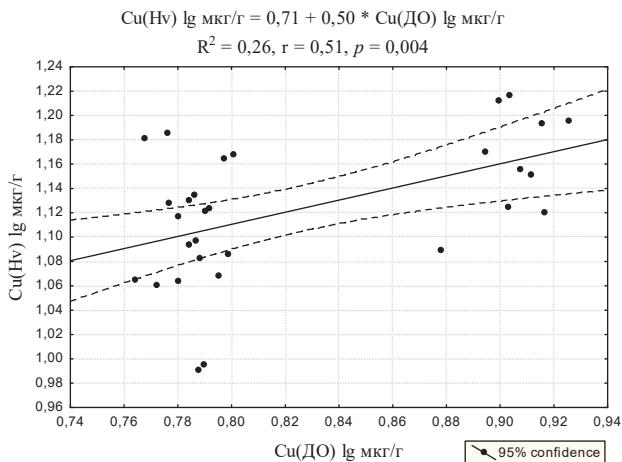


Рисунок 3.3.6 – Зависимость содержания эссенциальных металлов Cu и Fe (lg мкг/г сухого вещества) в тканях аптечной пиявки *H. verbana* (Hv) от их концентраций в донных отложениях (ДО)

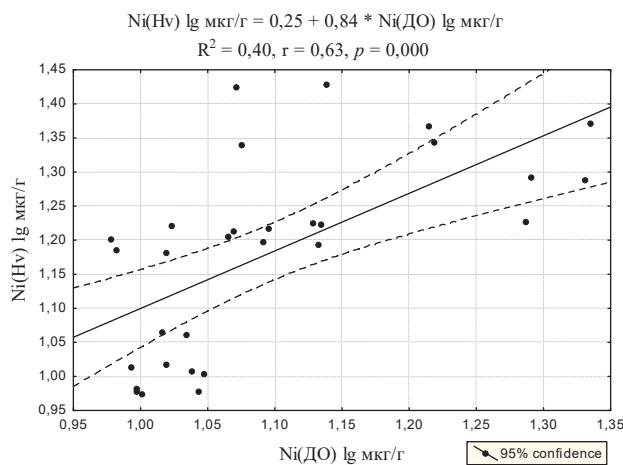
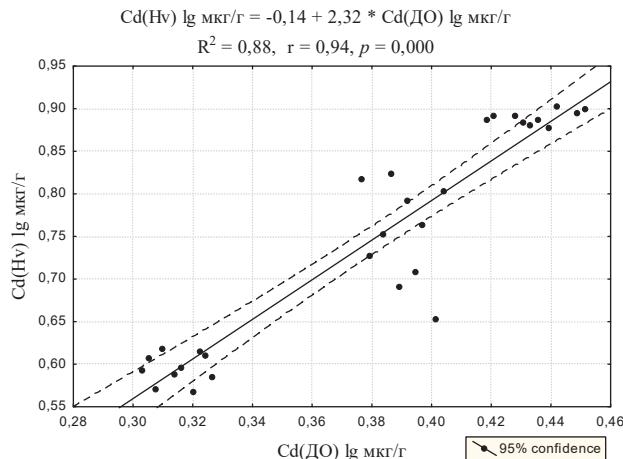


Рисунок 3.3.7 – Зависимость содержания токсичных металлов Cd и Ni (lg мкг/г сухого вещества) в тканях аптечной пиявки *H. verbana* (Hv) от их концентраций в донных отложениях (ДО)

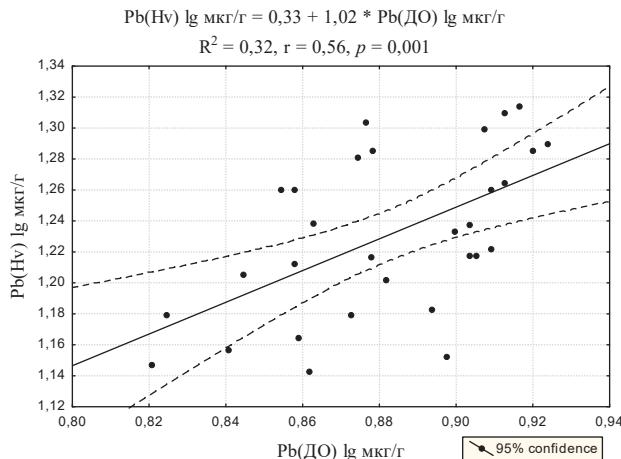


Рисунок 3.3.8 – Зависимость содержания токсичного металла Pb (lg мкг/г сухого вещества) в тканях аптечной пиявки *H. verbana* (Hv) от их концентраций в донных отложениях (ДО)

Необходимо отметить, что аналогичный характер корреляционных связей был нами выявлен при исследовании сезонной аккумуляции ТМ пиявкой *H. verbana* (Chernaya et al., 2018).

У хищной гирудиниды *H. sanguisuga*, так же, как и у медицинских пиявок, выявлена способность к физиологической регуляции Mn – для этого биогенного металла не было выявлено статистически значимой связи между изучаемыми параметрами ($r = 0,11; p = 0,40$).

Вместе с тем, в отличие от медицинских пиявок, у *H. sanguisuga* обнаружена корреляционная связь средней силы между концентрацией эссенциального Zn в тканях и его содержанием в ДО ($r = 0,48; p = 0,000$) (рис. 3.3.9).

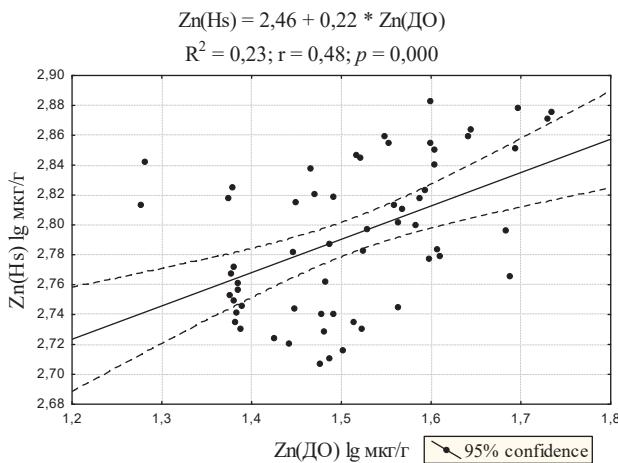
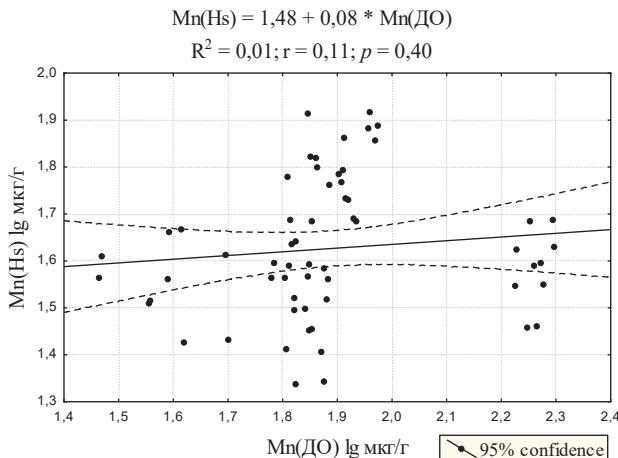


Рисунок 3.3.9 – Зависимость содержания эсценциальных металлов Mn и Zn (lg мкг/г сухого вещества) в тканях ложноконской пиявки *H. sanguisuga* (Hs) от их концентраций в донных отложениях (ДО)

Высокая степень корреляционной связи между тканевыми и грунтовыми концентрациями установлена для Fe ($r = 0,78$), Ni ($r = 0,81$) и Pb ($r = 0,70$), и

средняя – для Cu ($r = 0,68$) ($p = 0,000$). Очень сильная связь между изучаемыми параметрами характерна для Cd ($r = 0,95$; $p = 0,000$) (рис. 3.3.10-3.3.12).

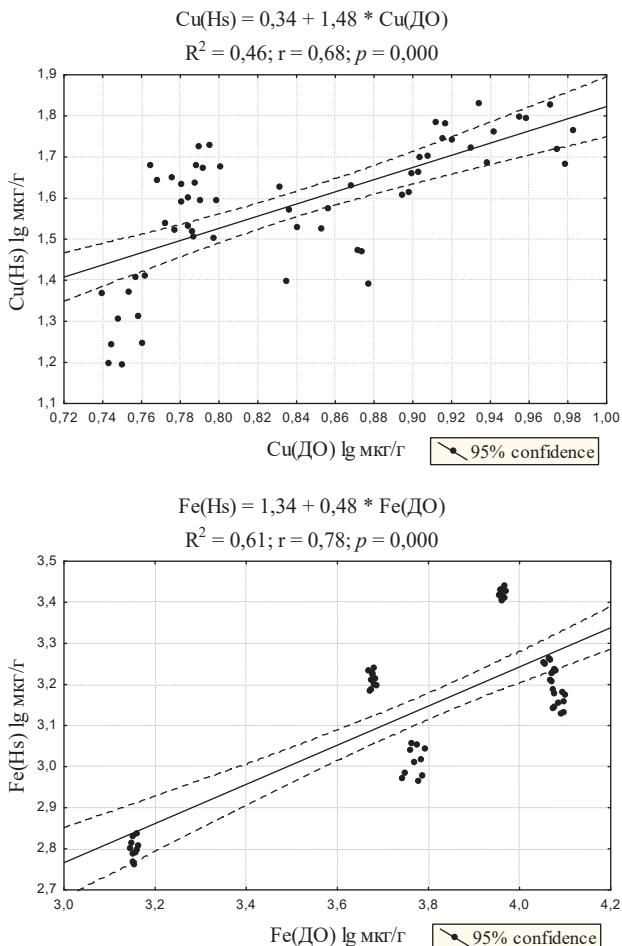


Рисунок 3.3.10 – Зависимость содержания эссенциальных металлов Cu и Fe ($\lg \text{мкг/г}$ сухого вещества) в тканях ложноконской пиявки *H. sanguisuga* (Hs) от их концентраций в донных отложениях (ДО)

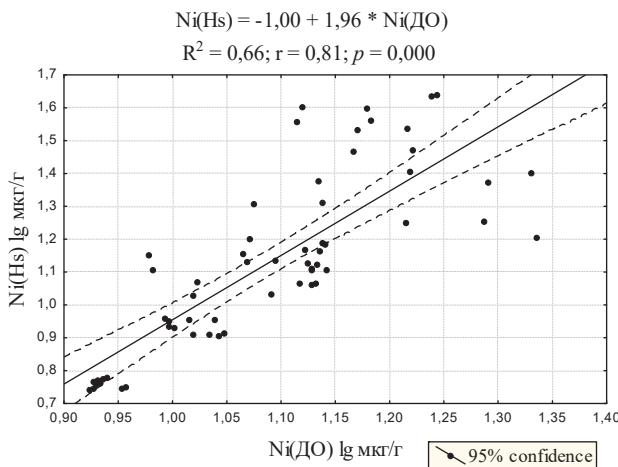
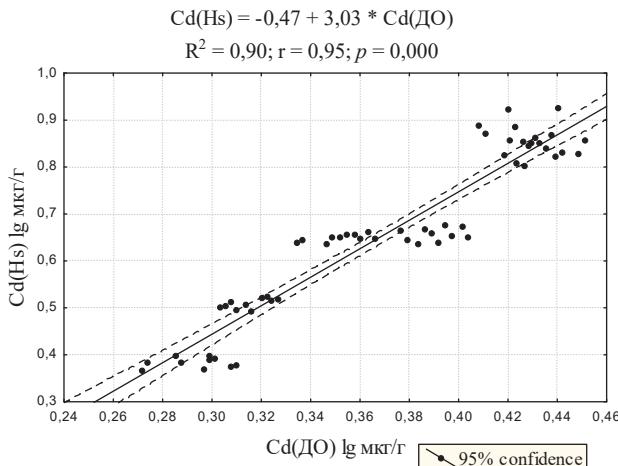


Рисунок 3.3.11 – Зависимость содержания токсичных металлов Cd и Ni (lg мкг/г сухого вещества) в тканях ложноконской пиявки *H. sanguisuga* (Hs) от их концентраций в донных отложениях (ДО)

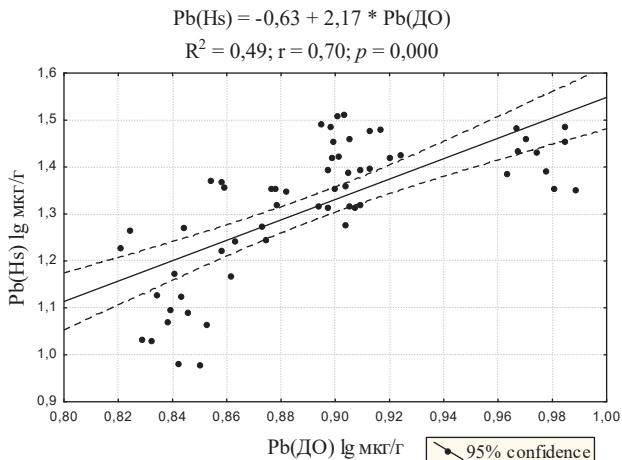


Рисунок 3.3.12 – Зависимость содержания токсичного металла Pb (lg мкг/г сухого вещества) в тканях ложноконской пиявки *H. sanguisuga* (Hs) от их концентраций в донных отложениях (ДО)

Исследование биологической аккумуляции тяжелых металлов в тканях пиявок показало, что кровососущие и хищные гирудиниды, независимо от видовой принадлежности и местообитания, являются макроконцентратами Zn и деконцентраторами Fe и Mn. Хищная пиявка *H. sanguisuga* во всех водных объектах – макроконцентратор Cu, а кровосос *H. verbana* – макроконцентратор Cd и Pb (табл. 3.3.3).

У пиявок, обитающих в водных экосистемах промышленных регионов России и Украины (Луганская и Волгоградская области), выявлена тенденция к потенциально высокой кумулятивной активности к экотоксикантам Cd и Pb, в результате которой в тканях нарушен баланс между эссенциальными и токсичными металлами. Высокие значения $K_{БН}$ свидетельствуют о биологической доступности и возможности МЭ включаться во все физиологические и биохимические процессы организма.

Таблица 3.3.3 – Коэффициенты биологического накопления ($K_{БН}$) и корреляционных связей (r) у кровососущих и хищных пиявок, обитающих в водных экосистемах России и Украины

МЭ	Медицинские пиявки				<i>H. sanguisuga</i> $n = 60$	
	<i>H. medicinalis</i> $n = 40$		<i>H. verbana</i> $n = 30$			
	$K_{БН}$	r	$K_{БН}$	r	$K_{БН}$	r
Cu	0,48-4,42	0,70	1,9-2,46	0,51	4,22-8,27	0,68
Zn	8,88-14,9	0,07*	7,19-16,1	-0,26*	15,9-24,4	0,48
Mn	0,06-0,65	-0,22*	0,07-0,29	-0,22*	0,21-0,93	0,11*
Fe	0,19-0,73	0,88	0,44-0,72	0,71	0,12-0,45	0,78
Cd	0,13-7,95	0,92	2,75-3,93	0,94	1,47-3,86	0,95
Pb	0,15-3,4	0,66	2,26-2,58	0,56	1,77-3,97	0,70
Ni	0,13-2,94	0,92	0,98-1,43	0,63	0,62-2,47	0,81

Примечание: * – $p > 0,05$

Поскольку пиявки относятся к консументами второго и третьего порядков, они находятся на вершине пищевой пирамиды водных экосистем, вследствие чего депонируют в своих тканях значительные количества ТМ, концентрации которых, как известно, увеличиваются по мере продвижения по трофической цепи (Мур, Рамамурти, 1987; Черная, Ковальчук, 2009а). Отсюда столь высокие величины $K_{БН}$ большинства исследуемых металлов. В то же время имеются работы, указывающие на отсутствие накопления токсичных металлов Cd и Pb в тканях животных при продвижении этих элементов по пищевой цепи (Wright, 1980), в отличие от биофильных элементов Zn и Cu, поступающих в организм беспозвоночных с пищей или через дыхательные поверхности (Lithner et al., 1995). Показано, что моллюски *D. polymorpha* способны регулировать концентрацию Zn в теле независимо от его содержания в окружающей среде, а содержание в их тканях Pb, Cd и Cu зависит от содержания последних в воде (Данилин, Павловская, 2006).

Проведенные исследования показали, что медицинские пиявки *H. medicinalis* и *H. verbana* способны регулировать в своих тканях содержание Mn и Zn,

независимо от концентраций этих металлов в окружающей среде, *H. sanguisuga* отличаются такой способностью только к Mn. Содержание Cu, Fe, Ni, Cd и Pb в тканях всех изучаемых видов гирудинид находится в прямой зависимости от концентраций этих металлов в донных отложениях. Для *H. sanguisuga* выявлена корреляционная связь средней силы и для Zn.

Известно, что в условиях комплексного загрязнения водоемов токсичными металлами может наблюдаться как избыток содержания ряда элементов в организме вследствие их аккумуляции, так и недостаток эссенциальных элементов вследствие разрушения ферментных систем, элиминации микроэлементов из организма или замещения важных для жизнедеятельности металлов другими, более токсичными (Моисеенко, 2009).

Поскольку существует прямая зависимость концентраций большинства экотоксикантов в тканях пиявок от их содержания в среде обитания, дальнейшее их поступление и биомагнификация в водных экосистемах может оказать пагубное влияние на здоровье природных популяций медицинских пиявок, что особенно актуально для промышленных регионов России и Украины.

Вместе с тем, это же обстоятельство позволяет рекомендовать использование медицинских и большой ложноконской пиявок в качестве индикаторных организмов при проведении мониторинга за загрязнением водных экосистем тяжелыми металлами.

Учитывая выявленные в ходе исследования общие закономерности формирования микроэлементного спектра в тканях кровососущих и хищных гирудинид, в водных экосистемах с низкой численностью *H. medicinalis* и *H. verbana* в качестве биоиндикатора, с нашей точки зрения, можно использовать особей *H. sanguisuga*.

Глава 4. СЕЗОННАЯ И ВОЗРАСТНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ МИКРОЭЛЕМЕНТНОГО СПЕКТРА В ТКАНЯХ МЕДИЦИНСКИХ ПИЯВОК ИЗ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

Важным и до сих пор слабо изученным аспектом в формировании микроэлементного состава тканей медицинских пиявок является взаимосвязь между биологическим накоплением эссенциальных и токсичных металлов и их эколого-физиологическими особенностями – размножением, развитием и ростом, подготовкой к зимнему анабиозу. Учитывая, что продолжительность жизни челюстных пиявок составляет пять и более лет, для них характерны неоднократные зимовки и относительно медленное развитие (половая зрелость наступает на третий год жизни). С этих позиций изучение сезонной и возрастной вариабельности микроэлементного спектра их тканей, представляет несомненный интерес.

4.1. Сезонная динамика содержания микроэлементов в тканях медицинской пиявки *H. verbana*

Биологический цикл медицинских пиявок напрямую связан с сезонной изменчивостью абиотической компоненты среды. Весной, при повышении температуры воды наступает период выхода пиявок из зимнего анабиоза, сопровождающийся активизацией метаболических процессов. Летом, на фоне интенсивного увеличения мышечной массы гирудинид, осуществляется их основная репродуктивная деятельность. Поздней осенью, при понижении температуры воды до низких положительных значений, у пиявок наступает период подготовки к зимнему анабиозу, характеризующийся метаболическими перестройками, направленными на замедление скорости обменных процессов в организме (Лукин, 1976).

В данной части главы будут изучены особенности сезонной динамики эссенциальных и токсичных микроэлементов (МЭ) в тканях медицинских пиявок, обусловленные, как влиянием абиотических факторов среды, так и приурочен-

ными к смене времен года физиологическими изменениями в их организме (Черная, Ковальчук, 2012; Chernaya et al., 2018).

В исследованиях использованы взрослые особи аптечной пиявки *Hirudo verbana*, отловленные в р. Челбас (Краснодарский край, Каневской район) весной (первая декада мая; температура воды +10°C), летом (первая декада августа; +21°C) и осенью (последняя декада ноября; +2°C).

Результаты спектрометрического анализа показали, что концентрации тяжелых металлов в донных отложениях реки Челбас, независимо от сезона, располагаются в едином убывающем ряду: Fe > Mn > Zn > Ni > Pb > Cu > Cd (табл. 4.1.1).

Таблица 4.1.1 – Сезонная динамика концентраций тяжелых металлов (мкг/г сухого вещества) в донных отложениях реки Челбас

TM, мкг/г	1. Весна n = 10	2. Лето n = 10	3. Осень n = 10	p Tukey test
Cu	$5,14 \pm 0,03$ [5,07-5,20]	$4,11 \pm 0,11$ [3,87-4,35]	$7,45 \pm 0,08$ [7,27-7,62]	I-2: 0,000 I-3: 0,000 2-3: 0,000
Zn	$23,12 \pm 0,08$ [22,95-23,29]	$19,34 \pm 0,46$ [18,29-20,38]	$30,99 \pm 0,70$ [29,42-32,57]	I-2: 0,000 I-3: 0,000 2-3: 0,000
Mn	$181,93 \pm 3,25$ [174,58-189,27]	$136,52 \pm 2,23$ [131,48-141,56]	$220,25 \pm 2,40$ [214,82-225,68]	I-2: 0,000 I-3: 0,000 2-3: 0,000
Fe	$4751,4 \pm 17,93$ [4710,8-4791,9]	$3533,7 \pm 24,83$ [3477,5-3589,9]	$4346,8 \pm 25,14$ [4289,9-4403,7]	I-2: 0,000 I-3: 0,000 2-3: 0,000
Cd	$1,46 \pm 0,02$ [1,42-1,49]	$1,26 \pm 0,01$ [1,24-1,27]	$1,49 \pm 0,02$ [1,44-1,51]	I-2: 0,000 I-3: 0,257 2-3: 0,000
Pb	$6,50 \pm 0,10$ [6,27-6,73]	$6,74 \pm 0,05$ [6,65-6,86]	$8,46 \pm 0,10$ [8,23-8,69]	I-2: 0,096 I-3: 0,000 2-3: 0,000
Ni	$9,45 \pm 0,16$ [9,09-9,82]	$10,29 \pm 0,25$ [9,73-10,85]	$12,65 \pm 0,27$ [12,05-13,25]	I-2: 0,054 I-3: 0,000 2-3: 0,000

Согласно литературным данным (Никаноров и др., 1993) фоновые концентрации изучаемых тяжелых металлов в грунтах пресноводных водоемов составля-

ют: меди – 4-50 мкг/г, цинка – 8-60 мкг/г, марганца – 70-400 мкг/г, железа – 1000-18000 мкг/г, кадмия – 0,1-1,2 мкг/г, свинца – 5-18 мкг/г, никеля – 0,7-15 мкг/г.

По нашим данным уровень содержания практически всех металлов во все сезоны соответствует фоновым показателям; незначительное превышение наблюдалось для кадмия: весной и осенью (табл. 4.1.1).

Полученные нами результаты согласуются с литературными данными о высоком уровне накопления токсичного кадмия за последние годы не только в загрязненных, но и в фоновых водоемах (Степанова и др., 2007; Моисеенко, 2009; Kovalchuk et al., 2017; Решетняк и др., 2017).

Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA подтвердил нашу гипотезу о том, что сезонное изменение температуры существенно влияет на уровень содержания в ДО всех изучаемых металлов ($p < 0,001$) (табл. 4.1.1, рис. 4.1.1-4.1.4).

Максимальные концентрации меди, цинка, марганца, свинца и никеля в донных отложениях наблюдались осенью, железа – весной, кадмия – весной и осенью.

Летом в среде обитания пиявок отмечено пониженное содержание меди, цинка, марганца, железа и кадмия. Меньше всего свинца и никеля отмечено в весенних и летних пробах (табл. 4.1.1).

Показано, что сезонная динамика изучаемых тяжелых металлов в донных отложениях имеет, как сходные тенденции, так и специфические различия (рис. 4.1.1-4.1.4).

Из рисунков видно, что сезонная изменчивость грунтовых концентраций Cu, Zn, Mn, Fe, Cd имеет фазовый характер, а Pb и Ni – линейный.

Наибольшая сезонная изменчивость характерна для грунтовых концентраций Cu, Zn, Mn, Fe – между их содержанием во все сезоны выявлены статистически значимые различия ($p < 0,001$).

Несколько ниже была сезонная изменчивость для Cd, Pb и Ni. Для концентраций данных металлов статистически значимые различия были выявлены не во все сезоны года.

Осенние пробы донных отложений по уровню содержания свинца и никеля отличались от весенних и летних показателей ($p < 0,001$), а по кадмию – летние от весенних и осенних ($p < 0,001$) (табл. 4.1.1, рис. 4.1.1-4.1.4).

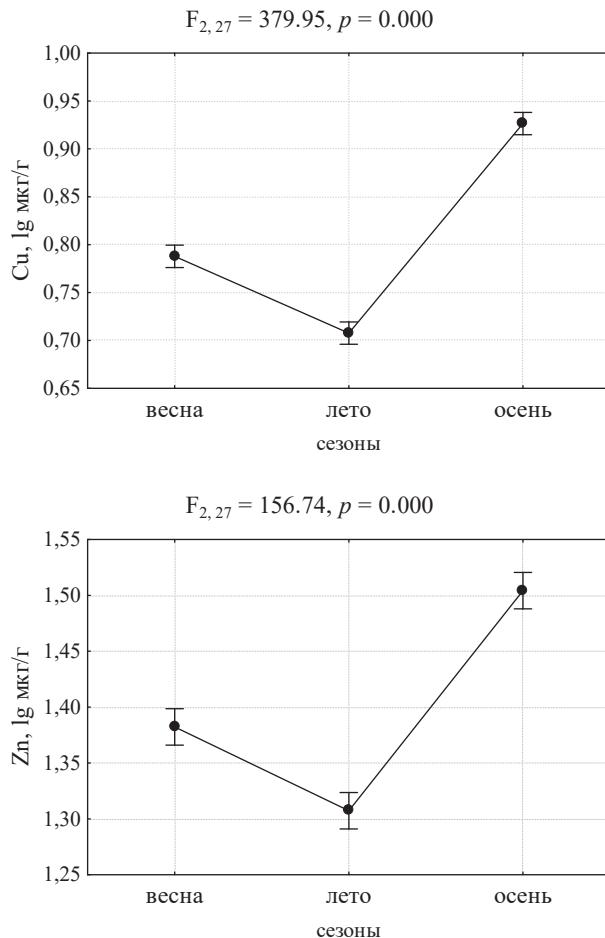
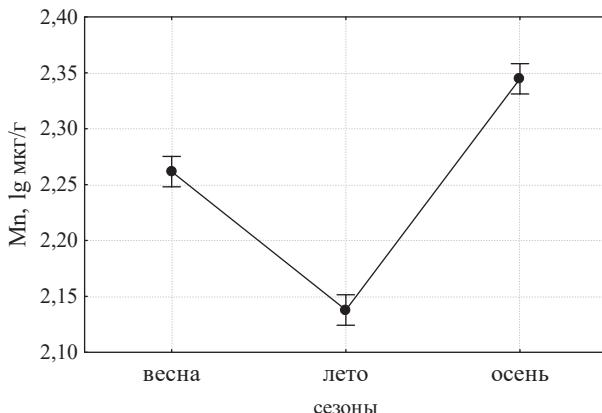


Рисунок 4.1.1 – Сезонная динамика концентраций меди и цинка ($\lg \text{мкг/г}$ сухого вещества) в донных отложениях реки Челбас

$$F_{2,27} = 246.81, p = 0.000$$



$$F_{2,27} = 715.31, p = 0.000$$

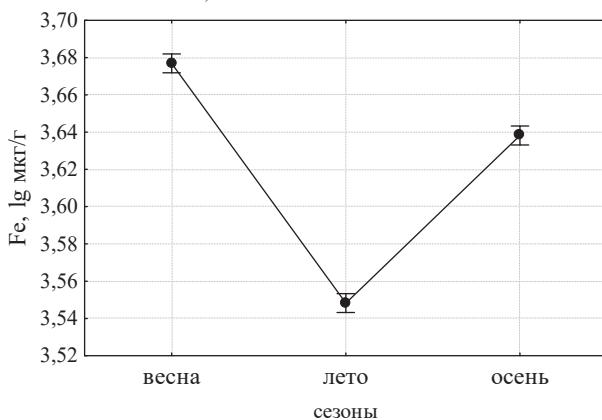
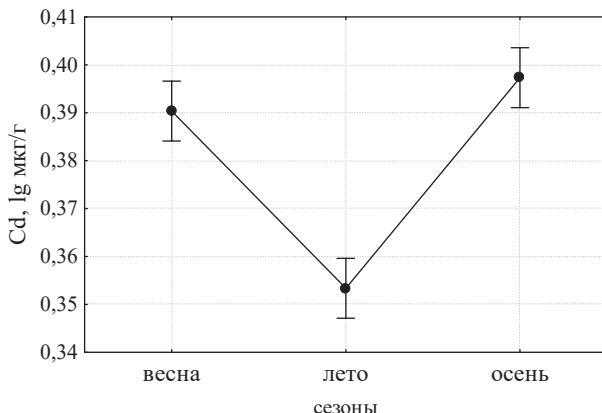


Рисунок 4.1.2 – Сезонная динамика концентраций марганца и железа (lg мкг/г сухого вещества) в донных отложениях реки Челбас

$$F_{2,27} = 60.21, p = 0.000$$



$$F_{2,27} = 142.18, p = 0.000$$

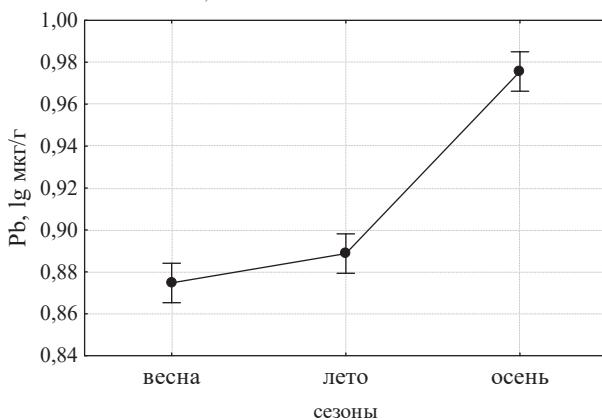


Рисунок 4.1.3 – Сезонная динамика концентраций кадмия и свинца (lg мкг/г сухого вещества) в донных отложениях реки Челбас

$$F_{2,27} = 50.86, p = 0.000$$

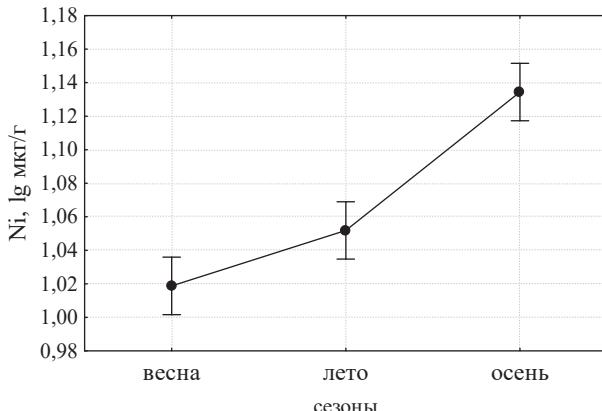


Рисунок 4.1.4 – Сезонная динамика концентраций никеля ($\lg \text{мкг/г}$ сухого вещества) в донных отложениях реки Челбас

Полученные нами результаты в целом согласуются с литературными данными. Было показано, что сезонная динамика содержания ТМ в ДО водных объектов определяется влиянием большого количества физико-химических и биотических факторов, которые определяют, как поступление, так и пространственно-временное распределение металлов с различной окислительно-восстановительной способностью по абиотическим компонентам водных экосистем (Никаноров, 1989; Степанова, 2008; Моисеенко, 2009; Кольчугина, 2010; Ваганов, 2012).

С помощью метода главных компонент (PCA) представлена сезонная специфика элементного состава донных отложений из мест обитания пиявок: 72,42% общей дисперсии приходится на первую главную компоненту (PC1), 21,02% – на вторую главную компоненту (PC2) (рис. 4.1.5, табл. 4.1.2).

Как видно из рисунка, все экспериментальные наблюдения четко разделились на три сезонные группы.

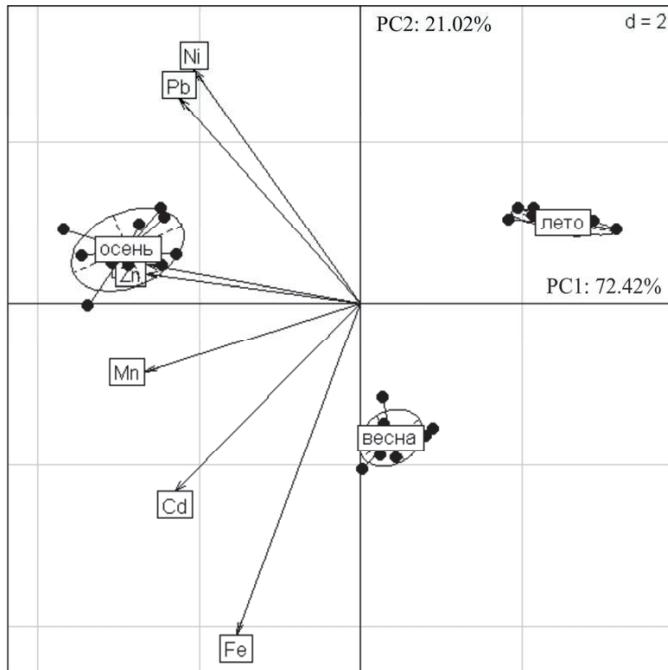


Рисунок 4.1.5 – Сезонное содержание тяжелых металлов в донных отложениях реки Челбас в пространстве главных компонент

Наибольший вклад в сезонную изменчивость ТМ в донных отложениях по PC1 вносят Cu (18,44%), Zn (18,50%) и Mn (18,67%), по PC2 – Fe (43,88%), а их коэффициенты корреляции с главными компонентами составляют -0,97, -0,97, -0,97 и -0,80, соответственно ($p = 0,000$).

На рисунке отражено повышенное содержание эсценциальных металлов Cu, Mn, Zn в осенних пробах донных отложений и Fe – в весенних, что подтверждает результаты дисперсионного анализа ANOVA, обсуждаемые выше.

Таблица 4.1.2 – Результаты компонентного анализа микроэлементного спектра
донных отложений реки Челбас в разные сезоны года

МЭ, lg мкг/г (i = 7)	Нагрузки (loadings, a_{ij})		Вклад в главную компоненту (Contribution = $(a_{ij}^2 * 100) / \lambda_j$, %)	
	Главные компоненты (Principal Components – PC), j = 1,2			
	1	2	1	2
Cu	-0,97***	0,09	18,44	0,58
Zn	-0,97***	0,07	18,50	0,35
Mn	-0,97***	-0,17	18,67	1,92
Fe	-0,56**	-0,80***	6,18	43,88
Cd	-0,84***	-0,46*	13,80	14,27
Pb	-0,82***	0,50**	13,26	16,92
Ni	-0,75***	0,57**	11,14	22,07
	Собственные значения (eigenvalues, λ_j) PC		Дисперсия, объясненная PC (%)	
	5,07	1,47	72,42	21,02

Примечание: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$

Количественные соотношения между концентрациями тяжелых металлов в тканях медицинских пиявок были несколько иные, чем в донных отложениях, и, кроме того, обладали сезонными особенностями – весной они располагались в последовательности: Fe > Zn > Pb > Mn = Cu > Ni > Cd; летом и осенью ряды выглядели по-другому: Fe > Zn > Pb > Ni \geq Cu > Mn \geq Cd (табл. 4.1.3).

По данным результатов однофакторного дисперсионного анализа ANOVA характер сезонной динамики эссенциальных металлов Zn, Mn, Fe в тканях пиявок был однотипным – от весны к осени наблюдалось линейное снижение их концентраций (табл. 4.1.3, рис. 4.1.6-4.1.7).

Таблица 4.1.3 – Содержание эссенциальных и токсичных металлов
(мкг/г сухого вещества) в тканях медицинской пиявки

H. verbana в разные сезоны года

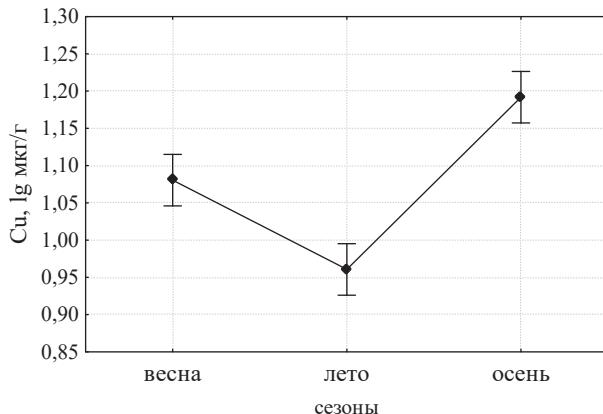
TM, мкг/г	1. Весна n = 10	2. Лето n = 10	3. Осень n = 10	p Tukey test
Cu	$11,12 \pm 0,45$ [10,10-12,13]	$8,25 \pm 0,48$ [7,17-9,33]	$14,57 \pm 0,25$ [14,01-15,14]	I-2: 0,000 I-3: 0,000 2-3: 0,000
Zn	$371,47 \pm 25,61$ [313,53-429,41]	$307,71 \pm 6,77$ [292,40-323,01]	$234,67 \pm 4,90$ [223,59-245,74]	I-2: 0,057 I-3: 0,000 2-3: 0,000
Mn	$11,99 \pm 0,25$ [11,42-12,56]	$7,30 \pm 0,23$ [6,77-7,83]	$6,47 \pm 0,24$ [5,93-7,01]	I-2: 0,000 I-3: 0,000 2-3: 0,056
Fe	$3435,27 \pm 14,40$ [3402,77-3467,78]	$2176,55 \pm 84,72$ [1984,89-2368,20]	$1955,75 \pm 23,15$ [1903,38-2008,12]	I-2: 0,000 I-3: 0,000 2-3: 0,010
Cd	$4,71 \pm 0,23$ [4,18-5,23]	$3,06 \pm 0,05$ [2,94-3,17]	$5,23 \pm 0,23$ [4,86-6,13]	I-2: 0,000 I-3: 0,064 2-3: 0,000
Pb	$16,83 \pm 0,61$ [15,45-18,21]	$13,99 \pm 0,48$ [12,92-15,08]	$17,26 \pm 0,48$ [16,17-18,35]	I-2: 0,002 I-3: 0,830 2-3: 0,000
Ni	$9,21 \pm 0,25$ [8,63-9,78]	$10,87 \pm 0,46$ [9,82-11,93]	$14,84 \pm 0,41$ [13,90-15,78]	I-2: 0,006 I-3: 0,000 2-3: 0,000

Очевидно, максимальную потребность в этих МЭ пиявки испытывают после выхода из зимнего анабиоза, когда активируются ферментные системы, в состав многих из которых в качестве кофермента входят эссенциальные металлы.

Летом, в период активного роста и основных репродуктивных процессов, уровень содержания Zn, Mn, Fe остается еще достаточно высоким.

Осенью, со снижением скорости обменных процессов у малоактивных пиявок, уходящих в зимний анабиоз, отмечалось минимальное содержание Zn, Fe, Mn (табл. 4.1.3, рис. 4.1.6-4.1.7).

$$F_{2,27} = 47.12, p = 0.000$$



$$F_{2,27} = 29.78, p = 0.000$$

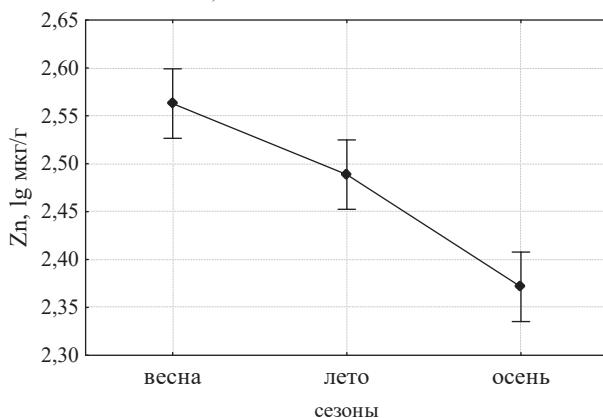


Рисунок 4.1.6 – Сезонная динамика концентраций меди и цинка ($\lg \text{мкг/г}$ сухого вещества) в тканях медицинской пиявки *H. verbana*

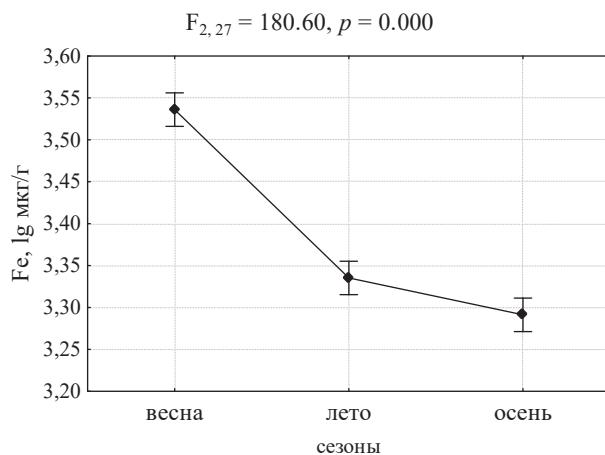
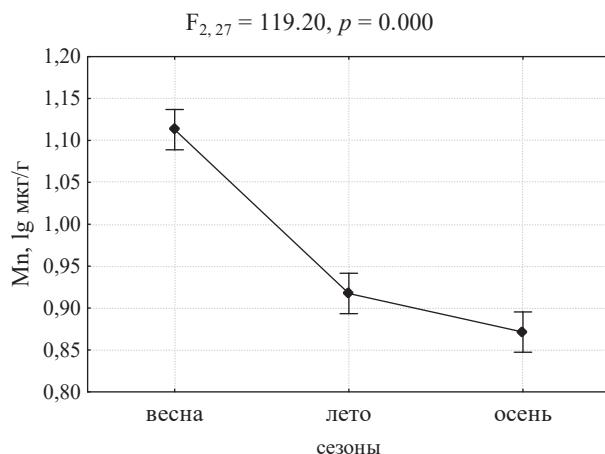
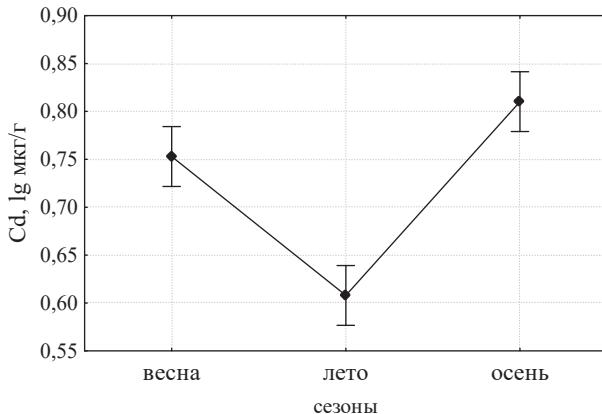


Рисунок 4.1.7 – Сезонная динамика концентраций марганца и железа (lg мкг/г сухого вещества) в тканях медицинской пиявки *H. verbana*

$$F_{2,27} = 46.86, p = 0.000$$



$$F_{2,27} = 11.66, p = 0.0002$$

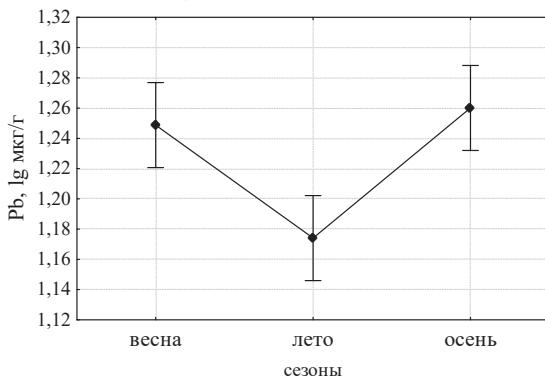


Рисунок 4.1.8 – Сезонная динамика концентраций кадмия и свинца ($\lg \text{мкг/г}$ сухого вещества) в тканях медицинской пиявки *H. verbana*

Обратная картина наблюдалась для сезонной динамики никеля (рис. 4.1.9), что связано, скорее всего, с тем, что Fe и Zn являются его антагонистами.

$$F_{2,27} = 52.89, p = 0.000$$

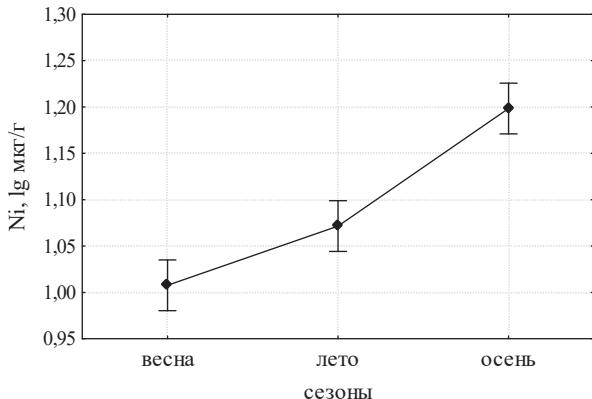


Рисунок 4.1.9 – Сезонная динамика концентраций никеля ($\lg \text{мкг}/\text{г}$ сухого вещества) в тканях медицинской пиявки *H. verbana*

У меди, кадмия и свинца характер сезонной динамики фазовый, с максимальными концентрациями осенью и минимальными – летом (рис. 4.1.6, 4.1.8). Вероятно, в период наращивания мышечной массы, сезонной линьки и откладки коконов, у пиявок происходит частичная элиминация этих металлов из организма.

Наибольшая сезонная вариабельность отмечена для тканевых концентраций Fe ($F_{2,27} = 180,60, p = 0,000$) и Mn ($F_{2,27} = 119,20, p = 0,000$), наименьшая – для Pb ($F_{2,27} = 11,66, p = 0,000$) (рис. 4.1.7, 4.1.9).

Методом главных компонент (PCA) визуализирована сезонная изменчивость микроэлементного спектра тканей аптечных пиявок (рис. 4.1.10, табл. 4.1.4).

Все экспериментальные данные разделились на три сезонные группы пиявок. Показано, что 49,22% общей дисперсии приходится на первую главную компоненту (PC1), 32,86% – на вторую главную компоненту (PC2) (рис. 4.1.10, табл. 4.1.4).

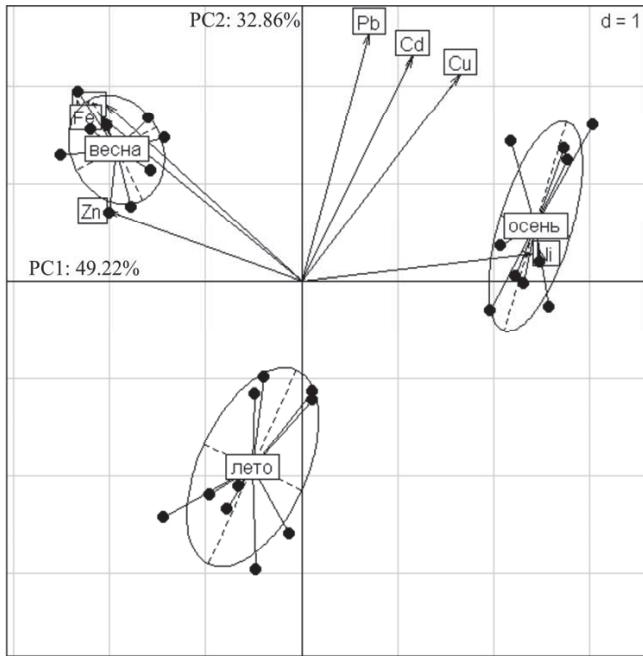


Рисунок 4.1.10 – Сезонное содержание эссенциальных и токсичных металлов в тканях медицинской пиявки *H. verbana* в пространстве главных компонент.

Наибольший вклад в сезонную изменчивость микроэлементного спектра тканей медицинских пиявок по первой компоненте (PC1) вносят Zn (17,87%), Mn (18,08%), Fe (18,64%), концентрации которых повышенны у весенних особей, а также Ni (25,19%), максимальное содержание которого выявлено у осенней группы пиявок (табл. 4.14).

Высокий вклад в дисперсию данных, объясненной второй главной компонентой (PC2), вносят Cu (19,58%), Cd (23.29%) и Pb (27,98%), минимальное содержание которых характерно для тканей медицинских пиявок в летний период (табл. 4.14).

Таблица 4.1.4 – Результаты компонентного анализа микроэлементного спектра тканей медицинской пиявки *H. verbana* в разные сезоны года

МЭ, lg мкг/г (i = 7)	Нагрузки (loadings, a_{ij})		Вклад в главную компоненту (Contribution = $(a_{ij}^2 * 100) / \lambda_j$, %)	
	Главные компоненты (Principal Components – PC), j = 1,2			
	1	2	1	2
Cu	0,64***	0,67***	11,90	19,58
Zn	-0,78***	0,23	17,87	2,26
Mn	-0,79***	0,57**	18,08	14,26
Fe	-0,81***	0,53**	18,94	12,29
Cd	0,45*	0,73***	5,84	23,29
Pb	0,27	0,80***	2,18	27,98
Ni	0,93***	0,09	25,19	0,34
	Собственные значения (eigenvalues, λ_i) PC		Дисперсия, объясненная PC (%)	
	3,45	2,30	49,22	32,86

Примечание: *– $p < 0,05$, **– $p < 0,01$, ***– $p < 0,001$

Одной из важнейших характеристик микроэлементного обмена гидробионтов является их способность к накоплению в тканях биологически активных металлов. При изучении биоаккумуляционной активности было обнаружено, что медицинские пиявки, независимо от сезона, являются макроконцентраторами Zn, Cd, Pb ($K_{BH} > 2$) и деконцентраторами Mn и Fe ($K_{BH} < 1$) (табл. 4.1.5).

Таблица 4.1.5 – Сезонная динамика коэффициентов биологического накопления (K_{BH}) тяжелых металлов у аптечной пиявки *H. verbana*

Сезоны / K_{BH}	Cu	Zn	Mn	Fe	Ni	Cd	Pb
Весна	2,16	16,1	0,07	0,72	0,97	3,23	2,59
Лето	2,01	15,9	0,05	0,62	1,06	2,43	2,07
Осень	1,96	7,57	0,03	0,44	1,17	3,51	2,04

Полученные значения $K_{БН}$ демонстрируют неоднозначный уровень накопления тяжелых металлов в тканях пиявок различных сезонов. Показано, что осенью медицинские пиявки снижают биоаккумуляционную активность к эссенциальному Cu, Zn, Mn, Fe и ксенобиотику Pb, но повышают ее по отношению к токсичным Ni и Cd (табл. 4.1.5). Данное обстоятельство обусловлено, скорее всего, замедлением обменных процессов, в том числе механизмов детоксикации и элиминации экотоксикантов, в организме пиявок при уходе в зимний анабиоз. Максимальные значения коэффициентов биологического накопления ($K_{БН}$) Cu, Zn, Mn, Fe и Pb выявлены у весенних особей пиявок, активизирующих обменные процессы. В летний период отмечено снижение аккумуляции кадмия.

Необходимо особо отметить потенциально высокую кумулятивную способность *H. verbana* к токсичным металлам Cd и Pb. Повышенная способность пиявок к накоплению этих токсикантов в условиях более сильного загрязнения водной среды может стать причиной нарушения их обменных процессов. С учетом низкой способности Cd к выведению из организма и высокой степени его аккумуляции в тканях пиявок, его продолжительное поступление может вызвать метаболические нарушения.

Высокие значения $K_{БН}$ свидетельствуют о биологической доступности и возможности ТМ включаться в физиологические и биохимические процессы организма. При физиолого-биохимическом подходе к аккумуляции тяжелых металлов в гидробионтах оказывается, что максимальная метаболическая потребность в них значительно ниже, чем фактическое содержание в организме. Однако повышение концентрации какого-либо металла в тканях и органах гидробионтов не является фактом токсического воздействия последнего на организм, а, напротив, высокий уровень биоаккумуляции отражает нормальное физиологическое состояние и способность организмов депонировать те или иные МЭ, что было подтверждено эмпирически на моллюсках (Betzer, Yevich, 1975).

Отмечено, что сезонная динамика содержания Zn и Mn в тканях *H. verbana* не зависит от сезонных колебаний их концентраций в ДО ($r = -0.36$; $p = 0.05$ и $r =$

-0.05 ; $p = 0.79$, соответственно) (рис. 4.1.11), а обусловлена физиологическими потребностями МП в данных МЭ на разных этапах биологического цикла.

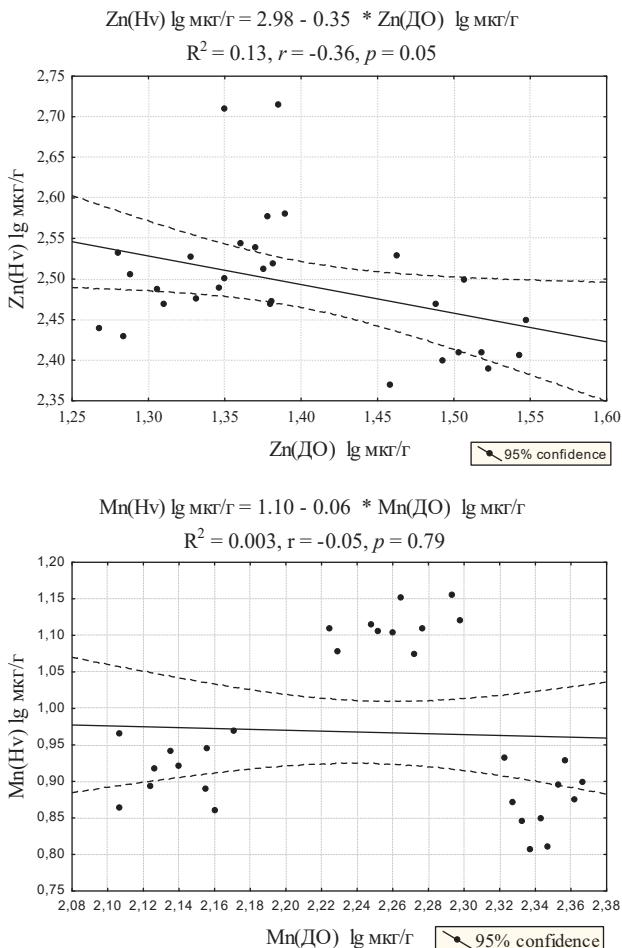


Рисунок 4.1.11 – Зависимость содержания Zn и Mn ($\lg \text{мкг/г}$ сухого вещества) в тканях аптечной пиявки *H. verbana* (Hv) от их концентраций ($\lg \text{мкг/г}$ сухого вещества) в донных отложениях (ДО)

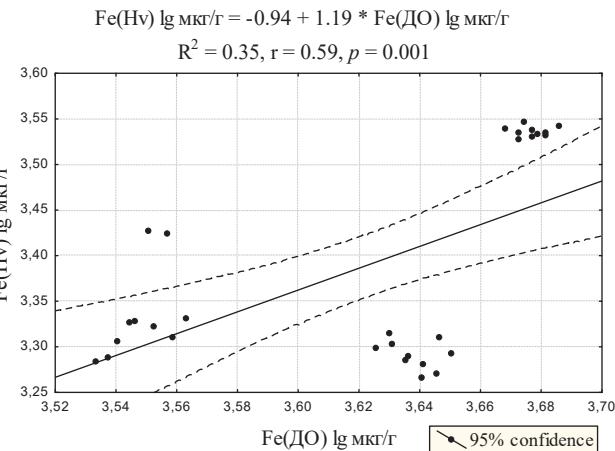
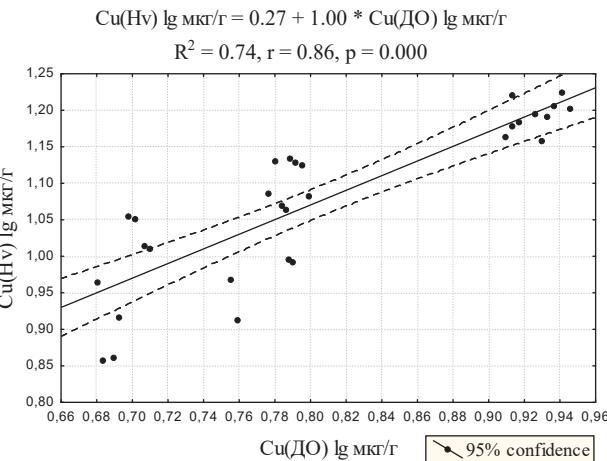
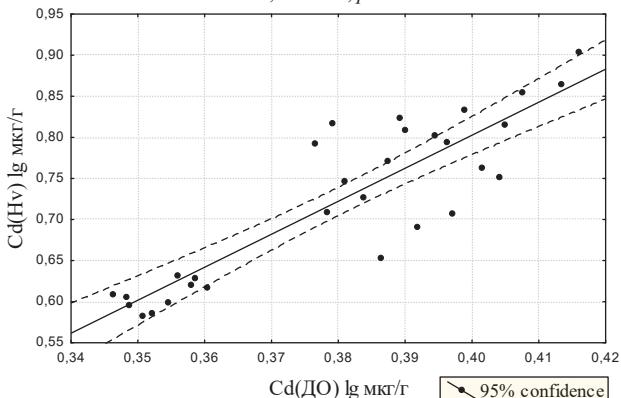


Рисунок 4.1.12 – Зависимость содержания Cu и Fe ($\lg \text{мкг/г}$ сухого вещества) в тканях аптечной пиявки *H. verbana* (Hv) от их концентраций ($\lg \text{мкг/г}$ сухого вещества) в донных отложениях (ДО)

Выявлена значимая корреляционная сильная связь для Cu ($r = 0.86; p = 0.000$), Cd ($r = 0.89; p = 0.000$), Ni ($r = 0.85; p = 0.000$) (рис. 4.1.12-4.1.13), что указывает на существенное влияние абиотических факторов среды на сезонную динамику этих металлов в тканях пиявок.

$$\text{Cd(Hv) lg мкг/г} = -0.80 + 4.02 * \text{Cd(ДО) lg мкг/г}$$

$$R^2 = 0.79, r = 0.89, p = 0.000$$



$$\text{Ni(Hv) lg мкг/г} = -0.38 + 1.37 * \text{Ni(ДО) lg мкг/г}$$

$$R^2 = 0.72, r = 0.85, p = 0.000$$

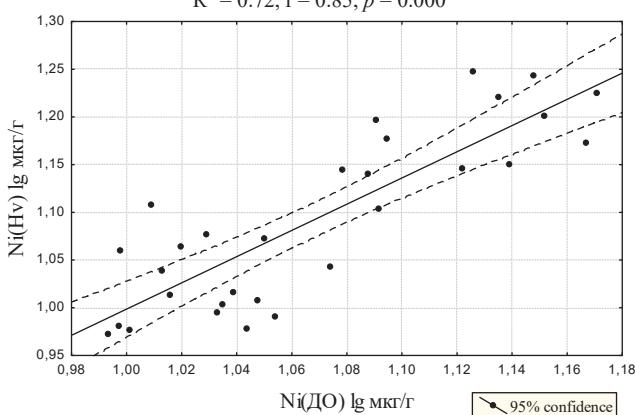


Рисунок 4.1.13 – Зависимость содержания Cd и Ni (lg мкг/г сухого вещества) в тканях аптечной пиявки *H. verbana* (Hv) от их концентраций (lg мкг/г сухого вещества) в донных отложениях (ДО)

Корреляционная связь средней силы обнаружена для железа ($r = 0.59; p = 0.000$), что свидетельствует о способности пиявок к частичной регуляции его содержания в организме (рис. 4.1.12). Для токсичного Pb, как и для Zn и Mn, не

обнаружено связи между концентрациями в тканях и среде обитания ($r = 0,31$; $p = 0,095$) (рис. 4.1.14).

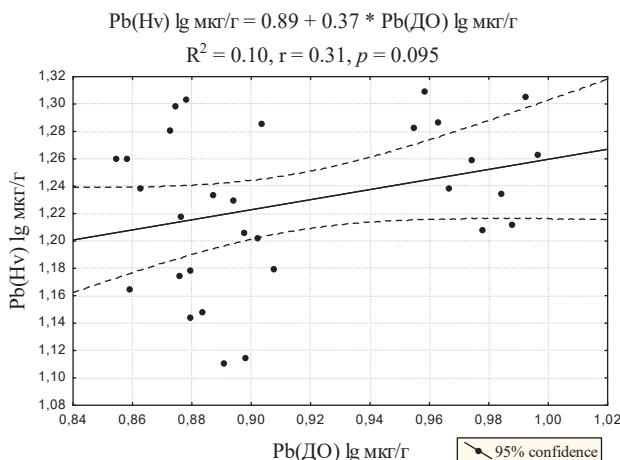


Рисунок 4.1.14 – Зависимость содержания Pb (lg мкг/г сухого вещества) в тканях аптечной пиявки *H. verbana* (Нv) от их концентраций (lg мкг/г сухого вещества) в донных отложениях (ДО)

Авторами ранее было показано, что в тканях медицинских пиявок, уходящих в зимний анабиоз, накапливаются высокие концентрации свободных аминокислот, обладающих детоксицирующими свойствами, что, несомненно, способствует связыванию избыточного количества тяжелых металлов, поступающих в организм *H. verbana*, в нетоксичные хелатные комплексы (Chernaya et al., 2015).

Закономерности формирования микроэлементного спектра в тканях хищной гирудиниды *H. sanguisuga* в разные сезоны года

В качестве дополнительной информации по сезонной изменчивости микроэлементного спектра тканей челюстных пиявок традиционно был использован фоновый для медицинских пиявок вид – *H. sanguisuga*. При изучении уровня содержания ТМ в донных отложениях (ДО) Белоярского водохранилища (Сверд-

ловская обл.), в котором были отловлены особи *H. sanguisuga*, было установлено что, сезонная динамика биофильных и токсичных ТМ имеет, как сходные тенденции, так и специфические различия. Из рисунка видно, что сезонная изменчивость грунтовых концентраций Cu, Zn, Mn, Fe, Ni и Cd имеет фазовый характер, а Pb – линейный (рис. 4.1.15).

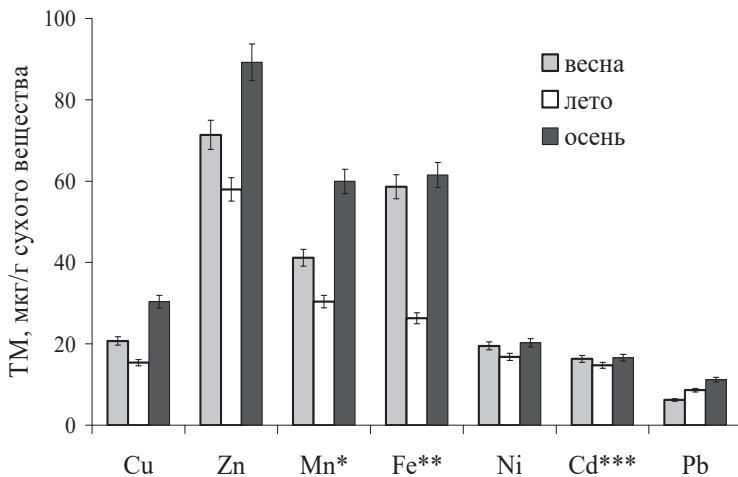


Рисунок 4.1.15 – Сезонная динамика содержания тяжелых металлов (ТМ) в донных отложениях из мест обитания большой ложноконской пиявки *H. sanguisuga* (вдхр. Белоярское, Свердловская обл.). Условные обозначения:
 *; **концентрации ТМ уменьшены в 10 и в 100 раз, соответственно,
 *** – увеличены в 10 раз

Максимальные концентрации Cu ($30,66 \pm 1,77$ мкг/г), Zn ($87,46 \pm 1,11$ мкг/г), Mn ($596,13 \pm 6,34$ мкг/г), Fe ($6172,68 \pm 30,01$ мкг/г), Pb ($10,82 \pm 0,41$ мкг/г) были отмечены в донных отложениях осенью ($p < 0,001$); Ni ($19,25 \pm 0,64$ и $20,41 \pm 0,58$ мкг/г), Cd ($1,64 \pm 0,02$ и $1,68 \pm 0,03$ мкг/г) – весной и осенью.

В летних пробах обнаружено меньше всего Cu ($15,81 \pm 0,77$ мкг/г), Zn ($57,49 \pm 1,92$ мкг/г), Mn ($298,44 \pm 5,11$ мкг/г), Fe ($2585,87 \pm 28,93$ мкг/г) ($p <$

0,001) и Ni ($17,37 \pm 0,48$ мкг/г) ($p < 0,01$). Минимальные грунтовые концентрации Pb ($6,23 \pm 0,20$ мкг/г) наблюдались в весенний период ($p < 0,001$), а Cd ($1,58 \pm 0,02$ мкг/г) – в летний ($p < 0,05$) (рис. 4.1.15).

По данным однофакторного дисперсионного анализа ANOVA наибольшая сезонная изменчивость характерна для грунтовых концентраций Fe ($F_{2,27} = 4342,3$), Mn ($F_{2,27} = 827,73$) и Pb ($F_{2,27} = 90,61$) ($p = 0,000$); несколько ниже – для Zn ($F_{2,27} = 63,15$) и Cu ($F_{2,27} = 64,63$) ($p = 0,000$). На уровень содержания токсичных металлов Ni и Cd в донных отложениях Белоярского водохранилища сезонный фактор оказывает наименьшее влияние ($F_{2,27} = 7,30$; $p = 0,003$ и $F_{2,27} = 4,65$; $p = 0,018$, соответственно).

Установлено, что сезонная динамика уровня содержания МЭ в тканях *H. sanguisuga* не так однозначна, как в абиотической компоненте (рис. 4.1.16).

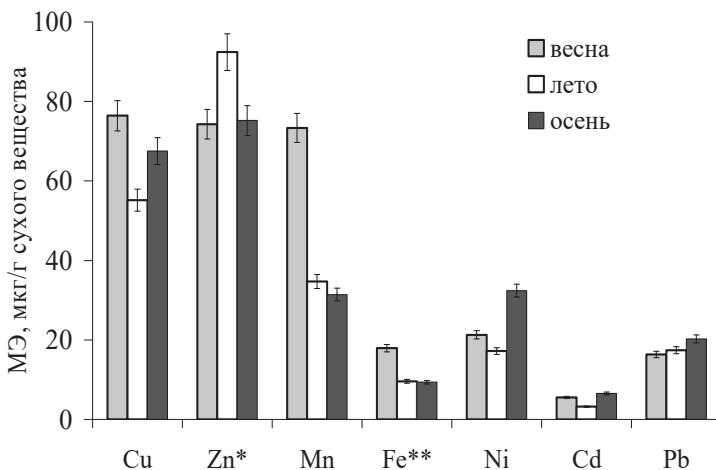


Рисунок 4.1.16 – Сезонная динамика уровня содержания микроэлементов (МЭ, мкг/г) в тканях хищной пиявки *H. sanguisuga*: Условные обозначения:

*, ** – концентрации МЭ уменьшены в 10 и в 100 раз, соответственно

Так, максимальные концентрации эссенциальных Cu ($76,38 \pm 2,13$ мкг/г), Mn ($72,14 \pm 2,36$ мкг/г) и Fe ($1796,31 \pm 18,36$ мкг/г) отмечены в тканях весенних, вышедших из зимнего анабиоза, особей *H. sanguisuga* ($p < 0,001$), а токсичных металлов Ni ($32,4 \pm 1,41$ мкг/г), Cd ($6,53 \pm 0,36$ мкг/г) и Pb ($20,3 \pm 1,16$ мкг/г) – у малоактивных осенних пиявок ($p < 0,01$).

В биогенном цинке пиявки нуждаются больше всего летом ($932,10 \pm 21,14$ мкг/г), в период спаривания и откладки коконов ($p < 0,001$).

Минимальные концентрации Cu ($55,69 \pm 2,07$ мкг/г), Ni ($17,14 \pm 0,43$ мкг/г) и Cd ($3,20 \pm 0,14$ мкг/г) обнаружены в тканях летних особей *H. sanguisuga* ($p < 0,01$); Fe ($881,70 \pm 22,08$ мкг/г) – у осенних ($p < 0,05$), Mn – у летних и осенних ($33,99 \pm 2,05$ и $31,39 \pm 2,04$ мкг/г, соответственно) ($p < 0,001$).

Свинца меньше всего содержится в тканях весенних и летних пробах тканей пиявок ($16,39 \pm 0,23$ мкг/г и $17,28 \pm 0,44$ мкг/г, соответственно) ($p < 0,01$).

Из рисунка видно, что от весны к осени у больших ложноконских пиявок линейно снижается потребность в эссенциальных металлах Mn и Fe, и накапливается в тканях Pb.

Дисперсионный анализ (ANOVA) показал, что сезонный фактор оказывает наибольшее влияние на уровень содержания в тканях ложноконских пиявок металлов: Fe ($F_{2, 27} = 385,08$), Cd ($F_{2, 27} = 172,67$), Ni ($F_{2, 27} = 181,87$), Mn ($F_{2, 27} = 72,09$) и Zn ($F_{2, 27} = 56,19$) ($p = 0,000$), наименьшее – Cu и Pb ($F_{2, 27} = 23,31$; $p = 0,000$ и $F_{2, 27} = 16,13$; $p = 0,000$, соответственно).

Анализ биоаккумуляционных способностей показал, что пиявка *H. sanguisuga*, независимо от сезона, является макроконцентратором Cu, Zn, Cd, ($K_{БН} > 2$), микроконцентратором Ni ($1 < K_{БН} < 2$) и деконцентратором Mn и Fe ($K_{БН} < 1$); по отношению к токсичному Pb характерна сезонная специфика (табл.4.1.6).

Вместе с тем, установлено, что осенью пиявка *H. sanguisuga* снижает биоаккумуляционную активность к эссенциальным Cu, Zn, Mn, Fe и токсичному Pb, но повышает ее по отношению к ксенобиотикам Cd и Ni.

Максимальные значения $K_{БН}$ Cu, Mn и Pb выявлены у весенней группы пиявок, Zn и Fe – у летних особей. Эффективная элиминация Ni и Cd из орга-

низма хищных гирудинид происходит летом, в период наращивания мышечной массы и откладки коконов (табл. 4.1.6).

Таблица 4.1.6 – Сезонная динамика показателей коэффициентов биологического накопления (K_{BH}) эсценциальных и токсичных металлов у хищной пиявки *H. sanguisuga*

Сезоны / K_{BH}	Cu	Zn	Mn	Fe	Ni	Cd	Pb
Весна	3,69	10,4	0,18	0,31	1,09	3,38	2,64
Лето	3,58	15,8	0,11	0,36	1,02	2,04	2,01
Осень	2,22	8,43	0,05	0,15	1,59	3,93	1,81

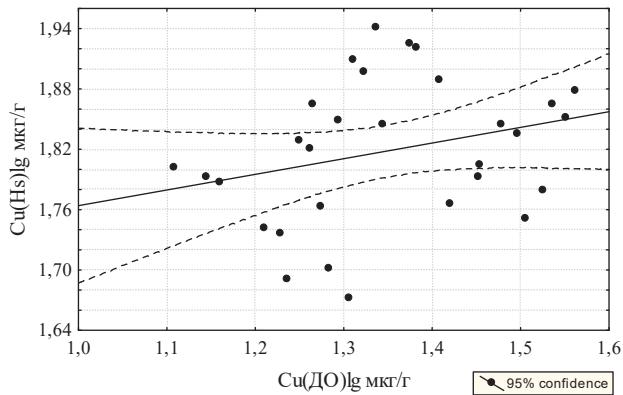
Регрессионный анализ, проведенный для поиска зависимости уровня содержания тяжелых металлов в тканях пиявок от их концентраций в донных отложениях, позволил выявить статистически значимую положительную корреляционную связь только для экотоксикантов: Cd ($r = 0,52; p = 0,003$), Pb ($r = 0,75; p = 0,000$) и Ni ($r = 0,61; p = 0,000$).

Для эсценциального цинка связь между изучаемыми параметрами оказалось сильной, но отрицательной – $r = -0,70; p = 0,000$, что указывает на способность пиявок регулировать его содержание в организме при смене времен года.

Установлено, что сезонная динамика уровня содержания Cu ($r = 0,28; p = 0,13$), Mn ($r = -0,11; p = 0,56$) и Fe ($r = 0,35; p = 0,06$) в тканях *H. sanguisuga* не зависит от изменения концентраций этих эсценциальных металлов в среде обитания, а обусловлена, в первую очередь, физиологическими потребностями пиявок в этих микроэлементах на разных этапах биологического цикла (рис. 4.1.17-4.1.20).

$$\text{Cu(Hs)lg} = 1.61 + 0.16 * \text{Cu(ДО)lg}$$

$$R^2 = 0.08, r = 0.28, p = 0.13$$



$$\text{Zn(Hs)lg} = 3.73 - 0.44 * \text{Zn(ДО)lg}$$

$$R^2 = 0.49, r = -0.70, p = 0.000$$

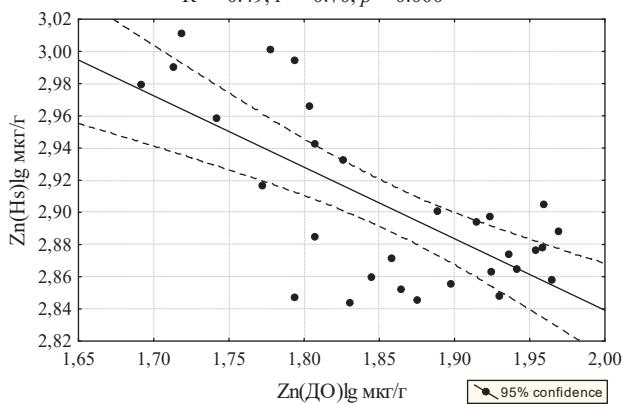


Рисунок 4.1.17 – Зависимость содержания эсценциальных металлов Cu и Zn (lg мкг/г сухого вещества) в тканях хищной пиявки *H. sanguisuga* (Hs) от их концентраций (lg мкг/г сухого вещества) в донных отложениях (ДО)

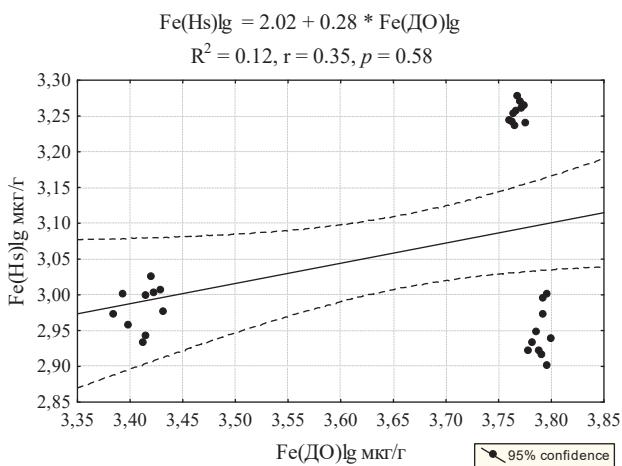
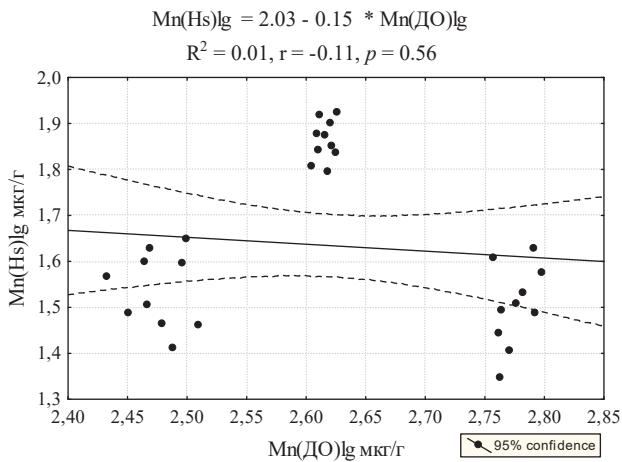


Рисунок 4.1.18 – Зависимость содержания эссенциальных металлов Mn и Fe (lg мкг/г сухого вещества) в тканях хищной пиявки *H. sanguisuga* (Hs) от их концентраций (lg мкг/г сухого вещества) в донных отложениях (ДО)

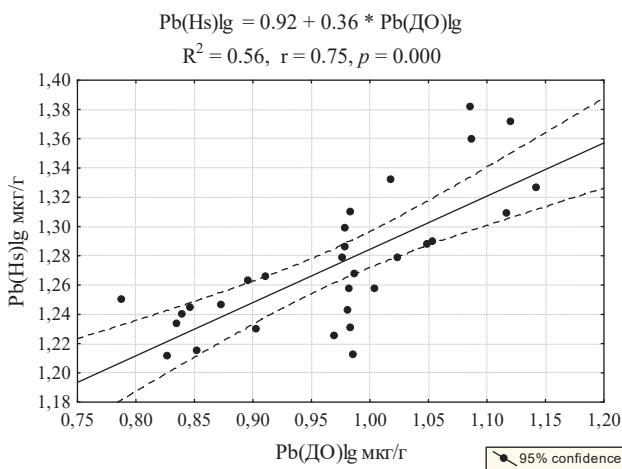
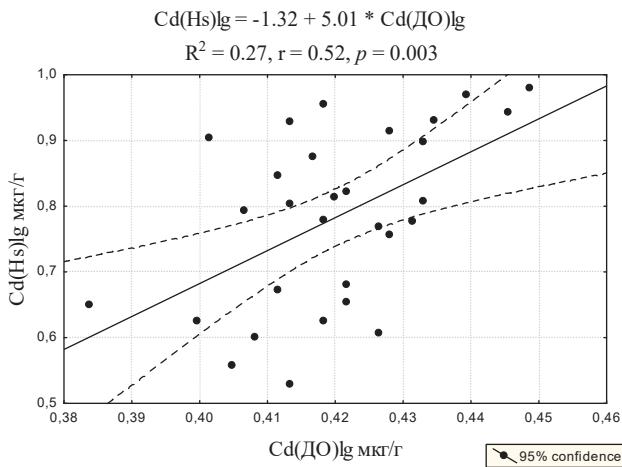


Рисунок 4.1.19 – Зависимость содержания токсичных металлов Cd и Pb (lg мкг/г сухого вещества) в тканях хищной пиявки *H. sanguisuga* (Hs) от их концентраций (lg мкг/г сухого вещества) в донных отложениях (ДО)

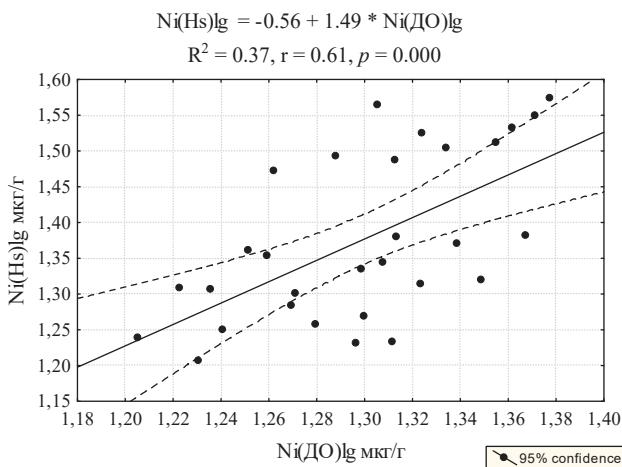


Рисунок 4.1.20 – Зависимость содержания Ni (\lg мкг/г сухого вещества) в тканях хищной пиявки *H. sanguisuga* (Hs) от их концентраций (\lg мкг/г сухого вещества) в донных отложениях (ДО)

При сравнительной оценке было установлено, что пиявки *H. verbana* и *H. sanguisuga*, независимо от трофической специализации, в осенний период снижают биоаккумуляционную активность к эссенциальным металлам Cu, Zn, Mn, Fe и токсичному Pb, но повышают ее по отношению к токсичным Ni и Cd (табл. 4.1.7).

Подобные сезонные закономерности характерны и для пресноводных моллюсков (Шаплыгина и др., 2013). Данное обстоятельство обусловлено, скорее всего, замедлением обменных процессов, в том числе механизмов элиминации токсичных металлов, при уходе кровососущих и хищных пиявок в зимний анабиоз. Вместе с тем, летом, в период наращивания мышечной массы, сезонной линьки и откладки коконов, у обоих видов гирудинид, на фоне снижения концентраций эссенциальных металлов Cu, Mn, Fe в тканях, отмечена частичная элиминация экотоксикантов Ni и Cd из организма.

Таблица 4.1.7 – Сезонные особенности микроэлементного обмена кровососущих (*H. verbana*) и хищных (*H. sanguisuga*) пиявок

МЭ	<i>H. verbana</i> (n = 30)			<i>H. sanguisuga</i> (n = 30)		
	K_{BH} max/min	r	p	K_{BH} max/min	r	p
Cu	весна / осень	0,86	0,000	весна / осень	0,28	0,13
Zn	весна / осень	-0,36	0,05	лето / осень	-0,70	0,000
Mn	весна / осень	-0,05	0,79	весна / осень	-0,11	0,56
Fe	весна / осень	0,56	0,001	лето / осень	0,35	0,06
Cd	осень / лето	0,89	0,000	осень / лето	0,52	0,003
Pb	весна / осень	0,31	0,09	весна / осень	0,75	0,000
Ni	осень / лето	0,85	0,000	осень / лето	0,61	0,000

Примечание: K_{BH} max/min – времена года с максимальными и минимальными коэффициентами биологического накопления ТМ, r – коэффициент линейной корреляции.

Показано, что при смене времен года общими тенденциями для хищных и кровососущих пиявок является способность к физиологической регуляции в тканях Mn, независимо от сезонной динамики этого эссенциального металла в абиотической компоненте. Вариабельность концентраций экотоксикантов Ni и Cd в тканях *H. verbana* и *H. sanguisuga* напрямую зависит от сезонной динамики содержания этих металлов в донных отложениях. Вместе с тем корреляционные связи для эссенциальных металлов Cu, Zn, Fe и ксенобиотика Pb в системе «ткань пиявок – донные отложения» обусловлены эколого-физиологическими особенностями медицинских и больших ложноконских пиявок.

4.2. Возрастные особенности микроэлементного спектра в тканях хищных и кровососущих пиявок

Все наши предыдущие исследования были проведены с использованием взрослых особей медицинских пиявок. Между тем возрастные различия в содержании МЭ в тканях *H. sanguisuga* и *H. verbana* могут стать дополнительными информативными показателями при изучении роли биологически активных соединений в онтогенезе хищных и кровососущих пиявок. Тем более что челюстные пиявки отличаются от других представителей гирудофауны Палеарктики более высокой продолжительностью жизни – пять и более лет (Лукин, 1976).

Рост и развитие животных обеспечиваются образованием новых клеток и нарастанием тканей, что немыслимо без микроэлементов. Известно, что биогенные МЭ участвуют в водном, белковом, углеводном и липидном обменах, образуют с гормонами, витаминами, аминокислотами и ферментами внутрикомплексные соединения, способствуя их биохимической активности, обезвреживают токсины и т. д. (Агаджанян, Скальный, 2001; Оберлис и др., 2008).

Уровень содержания микроэлементов в тканях молодых и взрослых особей H. verbana из природных популяций

Биология гирудинид изучена довольно хорошо. Известно, что они размножаются летом, откладывают коконы во влажный грунт прибрежной полосы водоемов. Через месяц из коконов выходит молодь, которая растет и развивается довольно медленно – половая зрелость у челюстных пиявок наступает только в трехлетнем возрасте (Лукин, 1976). В природе невозможно определить точный возраст пиявок, поэтому в дальнейшем мы будем оперировать терминами «молодь» и «взрослые особи».

Масса тела молоди *H. verbana*, используемых в эксперименте, составила $0,14 \pm 0,08$ г, взрослых особей – $1,83 \pm 0,24$ г.

Результаты спектрофотометрического анализа показали, что молодь медицинских пиявок содержит в своих тканях изучаемые микроэлементы в следую-

щей последовательности: Fe > Zn > Ni > Cu = Pb > Mn > Cd; взрослые особи *H. verbana*: Fe > Zn > Pb > Ni > Cu > Mn > Cd. Полученные ряды отражают различия в минеральных потребностях взрослых и растущих пиявок. Показано, что развивающиеся медицинские пиявки нуждаются в эссенциальной меди больше, нежели полновозрелые особи. Для молоди *H. verbana* также характерна пониженная аккумулятивная активность к токсичному свинцу.

Количественная оценка микроэлементного спектра тканей медицинских пиявок различных возрастных групп показала, что в тканях взрослых особей, в отличие от молоди, содержится значительно больше цинка (в 1,21 раз), железа (в 1,13 раз) и свинца (в 1,30 раз), но меньше меди (в 1,27 раз), марганца (в 1,20 раз), никеля (в 1,18 раз) и кадмия (в 1,38 раз) ($p < 0,05$) (табл. 4.2.1).

Таблица 4.2.1 – Содержание эссенциальных и токсичных металлов (мкг/г сухого вещества) в тканях медицинских пиявок различных возрастных групп

TM мкг/г	Взрослые n = 10	Молодь n = 10 (25)*	<i>p</i> Tukey test
Cu	$8,25 \pm 0,48$ [7,17-9,33]	$10,51 \pm 0,32$ [9,78-11,23]	0,000
Zn	$307,71 \pm 6,77$ [292,40-323,01]	$253,98 \pm 4,42$ [243,94-264,04]	0,000
Mn	$7,30 \pm 0,23$ [6,77-7,83]	$8,78 \pm 0,28$ [8,15-9,40]	0,043
Fe	$2176,55 \pm 84,72$ [1984,89-2368,20]	$1929,26 \pm 9,77$ [1907,17-1951,36]	0,005
Cd	$3,06 \pm 0,05$ [2,94-3,17]	$4,21 \pm 0,06$ [4,07-4,35]	0,000
Pb	$13,99 \pm 0,48$ [12,92-15,08]	$10,76 \pm 0,31$ [10,07-11,48]	0,000
Ni	$10,87 \pm 0,46$ [9,82-11,93]	$12,88 \pm 0,35$ [12,08-13,67]	0,004

Примечание: * – количество проб (особей)

Обнаруженные возрастные различия в содержании, как эссенциальных, так и токсичных металлов в тканях *H. verbana* обусловлены, в первую очередь, особенностями пищевого рациона взрослых и растущих пиявок. Молодь медицинских пиявок способна прокусить только кожу земноводных, в то время как

взрослые особи *H. verbana* сосут кровь всех классов позвоночных, отдавая предпочтение млекопитающим (крупному рогатому скоту и человеку).

В то же время при анализе микроэлементного состава разновозрастных групп пиявок, следует учитывать и физиологические особенности развивающихся и половозрелых животных. Например, известно, что Zn и Fe, повышенное содержание которых были отмечены в тканях взрослых пиявок, принимают активное участие в репродуктивных процессах. Цинк относится к числу микроэлементов, активно участвующих в обменных процессах организма, влияющих на их рост и нормальное развитие. Цинк обнаружен в составе более 200 ферментов, относящихся ко всем шести классам, включая гидролазы, трансферазы, оксидоредуктазы, лиазы, лигазы и изомеразы. Железо входит в состав гемоглобина, протоплазмы всех клеток и в состав цитохромов, участвующих в процессах тканевого дыхания (Авцын и др., 1991; Скальный, 2004).

Растущим и развивающимся организмам необходимы в достаточном количестве эссенциальные микроэлементы Mn и Cu, повышенные концентрации которых отмечены в тканях молоди медицинских пиявок. Физиологическое значение Mn определяется его активизирующей ролью в процессах фосфорилирования, а, следовательно, и углеводного обмена. Марганец необходим для нормального функционирования центральной нервной системы, для процессов роста и развития животных. Медь входит в состав целого ряда ферментов-оксидаз и участвует в биохимических процессах как составная часть ферментов, осуществляющих реакции окисления субстратов молекулярным кислородом (Авцын и др., 1991).

Концентрации Cd и Ni, по нашим данным, существенно ниже у взрослых пиявок. Никель относится к числу микроэлементов, необходимых для нормального развития живых организмов, однако о его роли в живых организмах известно немного.

Известно, что Ni принимает участие в ферментативных реакциях у животных. Предполагается, что биологическая роль Ni заключается в участии структурной организации и функционировании основных клеточных компонентов –

ДНК, РНК и белка. Наряду с этим он присутствует и в гормональной регуляции организма (Биоэлементный статус..., 2011).

Кадмий хорошо известен, как токсичный элемент, но он же, наряду с никелем, относится к группе «новых» биофильных микроэлементов и в низких концентрациях способен стимулировать рост некоторых животных (Авцын и др., 1991). По некоторым данным, соединения Cd играют важную роль в процессе жизнедеятельности животных и человека, например, активирует ряд ферментов, являющихся в норме цинксодержащими энзимами (Kostial, 1986; Anke et al., 2004).

Взрослые животные, в отличие от молодых, как правило, обладают более совершенными механизмами детоксикации и элиминации чужеродных элементов (Моисеенко, 2009). Несомненный вклад в элиминацию Cd вносит его метаболический антагонист – Zn, повышенное содержание которого было выявлено у взрослых особей медицинских пиявок.

Анализ биоаккумуляционных способностей взрослых и молодых особей *H. verbana* показал, что пиявки, независимо от возраста являются макроконцентраторами Cu, Zn, Cd, ($K_{BH} > 2$), микроконцентраторами Ni ($1 < K_{BH} < 2$) и деконцентраторами Mn и Fe ($K_{BH} < 1$); по отношению к токсичному Pb отмечена возрастная специфика (табл. 4.2.2)

Таблица 4.2.2 – Коэффициенты биологического накопления (K_{BH}) тяжелых металлов у медицинской пиявки *H. verbana* различных возрастных групп

Возраст / K_{BH}	Cu	Zn	Mn	Fe	Ni	Cd	Pb
Взрослые	2,01	15,9	0,05	0,62	1,06	2,43	2,08
Молодь	2,56	13,1	0,06	0,55	1,25	3,34	1,60

Для полноты картины по возрастной изменчивости микроэлементного спектра челюстных пиявок нами были использованы, как и в случае с сезонной вариабельностью МЭ, особи большой ложноконской пиявки *H. sanguisuga* из

вдхр. Белоярского. Масса тела молоди хищных пиявок, используемых в эксперименте, составила $0,13 \pm 0,06$ г, взрослых особей – $2,30 \pm 0,41$ г.

Обнаружено, что в тканях молоди *H. sanguisuga* концентрации изучаемых микроэлементов располагаются в ряду: Zn > Fe > Mn > Cu > Pb > Ni > Cd. Для взрослых особей этот ряд выглядит иначе: Fe = Zn > Cu > Mn > Pb = Ni > Cd. Из полученных рядов видно, что в тканях молодых особей *H. sanguisuga*, в отличие от взрослых пиявок, Zn содержится значительно больше, чем Fe. Растущие пиявки демонстрируют большую потребность в Mn и меньшую в Cu, нежели сформировавшиеся особи *H. sanguisuga*.

В тканях взрослых особей *H. sanguisuga*, в сравнении с ее молодью, значительно повышены концентрации Cu (в 1,45 раз), Zn (в 1,26 раз), Fe (в 1,73 раз) и Ni (в 1,38 раз), но существенно понижено содержание Mn (в 1,68 раз) и экотоксикантов Pb (в 1,34 раз) и Cd (в 1,41 раз) ($p < 0,001$) (табл. 4.2.3).

Таблица 4.2.3 – Содержание ТМ (мкг/г сухого вещества)

в тканях *H. sanguisuga* различных возрастных групп

TM мкг/г	Взрослые n = 10	Молодь n = 10 (25)	<i>p</i> Tukey test
Cu	$55,92 \pm 2,09$ [51,20-60,64]	$38,33 \pm 0,97$ [36,13-40,52]	0,000
Zn	$927,69 \pm 21,08$ [880,01-975,39]	$737,58 \pm 7,56$ [720,48-754,68]	0,000
Mn	$34,68 \pm 2,16$ [29,79-39,58]	$58,16 \pm 2,79$ [51,83-64,49]	0,000
Fe	$959,45 \pm 19,93$ [914,36-1004,54]	$556,07 \pm 7,12$ [539,97-572,18]	0,000
Cd	$3,23 \pm 0,11$ [2,99-3,46]	$4,54 \pm 0,06$ [4,54 [4,41-4,67]	0,000
Pb	$17,26 \pm 0,44$ [16,24-18,62]	$23,06 \pm 0,44$ [22,06-24,07]	0,000
Ni	$17,12 \pm 0,47$ [16,05-18,19]	$12,37 \pm 0,38$ [11,50-13,24]	0,000

Примечание: * – количество проб (особей)

Обнаруженные возрастные различия в содержании, как эссенциальных, так и токсичных металлов в тканях *H. sanguisuga* обусловлены различием трофического спектра взрослых и растущих пиявок. Так, взрослые особи большой ложноконской пиявки питаются как разнообразными водными и околоводными беспозвоночными, так и мелкими позвоночными животными: мальками рыб, головастиками и т. д. Для молоди *H. sanguisuga*, в силу небольших ее размеров, в качестве «жертв» доступны только мелкие беспозвоночные.

При оценке биоаккумуляционных способностей взрослых и молодых особей *H. sanguisuga* было установлено, что пиявки, независимо от возрастной специфики биоэлементного спектра тканей, являются макроконцентраторами Cu, Zn, Cd ($K_{BH} > 2$) и деконцентраторами Mn, Fe и Ni ($K_{BH} < 1$) (табл. 4.2.4)

Таблица 4.2.4 – Коэффициенты биологического накопления (K_{BH}) тяжелых металлов у возрастных групп хищной пиявки *H. sanguisuga*

Возраст / K_{BH}	Cu	Zn	Mn	Fe	Ni	Cd	Pb
Взрослые	3,53	16,1	0,12	0,37	0,99	2,04	2,01
Молодь	2,42	12,8	0,19	0,22	0,37	2,87	2,68

Сравнительный анализ возрастной специфики микроэлементного спектра тканей кровососущих и хищных гидрудинид

Результаты сравнительной оценки микроэлементного обмена медицинских и больших ложноконских пиявок всех экспериментальных групп показали, что независимо от возраста и биотопической приуроченности, гематофаги *H. verbana* отличаются от хищников *H. sanguisuga* пониженным содержанием в тканях эссенциальных микроэлементов Cu, Zn, Mn и экотоксиканта Pb, но повышенным – биофильного Fe (Tukey test, $p < 0.001$) (рис. 4.2.1). Заметим, что подобная трофическая специфика микроэлементных спектров тканей челюстных пиявок обсуждалась нами в предыдущей главе.

Вместе с тем, несмотря на эколого-физиологическую специфику микроэлементного спектра тканей изучаемых групп пиявок, для *H. verbana* и *H. sanguisuga* выявлены общие возрастные особенности – в тканях взрослых особей, по сравнению с молодью, повышенено содержание Zn и Fe, и понижено – Mn и Cd (рис. 4.2.1).

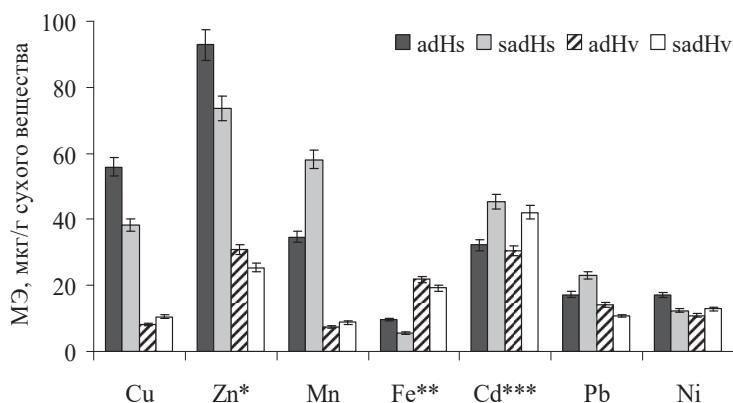


Рисунок 4.2.1 – Содержание эсценциальных и токсичных микроэлементов (МЭ, мкг/г сухого вещества) в тканях взрослых (ad) и молодых (sad) особей медицинской *H. verbana* (Hv) и ложноконской *H. sanguisuga* (Hs) пиявок.

Условные обозначения: * , ** – концентрации МЭ уменьшены в 10 и в 100 раз,

*** – увеличены в 10 раз, соответственно

Следует отметить, что молодь обоих видов пиявок, независимо от региона обитания, депонирует в тканях сопоставимые концентрации токсичных металлов Cd ($p = 0,05$) и Ni ($p = 0,82$). У взрослых особей *H. sanguisuga* и *H. verbana* подобное сходство отмечено только для Cd ($p = 0,34$).

Обобщая полученные нами данные по биоаккумуляционной активности всех исследуемых пиявок можно заключить, что молодь гематофагов отличается от особей остальных возрастных и трофических групп более высокой аккумуляцией никеля и кадмия, а молодь хищников – марганца и свинца. Для взрослых

гирудинид характерна максимальная накопительная способность железа (*H. verbana*) и меди (*H. sanguisuga*) (табл. 4.2.5).

Таблица 4.2.5 – Коэффициенты биологического накопления ($K_{БН}$) тяжелых металлов у гирудинид различных возрастных групп

Возраст / $K_{БН}$	Cu	Zn	Mn	Fe	Ni	Cd	Pb
<i>H. verbana</i> (n = 20)							
Взрослые	2,01	15,9	0,05	0,62	1,06	2,43	2,08
Молодь	2,56	13,1	0,06	0,55	1,25	3,34	1,60
<i>H. sanguisuga</i> (n = 20)							
Взрослые	3,53	16,1	0,12	0,37	0,99	2,04	2,01
Молодь	2,42	12,8	0,19	0,22	0,37	2,87	2,68

Глава 5. ФОРМИРОВАНИЕ МИКРОЭЛЕМЕНТНОГО СПЕКТРА ТКАНЕЙ И СЕКРЕТА СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ МЕДИЦИНСКИХ ПИЯВОК В ГИРУДОКУЛЬТУРЕ

В России уже с середины прошлого века медицинских пиявок выращивают на биофабриках по методике, разработанной профессором Г. Г. Щеголевым с сотрудниками (Синева, 1944; 1949; Щеголев, 1946, 1948). Суть метода заключается в том, что медицинских пиявок отлавливают из природных водоемов, доставляют на биофабрику, где их кормят кровью крупного рогатого скота и обеспечивают им необходимые условия для размножения. Тонкости биотехнологии воспроизведения пиявок не разглашаются и являются собственностью каждой биофабрики. Основными этапами реализации технологии разведения являются спаривание «маточного» поголовья пиявок, выборка молоди и ускоренное ее раскармливание до размеров готовой продукции. Как правило, весь цикл выращивания медицинских пиявок занимает 8-12 месяцев, в то время как в природе, они достигают нужных размеров только на третий год жизни (Лукин, 1976; Никонов, 2007).

В настоящее время на территории России официально действует шесть биофабрик по выращиванию медицинских пиявок: в Санкт-Петербурге, в Саратовской области (г. Балаково), в Краснодарском крае (ст. Каневская) и Алтайском крае (г. Барнаул) и две в Московской области (ст. Удельная и г. Люберцы). В гирудокультуре используют, как правило, особей двух видов медицинских пиявок *H. medicinalis* и *H. verbana*, различающихся между собой, как по географическому происхождению, так и по некоторым физиологическим параметрам (Рассадина, Романова, 2008; Черная и др., 2014).

К настоящему времени мировой литературе представлен обширный фактический материал по фармакологическим аспектам применения биологически активных соединений, продуцируемых медицинскими пиявками, тем не менее, комплексные сведения, касающиеся физиологического состояния медицинской пиявки, выращенной в искусственных условиях, практически отсутствуют. Нет полного представления о фоновом содержании эссенциальных и токсичных ме-

таллов в гомогенатах тканей и секрете слюнных желез пиявок из гирудокультуры, используемых в гиудофармакологии и косметологии. Исследования в эколого-физиологическом сравнительном аспекте медицинской пиявки из природных популяций и гирудокультуры практически отсутствуют как на популяционном, организменном, так и на клеточном уровне, в то время как оценка физиологического состояния с позиции оптимального биоэлементного баланса в организме способна пролить свет и на резервные адаптивные возможности медицинских пиявок в перманентно изменяющихся условиях среды обитания.

В данной главе будут рассмотрены видовые и региональные особенности микроэлементного состава тканей двух видов медицинских пиявок из гирудокультуры четырех биофабрик России. Приводятся данные сравнительного анализа биоэлементного статуса пиявок из гирудокультуры и их «предков» – особей из природных популяций. На примере модельного вида аптечной пиявки *H. verbana*, будут изучены возрастные закономерности формирования биоэлементного спектра тканей медицинских пиявок и его изменчивость в системе «гомогенаты тканей – слюнные железы – секрет слюнных желез». Кроме того, в целях получения представлений о закономерностях видовой, популяционной и трофической вариабельности энергетических и морфофизиологических параметров гирудинид, связанных с экологическими особенностями условиями обитания или содержания, нами предварительно был проведен анализ основного обмена двух видов медицинских пиявок: лечебной *H. medicinalis* и аптечной *H. verbana* и фонового для них вида – большой ложноконской пиявки *H. sanguisuga*.

5.1. Видовые, трофические и популяционные особенности основного обмена медицинских пиявок

Сравнительный анализ основного обмена двух видов медицинских пиявок из гирудокультуры показал наличие статистически значимых межвидовых различий у особей по потреблению кислорода (рис. 5.1.1) ($p < 0,001$).

Так, у аптечных медицинских пиявок *H. verbana*, выращенных на биофабрике («Гирудо-Мед.Юг», Краснодарский край) уровень основного обмена достигает $0,86 \pm 0,069$ млО₂/г·час, что значимо, в 1,34 раз выше этих показателей, обнаруженных у лечебных пиявок *H. medicinalis*, выращенных в подобных условиях (биофабрика «ГирудИ.Н.», Саратовская обл.), у которых он составляет – $0,64 \pm 0,035$ млО₂/г·час ($p < 0,001$). Обсуждаемый уровень основного обмена обоих видов медицинских пиявок из гирудокультуры относится особям, голодающим три месяца.

Видоспецифичность энергетического обмена медицинских пиявок обусловлена, как климатогеографическими различиями мест обитания «предков» опытных особей, так и их эколого-физиологическими особенностями.

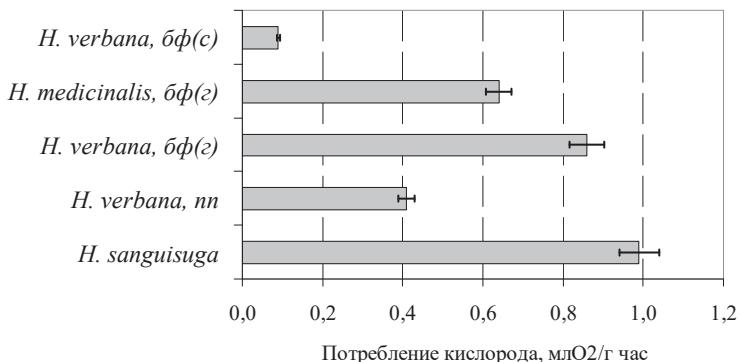


Рисунок 5.1.1 – Потребление кислорода (млО₂/г·час) у челюстных пиявок различных эколого-физиологических групп. Условные обозначения:
пп – природные популяции, бф – биофабрика, (г) – голодные особи,
(с) – сытые особи

При изучении популяционных различий потребления кислорода мы использовали особей аптечных медицинских пиявок *H. verbana* из природных популяций, отловленных в реке Челбас (Краснодарский край) в первую декаду мая на их выходе из зимнего анабиоза. Отсутствие крови в кишечнике опытных пиявок

вок и их масса ($0,78 \pm 0,14$ г) позволили оценить их физиологическое состояние, как «голодные», и репрезентативно сопоставить их уровень основного обмена ($\text{млO}_2/\text{г}\cdot\text{час}$) с аналогичными показателями у особей этого же вида (*H. verbana*), но выращенных в искусственных условиях (масса опытных пиявок из гирудокультуры с периодом голодания три месяца составила $0,79 \pm 0,23$ г).

Показано, что при одинаковом физиологическом состоянии особей двух опытных групп уровень основного обмена медицинских пиявок, выращенных на биофабрике ($0,86 \pm 0,069$ $\text{млO}_2/\text{г}\cdot\text{час}$) вдвое превышает аналогичные показатели этого же вида пиявок ($0,41 \pm 0,027$ $\text{млO}_2/\text{г}\cdot\text{час}$) из природных популяций (р. Челбас, Краснодарский край) ($p < 0,001$) (рис. 5.1.1).

Аптечные пиявки из природных популяций потребляют кислорода меньше, чем особи обоих видов (*H. medicinalis* и *H. verbana*) из гирудокультуры ($p < 0,001$). Сравнительный анализ показал, что пиявки, выращенные в искусственных условиях, потребляют кислород интенсивнее, на порядок выше, чем пиявки из природных популяций.

Действие на животный организм разного рода экстремальных факторов всегда сопряжено с энергетическими затратами отдельных систем и целого организма. Условия содержания пиявок в искусственных условиях биофабрики 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 гирудокультуре медицинские пиявки достигают половой зрелости не в 3 года, как в природе, а за 8-12 месяцев.

По нашему мнению, ускоренному половому созреванию особей медицинских пиявок, выращиваемых на биофабриках, помимо прочих условий, способствует повышенный уровень энергетического обмена.

Морфометрический анализ показал, что масса сытых медицинских пиявок *H. verbana* превышает вес голодных особей более чем в пять раз: средняя масса голодных пиявок составила $0,79 \pm 0,23$ г, а сытых – $4,33 \pm 0,87$ г ($p < 0,05$). В опыте (при расчете на особь) наблюдали повышение потребления кислорода у

сытых пиявок, что совпадает с литературными данными (Прессер, 1977). Известно, что общее потребление кислорода растет с размером животного, но потребление на единицу веса при этом падает (Константинов, 1979).

Установлено, что интенсивность потребления кислорода у медицинских пиявок, выращенных на биофабрике, зависит от физиологического состояния особей. Так, уровень основного обмена пиявок *H. verbana* в состоянии голода достигает $0,86 \pm 0,069$ млО₂/г·час, что превышает интенсивность потребления кислорода сытых пиявок ($0,09 \pm 0,009$ млО₂/г·час) в 9,6 раз ($p = 0,001$) (Ковалчук и др., 2007) (рис. 5.1.1).

Аналогичные статистически значимые различия по основному обмену между голодными и сытыми особями медицинской пиявки наблюдаются и в природных популяциях (Herter, 1968). Согласно литературным данным, подобные особенности основного обмена свойственны и другим гидробионтам: у олигохеты *Tubifex tubifex* и *Limnodrilus rivalis*, а также у личинок комара *Procladius* наблюдалось повышение величины дыхания во время голодания (Константинов, 1979).

Поскольку интенсивность дыхания гидробионтов в сильнейшей степени зависит от их физиологического состояния: подвижности, половой зрелости, насыщения и т. д., данный факт можно объяснить усиленной подвижностью голодных особей, направленной на поиск жертвы.

Вероятно, морфофизиологические особенности и, в основном, сильное развитие паренхимы, богатой запасными веществами, обеспечивают пиявкам возможность долго обходиться без пищи на фоне высокого уровня метаболизма. Существенные различия пиявок по потреблению кислорода и энергетическим затратам, по-видимому, являются результатом воздействия и климатических факторов.

Трофическую специфику основного обмена исследовали у «голодных» кровососущих и хищных гирудинид, отловленных в реке Челбас на выходе пиявок из зимнего анабиоза (май). Показано, что потребление кислорода у большой ложноконской пиявки *H. sanguisuga* ($0,99 \pm 0,016$ млО₂/г·час) более чем в два раза выше, чем у медицинской *H. verbana* из природных популяций ($0,41 \pm$

0,027 млО₂/г·час) ($p < 0,001$), что согласуется с нашими данными о высоком уровне микроэлементного обмена хищных гирудинид (главы 3 и 4).

Комплексное изучение уровней основного обмена гирудинид показало его значимое различие: видовое – у двух видов медицинских пиявок; популяционное – у медицинских пиявок из природных популяций и гирудокультуры; физиологическое – у «голодных» и «сытых» особей медицинских пиявок; трофическое – у кровососущих и хищных челюстных пиявок из природных популяций.

Полагаем, что установленные показатели энергетического обмена изучаемых групп пиявок позволяют в дальнейшем адекватно оценить и интерпретировать эколого-физиологические закономерности формирования их микроэлементного профиля.

5.2. Видовые и региональные особенности микроэлементного спектра тканей медицинских пиявок, выращенных в искусственно созданных условиях на биофабриках

Результаты спектрофотометрического анализа показали, что уровень содержания изучаемых микроэлементов в тканях пиявок *H. medicinalis* и *H. verbana*, выращенных в едином режиме содержания и кормления (биофабрика «СибМедПиявка», Алтайский край) изменяется в едином ряду: Fe > Zn > Cu > Ni ≥ Pb > Mn > Cd.

Вместе с тем, как показала количественная оценка, особи двух видов медицинских пиявок существенно различаются по уровню микроэлементного обмена (таблица 5.2.1).

Так, особи *H. medicinalis*, по сравнению с *H. verbana*, содержат в тканях существенно больше эссенциальной Cu, но значительно меньше Zn, Fe, Ni и Cd ($p < 0,01$). Уровень содержания эссенциального Mn и токсичного Pb в тканях лечебных и аптечных пиявок в равных условиях развития и роста сопоставим ($p > 0,05$).

Важно, что подобные тенденции межвидовых различий были обнаружены нами при исследовании микроэлементного обмена симпатических видов медицинских пиявок из природных популяций (оз. Горелое, Харьковская обл.).

Видовая специфика микроэлементного профиля тканей медицинских пиявок, выявленная нами ранее у природных особей *H. medicinalis* и *H. verbana*, при их искусственном разведении сохраняется.

Таблица 5.2.1 – Содержание эссенциальных и токсичных металлов (мкг/г сухого вещества) в тканях двух видов медицинских пиявок, выращенных в равных условиях (биофабрика «СибМедПиявка», Алтайский край)

TM, мкг/г	<i>H. medicinalis</i> n = 15	<i>H. verbana</i> n = 15	p Tukey test
Cu	$20,20 \pm 0,36$ [19,43-20,98]	$18,81 \pm 0,10$ [18,58-19,03]	0,005
Zn	$238,89 \pm 2,70$ [233,11-244,68]	$301,17 \pm 2,88$ [294,98-307,35]	0,000
Mn	$5,48 \pm 0,14$ [5,19-5,77]	$5,79 \pm 0,09$ [5,48-5,89]	0,45
Fe	$2413,37 \pm 6,74$ [2398,92-2427,82]	$2521,36 \pm 15,61$ [2487,88-2554,83]	0,000
Cd	$3,81 \pm 0,02$ [3,76-3,86]	$4,35 \pm 0,02$ [4,31-4,38]	0,000
Pb	$15,08 \pm 0,15$ [14,78-15,37]	$15,76 \pm 0,14$ [15,46-16,05]	0,06
Ni	$15,09 \pm 0,16$ [14,75-15,43]	$17,78 \pm 0,21$ [17,34-18,22]	0,000

Показано, что при стандартизированном режиме питания и содержания медицинских пиявок на биофабрике, видоспецифичность их биоэлементного статуса проявляется более четко, согласно особенностям и их основного обмена. Необходимо подчеркнуть, что пиявки-матки, от которых было получено потомство в гирудокультуре биофабрики «СибМедПиявка», имеют различное географическое происхождение: особи-производители *H. verbana* были отловлены в водных экосистемах Краснодарского края, *H. medicinalis* – Алтайского края.

Таким образом, можно предположить, что эколого-физиологические особенности двух видов медицинских пиявок из природных популяций и качество среды их обитания имеют приоритетное значение для формирования физиологически нормального (фонового) микроэлементного профиля особей *H. medicinalis* и *H. verbana* в гирудокультуре.

Использование анализа главных компонент (PCA) позволило визуализировать видовую специфику биоэлементного спектра тканей медицинских пиявок *H. verbana* и *H. medicinalis*: 60,79% общей дисперсии приходится на первую главную компоненту (PC1), 13,86% – на вторую главную компоненту (PC2) (рис. 5.2.1, табл. 5.2.2).

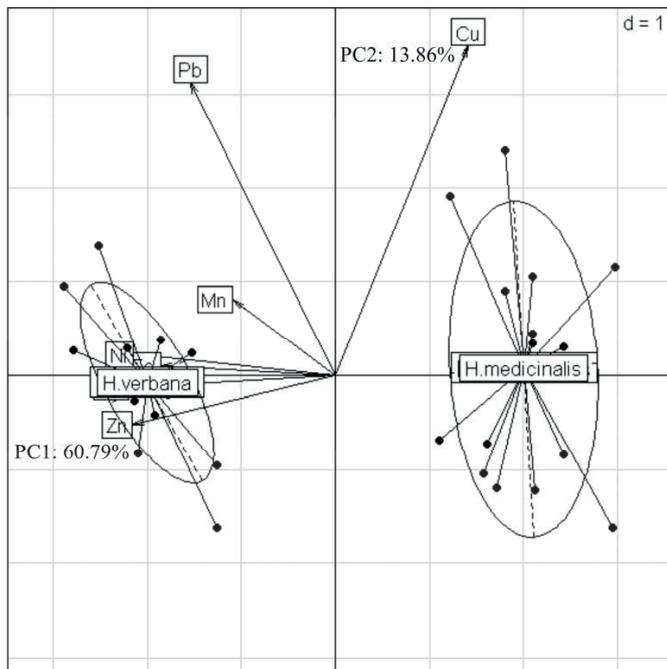


Рисунок 5.2.1 – Содержание эссенциальных и токсичных металлов в тканях медицинских пиявок *H. verbana* и *H. medicinalis* из гирудокультуры биофабрики «СибМедПиявка» в пространстве главных компонент

На рисунке показана четкая дифференциация биоэлементного спектра медицинских пиявок по первой компоненте PC1. Отмечена существенная пространственная удаленность аптечной пиявки *H. verbana* от лечебной *H. medici-*

nalis, связанная с повышенными концентрациями в ее тканях эссенциальных металлов Zn и Fe, а также экотоксикантов Cd и Ni.

Таблица 5.2.2 – Результаты компонентного анализа микроэлементного спектра тканей двух видов медицинских пиявок из гирудокультуры биофабрики «СибМедПиявка»

МЭ, 1g мкг/г (i = 7)	Нагрузки (loadings, a_{ij})		Вклад в главную компоненту (Contribution = $(a_{ij}^2 * 100) / \lambda_j, \%$)	
	Главные компоненты (Principal Components – PC), j = 1,2			
	1	2	1	2
Cu	0,61**	0,72**	8,67	53,41
Zn	-0,93**	-0,11	20,14	1,17
Mn	-0,47*	0,17	5,17	2,84
Fe	-0,80**	0,02	14,94	0,04
Cd	-0,94**	-0,03	20,95	0,07
Pb	-0,66**	0,64**	10,29	42,25
Ni	-0,92**	0,05	19,85	0,21
	Собственные значения (eigenvalues, λ_j) PC		Дисперсия, объясненная PC (%)	
	4,25	0,97	60,79	13,86

Примечание: *– $p < 0,01$, ** – $p < 0,001$

Наибольший вклад в межвидовые различия биоэлементного спектра тканей *H. verbana* и *H. medicinalis* из гирудокультуры по первой компоненте (PC1) вносят эссенциальный Zn (20,14%) и токсичные металлы Cd (20,95%), Ni (19,85%). Коэффициенты корреляции этих элементов с первой компонентой составили -0,93, -0,94 и -0,92, соответственно ($p = 0,000$). Со второй главной компонентой (PC2) статистически значимо коррелируют биофильная Cu (0,71, $p = 0,000$) и токсичный Pd (0,64, $p = 0,000$), вклад которых в дисперсию данных, объясненной компонентой PC2, составил 53,41% и 42,25%, соответственно (рис. 5.2.1, табл. 5.2.2).

Специфика условий разведения лечебной медицинской пиявки *H. medicinalis* на биофабриках различных регионов России оказывает высокое влияние на уровень содержания в их тканях всех изучаемых микроэлементов (ANOVA, $p = 0,000$).

Региональная вариабельность выявлена для тканевых концентраций всех микроэлементов: Zn ($F_{1,28} = 3536,90; p = 0,000$), Ni ($F_{1,28} = 2516,30; p = 0,000$), Mn ($F_{1,28} = 2009,90; p = 0,000$), Cd ($F_{1,28} = 484,46; p = 0,000$), Pb ($F_{1,28} = 403,65; p = 0,000$), Cu ($F_{1,28} = 123,92; p = 0,000$), Fe ($F_{1,28} = 35,02; p = 0,000$).

Наши данные показали, что особи *H. medicinalis*, выращенные на биофабрике Саратовской области («ГирудИ.Н.»), по сравнению с пиявками из Алтайского края («СибМедПиявка»), содержат в тканях значительно больше Zn, Mn, Ni, Cd и Pb, но существенно меньше Cu и Fe ($p < 0,001$) (табл. 5.2.3).

Таблица 5.2.3 – Содержание эссенциальных и токсичных металлов (мкг/г сухого вещества) в тканях пиявки *H. medicinalis* из гирудокультуры различных регионов России

TM, мкг/г	Алтайский край $n = 15$	Саратовская область $n = 15$	p Tukey test
Cu	$20,20 \pm 0,36$ [19,43-20,98]	$15,81 \pm 0,23$ [15,32-16,30]	0,000
Zn	$238,89 \pm 2,70$ [233,11-244,68]	$529,32 \pm 3,79$ [521,19-537,44]	0,000
Mn	$5,48 \pm 0,14$ [5,19-5,77]	$34,87 \pm 1,15$ [32,39-37,34]	0,000
Fe	$2413,37 \pm 6,74$ [2398,92-2427,82]	$2267,77 \pm 23,29$ [2217,80-2317,73]	0,000
Cd	$3,81 \pm 0,02$ [3,76-3,86]	$6,28 \pm 0,13$ [5,99-6,56]	0,000
Pb	$15,08 \pm 0,14$ [14,78-15,37]	$23,55 \pm 0,47$ [22,53-24,56]	0,000
Ni	$15,09 \pm 0,16$ [14,75-15,43]	$34,85 \pm 0,45$ [33,87-35,82]	0,000

Наибольшие различия отмечены для тканевых концентраций Mn, Ni и Zn, которые у саратовских особей *H. medicinalis*, превышают таковые у алтайских пиявок в 6,4, 2,3 и 2,2 раз, соответственно ($p < 0,001$).

Характер поступления, накопления и распределения эссенциальных и токсичных металлов в тканях *H. medicinalis*, выращенных в различных регионах, зависит от ряда факторов, таких, например, как экологические условия территорий, на которых расположены биофабрики, особенности технологии разведения пиявок.

Так, на производстве «ГирудИ.Н.» используется кюветная система разведения медицинских пиявок, а на биофабрике «СибМедПиявка» – баночная. По литературным данным в Балаковском районе Саратовской области, где расположена биофабрика «ГирудИ.Н.», индекс загрязнения Волги превышает 2,5 (умеренно загрязненные воды) и отмечена неблагополучная экологическая ситуация (Ларионов, Ларионов, 2009).

Кроме того, важно заметить, что пиявки-матки *H. medicinalis* из природных популяций Алтайского края, в сравнении с особями-производителями этого же вида, обитающими в водных экосистемах европейской территории России и Восточной Украины, характеризуются пониженней биоаккумуляцией тяжелых металлов, о чем подробно было изложено в Главе 3.

Анализ полученных экспериментальных данных с помощью компонентного анализа наглядно демонстрирует региональную специфику микроэлементного спектра тканей лечебных пиявок из гирудокультуры (табл. 5.2.4, рис. 5.2.2).

На рисунке отражена существенная пространственная дифференциация изучаемых региональных групп пиявок *H. medicinalis*, связанная с очень высокой популяционной вариабельностью тканевых концентраций эссенциальных и токсичных металлов, обсуждаемой выше. На первую главную компоненту (PC1) приходится 89,50% общей дисперсии данных, на вторую (PC2) – 6,70%.

Наиболее весомый вклад в первую компоненту, более 15,6%, вносят Zn, Mn, Ni, а их коэффициенты корреляции с PC1 очень высоки (-0,99, $p = 0,000$). Со второй главной компонентой (PC2) статистически значимо коррелирует

только железо ($-0,64$, $p = 0,000$), его вклад в общую дисперсию составил 86,93% (табл. 5.2.4, рис. 5.2.2).

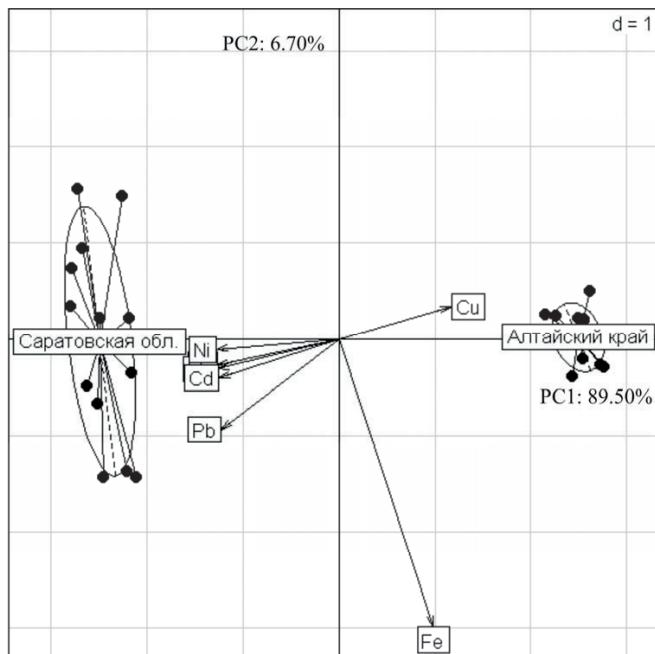


Рисунок 5.2.2 – Содержание эсценциальных и токсичных металлов в тканях медицинской пиявки *H. medicinalis* из гирудокультуры биофабрик различных регионов России в пространстве главных компонент

Эти статистические данные однозначно согласуются с результатами дисперсионного анализа (ANOVA), с помощью которого у лечебных пиявок была установлена максимальная региональная вариабельность для тканевых концентраций Zn, Mn, Ni, и минимальная – Fe.

Таблица 5.2.4 – Результаты компонентного анализа микроэлементного спектра тканей *H. medicinalis* из гирудокультуры различных регионов России

МЭ, lg мкг/г (i = 7)	Нагрузки (loadings, a_{ij})		Вклад в главную компоненту (Contribution = $(a_{ij}^2 * 100) / \lambda_j, \%$)	
	Главные компоненты (Principal Components – PC), j = 1,2			
	1	2	1	2
Cu	0,91*	0,07	13,34	1,14
Zn	-0,99*	-0,06	15,74	0,73
Mn	-0,99*	-0,07	15,61	0,94
Fe	0,77*	-0,64*	9,44	86,93
Cd	-0,98*	-0,09	15,23	1,59
Pb	-0,96*	-0,20	14,80	8,55
Ni	-0,99*	-0,02	15,84	0,11
	Собственные значения (eigenvalues, λ_j) PC		Дисперсия, объясненная PC (%)	
	6,26	0,47	89,50	6,70

Примечание: * – $p < 0,001$

При изучении внутривидовых особенностей уровня содержания биогенных и токсичных микроэлементов в тканях особей аптечной пиявки *H. verbana*, имеющих общее происхождение (водные экосистемы Краснодарского края), но выращенных на различных биофабриках России, было установлено, что региональный фактор в значительной мере влияет на элементный профиль тканей первых (ANOVA, $p < 0,001$).

Высокая популяционная изменчивость выявлена для тканевых концентраций всех МЭ: Fe ($F_{2,42} = 1351,90; p = 0,000$), Ni ($F_{2,42} = 465,59; p = 0,000$), Zn ($F_{2,42} = 188,44; p = 0,000$), Pb ($F_{2,42} = 187,90; p = 0,000$), Cd ($F_{2,42} = 154,72; p = 0,000$), Cu ($F_{2,42} = 141,37; p = 0,000$), Mn ($F_{2,42} = 124,26; p = 0,000$).

Медицинские пиявки *H. verbana*, выращенные на биофабрике «ГирудоМед.Юг» в Краснодарском крае отличаются от особей этого вида МП из других регионов повышенным содержанием в тканях Cu и Cd ($p < 0,001$) (табл. 5.2.5).

Таблица 5.2.5 – Содержание эссенциальных и токсичных металлов

(мкг/г сухого вещества) в тканях медицинской пиявки

H. verbana из гирудокультуры различных регионов России

TM, мкг/г	1. Алтайский край n = 15	2. Краснодарский край n = 15	3. Московская область n = 15	p Tukey test
Cu	$18,81 \pm 0,10$ [18,58-19,03]	$25,56 \pm 0,45$ [24,59-26,53]	$20,29 \pm 0,28$ [19,69-20,90]	I-2: 0,000 I-3: 0,004 2-3: 0,000
Zn	$301,17 \pm 2,88$ [294,98-307,35]	$273,50 \pm 4,85$ [263,09-283,90]	$204,89 \pm 3,10$ [198,24-211,56]	I-2: 0,000 I-3: 0,000 2-3: 0,000
Mn	$5,79 \pm 0,09$ [5,48-5,89]	$6,08 \pm 0,13$ [5,81-6,36]	$8,36 \pm 0,17$ [7,98-8,72]	I-2: 0,65 I-3: 0,000 2-3: 0,000
Fe	$2521,36 \pm 15,61$ [2487,88-2554,83]	$3049,53 \pm 11,57$ [3015,43-3093,63]	$3463,58 \pm 12,77$ [3436,19-3490,97]	I-2: 0,000 I-3: 0,000 2-3: 0,010
Cd	$4,35 \pm 0,02$ [4,31-4,38]	$5,04 \pm 0,07$ [4,90-5,18]	$3,74 \pm 0,06$ [3,62-3,87]	I-2: 0,000 I-3: 0,000 2-3: 0,000
Pb	$15,76 \pm 0,14$ [15,46-16,05]	$14,69 \pm 0,19$ [14,28-15,11]	$11,66 \pm 0,14$ [11,35-11,96]	I-2: 0,003 I-3: 0,000 2-3: 0,000
Ni	$17,78 \pm 0,21$ [17,34-18,22]	$23,34 \pm 0,26$ [22,78-23,91]	$28,23 \pm 0,27$ [27,65-28,81]	I-2: 0,000 I-3: 0,000 2-3: 0,000

Максимальные концентрации Mn, Fe и Ni отмечены у московских особей *H. verbana* ($p < 0,001$), а Zn и Pb – у алтайских ($p < 0,01$). Не выявлено статистически значимых региональных различий только для уровня содержания биофильного Mn в тканях особей *H. verbana*, выращенных на биофабриках Алтайского и Краснодарского края ($p > 0,05$).

Выявленная нами региональная специфика микроэлементного спектра тканей аптечной пиявки из гирудокультуры визуализирована методом главных компонент (табл. 5.2.6, рис. 5.2.3).

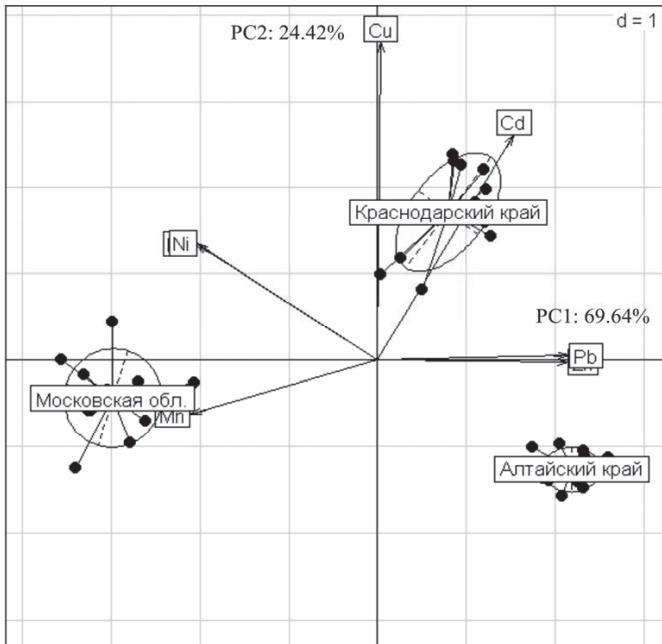


Рисунок 5.2.3 – Содержание эссенциальных и токсичных металлов в тканях аптечной пиявки *H. verbana* из гирудокультуры биофабрик различных регионов России в пространстве главных компонент

Как видно из рисунка, 69,64% общей дисперсии данных приходится на первую главную компоненту (PC1), 24,42% – на вторую главную компоненту (PC2). Все экспериментальные наблюдения оформились в три группы аптечной пиявки *H. verbana*, согласно выявленным региональным особенностям биоэлементного состава их тканей.

По первой компоненте (PC1) отмечена существенная пространственная дифференциация особей, выращенных в Московской области (биофабрика «Международный центр медицинской пиявки»), для тканей которых характерны повышенные концентрации Fe, Mn, Ni и самые низкие Cu и Cd.

Вторая главная компонента (PC2) пространственно отдаляет особей *H. verbana* краснодарской популяции, благодаря высокому содержанию Cu и Cd, а алтайской – за счет высоких показателей Zn и Pb.

Наибольший вклад в региональные различия микроэлементного спектра тканей аптечной пиявки *H. verbana* по первой компоненте (PC1) вносят Zn (18,92%), Mn (18,25%), Pb (19,01%), по второй (PC2) – Cu (55,57%) и Cd (27,90%).

Таблица 5.2.6 – Результаты компонентного анализа микроэлементного спектра тканей аптечной пиявки *H. verbana* из гирудокультуры различных регионов России

МЭ, лг мкг/г (i = 7)	Нагрузки (loadings, a_{ij})		Вклад в главную компоненту (Contribution = $(a_{ij}^2 * 100) / \lambda_j$, %)	
	Главные компоненты (Principal Components – PC), j = 1,2			
	1	2	1	2
Cu	0,02	0,97**	0,01	55,57
Zn	0,96**	-0,01	18,92	0,00
Mn	-0,94**	-0,17	18,25	1,63
Fe	-0,91**	0,36*	17,23	7,39
Cd	0,68**	0,69**	9,62	27,90
Pb	0,96**	0,01	19,01	0,01
Ni	-0,91**	0,36*	16,97	7,49
	Собственные значения (eigenvalues, λ_j) PC		Дисперсия, объясненная PC (%)	
	4,87	1,71	69,64	24,42

Примечание: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,001$

Проведенные исследования внутривидовой изменчивости уровня содержания МЭ в тканях медицинских пиявок, выращенных на различных фабриках России, показали, что, специфика условий разведения, экологические особенности изучаемых регионов, а также географическое происхождение пиявок-маток, в значительной мере влияют на биоэлементный статус тканей *H. medicinalis* и *H. verbana*.

Согласно нашим данным, показатели фоновых концентраций эссенциальных и токсичных металлов в тканях медицинских пиявок, выращиваемых в практических целях, лежат в широком диапазоне концентраций, и могут быть использованы в качестве физиологической нормы на биофабриках различных регионов России.

5.3. Сравнительный анализ содержания МЭ в тканях медицинских пиявок из природных популяций и гирудокультуры

Искусственно созданные условия для роста и развития медицинских пиявок (МП) на биофабриках, по-нашему мнению, достаточно сильный антропогенный фактор, влияющий на их физиологические особенности, поскольку, несмотря на отсутствие естественных врагов и частое кормление, экстремальными для них являются отсутствие солнечного света и естественного грунта, температурный режим, не соответствующий природным условиям, высокая плотность популяции и пространственное ограничение, отсутствие выбора жертвы и зимнего анабиоза. В таких условиях медицинские пиявки достигают половой зрелости и размеров, необходимых для гирудотерапевтических целей, не в три года, как в природе, а за 8-12 месяцев. Вместе с тем, в условиях искусственного разведения пиявок на биофабриках отмечается их высокая смертность в первые месяцы жизни.

В естественной среде медицинская пиявка может сосать кровь представителей всех классов позвоночных, но их основным прокормителем являются озерные лягушки. В природе пиявки довольно долго увеличивают свою массу, поскольку бывает, что акты кровососания у них редки и не всегда гарантированы, и половой зрелости они достигают только на третий год жизни.

Поскольку выращенные в искусственных условиях медицинские пиявки являются первым поколением особей-маток из природных популяций, особенный теоретический и практический интерес представляет сравнительная оценка уровней содержания эссенциальных и токсичных металлов в тканях особей из природных популяций и гирудокультуры.

Проведенные исследования (Главы 3 и 4) показали, что уровень содержания тяжелых металлов в тканях медицинских пиявок в естественных ландшафтах варьируются в большом диапазоне концентраций, и зависят от климатогеографических и сезонных особенностей среды обитания, а также от возраста исследуемых особей. Таким образом, для получения репрезентативных результатов следует синхронизировать места и время отлова МП из естественных водоемов и региона разведения их в искусственных условиях.

Для решения поставленной задачи мы при сравнительной оценке микроэлементного спектра тканей медицинских пиявок различных эколого-физиологических групп использовали взрослых особей аптечной пиявки *H. ver-bana*, отловленных летом в реке Челбас (Краснодарский край) и приобретенных в это же время на биофабрике «Гирудо-Мед.Юг» (Краснодарский край), расположенной в непосредственной близости к местам отлова пиявок. Экспериментальные особи лечебной пиявки *H. medicinalis* были отловлены весной в реке Тогул (Алтайский край) и одновременно приобретены на производстве «Сиб-МедПиявка» этого же региона (Алтайский край).

При оценке результатов спектрофотометрического анализа биопроб было установлено, что концентрации исследуемых микроэлементов в тканях лечебной пиявки *H. medicinalis* из природных популяций располагаются в ряду: Fe > Zn > Pb > Ni > Cu > Mn > Cd. Для особей лечебных пиявок из гирудокультуры последовательность уровня содержания металлов была несколько иная: Fe > Zn > Cu > Ni = Pb > Mn > Cd.

Сравнительный анализ показал отсутствие статистически значимых различий между концентрациями эссенциального Mn в тканях особей *H. medicinalis* из гирудокультуры и природных популяций ($p > 0,05$) (табл. 5.3.1). Для остальных микроэлементов выявлены существенные различия.

Обнаружено, что лечебные пиявки, выращенные на биофабрике, отличаются от природных особей повышенным уровнем содержания в тканях Cu в 1,75 раз, Fe в 1,41 раз, Ni в 1,09 раз ($p < 0,05$), и пониженным – Zn в 2,45 раз, Cd в 1,14 раз, Pb 1,23 раз ($p < 0,001$).

Таблица 5.3.1 – Содержание эссенциальных и токсичных металлов (мкг/г сухого вещества) в тканях лечебной пиявки *H. medicinalis* из гирудокультуры и природных популяций Алтайского края

ТМ, мкг/г	Гирудокультура n = 15	Природные популяции n = 10	p Tukey test
Cu	20,20 ± 0,36 [19,43-20,98]	11,52±0,23 [10,99-12,04]	0,000
Zn	238,89 ± 2,70 [233,11-244,68]	584,13±5,96 [570,65-597,59]	0,000
Mn	5,48 ± 0,14 [5,19-5,77]	5,33±0,22 [4,84-5,82]	0,89
Fe	2413,37 ± 6,74 [2398,92-2427,82]	1708,50±8,65 [1688,93-1728,07]	0,000
Cd	3,81 ± 0,02 [3,76-3,86]	4,33±0,06 [4,20-4,46]	0,000
Pb	15,08 ± 0,14 [14,78-15,37]	18,61±0,30 [17,94-19,28]	0,000
Ni	15,09 ± 0,16 [14,75-15,43]	13,81±0,18 [13,39-14,23]	0,017

Методом главных компонент представлена визуализация эколого-физиологической специфики микроэлементного спектра тканей лечебных пиявок из природных популяций и их потомков из гирудокультуры: 74,97% общей дисперсии приходится на первую компоненту (PC1), 15,45% – на вторую (PC2) (рис. 5.3.1, табл. 5.3.2).

На рисунке отражена пространственная дифференциация исследуемых особей *H. medicinalis* согласно полученным выше результатам.

Наибольший вклад в различия микроэлементного спектра тканей изучаемых групп медицинских пиявок вносят эссенциальные металлы: Cu (18,38%), Zn (18,76%), Fe (18,80%), корреляция которых с первой компонентой (PC1) характеризуется очень высокой силы связи (0,98, -0,99, 0,99, соответственно, $p = 0,000$).

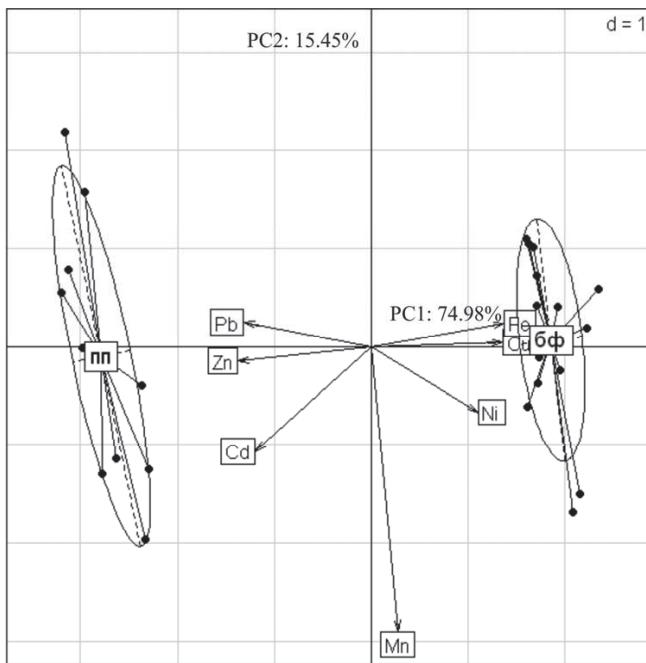


Рисунок 5.3.1 – Содержание эссенциальных и токсичных металлов в тканях медицинской пиявки *H. medicinalis* из гирудокультуры (бф) и природных популяций (пп) Алтайского края в пространстве главных компонент

Со второй компонентой (PC2) статистически значимо коррелирует только биофильный металл Mn ($-0,95, p = 0,000$), его вклад в дисперсию данных, объясненной PC2, составил 82,86% (рис. 5.3.1, табл. 5.3.2).

Таблица 5.3.2 – Результаты компонентного анализа микроэлементного спектра тканей пиявок *H. medicinalis* из гирудокультуры и природных популяции Алтайского края

МЭ, lg мкг/г (i = 7)	Нагрузки (loadings, a_{ij})		Вклад в главную компоненту (Contribution = $(a_{ij}^2 * 100) / \lambda_j, \%$)	
	Главные компоненты (Principal Components – PC), j = 1,2			
	1	2	1	2
Cu	0,98*	0,02	18,38	0,02
Zn	-0,99*	-0,05	18,76	0,21
Mn	0,20	-0,95*	0,77	82,86
Fe	0,99*	0,08	18,80	0,58
Cd	-0,86*	-0,35	14,13	11,30
Pb	-0,95*	0,08	17,07	0,63
Ni	0,80*	-0,21	12,10	4,41
	Собственные значения (eigenvalues, λ_j) PC		Дисперсия, объясненная PC (%)	
	5,25	1,08	74,98	15,45

Примечание: * – $p < 0,001$

В целом результаты компонентного анализа адекватно отражают результаты сравнительной оценки биоэлементного статуса экологически и физиологически контрастных особей медицинской пиявки *H. medicinalis*.

У другого вида медицинских пиявок – аптечной *H. verbana*, также были выявлены существенные различия микроэлементного состава тканей между особями из естественных ландшафтов и выращенных в искусственно созданных условиях.

Результаты спектрофотометрического анализа биологических проб показали, что концентрации микроэлементов в тканях особей *H. verbana* из реки Челбас располагаются в ряду: Fe > Zn > Pb > Ni > Cu > Mn > Cd.

Для особей аптечных пиявок из гирудокультуры биофабрики «ГирудоМед.Юг» последовательность уровня содержания металлов выглядит иначе: Fe > Zn > Cu > Ni > Pb > Mn > Cd (табл. 5.3.3).

Таблица 5.3.3 – Содержание эссенциальных и токсичных металлов (мкг/г сухого вещества) в тканях аптечной пиявки *H. verbana* из гирудокультуры и природных популяций Краснодарского края

ТМ, мкг/г	Гирудокультура n = 15	Природные популяции n = 10	p Tukey test
Cu	25,56 ± 0,45 [24,59-26,53]	8,25 ± 0,48 [7,17-9,33]	0,000
Zn	273,50 ± 4,85 [263,09-283,90]	307,71 ± 6,77 [292,40-323,01]	0,000
Mn	6,08 ± 0,13 [5,81-6,36]	7,30 ± 0,23 [6,77-7,83]	0,000
Fe	3049,53 ± 11,57 [3015,43-3093,63]	2176,55 ± 84,72 [1984,89-2368,20]	0,000
Cd	5,04 ± 0,07 [4,90-5,18]	3,06 ± 0,05 [2,94-3,17]	0,000
Pb	14,69 ± 0,19 [14,28-15,11]	13,99 ± 0,48 [12,92-15,08]	0,19
Ni	23,34 ± 0,26 [22,78-23,91]	10,87 ± 0,46 [9,82-11,93]	0,000

Сравнительный анализ показал, что аптечные пиявки, выращенные на биофабрике, содержат в тканях эссенциальные и токсичные металлы Cu, Fe, Cd, Ni в более высоких концентрациях, чем пиявки из природных популяций: Cu в 3,10 раз, Fe в 1,40 раз, Cd в 1,65 раз, Ni в 2,15 раз ($p < 0,001$). Кроме того, отмечена тенденция к росту токсичного Pb в тканях особей *H. verbana* из гирудокультуры ($p > 0,05$) (табл. 5.3.3).

Вместе с тем, в тканях аптечных пиявок при ускоренном развитии и росте на биофабрике значимо снижается содержание эссенциальных металлов Zn и Mn в 1,13 и 1,20 раз, соответственно ($p < 0,001$) (Ковальчук и др., 2007; Черная и др., 2008; Нохрина и др., 2006, 2010; Chernaya, 2010; Chernaya et al., 2010).

Эколо-физиологическая специфика микроэлементного профиля тканей медицинской пиявки *H. verbana* исследуемых групп наглядно представлена с

помощью компонентного анализа: 69,88% общей дисперсии приходится на первую компоненту (PC1), 17,12% – на вторую (PC2) (рис. 5.3.2, табл. 5.3.4).

На рисунке хорошо видна пространственная дифференциация экологически и физиологически контрастных групп аптечных пиявок, согласно выявленными существенными отличиями микроэлементного состава их тканей.

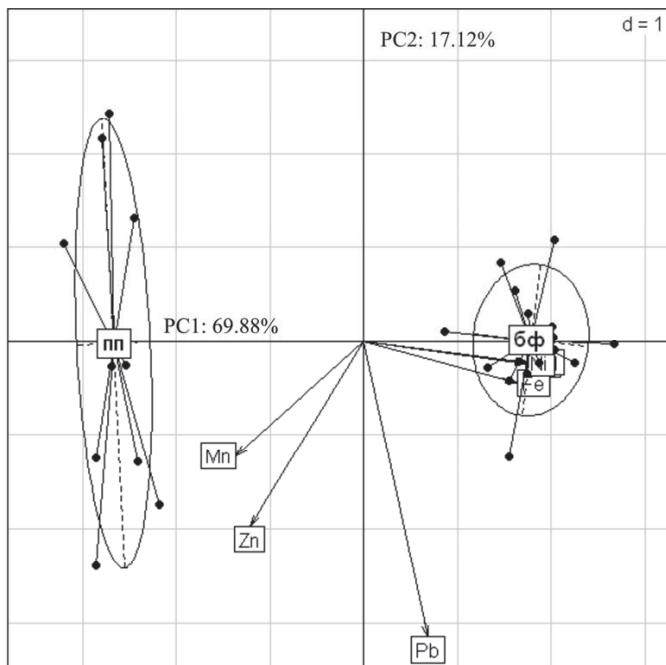


Рисунок 5.3.2 – Содержание эссенциальных и токсичных металлов в тканях медицинских пиявок *H. verbana* из гирудокультуры (бф) и природных популяций (пп) Краснодарского края в пространстве главных компонент.

С первой главной компонентой (PC1) сильнее всего коррелируют металлы Cu (0,97), Cd (0,99), Ni (0,97) ($p = 0,000$), вклад которых в общую дисперсию данных составил 19,33%, 19,92%, 19,30%, соответственно (табл. 5.3.4).

Таблица 5.3.4 – Результаты компонентного анализа микроэлементного спектра тканей пиявок *H. verbana* из гирудокультуры и природных популяции Краснодарского края

МЭ, лг мкг/г (i = 7)	Нагрузки (loadings, a_{ij})		Вклад в главную компоненту (Contribution = $(a_{ij}^2 * 100) / \lambda_j$, %)	
	Главные компоненты (Principal Components – PC), j = 1,2			
	1	2	1	2
Cu	0,97**	-0,06	19,33	0,37
Zn	-0,68**	-0,55*	9,45	24,86
Mn	-0,76**	-0,34	11,90	9,55
Fe	0,92**	-0,12	17,17	1,25
Cd	0,99**	-0,06	19,92	0,32
Pb	0,38	-0,87**	2,93	63,31
Ni	0,97**	-0,06	19,30	0,33
	Собственные значения (eigenvalues, λ_i) PC		Дисперсия, объясненная PC (%)	
	4,89	1,20	69,88	17,12

Примечание: * – $p < 0,01$, ** – $p < 0,001$

Со второй компонентой (PC2) статистически значимо коррелируют эссенциальный Zn (-0,55, $p = 0,004$) и токсичный Pb (-0,87, $p = 0,000$), вклад которых в PC2 составил 24,86% и 63,31% общей дисперсии.

Таким образом, на основании полученных результатов, можно заключить, что медицинские пиявки *H. verbana* из гирудокультуры отличаются от природных особей своего вида более высоким уровнем микроэлементного обмена.

Как мы уже отмечали, искусственные условия разведения медицинских пиявок на биофабриках, являются для них экстремальными. Известно, что действие на животный организм разного рода экстремальных факторов всегда сопряжено с энергетическими затратами отдельных систем и целого организма (Ковальчук, 2008).

Ранее нами было установлено, что уровень основного обмена медицинских пиявок *H. verbana*, выращенных на биофабрике ($0,86 \pm 0,069$ млО₂/г·час)

вдвое превышает аналогичные показатели особей из природных популяций ($0,41 \pm 0,027$ мл O_2 /г·час) (Ковальчук и др., 2007). Можно предположить, что повышенный уровень основного обмена у пиявок, выращенных на биофабрике, является одним из физиологических факторов, определяющих высокую интенсивность микроэлементного обмена в условиях ускоренного роста и развития. Высокие концентрации изучаемых эссенциальных и токсичных металлов в тканях медицинских пиявок из гирудокультуры, кроме того, обусловлены качеством воды, в которой они содержатся и крови, которой они питаются.

Достаточно значимым биотическим фактором, обеспечивающим высокий уровень обменных процессов в тканях медицинских пиявок, выращенных на биофабрике, может являться, по-нашему мнению, чрезмерно высокая плотность (до 100 особей на 1,5-2 литра воды).

Было показано, что у животных, выращенных в лаборатории в условиях повышенной плотности, которая на 2-4 и более порядков величин превышала реально существующую их численность в природе, формируются группировки особей, специфические по морфофизиологическим, гистологическим и биохимическим показателям (Добринская, Следь, 1974; Иванова, 1975; Ковальчук, 1977; Рункова, Ковальчук, 1975; Степанова, 1982; Некрасова, 2004).

Так, у личинок амфибий из загущенных группировок были выявлены изменения показателей общего обмена, тканевого дыхания, в частности окислительного фосфорилирования; а животные, развивавшиеся в условиях повышенной плотности, приобретали в процессе развития повышенную резистентность к кислородной недостаточности (Ковальчук, 1977).

Кроме того, был исследован эффект группы в популяциях гидробионтов, определяемый как метаболическая регуляция роста, развития и генетического состава животных на популяционном и организменном уровнях (Рункова, Ковальчук, 1975).

Выявлено, что водная среда из популяций разной групповой плотности существенно различается по количественному соотношению свободных аминокислот (Степанова, 1982).

Авторами было показано, что медицинские пиявки *H. verbana*, выращенные в искусственно созданных условиях, отличаются от особей из природных популяций не только высоким содержанием в тканях эсценциальных и токсичных металлов (Cu, Fe, Cd, Ni, Pb), но и свободных аминокислот, обладающих иммуностимулирующими и детоксицирующими свойствами: метионина, гистидина, цистеина, изолейцина, а также основных метаболических групп аминокислот: незаменимых, с разветвленной углеродной цепью, ароматических, серосодержащих (Черная и др., 2006; Черная, Ковалчук, 2007б).

Специфика условий содержания обуславливает особенности метаболизма, при котором формируются животные разных физиологических групп, что подтверждают проведенные нами исследования.

Согласно нашим данным, медицинские пиявки, выращенные в искусственных условиях, являясь потомками первого поколения особей из природных популяций, отличаются по всем изучаемым эколого-физиологическим параметрам.

Увеличение общего содержания микроэлементов в тканях медицинских пиявок из гирудокультуры обусловлено активацией метаболических процессов, направленных на поддержание гомеостаза в условиях интенсивного питания, роста и развития, и, вкупе с повышенным уровнем основного и аминокислотного обмена, является, вероятно, одной из форм физиологической адаптации этих кровососущих гирудинид к экстремальным условиям искусственного разведения.

5.4. Возрастная динамика МЭ в тканях медицинских пиявок

***H. verbana* в условиях ускоренного роста и развития на биофабрике**

Исследования, направленные на изучение физиологической роли эсценциальных металлов в онтогенезе медицинских пиявок представляют очевидный интерес, поскольку при массовом производстве животных, необходимо учитывать их физиологические особенности и потребности. Знания об оптимальном соотношении жизненно важных макро- и микроэлементов в тканях медицинских пиявок

вок на различных этапах роста и развития могут способствовать более эффективному и качественному воспроизведению этих ценных для человека гидробионтов.

Медицинские пиявки, выращенные на биофабрике, являются уникальными модельными объектами для изучения физиологических особенностей пиявок в онтогенезе, поскольку возраст на разных этапах развития у них четко определен. Это позволило нам оценить уровень содержания макро- и микроэлементов в тканях аптечной пиявки *H.verbana* на разных стадиях развития и роста (Черная, Ковальчук, 2011).

В естественных водоемах молодые особи медицинских пиявок, в силу ряда причин (ограниченность кормовых ресурсов, погодные условия, зимний анабиоз), растут достаточно медленно и достигают половой зрелости только на третий год жизни (Лукин, 1976).

В лабораторных условиях, при соблюдении разработанной методики, период роста и развития пиявок составляет, по разным данным, от восьми до двенадцати месяцев (Синева, 1949; Кустов и др., 2005; Никонов, 2007). Возрастной диапазон экспериментальных особей *H.verbana* составил: пять суток (новорожденные «нит-чатки», контроль), один, три, пять, семь и девять месяцев.

По данным морфометрического анализа средняя масса тела (в граммах) новорожденных пиявок составила 0,029, одномесячных особей – 0,09, трехмесячных – 0,25, пятимесячных – 0,61, семимесячных – 1,33, девятимесячных – 1,81 грамм.

Результаты однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) показали, что ускоренное развитие и рост медицинских пиявок в гирудокультуре оказывает существенное влияние на уровень содержания всех изучаемых макро- и микроэлементов в их тканях (табл. 5.4.1, рис. 5.4.1-5.4.10) ($p < 0,05$).

Показано, что рост и развитие медицинских пиявок в гирудокультуре сопровождается направленным повышением в их тканях суммарного содержания изучаемых макро- и микроэлементов ($p < 0,001$) (рис. 5.4.1, табл. 5.4.1).

Таблица 5.4.1 – Возрастная динамика содержания макро- и микроэлементов (мкг/г влажной ткани) в тканях *H. verbana* в гирудокультуре

МЭ мкг/г	5 суток контроль <i>n</i> = 5 (50)	1 месяц <i>n</i> = 5 (25)	3 месяца <i>n</i> = 5 (15)	5 месяцев <i>n</i> = 5	7 месяцев <i>n</i> = 5	9 месяцев <i>n</i> = 5
Cu	1,3 ± 0,01 [1,2-1,3]	1,3 ± 0,01 [1,2-1,3]	2,1 ± 0,02* [2,1-2,2]	2,1 ± 0,03* [2,0-2,2]	2,0 ± 0,03* [1,9-2,1]	2,1 ± 0,03* [2,0-2,2]
Zn	24,4 ± 1,69 [19,7-29,1]	8,3 ± 0,02* [8,2-8,4]	8,0 ± 0,02* [7,9-8,05]	20,7 ± 1,66 [16,1-25,4]	19,5 ± 1,25 [16,0-23,0]	47,1 ± 2,09* [41,3-52,9]
Mn	1,5 ± 0,05 [1,3-1,6]	0,6 ± 0,01* [0,5-0,6]	1,0 ± 0,01* [0,9-1,1]	1,0 ± 0,04* [0,8-1,0]	0,8 ± 0,01* [0,8-0,9]	1,0 ± 0,02* [0,9-1,1]
Fe	85,2 ± 4,39 [73,0-97,3]	190,5 ± 1,77* [185,6-195,4]	214,3 ± 3,68* [204,1-223,5]	278,9 ± 3,90* [268,1-289,8]	347,1 ± 8,21* [324,3-369,9]	342,6 ± 4,02* [331,5-353,8]
Ca	66,4 ± 3,85 [55,7-77,1]	42,4 ± 1,39* [38,5-46,3]	52,7 ± 1,08* [49,7-55,7]	50,4 ± 3,11 [41,8-59,0]	51,3 ± 1,40* [47,4-55,2]	47,5 ± 1,97* [41,9-52,9]
Mg	137,6 ± 3,56 [127,7-148,0]	56,4 ± 1,41* [52,5-60,3]	66,0 ± 1,79* [61,1-71,0]	64,4 ± 3,63* [54,0-74,5]	65,6 ± 1,37* [61,7-69,4]	73,9 ± 2,22* [67,8-80,2]
Co	0,8 ± 0,01 [0,7-0,8]	0,7 ± 0,01 [0,6-0,7]	0,8 ± 0,02 [0,7-0,8]	0,8 ± 0,03 [0,7-0,9]	0,8 ± 0,02* [0,8-0,9]	0,8 ± 0,02 [0,7-0,8]
Sr	1,8 ± 0,02 [1,7-1,8]	0,4 ± 0,07* [0,3-0,6]	0,2 ± 0,01* [0,2-0,3]	0,4 ± 0,02* [0,3-0,4]	0,5 ± 0,01* [0,5-0,6]	0,3 ± 0,02* [0,3-0,4]
Ni	2,5 ± 0,02 [2,5-2,6]	2,3 ± 0,02* [2,2-2,3]	2,8 ± 0,03* [2,7-2,8]	2,8 ± 0,03* [2,7-2,8]	2,8 ± 0,03* [2,7-2,9]	2,9 ± 0,02* [2,8-3,0]
Cd	0,5 ± 0,01 [0,4-0,5]	0,6 ± 0,02 [0,5-0,6]	0,5 ± 0,01 [0,5-0,6]	0,4 ± 0,02* [0,4-0,5]	0,3 ± 0,02* [0,3-0,4]	0,2 ± 0,02* [0,2-0,3]
Pb	1,3 ± 0,01 [1,2-1,3]	2,0 ± 0,02* [2,0-2,1]	1,9 ± 0,02* [1,8-1,9]	1,5 ± 0,04* [1,4-1,6]	1,2 ± 0,02 [1,1-1,22]	1,8 ± 0,02* [1,7-1,8]
Σ МЭ	323,0 ± 10,19 [294,7-351,4]	305,4 ± 0,90 [302,9-307,9]	350,3 ± 3,89* [339,5-361,1]	423,4 ± 9,30* [397,6-449,3]	491,9 ± 9,9* [464,2-519,6]	520,4 ± 3,86* [509,6-531,1]

Примечание: *n* – количество проб (особей), Σ МЭ – суммарный фонд макро- и микроэлементов; * – различия с контролем статистически значимы, *p* < 0,05

С помощью рангового корреляционного анализа выявлена положительная связь высокой силы между возрастом медицинских пиявок и суммарными концентрациями исследуемых макро- и микроэлементов в их тканях ($r_s = 0.88$; $p = 0.000$) (рис. 5.4.1).

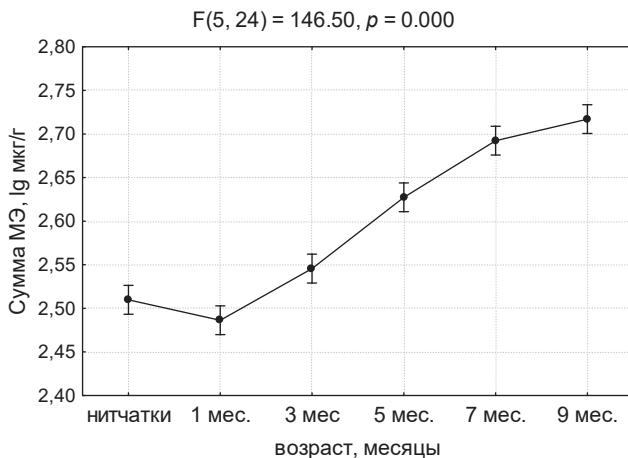


Рисунок 5.4.1 – Динамика суммарных концентраций макро- и микроэлементов ($\lg \text{мкг/г}$ влажной ткани) в тканях медицинских пиявок *H. verbana* при росте и развитии в гирудокультуре (ANOVA)

При этом отмечены существенные различия в характере возрастной динамики концентраций отдельных эссенциальных и токсичных металлов ($p < 0,01$, ANOVA). Так, у молоди пиявок, вышедших из коконов, отмечены минимальные концентрации биофильной меди ($1,25 \pm 0,01$ мкг/г), которые повышаются на 70% к трехмесячному возрасту ($p < 0,001$), далее, в процессе роста, претерпевают незначительные колебания (табл. 5.4.1, рис. 5.4.2). Корреляционный анализ выявил положительную, средней силы связь между содержанием в тканях пиявок меди и возрастом ($r_s = 0,67$; $p = 0,000$). Для новорожденных пиявок (нитчаток) характерно исходное высокое содержание эссенциального цинка ($24,43 \pm 1,69$ мкг/г), которое резко снижается, более чем на 60%, к концу первого месяца жизни, и начинает существенно повышаться только с пятимесячного возраста,

достигая максимальных показателей ($47,12 \pm 2,09$ мкг/г) в тканях взрослых, девятимесячных, особей ($p < 0,001$) (табл. 5.4.1, рис. 5.4.3).

$$F(5, 24) = 412.40, p = 0.000$$

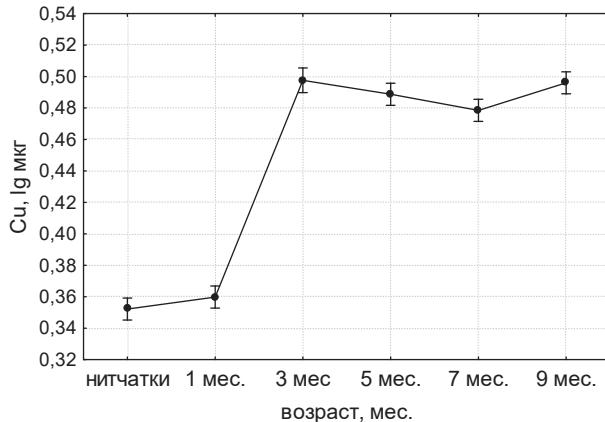


Рисунок 5.4.2 – Динамика содержания меди (lg мкг/г влажной ткани) в тканях медицинских пиявок *H. verbana* при росте и развитии в гирудокультуре (ANOVA)

$$F(5, 24) = 149.21, p = 0.000$$

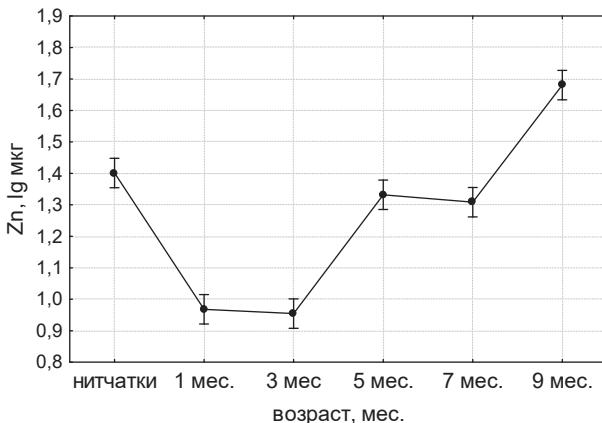


Рисунок 5.4.3 – Динамика содержания цинка (lg мкг/г влажной ткани) в тканях медицинских пиявок *H. verbana* при росте и развитии в гирудокультуре (ANOVA)

Необходимо отметить, что первое кормление молоди пиявок происходит в двухнедельном возрасте, второе – еще через две недели, далее – раз в месяц. Таким образом, первые приемы пищи не сопровождаются накоплением эссенциального Zn в тканях растущих пиявок, и потребность в этом эссенциальном элементе возрастает у них на более поздних этапах роста и полового созревания. Корреляционная связь между уровнем содержания цинка и возрастом оказалась слабой и статистически незначимой ($r_s = 0,30$; $p = 0,11$).

Максимальные концентрации эссенциального марганца ($1,45 \pm 0,05$ мкг/г) обнаружены в тканях «нитчаток», через месяц их значения падают на 40%, далее наблюдаются незначительные фазовые изменения в содержании этого металла, но не достигающие исходных показателей ($p < 0,001$) (табл. 5.4.1, рис. 5.4.4).

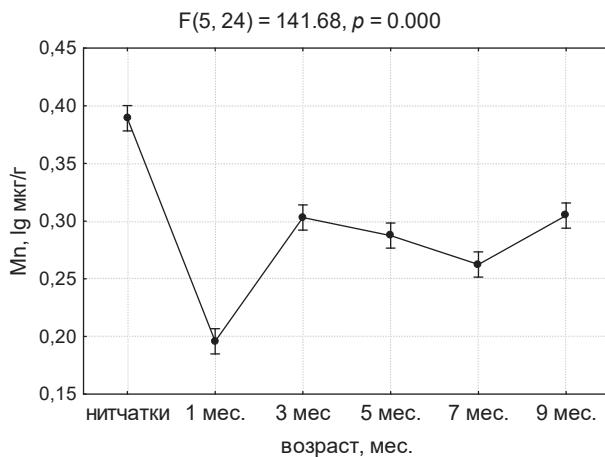


Рисунок 5.4.4 – Динамика содержания марганца (\lg мкг/г влажной ткани) в тканях медицинских пиявок *H. verbana* при росте и развитии в гирудокультуре (ANOVA)

Корреляционная связь между концентрациями эссенциального металла Mn, как и в случае с цинком, в тканях медицинских пиявок и их возрастом не выявлена ($r_s = -0,23$; $p = 0,22$).

При росте и развитии медицинских пиявок в гирудокультуре наблюдается многократное, до 400%, повышение концентраций Fe, характеризующееся очень высокой положительной корреляционной связью с возрастом ($r_s = 0,95$; $p = 0,000$) (табл. 5.4.1, рис. 5.4.5).

Минимальное содержание этого жизненно необходимого элемента ($85,16 \pm 4,39$ мкг/г) отмечены в тканях «нитчаток», максимальные ($347,06 \pm 8,21$ и $342,61 \pm 4,02$ мкг/г) – у взрослых, семимесячных и девятимесячных особей, соответственно ($p < 0,001$).

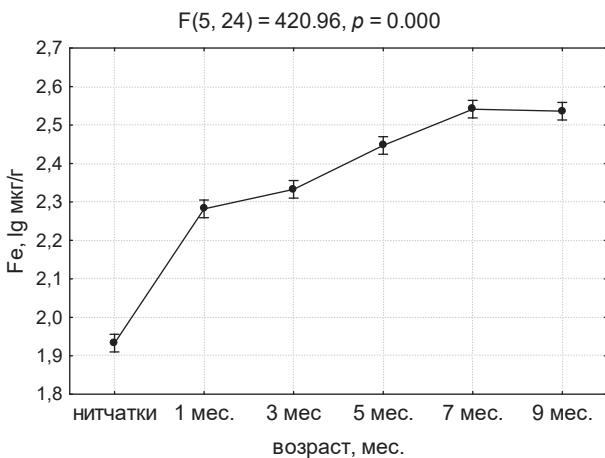


Рисунок 5.4.5 – Динамика содержания железа (\lg мкг/г влажной ткани) в тканях медицинских пиявок *H. verbana* при росте и развитии в гирудокультуре (ANOVA)

Для макроэлементов кальция, магния и микроэлемента стронция характерна обратная картина: максимальные концентрации этих эссенциальных металлов содержат ткани пиявок, вышедших из коконов ($66,40 \pm 3,85$ мкг/г, $137,56 \pm 3,56$ мкг/г и $1,75 \pm 0,02$ мкг/г, соответственно) (табл. 5.4.1, рис. 5.4.6-5.4.7) ($p < 0,001$). Их содержание значительно снижается после первых приемов пищи, а на дальнейших этапах роста подвержено незначительным колебаниям.

Корреляционная связь между содержанием в тканях и возрастом пиявок статистически незначима, но с отрицательной тенденцией: Ca ($r_s = -0,27; p = 0,15$), Mg ($r_s = -0,16; p = 0,40$) и Sr ($r_s = -0,34; p = 0,07$).

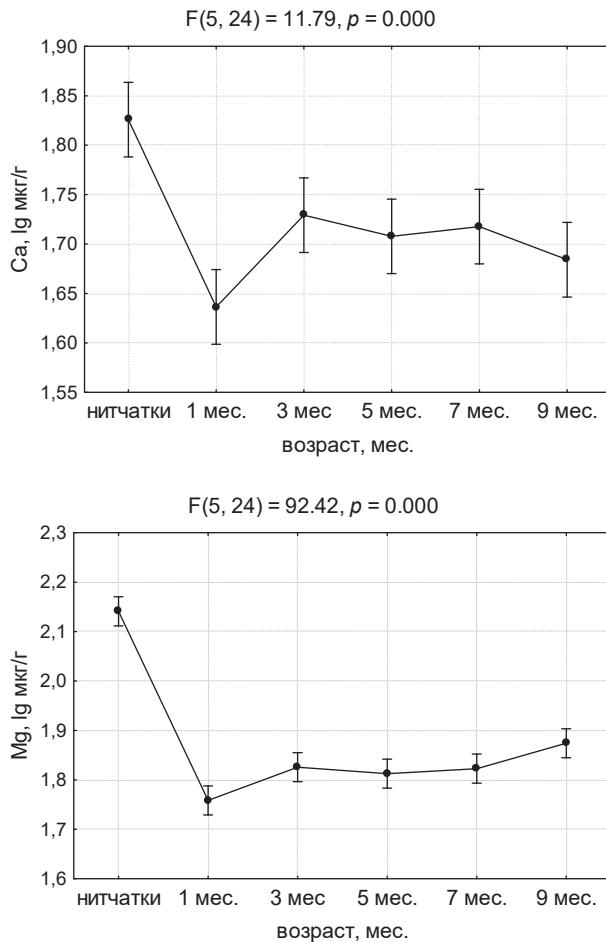


Рисунок 5.4.6 – Динамика содержания кальция и магния (lg мкг/г влажной ткани) в тканях медицинских пиявок *H. verbana* при росте и развитии в гирудокультуре (ANOVA)

Для концентраций эссенциального металла кобальта корреляционная связь между изучаемыми параметрами оказалась положительная, средней силы ($r_S = 0,58$; $p = 0,001$).

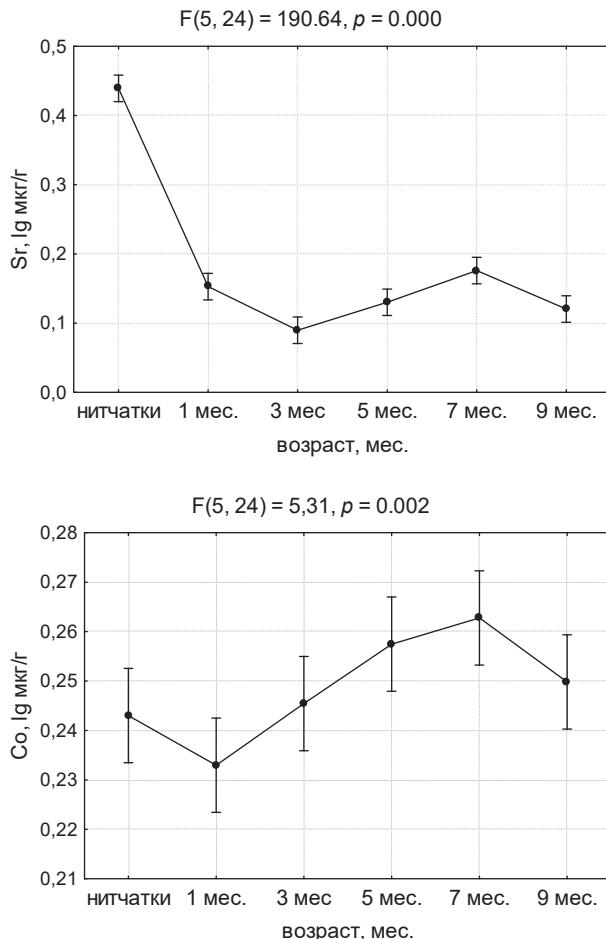


Рисунок 5.4.7 – Динамика содержания кобальта и стронция (lg мкг/г влажной ткани) в тканях медицинских пиявок *H. verbana* при росте и развитии в гирудокультуре (ANOVA)

Фазовый характер имеет динамика содержания токсичного свинца – максимальные концентрации ($2,01 \pm 0,02$ мкг/г) обнаружены в тканях однолетних пиявок. При дальнейшем развитии и росте (до семимесячного возраста), наблюдается снижение его концентраций в тканях, далее происходит значительное накопление этого экотоксиканта ($p < 0,001$) (табл. 5.4.1, рис. 5.4.8).

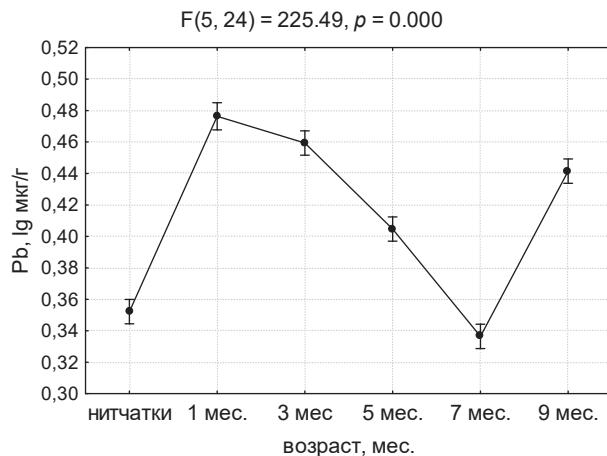


Рисунок 5.4.8 – Динамика содержания свинца ($\lg \text{мкг/г}$ влажной ткани) в тканях медицинских пиявок *H. verbana* при росте и развитии в гирудокультуре (ANOVA)

Для свинца корреляционная связь между изучаемыми показателями была статистически незначима, но с отрицательным трендом ($r_s = -0,26; p = 0,17$).

Вместе с тем выявлена сильная отрицательная корреляционная связь между возрастом пиявок и концентрациями токсичного кадмия в их тканях ($r_s = -0,77; p = 0,000$) (табл. 5.4.1, рис. 5.4.9).

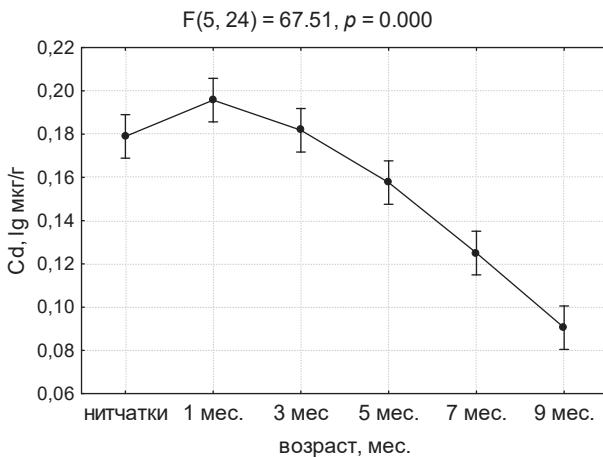


Рисунок 5.4.9 – Динамика содержания кадмия ($\lg \text{мкг}/\text{г}$ влажной ткани) в тканях медицинских пиявок *H. verbanus* при росте и развитии в гирудокультуре (ANOVA)

Данное позитивное явление обусловлено, на наш взгляд, несколькими факторами: интенсивным наращиванием мышечной массы пиявок на всех этапах роста и развития, наличием эффективных механизмов детоксикации и элиминации в их организме, четким контролем со стороны персонала биофабрики над качеством воды, в которой находятся пиявки и крови, которой они питаются.

Что касается условно эссенциального микроэлемента никеля, то его концентрации в тканях *H. verbanus*, в отличие от кадмия, с возрастом повышаются ($r_s = 0,77; p = 0,000$) (табл. 5.4.1, рис. 5.4.10).

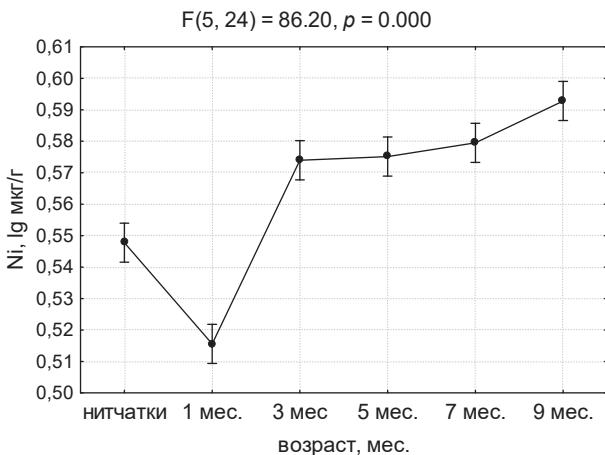


Рисунок 5.4.10 – Динамика содержания никеля ($\lg \text{мкг/г}$ влажной ткани) в тканях медицинских пиявок *H. verbana* при росте и развитии в гирудокультуре (ANOVA)

Таким образом, можно заключить, что у аптечных пиявок наибольшая возрастная изменчивость характерна для тканевых концентраций железа ($F_{5, 24} = 420,96; p = 0,000$), меди ($F_{5, 24} = 412,40; p = 0,000$) и свинца ($F_{5, 24} = 225,49; p = 0,000$), наименьшая – для кальция ($F_{5, 24} = 11,79; p = 0,000$) и кобальта ($F_{5, 24} = 5,31; p = 0,002$).

Показано, что у медицинских пиявок *H. verbana* в процессе интенсивного роста и развития на биофабрике линейно повышаются тканевые концентрации меди, железа, никеля, кобальта, и снижаются – кадмия (табл. 5.4.2). Для макро- и микроэлементов: цинка, марганца, кальция, магния, стронция, свинца выявлена фазовая динамика содержания в тканях, связанная с их физиологической ролью на разных этапах онтогенеза медицинских пиявок.

Известно, что микроэлементы могут взаимодействовать как между собой, так и с другими биологически активными соединениями и факторами. Это взаимное влияние типа синергизма или антагонизма осуществляется в абиотической среде, пище, пищеварительном канале, а также в процессах тканевого и

клеточного метаболизмов (Ковальчук, 2008; Моисеенко, 2009; Биоэлементный статус..., 2011).

Синергизм характерен, например, для Zn и Ca, Fe и Cu, Mn и Zn (Георгиевский и др., 1979; Mertz, 1985; Momciclovic, 1988). Антагонистами являются химические аналоги и гомологи, а также элементы, с одинаковой валентностью и способностью к образованию аналогичных комплексов. Так, снижение Pb в организме наблюдается в присутствии Ca, Zn, Mn; типичными антагонистами считаются Zn и Cd, Zn и Cu, Ca и Fe (Momciclovic, 1988; Биоэлементный статус..., 2011).

С практической точки зрения знание синергетических и антагонистических закономерностей эсценциальных и токсичных металлов позволяет предупреждать нежелательные формы взаимодействия и явления так называемых вторичных дефицитов макро- и микроэлементов у объектов аквакультуры.

В ходе исследования было установлено, что опасные экотоксианты Cd и Pb в тканях медицинских пиявок при ускоренном росте и развитии в гирудокультуре находятся между собой в синергетических отношениях, а с рядом эсценциальных металлов (Cu, Zn, Fe, Co) – в антагонистических (табл. 5.4.2).

Таблица 5.4.2 – Корреляционные связи между МЭ в тканях медицинской пиявки *H. verbana*, характеризующие синергетические и антагонистические отношения при ускоренном росте и развитии в гирудокультуре, $p < 0,05$

	Возраст	Cu	Zn	Mn	Fe	Ca	Mg	Cd	Pb	Ni	Co	Sr
Возраст		0,67			0,93			-0,77		0,77	0,58	
Cu	0,67				0,60			-0,46		0,66		-0,66
Zn				0,36			0,47	-0,65	-0,45	0,38		
Mn			0,36			0,62	0,80					
Fe	0,93	0,60						-0,81		0,77	0,52	
Ca				0,62			0,68		-0,48			0,42
Mg			0,47	0,80		0,68			-0,42			
Cd	-0,77	-0,46	-0,64		-0,81				0,48	-0,74	-0,52	
Pb			-0,45			-0,48	-0,42	0,48			-0,51	-0,55
Ni	0,77	0,66	0,38		0,77			-0,74			0,64	
Co	0,58				0,52			-0,52	-0,51	0,64		
Sr		-0,66				0,42			-0,55			

Для возрастной динамики эссенциальных макро- и микроэлементов в тканях аптечной пиявки, по нашим данным, характерен, в основном, синергизм: Cu – Fe; Zn – Mg; Fe – Cu, Sr; Ca – Mn, Mg, Sr; Mg – Zn, Mn, Ca; Co – Fe; Sr – Ca, а антагонистический тип связей выявлен только для меди и стронция (табл. 5.4.2).

Методом главных компонент (PCA) представлена визуализация возрастной специфики микроэлементного профиля тканей аптечных пиявок *H. verbana* в гирудокультуре (рис. 5.4.11, табл. 5.4.3).

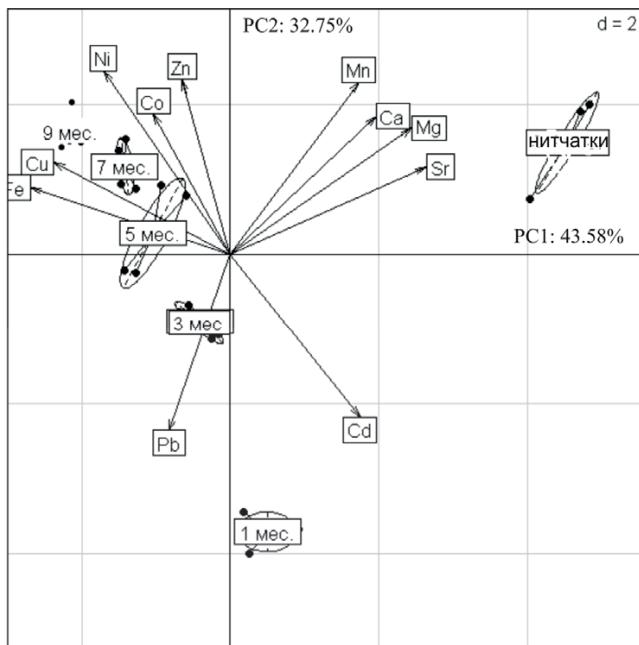


Рисунок 5.4.11 – Возрастная специфика МЭ состава тканей медицинских пиявок *H. verbana* из гирудокультуры в пространстве главных компонент

Показано, что 43,58% общей дисперсии приходится на первую главную компоненту (PC1), 32,75% – на вторую (PC2). Как видно из рисунка, все экспе-

риментальные наблюдения оформились в шесть возрастных групп медицинских пиявок, в соответствии со спецификой их микроэлементного обмена.

По первой компоненте (PC1) отмечена существенная пространственная отдаленность молоди *H. verbana* (нитчатки), для которых характерны максимальные концентрации эссенциальных микроэлементов Mn, Ca, Mg, Sr и минимальные – Cu, Fe и Pb.

Таблица 5.4.3 – Результаты компонентного анализа МЭ спектра тканей различных возрастных групп пиявок *H. verbana*

МЭ, lg мкг/г (i = 11)	Нагрузки (loadings, a_{ij})		Вклад в главную компоненту (Contribution = $(a_{ij}^2 * 100) / \lambda_j$, %)	
	Главные компоненты (Principal Components – PC), j = 1,2			
	1	2	1	2
Cu	-0,82***	0,37*	13,80	3,74
Zn	-0,22	0,70***	1,03	13,52
Mn	0,60***	0,69***	7,36	13,06
Fe	-0,93***	0,27	17,74	1,98
Ca	0,67***	0,55**	9,44	8,40
Mg	0,84***	0,50**	14,65	7,04
Cd	0,60***	-0,65***	7,47	11,65
Pb	-0,28	-0,70***	1,68	13,64
Ni	-0,59***	0,73***	7,14	14,85
Co	-0,36	0,56**	2,63	8,73
Sr	0,91***	0,35	17,05	3,39
	Собственные значения (eigenvalues, λ_j) PC		Дисперсия, объясненная PC (%)	
	4,82	3,60	43,58	32,75

Примечание: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$

По второй компоненте следует особо отметить пространственную дифференциацию молодых (одномесчных) особей, в тканях которых наблюдалось повышенное содержание экотоксикантов Pb и Cd.

Наиболее весомый вклад в возрастные различия микроэлементного спектра тканей медицинских пиявок из гирудокультуры по первой компоненте (PC1) вносят Fe и Sr (17,74% и 7,05%, соответственно), по второй (PC2) – Ni (14,85%).

Ранее, при сравнительном анализе микроэлементного спектра медицинских пиявок *H. verbana* различных возрастных групп из природных популяций (Глава 4), нами было установлено, что в тканях взрослых особей, в отличие от молоди, содержится значительно больше цинка, железа и свинца, но меньше – меди, марганца, никеля и кадмия ($p < 0,05$). Таким образом, анализируя и сопоставляя полученные результаты по онтогенетическим особенностям микроэлементного статуса аптечных пиявок из естественных ландшафтов и гирудокультуры, можно обнаружить общие для них тенденции: при росте и развитии в их тканях повышается содержание эссенциальных металлов цинка и железа, и снижаются – токсичного кадмия.

Выявленные нами физиологически нормальные (фоновые) концентрации макро- и микроэлементов в тканях *H. verbana* на разных этапах роста и развития в гирудокультуре могут способствовать оптимизации технологии разведения этих гидробионтов в искусственно созданных условиях на биофабриках.

5.5. Формирование биоэлементного профиля секрета слюнных желез медицинской пиявки *H. verbana* в гирудокультуре

В настоящее время все больший интерес вызывают природные средства оздоровления организма, характеризующиеся большой эффективностью и отсутствием побочных реакций при их использовании. В этом плане медицинская пиявка является одним из значимых традиционных биологических ресурсов, используемых в медицинской практике, обладающим поливалентным действием и не дающим побочных эффектов при длительном применении.

Фундаментальные медико-биологические исследования, проводимые в нашей стране и за рубежом в течение последних 10-15 лет, представили научное обоснование противотромботического, противовоспалительного, иммуностимулирующего, бактериостатического, анальгезирующего эффектов гирудотерапии, и создали необходимые предпосылки к ее более широкому применению в медицинской практике.

Детальное изучение состава сокрета слюнных желез (ССЖ) медицинских пиявок (МП) дало такие результаты, которые в значительной степени вернули популярность гирудофармакотерапии в официальной медицине и расширили наши знания в области фундаментальных наук.

Установлено, что ССЖ медицинской пиявки содержит ингибиторы протеолитических ферментов: бделлины, эглины, гирудин, ингибитор калликреина плазмы крови, фактора Хагемана, ингибиторы компонентов системы комплемента. В его составе соединения, активирующие аденилатциклазу мембран тромбоцитов и повышающие уровень ц-АМФ, ферменты дестабилаза, коллагеназа, гиалуронидаза, дипаза и холестерин-эстераза.

В секрете пиявок идентифицированы свободные стероидные гормоны (кортизол, прогестерон, тестостерон, андростендион, эстрадиол, дегидроэпиандростерон) и важные нейромедиаторы серотонин и гистамин (Баскова и др., 2008). В составе слюны МП обнаружен комплекс веществ, структурированный в липосому, которая, в зависимости от полярности растворителя, способна изменять свою пространственную ориентацию, чем обеспечивается беспрепятственное проникновение липосомы через мембрану клетки (Никонов, 2007).

Однако, несмотря на достаточную изученность биологически активных соединений, содержащихся в слюне медицинской пиявки, в мировой литературе недостаточно данных о ее биоэлементном статусе.

Учитывая первостепенное значение макро- и микроэлементов (МЭ) в процессах биосинтеза высокоактивных биологических соединений актуальность исследования их содержания в ССЖ медицинской пиявки несомненна.

Наши исследования показали, что медицинские пиявки при интенсивном росте и развитии проявляют высокую кумулятивную активность как к эссенциальным, так и к токсичным металлам (Chernaya, 2010; Черная, Ковальчук, 2011; Ковальчук и др., 2012).

Возникает вполне закономерный вопрос, насколько высоко содержание токсичных металлов в секрете слюнных желез медицинских пиявок, и возможен ли риск поступления избыточного количества ксенобиотиков со слюной кровососущих гирудинид в организм человека.

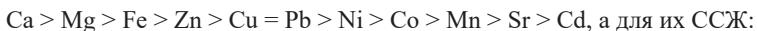
В данной части главы будут изучены закономерности формирования биоэлементного профиля секрета слюнных желез медицинской пиявки. Особенности накопления и распределения эссенциальных и токсичных МЭ в биологической системе «ткань – слюнные железы – секрет слюнных желез» исследовали у взрослых особей аптечной пиявки *H. verbana*, выращенных в искусственно созданных условиях на предприятии ЗАО «Международный центр медицинской пиявки» (п. Удельная, Московская обл.). Период голодаания пиявок составил пять месяцев.

Результаты спектрофотометрического анализа биологических проб экспериментальных особей медицинских пиявок представлены в таблице 5.5.1.

Показано, что уровень содержания исследуемых макро- и микроэлементов в тканях пиявок располагаются в ряду:



Для слюнных желез (СЖ) подобный ряд выглядит иначе:



Из полученных рядов видно, что соотношение исследуемых макро- и микроэлементов в биосубстратах медицинской пиявки весьма специфично.

Количественная оценка показала, что концентрации всех изучаемых макро- и микроэлементов в секрете слюнных желез пиявок кратно ниже, чем в гомогенатах тканей и слюнных железах ($p < 0,001$) (табл. 5.5.1).

Таблица 5.5.1 – Концентрации МЭ (мкг/г влажной ткани) в гомогенатах тканей, слюнных железах (СЖ) и секрете слюнных желез (ССЖ) пиявки *H. verbana*

MЭ, мкг/г	1. Ткань	2. СЖ	3. ССЖ	<i>p</i> Tukey test
Cu	3,38±0,01 [3,35-3,40]	2,08±0,09 [1,84-2,32]	0,068±0,001 [0,061-0,074]	<i>I</i> -2: 0,000 <i>I</i> -3: 0,000 <i>2</i> -3: 0,000
Zn	58,39±0,91 [56,34-60,45]	76,46±3,07 [67,93-84,98]	1,336±0,027 [1,220-1,453]	<i>I</i> -2: 0,000 <i>I</i> -3: 0,000 <i>2</i> -3: 0,000
Mn	0,63±0,02 [0,59-0,66]	0,72±0,04 [0,62-0,81]	0,016±0,001 [0,012-0,020]	<i>I</i> -2: 0,024 <i>I</i> -3: 0,000 <i>2</i> -3: 0,000
Fe	171,50±1,07 [169,08-173,91]	83,40±3,29 [74,26-92,54]	0,419±0,015 [0,335-0,483]	<i>I</i> -2: 0,000 <i>I</i> -3: 0,000 <i>2</i> -3: 0,000
Ca	197,32±1,18 [194,64-200,01]	231,54±8,56 [207,76-255,32]	48,234±1,506 [41,754-54,713]	<i>I</i> -2: 0,000 <i>I</i> -3: 0,000 <i>2</i> -3: 0,000
Mg	109,46±1,26 [106,62-112,31]	117,86±3,72 [107,53-128,19]	4,915±0,089 [4,532-5,297]	<i>I</i> -2: 0,053 <i>I</i> -3: 0,000 <i>2</i> -3: 0,000
Co	1,16±0,01 [1,13-1,18]	1,06±0,02 [1,01-1,10]	0,001±0,0003 [0,0006-0,0009]	<i>I</i> -2: 0,000 <i>I</i> -3: 0,000 <i>2</i> -3: 0,000
Sr	0,25±0,02 [0,20-0,29]	0,33±0,03 [0,25-0,41]	0,137±0,010 [0,094-0,179]	<i>I</i> -2: 0,049 <i>I</i> -3: 0,000 <i>2</i> -3: 0,002
Ni	2,52±0,03 [2,46-2,58]	1,98±0,04 [1,87-2,09]	0,007±0,0003 [0,006-0,009]	<i>I</i> -2: 0,000 <i>I</i> -3: 0,000 <i>2</i> -3: 0,000
Cd	0,31±0,01 [0,29-0,32]	0,12±0,01 [0,08-0,15]	0,0004±0,000 [0,0002-0,0006]	<i>I</i> -2: 0,000 <i>I</i> -3: 0,000 <i>2</i> -3: 0,000
Pb	2,08±0,01 [2,05-2,11]	2,06±0,07 [1,87-2,23]	0,0137±0,0010 [0,0094-0,0179]	<i>I</i> -2: 0,902 <i>I</i> -3: 0,000 <i>2</i> -3: 0,000
Σ МЭ	546,99±2,21 [541,10-552,03]	517,61±11,62 [485,35-549,87]	55,146±1,650 [48,047-62,244]	<i>I</i> -2: 0,021 <i>I</i> -3: 0,000 <i>2</i> -3: 0,000

Примечание: Σ МЭ – суммарный фонд макро- и микроэлементов

Так, суммарный фонд исследуемых биоэлементов в слюне пиявок в 9,92 и 9,39 раз ниже, чем в ее тканях и в слюнных железах, соответственно ($p < 0,001$). Наибольший вклад в выявленную диспропорцию вносят токсичные металлы кадмий, никель и свинец – их содержание в слюнной жидкости в 775 и 300 раз (Cd), в 360 и 283 раз (Ni), в 152 и 150 раз (Pb) ниже, чем в тканях и железах, соответственно ($p < 0,001$). Наименьшие различия между уровнем содержания МЭ в исследуемых биосубстратах медицинской пиявки характерны для эссенциального микроэлемента стронция (в 1,82 и 2,41 раз, соответственно) и макроэлемента кальция (в 4,09 и 4,80 раз, соответственно) ($p < 0,001$) (табл. 5.5.1).

Сравнительный анализ показал, что максимальные концентрации меди, железа, кобальта, никеля и кадмия содержат гомогенаты тканей пиявок, а эссенциальных металлов цинка, марганца, кальция – слюнные железы ($p < 0,001$) (табл. 5.5.1).

Между уровнем содержания магния, стронция и свинца в гомогенатах тканей и слюнных железах не выявлено статистически значимых различий, их концентрации в этих биосубстратах оказались сопоставимы ($p < 0,001$) (табл. 5.5.1).

Учитывая столь существенные различия между концентрациями макро- и микроэлементов в биопробах пиявок, изучение закономерностей формирования биоэлементного профиля в системе «ткань – слюнные железы – секрет слюнных желез» в дальнейшем мы проводили, используя показатели процентного содержания (%) от суммарного фонда) металлов (табл. 5.5.2, рис. 5.5.1-5.5.6).

Результаты дисперсионного анализа (ANOVA) показали, что в биологической системе медицинских пиявок «ткань – слюнные железы – секрет слюнных желез» уровень содержания эссенциальных металлов меди и железа линейно снижается ($p = 0,000$) (рис. 5.5.1).

Таблица 5.5.2 – Содержание макро- и микроэлементов (%) от суммарного фонда в гомогенатах тканей, слюнных железах (СЖ) и секрете слюнных желез (ССЖ) медицинской пиявки *H. verbana*

MЭ, %	1. Ткань	2. СЖ	3. ССЖ	<i>p</i> Tukey test
Cu	0,62±0,003 [0,61-0,62]	0,40±0,013 [0,37-0,44]	0,123±0,001 [0,118-0,127]	<i>I</i> -2: 0,000 <i>I</i> -3: 0,000 <i>2</i> -3: 0,000
Zn	10,67±0,133 [10,37-10,97]	14,84±0,865 [12,44-17,24]	2,424±0,025 [2,317-2,532]	<i>I</i> -2: 0,000 <i>I</i> -3: 0,000 <i>2</i> -3: 0,000
Mn	0,11±0,003 [0,11-0,12]	0,14±0,005 [0,12-0,15]	0,029±0,001 [0,025-0,033]	<i>I</i> -2: 0,001 <i>I</i> -3: 0,000 <i>2</i> -3: 0,000
Fe	31,35±0,138 [31,04-31,66]	16,09±0,275 [74,26-92,54]	0,759±0,004 [0,740-0,778]	<i>I</i> -2: 0,000 <i>I</i> -3: 0,000 <i>2</i> -3: 0,000
Ca	36,07±0,144 [35,75-36,40]	44,68±0,679 [42,79-46,56]	87,46±0,119 [86,95-87,97]	<i>I</i> -2: 0,000 <i>I</i> -3: 0,000 <i>2</i> -3: 0,000
Mg	20,02±0,255 [19,44-20,59]	22,78±0,638 [21,01-24,55]	8,918±0,109 [8,451-9,385]	<i>I</i> -2: 0,000 <i>I</i> -3: 0,000 <i>2</i> -3: 0,000
Co	0,211±0,002 [0,207-0,215]	0,205±0,006 [0,187-0,223]	0,0014±0,0000 [0,0012-0,0016]	<i>I</i> -2: 0,381 <i>I</i> -3: 0,000 <i>2</i> -3: 0,000
Sr	0,045±0,004 [0,037-0,052]	0,063±0,004 [0,053-0,075]	0,247±0,011 [0,202-0,293]	<i>I</i> -2: 0,029 <i>I</i> -3: 0,000 <i>2</i> -3: 0,002
Ni	0,461±0,005 [0,450-0,473]	0,383±0,014 [0,344-0,423]	0,013±0,0001 [0,012-0,014]	<i>I</i> -2: 0,000 <i>I</i> -3: 0,000 <i>2</i> -3: 0,000
Cd	0,056±0,001 [0,053-0,059]	0,023±0,002 [0,017-0,030]	0,0008±0,000 [0,0005-0,0011]	<i>I</i> -2: 0,000 <i>I</i> -3: 0,000 <i>2</i> -3: 0,000
Pb	0,380±0,003 [0,374-0,386]	0,397±0,016 [0,354-0,440]	0,025±0,0011 [0,020-0,029]	<i>I</i> -2: 0,267 <i>I</i> -3: 0,000 <i>2</i> -3: 0,000

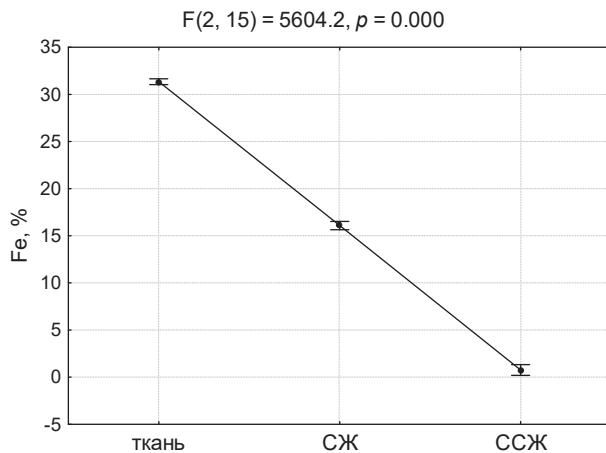
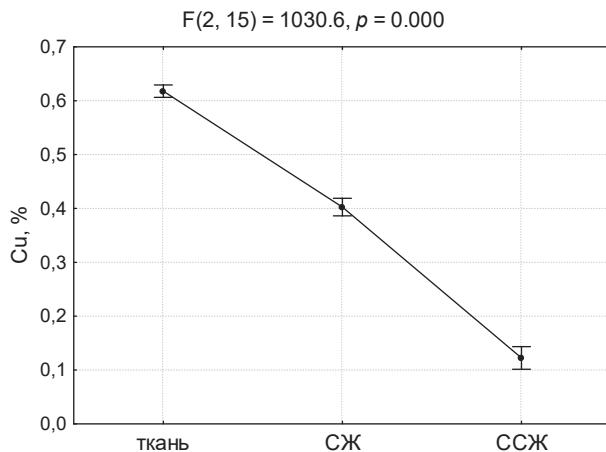


Рисунок 5.5.1 – Процентное содержание (% от фонда МЭ) меди и железа в системе биосубстратов медицинской пиявки «ткань-СЖ-ССЖ» (ANOVA)

Аналогичная картина была выявлена для токсичных металлов кадмия и никеля ($p = 0,000$) (рис. 5.5.2).

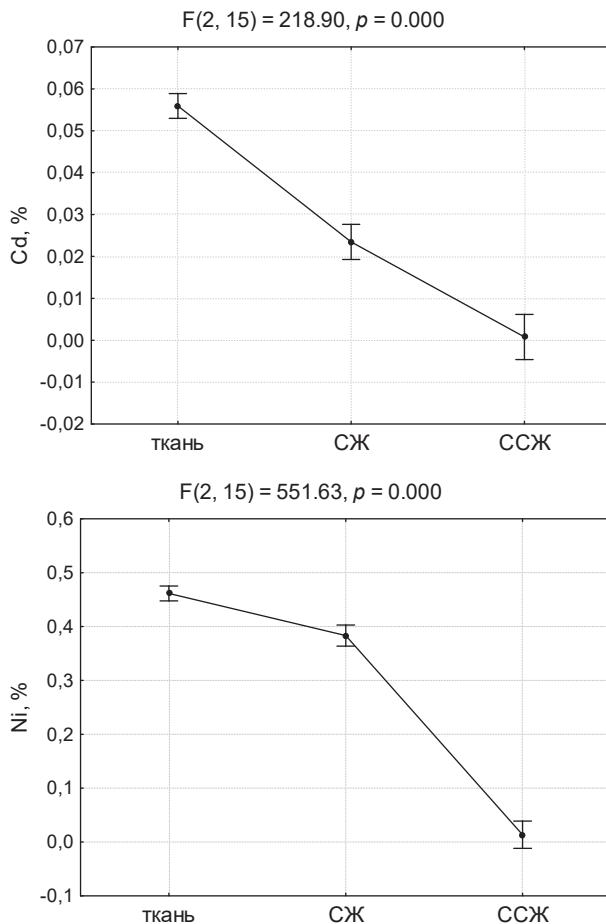


Рисунок 5.5.2 – Процентное содержания (%) от фонда МЭ) кадмия и никеля в системе биосубстратов медицинской пиявки «ткань-СЖ-ССЖ» (ANOVA)

Обратная картина (линейный рост) наблюдалась для содержания в тканях, слюнных железах и слюне пиявок для важнейшего макроэлемента Са и микроэлемента Sr ($p = 0,000$) (рис. 5.5.3).

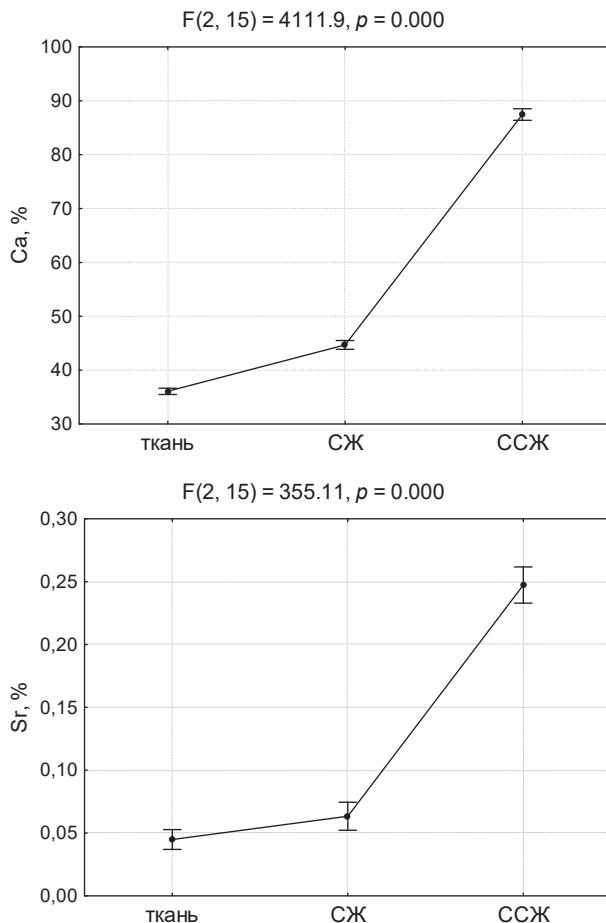


Рисунок 5.5.3 – Процентное содержание (% от фонда МЭ) кальция и стронция в системе биосубстратов медицинской пиявки «ткань-СЖ-ССЖ» (ANOVA)

Для эссенциальных микроэлементов цинка и марганца наблюдались фазовые изменения содержания в тканях, слюнных железах и слюне пиявок ($p = 0,000$) (рис. 5.5.4).

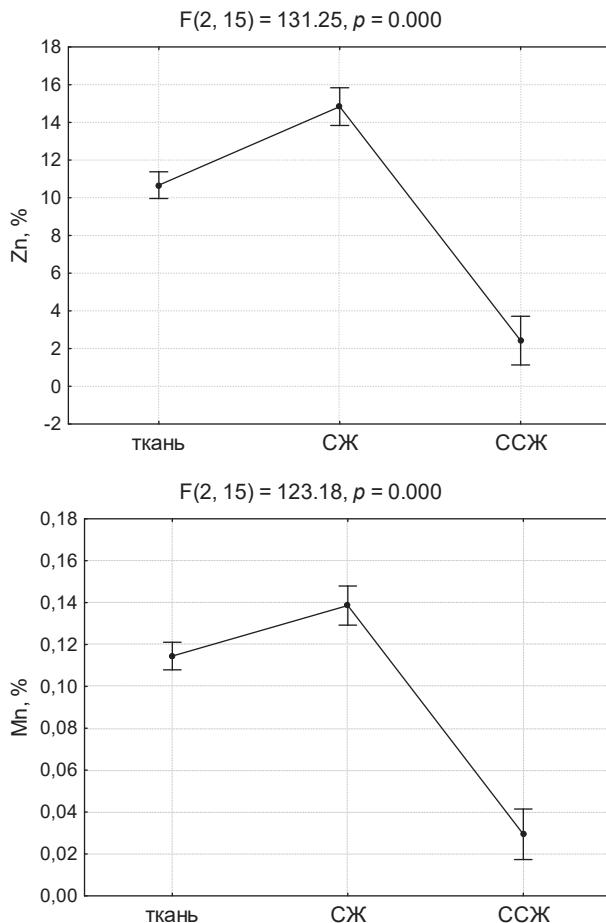


Рисунок 5.5.4 – Процентное содержание (%) от фонда МЭ) цинка и марганца в системе биосубстратов медицинской пиявки «ткань-СЖ-ССЖ» (ANOVA)

Несколько иной характер изменчивости был у токсичного свинца и эссенциального кобальта ($p = 0,000$) (рис. 5.5.5).

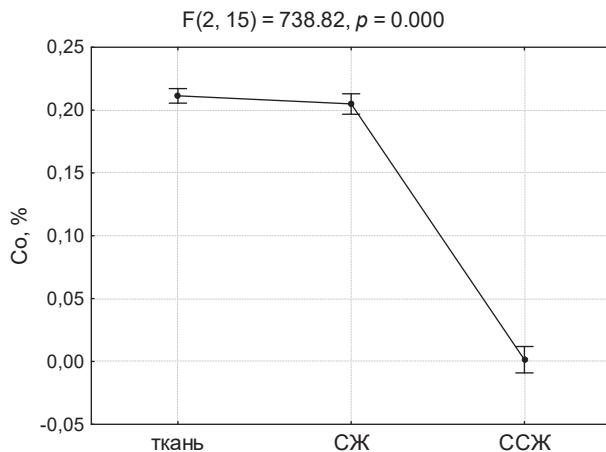
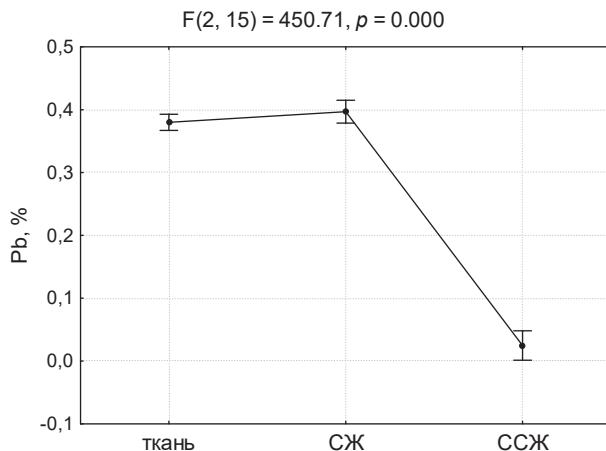


Рисунок 5.5.5 – Процентное содержание (%) от фонда МЭ) свинца и кобальта в системе биосубстратов медицинской пиявки «ткань-СЖ-ССЖ» (ANOVA)

Для процентного содержания магния, так же, как и для цинка и марганца, выявлена фазовая динамика в биологических субстратах – максимальные показатели этого макроэлемента характерны для слюнных желез, минимальные – для их секрета ($p = 0,000$) (рис. 5.5.6).

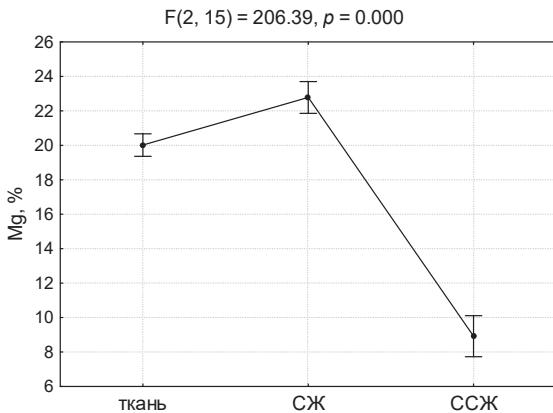


Рисунок 5.5.6 – Процентное содержание (%) от фонда МЭ) магния в системе биосубстратов медицинской пиявки «ткань-СЖ-ССЖ» (ANOVA)

Из рисунков видно, что наибольшая изменчивость содержания исследуемых макро- и микроэлементов в биологической системе организма медицинской пиявки «ткань – слюнные железы – секрет слюнных желез» характерна для эсценциальных металлов меди, железа, кальция, наименьшая – для цинка и марганца (ANOVA, $p < 0,001$).

Обобщая полученные нами данные можно заключить, что приоритетными элементами тканей и слюнных желез медицинской пиявки являются эсценциальные металлы: Ca, Fe, Mg и Zn, суммарное процентное содержание которых составляет 98,11% и 98,39%, соответственно.

Основу минерального пула слюнной жидкости аптечных пиявок *H. ver-bana* (98,79%) составляют Ca, Mg и Zn, причем 87,45% от суммарного фонда 11 макро- и микроэлементов приходится на кальций (табл. 5.5.3).

Таблица 5.5.3 – Баланс макро- и микроэлементов (МЭ, % от суммарного фонда) в тканях, слюнных железах (СЖ) и в секрете слюнных желез (ССЖ) медицинской пиявки *H. verbana* из гирудокультуры

МЭ, %	Ткань	СЖ	ССЖ	Ткань/ССЖ	СЖ/ССЖ
Cu	0,62	0,40	0,12	5,17	3,33
Zn	10,67	14,84	2,42	4,41	6,13
Mn	0,11	0,14	0,03	3,66	4,67
Fe	31,35	16,09	0,76	41,25	21,17
Ca	36,07	44,68	87,45	0,41	0,51
Mg	20,02	22,78	8,92	2,24	3,98
Co	0,21	0,20	0,001	210,00	200,00
Sr	0,04	0,06	0,25	0,16	0,24
Ni	0,46	0,38	0,013	35,38	29,23
Cd	0,06	0,02	0,0008	75,00	25,00
Pb	0,38	0,40	0,025	15,20	16,00

Обнаружено, что слюна медицинских пиявок, по сравнению с их тканями, значительно обеднена железом, содержание которого в гомогенатах тканей и слюнных железах составляет 31,35% и 16,09%, а в секрете – только 0,76% (табл. 5.5.3).

Аналогичные различия отмечены и для общего содержания токсичных металлов. Так, на суммарную долю Ni, Cd и Pb в тканях пиявок приходится 0,90% и 0,80%, в то время как их общее процентное содержание в слюне в 23,68 и 21,05 раз, соответственно, меньше, и составляет всего 0,038%, что указывает на депонирующую роль тканей и барьерную функцию слюнных желез при формировании микроэлементного спектра слюнной жидкости.

Установлено, что уровень содержания отдельных токсичных металлов в ССЖ медицинских пиявок на порядок ниже, чем в тканях и слюнных железах ($p < 0,001$). Так, процентное содержание Pb в слюне *H. verbana* в 15,20 и в 16 раз

ниже, соответственно, Ni – в 35,38 и 29,23 раз, Cd – в 75 и 25 раз, соответственно (табл. 5.5.3).

Вместе с тем, процентное содержание биофильных металлов стронция и кальция в слюне *H. verbana* существенно выше, чем в тканевых гомогенатах и слюнных железах ($p < 0,001$). Содержание остальных макро- и микроэлементов в тканях и железах значительно выше, чем в ССЖ ($p < 0,001$).

Наименьшие различия характерны для эссенциальных макро- и микроэлементов: Mg, Mn, Zn и Cu, наибольшие – для кобальта: его содержание в тканях и железах в 210 и 200 раз превышает таковое в слюнной жидкости (табл. 5.5.3).

При исследовании закономерностей формирования биоэлементного профиля в биологических субстратах аптечной пиявки *H. verbana* особенный интерес представляют синергетические и антагонистические взаимоотношения макро- и микроэлементов.

Показано, что между уровнем содержания эссенциальных металлов цинка, марганца и магния в тканях, слюнных железах и слюне медицинских пиявок существуют прямая корреляционная связь, а для марганца и магния еще и с токсичным свинцом ($p < 0,05$) (табл. 5.5.4).

Для экотоксикантов кадмия и никеля в биологической системе медицинской пиявки «ткань – слюнные железы – секрет слюнных желез» отмечен эффект синергизма, а также, что представляется особенно важным, выявлены отрицательные корреляционные связи с эссенциальными элементами кальцием и стронцием, и положительные – с медью, железом и кобальтом ($p < 0,05$).

Следует, кроме того, обратить особое внимание на антагонистический характер связей в системе «ткань – слюнные железы – секрет слюнных желез» между уровнем содержания макроэлемента кальция и эссенциальных металлов меди, железа и кобальта ($p < 0,05$) (табл. 5.5.4).

Таблица 5.5.4 – Корреляционные связи между микроэлементами (%)
в биологической системе медицинской пиявки *H. verbana*
«ткань – слюнные железы – секрет слюнных желез», $p < 0,05$

	Cu	Zn	Mn	Fe	Ca	Mg	Cd	Pb	Ni	Co	Sr
Cu				0,79	-0,86		0,80		0,79	0,63	-0,59
Zn			0,71			0,73					
Mn		0,71				0,74		0,56			
Fe	0,79				-0,69		0,94		0,67	0,54	-0,63
Ca	-0,86			-0,69			-0,78		-0,91	-0,58	0,84
Mg		0,73	0,74					0,70			
Cd	0,80			0,94	-0,78				0,69	0,59	-0,71
Pb			0,56			0,70					
Ni	0,79			0,67	-0,91		0,69			0,56	-0,87
Co	0,63			0,54	-0,58		0,59		0,56		-0,53
Sr	-0,59			-0,63	0,84		-0,71		-0,87	-0,53	

Визуализация специфики накопления и распределения эссенциальных и токсичных металлов (%) от суммарного фонда) в организме аптечной пиявки представлена с использованием метода главных компонент (PCA) (рис. 5.5.7, табл. 5.5.5).

Показано, что 86.30% общей дисперсии приходится на первую главную компоненту (PC1), 11.93% – на вторую главную компоненту (PC2).

На рисунке отражена существенная пространственная дифференциация секрета слюнных желез медицинских пиявок от гомогенатов тканей и слюнных желез по первой компоненте (PC1), обусловленная повышенным процентным содержанием кальция и стронция и пониженным уровнем остальных изучаемых макро- и микроэлементов.

По второй компоненте (PC2) визуализированы различия биоэлементного профиля тканей и слюнных желез по процентному содержанию кадмия, железа,

никеля, а также цинка, магния, марганца, согласно их распределению в данных биосубстратах медицинской пиявки.

Столь очевидные различия накопления и распределения макро- и микроэлементов в биологической системе медицинской пиявки «ткань – слюнные железы – секрет слюнных желез» подтверждаются очень высокой корреляцией исследуемых элементов с первой компонентой (PC1) (рис. 5.5.7, табл. 5.5.5).

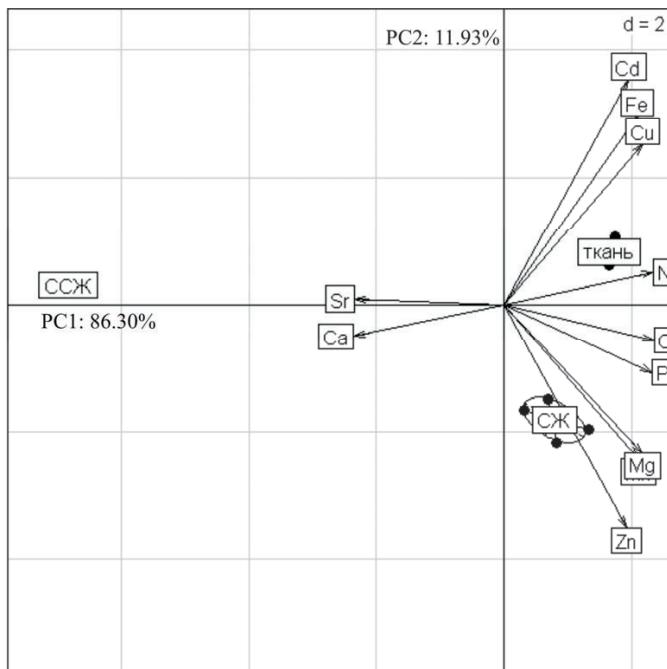


Рисунок 5.5.7 – Специфика микроэлементного спектра (%) тканей, слюнных желез (СЖ) и секрета слюнных желез (ССЖ) медицинских пиявок *H. verbana* из гирудокультуры в пространстве главных компонент

Таблица 5.5.5 – Результаты компонентного анализа МЭ спектра тканей, слюнных желез (СЖ) и секрета слюнных желез (ССЖ) медицинских пиявок *H. verbana* из гирудокультуры

МЭ, % (i = 11)	Нагрузки (loadings, a_{ij})		Вклад в главную компоненту (Contribution = $(a_{ij}^2 * 100) / \lambda_j$, %)	
	Главные компоненты (Principal Components – PC), j = 1,2			
	1	2	1	2
Cu	0,92**	0,40	8,84	11,94
Zn	0,81**	-0,55*	6,93	23,04
Mn	0,89**	-0,38	8,41	11,06
Fe	0,88**	0,47	8,21	16,60
Ca	-0,99**	-0,08	10,45	0,47
Mg	0,92**	-0,37	8,89	10,26
Cd	0,82**	0,55*	7,15	23,43
Pb	0,98**	-0,17	10,11	2,13
Ni	0,99**	0,08	10,30	0,47
Co	0,99**	-0,09	10,39	0,59
Sr	-0,99**	0,01	10,33	0,01
	Собственные значения (eigenvalues, λ_j) PC		Дисперсия, объясненная PC (%)	
	9,43	1,31	86,30	11,93

Примечание: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,001$

Таким образом, наглядно показано, что мышечная ткань и слюнные железы медицинских пиявок являются основными депонирующими биосредами для эссенциальных и токсичных металлов, поступающих в ее организм.

Особенности специфики микроэлементного спектра тканей и слюнных желез традиционно визуализировано при помощи компонентного анализа (PCA): 66,01% общей дисперсии приходится на первую главную компоненту (PC1), 18,93% – на вторую главную компоненту (PC2) (рис. 5.5.8, табл. 5.5.6).

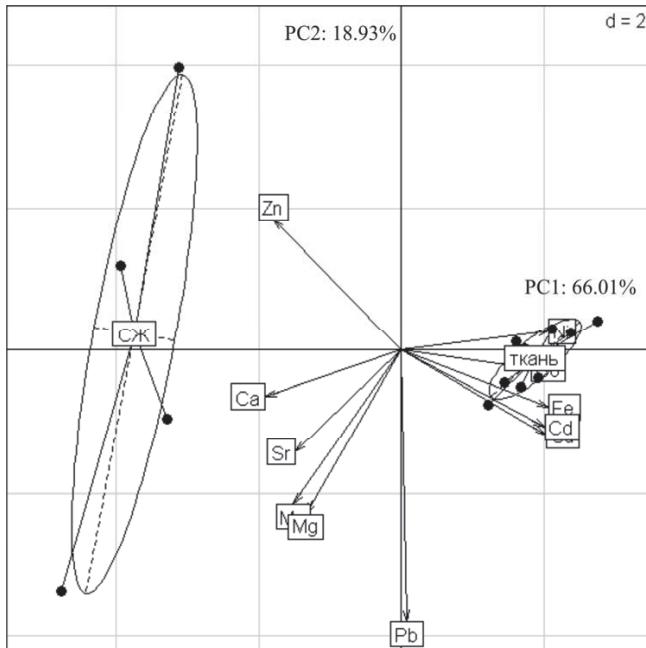


Рисунок 5.5.8 – Специфика биоэлементного профиля ($\lg \text{мкг/г}$ влажной ткани) тканей и слюнных желез (СЖ) медицинских пиявок *H. verbana* из гирудокультуры в пространстве главных компонент

Наибольший вклад, на фоне очень высокой корреляции, в дисперсию данных, объясненной первой главной компонентой (PC1), вносят Cu (12,37%), Fe (12,72%), Cd (12,15%) и Ni (12,90%) – элементы, концентрация которых в мышечной ткани существенно выше, чем в слюнных железах. Со второй компонентой очень сильно коррелирует токсичный свинец (-0,95, $p = 0,000$), его вклад в PC2 составил 43,16%.

На основании полученных нами экспериментальных данных можно заключить, что микроэлементный спектр сокрета слюнных желез медицинской пиявки *H. verbana*, выращенной в искусственно созданных условиях, характеризуется высоким процентным содержанием эссенциальных макро- и микроэле-

ментов ($\text{Ca}+\text{Mg}+\text{Zn} = 98,8\%$ от суммарного фонда) и крайне низким паттерном тяжелых металлов ($\text{Ni}+\text{Cd}+\text{Pb} = 0,04\%$), что обусловлено барьерной функцией слюнных желез и депонирующей ролью мышечных тканей.

Таблица 5.5.6 – Результаты компонентного анализа МЭ спектра тканей и слюнных желез (СЖ) медицинских пиявок *H. verbana* из гирудокультуры

МЭ, лг мкг/г (i = 11)	Нагрузки (loadings, a_{ij})		Вклад в главную компоненту (Contribution = $(a_{ij}^2 * 100) / \lambda_j$, %)	
	Главные компоненты (Principal Components – PC), j = 1,2			
	1	2	1	2
Cu	0,95***	-0,30	12,37	4,20
Zn	-0,84**	0,46	9,73	10,18
Mn	-0,71*	-0,54	6,95	13,77
Fe	0,96***	-0,20	12,72	1,88
Ca	-0,89***	-0,16	10,96	1,27
Mg	-0,63*	-0,57*	5,45	15,70
Cd	0,94***	-0,27	12,15	3,43
Pb	0,04	-0,95***	0,02	43,16
Ni	0,97***	0,07	12,90	0,22
Co	0,85***	-0,06	10,04	0,20
Sr	-0,70**	-0,35	6,71	6,00
	Собственные значения (eigenvalues, λ_j) PC		Дисперсия, объясненная PC (%)	
	7,26	2,08	66,01	18,93

Примечание: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$

Кроме того, авторами было установлено, что для слюны медицинских пиявок характерно высокое содержание незаменимых аминокислот, обладающих детоксицирующими свойствами (Ковалчук и др., 2011а; Ковалчук, Черная, 2013; Chernaya, 2013).

Результаты исследования микроэлементного состава тканей, слюнных желез и слюнной жидкости медицинских пиявок, помимо научной новизны, имеют практическое значение для гиудофармакологии.

Глава 6. ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО ГОЛОДАНИЯ НА МИКРОЭЛЕМЕНТНЫЙ СПЕКТР ТКАНЕЙ МЕДИЦИНСКИХ ПИЯВОК ИЗ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ И ГИРУДОКУЛЬТУРЫ

Одной из адаптаций медицинских пиявок к неблагоприятным факторам среды (недостаток кормовых ресурсов, пересыхание временных водоемов, сезонное снижение температуры и т. д.), приобретенных в ходе эволюционного развития, является способность к длительному голоданию.

В мировой литературе недостаточно данных об уровне содержания таких важных биологически активных соединений, как макро- и микроэлементы, в тканях медицинских пиявок при различных физиологических состояниях. Формирование микроэлементного состава тканей животных тесно связано с метаболизмом белков, углеводов, липидов, что может служить своеобразной интегративной характеристикой их фазовых изменений в состоянии эндогенного питания и переключения ферментных систем на возможно более экономное перераспределение и утилизацию тканевых ресурсов, что в особо яркой форме может проявляться при голодании (Ковалчук и др., 2011).

6.1. Содержание биологически активных металлов в тканях сытых и голодных особей *H. verbana* и *H. sanguisuga* из природных популяций

В данном разделе приведены результаты лабораторного эксперимента по влиянию хронического голодания (семь месяцев) на состояние микроэлементного профиля тканей медицинских пиявок *H. verbana* из природных популяций (р. Челбас, Краснодарский край).

Показано, что после вынужденного семимесячного голодания у медицинских пиявок существенно, в 5,62 раз, снижалась масса тела: от $3,26 \pm 0,22$ г до

$0,58 \pm 0,04$ г ($p < 0,001$). На фоне кратной потери веса в тканях голодающих особей аптечных пиявок, по данным спектрофотометрического анализа, значимо снижалось содержание эссенциального микроэлемента Fe, в 1,88 раз ($p < 0,001$). Обратная картина была для концентраций эссенциальных микроэлементов Cu и Zn – в эксперименте наблюдался их существенный рост в тканях голодных пиявок, в 1,96 раз и в 1,87 раз, соответственно ($p < 0,001$) (табл. 6.1.1).

Таблица 6.1.1 – Содержание эссенциальных и токсичных МЭ (мкг/г влажной ткани) в тканях медицинских пиявок *H. verbana* из природных популяций при хроническом голодаании (7 месяцев)

МЭ, мкг/г	Контроль n = 10	Голодание n = 10	p Tukey test
Cu	$0,78 \pm 0,05$ [0,67-0,88]	$1,53 \pm 0,09$ [1,32-1,73]	0,000
Zn	$28,49 \pm 0,63$ [27,07-29,91]	$53,28 \pm 1,17$ [50,63-55,93]	0,000
Mn	$0,73 \pm 0,02$ [0,67-0,78]	$0,78 \pm 0,03$ [0,72-0,84]	0,156
Fe	$234,63 \pm 9,13$ [213,97-255,29]	$124,80 \pm 4,86$ [113,81-135,79]	0,000
Cd	$0,29 \pm 0,05$ [0,28-0,29]	$0,37 \pm 0,01$ [0,36-0,39]	0,000
Pb	$1,40 \pm 0,05$ [1,29-1,21]	$1,83 \pm 0,06$ [1,69-1,98]	0,000
Ni	$1,09 \pm 0,05$ [0,98-1,19]	$1,11 \pm 0,05$ [1,00-1,21]	0,770

В тканях опытных особей отмечено также статистически значимое повышение концентраций токсичных металлов Cd (в 1,28 раз) и Pb (в 1,31 раз) ($p < 0,001$). Вместе с тем уровень содержания биологически активных металлов Mn и Ni в тканях голодных особей *H. verbana* показал несущественные изменения относительно контрольных показателей ($p > 0,05$) (табл. 6.1.1).

Изменение уровня содержания эссенциальных микроэлементов в тканях медицинских пиявок в период длительного голодаания указывает на их важную роль в поддержании гомеостаза экспериментальных особей. Высокий расход железа в организме опытных пиявок связан с его биологическими свойствами:

оно является главным действующим элементом гемоглобина крови, а также входит в состав ферментов, катализирующих процессы клеточного дыхания, участвует в энергетическом обмене. Повышение уровня содержания меди и цинка компенсирует недостаток железа у голодных особей, поскольку эти эссенциальные металлы также играют важную роль в процессах кроветворения и кислородном обмене на тканевом уровне. Медь является компонентом целого ряда ферментов-оксидаз, и участвует в биохимических процессах как составная часть ферментов, осуществляющих реакции окисления субстратов молекулярным кислородом. Цинк играет важную роль в нуклеиновом обмене, процессах транскрипции, стабилизации нуклеиновых кислот, белков и особенно компонентов биологических мембран, а также в обмене витамина А, он обнаружен в составе более 200 ферментов, относящихся ко всем шести классам, включая гидrolазы, трансферазы, оксидоредуктазы, лиазы, лигазы и изомеразы (Авцын и др., 1991).

Наблюдаемый нами в тканях экспериментальных особей медицинских пиявок *H. verbana* рост концентраций экотоксикантов Cd и Pb, не участвующих в нормальных физиологических процессах, скорее всего, происходит за счет многократного снижения мышечной массы голодающих пиявок, и, вероятно, ослабления детоксикационных возможностей последних.

Методом главных компонент (PCA) наглядно представлены результаты влияния хронического голодаания на биоэлементный профиль тканей медицинских пиявок (табл. 6.1.2, рис. 6.1.1).

Показано, что 68,52% общей дисперсии приходится на первую главную компоненту (PC1), 14,97% – на вторую главную компоненту (PC2) (табл. 6.1.2, рис. 6.1.1).

На рисунке показана четкая дифференциация биоэлементного спектра медицинских пиявок по первой компоненте PC1. Отмечена существенная пространственная дифференциация голодающих особей аптечной пиявки от сытых (контроль), связанная с повышенными концентрациями в их тканях меди, цинка, кадмия, свинца, а также тенденцией к более высокому содержанию марганца.

Таблица 6.1.2 – Результаты компонентного анализа МЭ спектра тканей медицинских пиявок при хроническом голодании

МЭ, лг мкг/г (i = 7)	Нагрузки (loadings, a_{ij})		Вклад в главную компоненту (Contribution = $(a_{ij}^2 * 100) / \lambda_j$, %)	
	Главные компоненты (Principal Components – PC), j = 1,2			
	1	2	1	2
Cu	-0,93**	0,20	18,19	3,65
Zn	-0,96**	-0,06	19,35	0,37
Mn	-0,57*	-0,24	6,71	5,30
Fe	0,93**	0,13	18,00	1,56
Cd	-0,98**	0,08	19,84	0,68
Pb	-0,90**	-0,17	16,94	2,89
Ni	-0,22	0,95**	0,97	85,56
	Собственные значения (eigenvalues, λ_i) PC		Дисперсия, объясненная PC (%)	
	4,80	1,05	68,52	14,97

Примечание: * – $p < 0,01$, ** – $p < 0,001$

Наибольший вклад в различия биоэлементных спектров тканей экспериментальных особей *H. verbana* по первой компоненте вносят цинк (19,35%) и кадмий (19,84%). Коэффициенты корреляции этих металлов с PC1 составили -0,96 и -0,98, соответственно ($p = 0,000$).

Со второй компонентой статистически значимо коррелирует только никель (0,95, $p < 0,001$), между концентрациями которого в тканях пиявок обеих экспериментальных групп не было выявлено значимых различий, его вклад в дисперсию данных, объясненной компонентой PC2 составил 85,56% (рис. 6.1.1, табл. 6.1.2).

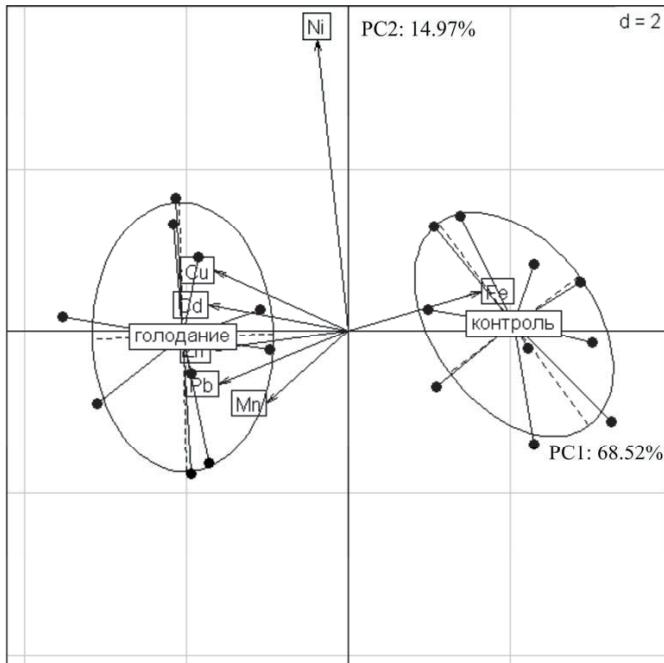


Рисунок 6.1.1 – Содержание эссенциальных и токсичных металлов в тканях медицинских пиявок *H. verbana* из природных популяций при хроническом голодании в пространстве главных компонент

Для изучения трофической специфики биоэлементного статуса голодающих особей челюстных пиявок, нами была параллельно проведена оценка микроэлементного спектра тканей больших ложноконских пиявок *H. sanguisuga*, содержащихся в лабораторных условиях без пищи пять месяцев.

Показано, что после пятимесячного голодаания особи хищной пиявки *H. sanguisuga* существенно, в 4,54 раз, теряли в весе – от $1,86 \pm 0,12$ г до $0,41 \pm 0,08$ г ($p < 0,001$).

На фоне кратного снижения мышечной массы у опытных особей *H. sanguisuga* в тканях значимо повышались концентрации биогенного микроэлемента

Zn (в 1,26 раз) и токсичного Cd (в 1,44 раз) ($p < 0,001$) и наблюдалась тенденция к повышению Mn (в 1,10 раз) ($p > 0,05$).

Одновременно у голодных особей *H. sanguisuga*, в сравнении с контрольными показателями, существенно снижалось содержание эссенциальных металлов Cu (в 1,29 раз) и Fe (в 1,27 раз) ($p < 0,001$), и происходило незначительное колебание тканевых концентраций Pb (в 1,04 раз) и Ni (в 1,09 раз) ($p > 0,05$) (табл. 6.1.3).

Таблица 6.1.3 – Содержание эссенциальных и токсичных МЭ (мкг/г влажной ткани) в тканях большой ложноконской пиявки *H. sanguisuga*
при хроническом голодании (5 месяцев)

MЭ, мкг/г	Контроль $n = 10$	Голодание $n = 10$	p Tukey test
Cu	$5,59 \pm 0,21$ [5,12-6,06]	$4,34 \pm 0,97$ [3,98-4,72]	0,000
Zn	$92,77 \pm 2,11$ [88,00-97,54]	$116,89 \pm 2,66$ [110,88-122,90]	0,000
Mn	$3,47 \pm 0,22$ [2,98-3,96]	$3,81 \pm 0,24$ [3,27-4,35]	0,312
Fe	$95,94 \pm 1,99$ [91,44-100,45]	$75,54 \pm 1,57$ [71,99-79,10]	0,000
Cd	$0,32 \pm 0,01$ [0,30-0,35]	$0,46 \pm 0,02$ [0,43-0,50]	0,000
Pb	$1,73 \pm 0,04$ [1,63-1,83]	$1,66 \pm 0,04$ [1,56-1,76]	0,292
Ni	$1,71 \pm 0,05$ [1,61-1,82]	$1,57 \pm 0,04$ [1,47-1,67]	0,052

Визуализация представленных данных по особенностям микроэлементного профиля тканей голодных и сытых (контроль) особей ложноконских пиявок проведена с помощью компонентного анализа (PCA).

Показано, что 49,29% общей дисперсии приходится на первую главную компоненту (PC1), 26,91% – на вторую главную компоненту (PC2) (рис. 6.1.2, табл. 6.1.4).

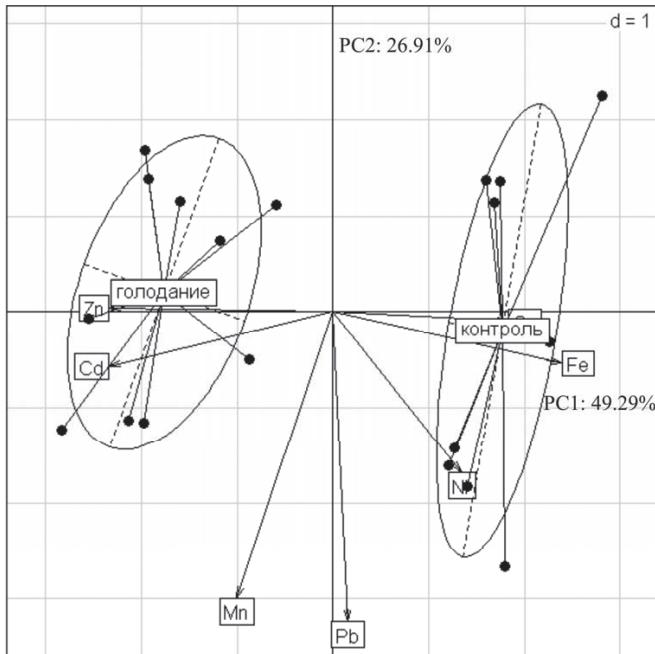


Рисунок 6.1.2 – Содержание эссенциальных и токсичных металлов в тканях больших ложноконских пиявок *H. sanguisuga* при влиянии хронического голодаания в пространстве главных компонент

Наибольший вклад в различия микроэлементного состава тканей контрольных и голодных особей ложноконских пиявок, объясненной первой компонентой (PC1), вносят цинк, железо и кадмий, их коэффициенты корреляции с PC1 составили -0,91, 0,93 и -0,91, соответственно, ($p < 0,001$).

Со второй компонентой (PC2) значимо коррелируют микроэлементы, содержание которых в тканях экспериментальных особей *H. sanguisuga* было со-поставимо ($p > 0,05$) – это марганец (-0,86) свинец (-0,93) и никель (-0,48) ($p < 0,05$).

Таблица 6.1.4 – Результаты компонентного анализа биоэлементного спектра тканей больших ложноконских пиявок *H. sanguisuga* при влиянии хронического голодаания

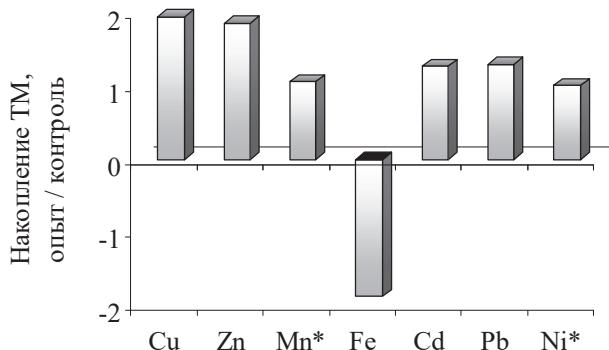
МЭ, lg мкг/г (i = 7)	Нагрузки (loadings, a_{ij})		Вклад в главную компоненту (Contribution = $(a_{ij}^2 * 100) / \lambda_j, \%$)	
	Главные компоненты (Principal Components – PC), j = 1,2			
	1	2	1	2
Cu	0,71**	-0,03	14,68	0,04
Zn	-0,91**	0,01	23,90	0,01
Mn	-0,39	-0,86**	4,42	39,19
Fe	0,93**	-0,15	25,08	1,27
Cd	-0,91**	-0,16	23,95	1,43
Pb	0,06	-0,93**	0,10	45,60
Ni	0,52*	-0,48*	7,90	12,46
	Собственные значения (eigenvalues, λ_j) PC		Дисперсия, объясненная PC (%)	
	3,45	1,88	49,29	26,91

Примечание: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,001$

Сравнительный анализ влияния хронического голодаания на микроэлементный состав тканей кровососущих и хищных челюстных пиявок выявил, как общебиологические сходства, так и трофические различия (рис. 6.1.3).

Так, в тканях голодающих особей хищных пиявок, в сравнении с кровососущими гирудинами, статистически значимо снижается не только содержание железа, но и эссенциальной меди ($p < 0,001$), а концентрации свинца имеют тенденцию к падению ($p > 0,05$). Кроме того, для медицинских пиявок в период хронического голодаания характерна более высокая, нежели у ложноконских пиявок, аккумуляция в тканях эссенциальных металлов меди и цинка – их концентрации почти в два раза превышают исходные значения (рис. 6.1.3).

Медицинские пиявки *H. verbana*



Ложноконские пиявки *H. sangusuga*

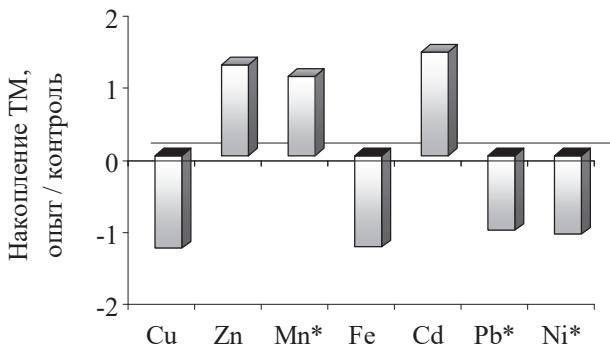


Рисунок 6.1.3 – Трофическая специфика накопления эссенциальных и токсичных металлов в тканях кровососущих (*H. verbana*) и хищных (*H. sanguisuga*) пиявок при хроническом голодании. По оси Z указано отношение концентраций микроэлементов в тканях голодных особей (опыт) к контрольным показателям

Аналогичный тренд наблюдается и для содержания железа – падение его концентраций в тканях голодных особей кровососущих *H. verbana* более масштабно (в 1,88 раз), чем у хищных пиявок (в 1,27 раз).

Обнаруженные различия в характере изменения содержания эссенциальных и токсичных МЭ в тканях голодных особей *H. verbana* и *H. sanguisuga* обусловлены тем, что хищные пиявки выдерживают продолжительное время без пищи исключительно за счет запасных веществ паренхимы и мышечного белка, а гематофаги, кроме того, используют резервы законсервированной в их объемистом желудке крови (до пяти месяцев голодания). Вместе с тем, общими закономерностями для кровососущих и хищных пиявок в критические сроки голодания, когда происходят необратимые изменения метаболических процессов, истощаются жизненные ресурсы, а в дальнейшем начинается гибель животных, являются существенные потери биофильтрного Fe на фоне значимого повышения концентраций Zn и Cd и незначительного колебания концентраций Mn и Ni.

6.2. Влияние хронического голодания на микроэлементный состав тканей медицинской пиявки *H. verbana* из гирудокультуры

Изучение уровня содержания биологически активных соединений, в частности макро- и микроэлементов, в тканях медицинских пиявок, выращенных на биофабрике, имеет не только теоретический интерес, но и практическую ценность. Основным параметром для медицинской пиявки, как лекарственного средства, является срок голодания, которым определяется наличие в составе секрета слюны желез сбалансированного комплекса биологически активных веществ. Показано, что оптимальная эффективность слюны пиявок наступает уже к трем месяцам голодания (Шестаков и др., 2007).

Принимая во внимание то, что в настоящее время медицинские пиявки используются не только нативно, при гирудотерапии, но и гомогенаты ее тканей служат сырьем для фармацевтической и косметологической продукции, актуальны исследования уровня содержания биологически активных соединений в их тканях в разные сроки голодания. Разработки в этом направлении могут способствовать более эффективному и направленному использованию приоритет-

ных МЭ, содержащихся в тканях пиявок, при производстве лекарственных препаратов, пищевых биологических добавок, косметологических средств.

Исследования, проведенные нами на медицинских пиявках *H. verbana* из природных популяций, показали, что хроническое голодание оказывает существенное влияние на микроэлементный обмен в ее тканях. Пиявки, выращенные на биофабрике, по нашим наблюдениям, способны голодать намного дольше, чем особи из естественных водоемов, более 12 месяцев. Мы располагали достаточно большим количеством особей *H. verbana* из гирудокультуры, что позволило нам детально изучить картину динамики МЭ в тканях медицинских пиявок, голодавших три, пять, семь, девять и двенадцать месяцев (Ковалчук и др., 2011).

Результаты однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) показали, что хроническое голодание оказывает существенное влияние, как на содержание отдельных исследуемых макро- и микроэлементов в тканях аптечных пиявок, так и на их суммарный фонд (табл. 6.2.1, рис. 6.2.1-6.2.11).

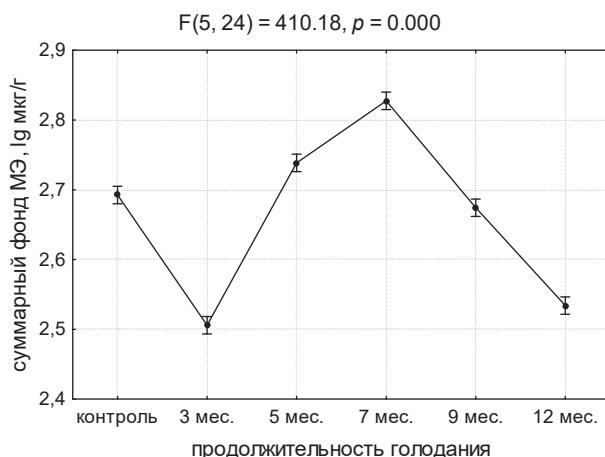


Рисунок 6.2.1 – Динамика суммарного фонда макро- и микроэлементов (МЭ, Ig мкг/г влажной ткани) в тканях медицинских пиявок *H. verbana* из гирудокультуры при хроническом голодании (ANOVA)

Таблица 6.2.1 – Динамика содержания макро- и микроэлементов (мкг/г влажной ткани) в тканях медицинских пиявок *H. verbana*, выращенных на биофабрике, при хроническом голодании

МЭ мкг/г	Контроль (сътые) <i>n</i> = 5	Продолжительность голодания <i>H. verbana</i> , месяцы				
		3 <i>n</i> = 5	5 <i>n</i> = 5	7 <i>n</i> = 5	9 <i>n</i> = 5	12 <i>n</i> = 5
Cu	2,0 ± 0,03 [1,9-2,1]	2,2 ± 0,01* [2,1-2,2]	3,4 ± 0,02* [3,3-3,4]	3,6 ± 0,08* [3,4-3,8]	3,6 ± 0,02* [3,5-3,7]	2,5 ± 0,01* [2,5-2,6]
Zn	20,5 ± 0,73 [18,5-22,5]	47,3 ± 1,49* [43,2-51,5]	58,4 ± 1,84* [53,3-63,5]	72,4 ± 2,54* [65,4-79,5]	39,3 ± 1,78* [34,4-44,3]	32,5 ± 4,01* [21,4-43,6]
Mn	0,8 ± 0,01 [0,8-0,9]	1,0 ± 0,02* [0,9-1,1]	0,6 ± 0,03* [0,5-0,7]	0,9 ± 0,01 [0,8-0,9]	0,8 ± 0,02 [0,8-0,9]	0,5 ± 0,02* [0,5-0,6]
Fe	346,3 ± 8,77 [321,9-370,6]	142,6 ± 4,02* [131,5-153,8]	171,5 ± 1,74* [166,7-176,3]	186,5 ± 2,64* [179,1-193,8]	195,9 ± 2,62* [188,6-203,1]	125,4 ± 1,96* [120,0-130,8]
Ca	51,3 ± 1,4 [47,4-55,2]	48,3 ± 1,79 [43,3-53,2]	197,3 ± 1,54* [193,0-201,5]	255,1 ± 5,31* [240,4-269,8]	97,0 ± 3,67* [86,9-107,2]	91,9 ± 3,51* [82,2-101,6]
Mg	65,6 ± 1,4 [61,7-69,4]	73,2 ± 2,06* [67,5-78,9]	109,5 ± 2,72* [101,9-117,0]	144,7 ± 6,84* [125,7-163,6]	128,5 ± 2,83* [120,6-136,3]	83,2 ± 2,37* [76,7-89,8]
Co	0,8 ± 0,02 [0,8-0,9]	0,8 ± 0,02 [0,7-0,8]	1,2 ± 0,02* [1,1-1,2]	1,4 ± 0,03* [1,3-1,5]	0,8 ± 0,03 [0,7-0,9]	0,7 ± 0,01* [0,6-0,7]
Sr	0,5 ± 0,01 [0,5-0,6]	0,3 ± 0,01* [0,3-0,4]	0,3 ± 0,03* [0,2-0,3]	1,4 ± 0,20* [0,9-1,9]	0,4 ± 0,01 [0,4-0,5]	0,3 ± 0,01* [0,3-0,4]
Ni	2,8 ± 0,05 [2,7-3,0]	1,9 ± 0,02* [1,8-2,0]	2,5 ± 0,06* [2,3-2,7]	2,6 ± 0,02* [2,5-2,6]	2,8 ± 0,03 [2,8-2,9]	2,5 ± 0,04* [2,4-2,6]
Cd	0,3 ± 0,02 [0,3-0,4]	0,2 ± 0,01* [0,2-0,3]	0,3 ± 0,01* [0,3-0,4]	0,4 ± 0,01* [0,4-0,5]	0,4 ± 0,01* [0,4-0,5]	0,5 ± 0,01* [0,5-0,6]
Pb	1,2 ± 0,02 [1,1-1,2]	1,8 ± 0,02* [1,7-1,8]	2,1 ± 0,02* [2,0-2,2]	2,4 ± 0,06* [2,3-2,6]	1,8 ± 0,06* [1,7-2,0]	1,3 ± 0,02* [1,3-1,4]
Σ МЭ	492,1 ± 10,52 [462,9-521,3]	319,6 ± 3,82* [309,0-330,2]	546,9 ± 4,5* [534,5-559,3]	671,3 ± 1,89* [660,5-682,1]	471,5 ± 3,48 [461,8-484,1]	341,3 ± 7,03* [321,8-360,9]

Примечание: Σ МЭ – суммарный фонд макро- и микроэлементов; * – различия с контролем статистически значимы, $p < 0,05$

Для суммарного фонда МЭ в тканях голодающих особей *H. verbana* выявлена фазовая динамика ($p < 0,001$) (рис. 6.2.1).

Обнаружено, что минимальные суммарные концентрации макро- и микроэлементов, в 1,54 раз ниже контрольных показателей, характерны для тканей

пиявок, голодящих три месяца, а максимальные, в 1,36 раз выше исходных значений – через семь месяцев эксперимента (рис. 6.2.1, табл. 6.2.1).

По данным корреляционного анализа статистически значимая связь между суммарным фондом макро- и микроэлементов и продолжительностью голодания отсутствует ($r_s = -0,05, p = 0,80$).

Максимальные концентрации эссенциальной меди (в 1,8 раз выше контроля) в тканях *H. verbana* были отмечены на седьмой и девятый месяцы голодания, минимальные – у сытых пиявок ($p < 0,05$) (рис. 6.2.2, табл. 6.2.1).

Динамика концентраций меди, вплоть до девятого месяца, имеет линейный характер, а корреляционная связь между ее содержанием и продолжительностью голодания оказалась положительной, умеренной силы ($r_s = 0,62, p = 0,000$).

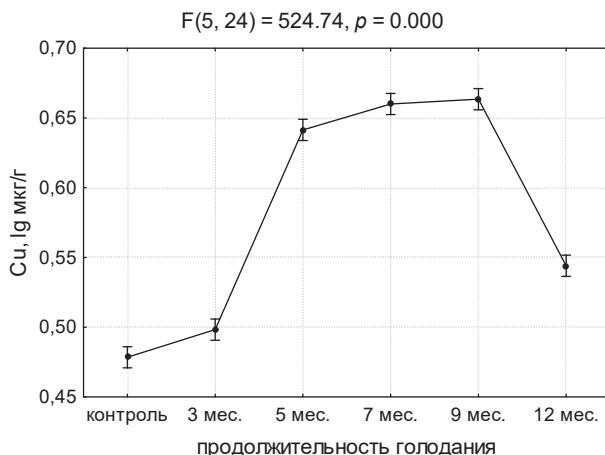


Рисунок 6.2.2 – Динамика содержания меди ($\lg \text{мкг/г}$ влажной ткани) в тканях медицинских пиявок *H. verbana* из гирудокультуры при хроническом голодании (ANOVA)

Более чем трехкратное повышение концентраций эссенциального цинка в тканях медицинских пиявок наблюдалось после седьмого месяца эксперимента ($p <$

0,001). Аналогично меди, минимальное содержание цинка отмечено у контрольных особей ($p < 0,001$) (рис.6.2.3, табл. 6.2.1).

Характер динамики концентраций цинка в тканях опытных пиявок имеет ярко выраженный фазовый тренд, а корреляционная связь с продолжительностью голодания отсутствует ($r_s = 0,11, p = 0,56$).

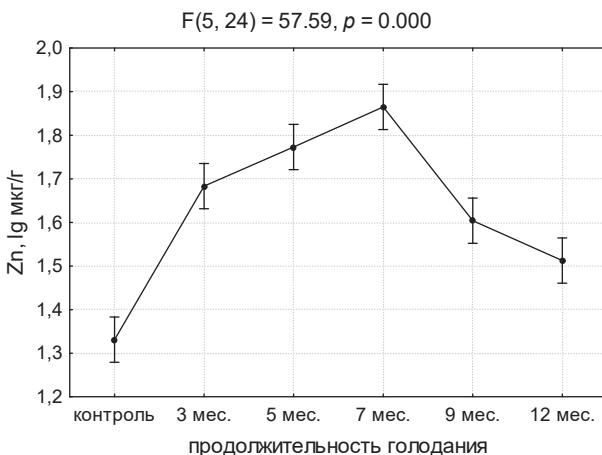


Рисунок 6.2.3 – Динамика содержания цинка (lg мкг/г влажной ткани) в тканях медицинских пиявок *H. verbana* из гирудокультуры при хроническом голодании (ANOVA)

Значимое повышение концентраций марганца, в 1,22 раз от контрольных значений, отмечено в тканях медицинских пиявок только на ранних сроках голодания (3 месяца), в дальнейшем содержание этого биофильтного элемента имела фазовые изменения, достигая минимальных значений, в 1,63 раз ниже исходных показателей, на заключительном этапе эксперимента (12 месяцев) ($p < 0,001$) (рис. 6.2.4, табл. 6.2.1). Корреляционная связь между содержанием марганца в тканях пиявок и продолжительностью их голодания была отрицательной, средней силы ($r_s = -0,50, p = 0,005$).

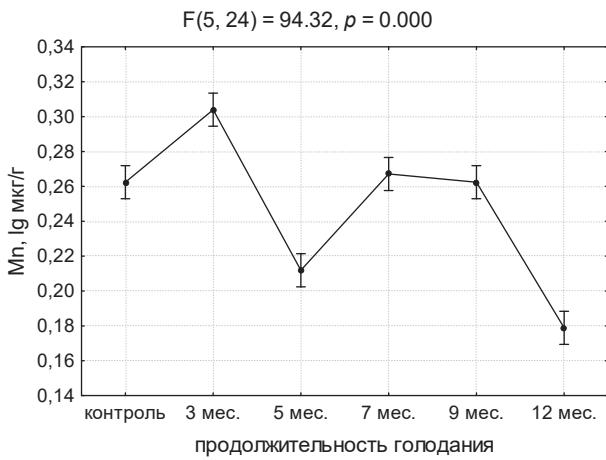


Рисунок 6.2.4 – Динамика содержания марганца ($\lg \text{мкг}/\text{г}$ влажной ткани) в тканях медицинских пиявок *H. verbana* из гирудокультуры при хроническом голодании (ANOVA)

Аналогичный характер корреляционной связи (отрицательная, средней силы) был выявлен между содержанием эссенциального микроэлемента железа в тканях пиявок и продолжительностью голодания ($r_S = -0,43, p = 0,019$).

Уже через три месяца голодания пиявок в их тканях в 2,5 раз, по сравнению с контролем, снижается содержание этого важнейшего биоэлемента, в последующие месяцы наблюдались фазовые изменения его концентраций: значимый рост (относительно предыдущего этапа) и, наконец, обвальное падение до минимальных значений (в 2,76 раз ниже исходных показателей) ($p < 0,001$) (рис. 6.2.5, табл. 6.2.1).

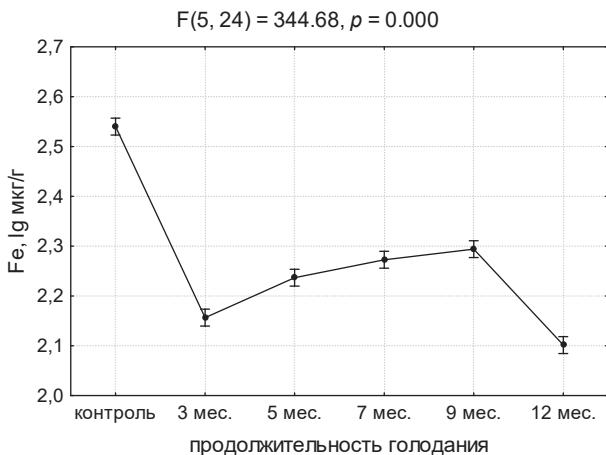
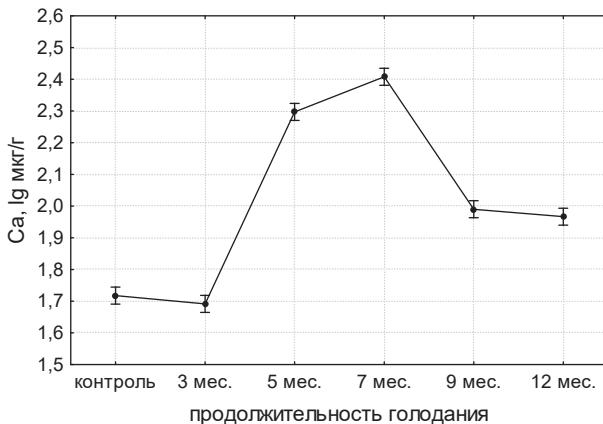


Рисунок 6.2.5 – Динамика содержания железа ($\lg \text{мкг/г}$ влажной ткани) в тканях медицинских пиявок *H. verbana* из гирудокультуры при хроническом голодании (ANOVA)

В отличие от железа, уровень содержания его физиологического антагониста – макроэлемента кальция в тканях пиявок после пяти месяцев голодания существенно повышался ($p < 0,001$) (рис. 6.2.6, табл. 6.2.1). Максимальный рост концентраций, выше контрольных показателей в 4,98 раз, отмечен в тканях пиявок после семи месяцев голодания ($p < 0,001$). Корреляционная связь между изучаемыми параметрами была положительная, средней силы ($r_s = 0,46, p = 0,011$).

Подобная картина наблюдалась в эксперименте и для тканевого содержания другого важнейшего макроэлемента – магния: положительная, средней силы корреляционная связь между содержанием в тканях пиявок и продолжительностью их голодания ($r_s = 0,59, p = 0,001$); минимальные исходные значения у сытых особей, а максимальные концентрации (в 2,21 раз выше контроля) – после семимесячного голодания ($p < 0,001$) (рис. 6.2.6, табл. 6.2.1).

$$F(5, 24) = 511.14, p = 0.000$$



$$F(5, 24) = 111.85, p = 0.000$$

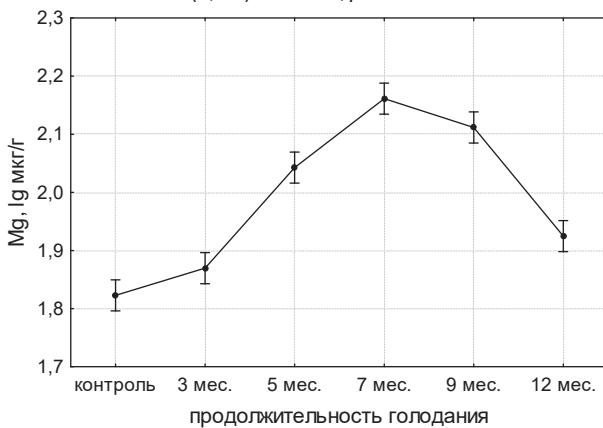


Рисунок 6.2.6 – Динамика содержания кальция и магния (lg мкг/г влажной ткани) в тканях медицинских пиявок *H. verbana* из гирудокультуры при хроническом голодании (ANOVA)

Так же, как и для биоэлементов кальция и магния, максимальное содержание эссенциального микроэлемента кобальта (в 1,73 раз выше контрольных значений) в тканях медицинских пиявок характерно после семи месяцев голодаания (рис. 6.2.7, табл. 6.2.1).

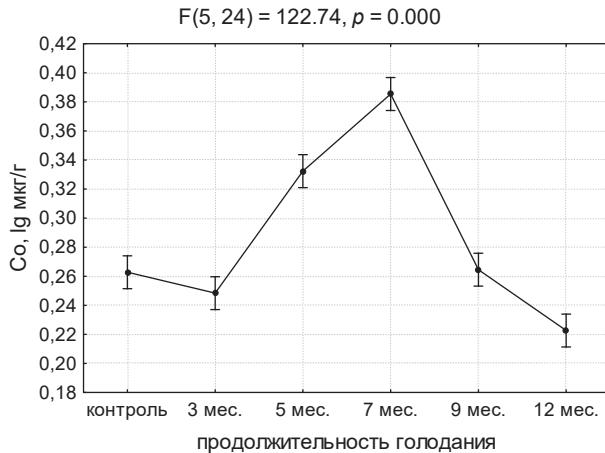


Рисунок 6.2.7 – Динамика содержания кобальта ($\lg \text{мкг/г}$ влажной ткани) в тканях медицинских пиявок *H. verbana* из гирудокультуры при хроническом голодаании (ANOVA)

Однако на последующих этапах эксперимента отмечалось линейное падение концентраций (в 1,24 раз ниже исходного уровня) ($p < 0,001$). Динамика содержания кобальта в тканях голодающих особей аптечных пиявок носила ярко выраженный фазовый характер, а корреляционная связь между его содержанием и продолжительностью голодаания оказалась незначимой ($r_s = -0,21, p = 0,26$).

Практически идентичная картина наблюдалась для эссенциального микроэлемента стронция: фазовый характер динамики содержания в тканях голодающих особей, отсутствие статистически значимой корреляционной связи между изучаемыми параметрами ($r_s = -0,09, p = 0,63$), максимальный рост (в 2,76 раз

выше контрольных показателей) после семи месяцев эксперимента ($p < 0,001$) (рис. 6.2.8, табл. 6.2.1).

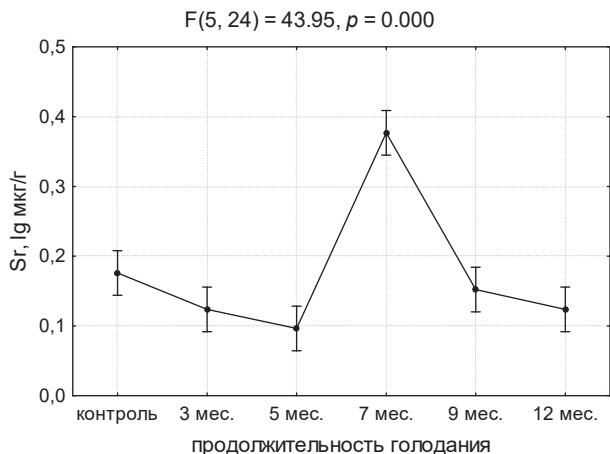


Рисунок 6.2.8 – Динамика содержания стронция (lg мкг/г влажной ткани) в тканях медицинских пиявок *H. verbana* из гирудокультуры при хроническом голодании (ANOVA)

Условно эссенциального микроэлемента никеля больше всего содержится в тканях сытых особей *H. verbana* и у пиявок, голодающих девять месяцев ($p < 0,001$). Для остальных экспериментальных групп медицинских пиявок концентрации никеля значимо ниже, чем в контроле, с минимальными показателями (в 1,48 раз меньше исходных) после трехмесячного срока вынужденного голодания ($p < 0,001$) (рис. 6.2.9, табл. 6.2.1).

Динамика содержания никеля в тканях опытных пиявок имеет ярко выраженный фазовый характер, а корреляционная связь с продолжительностью голодания отсутствует ($r_s = 0,01, p = 0,94$).

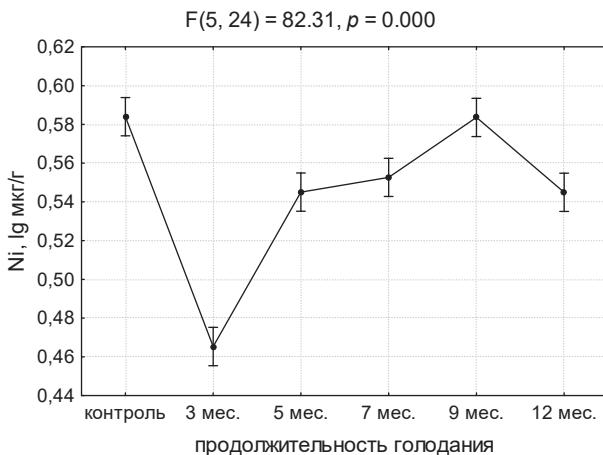


Рисунок 6.2.9 – Динамика содержания никеля ($\lg \text{мкг/г}$ влажной ткани)
в тканях медицинских пиявок *H. verbana* из гирудокультуры
при хроническом голодании (ANOVA)

Для токсичного микроэлемента кадмия, напротив, в ходе эксперимента выявлена высокая положительная связь между уровнем его содержания в тканях медицинских пиявок и продолжительностью их голодания ($r_s = 0,81, p = 0,000$). Минимальные концентрации (в 1,43 раз ниже контрольных значений) этого опасного токсиканта обнаружены в тканях пиявок, голодающих три месяца, максимальные (в 1,58 раз выше исходных показателей) – у группы голодающих особей на заключительном этапе эксперимента (12 месяцев) ($p < 0,001$) (рис. 6.2.10, табл. 6.2.1).

В отличие от кадмия, уровень содержания токсичного свинца в тканях опытных особей медицинских пиявок не зависит от срока их голодания ($r_s = 0,20, p = 0,28$), а динамика его концентраций носит фазовый характер ($p < 0,001$) (рис. 6.2.11, табл. 6.2.1). Минимальные концентрации отмечены в тканях сытых особей *H. verbana*, максимальные, в 2,09 раз выше – у пиявок, голодающих в течение семи месяцев ($p < 0,001$).

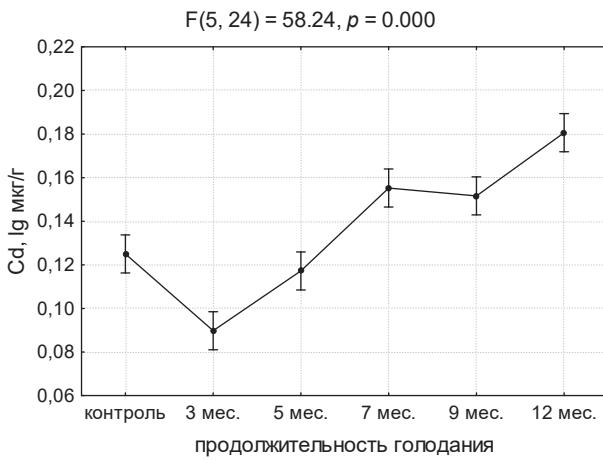


Рисунок 6.2.10 – Динамика содержания кадмия (lg мкг/г влажной ткани)
в тканях медицинских пиявок *H. verbana* из гирудокультуры
при хроническом голодании (ANOVA)

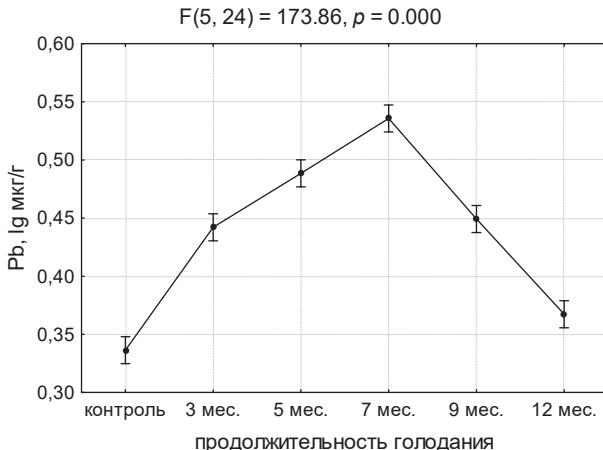


Рисунок 6.2.11 – Динамика содержания свинца (lg мкг/г влажной ткани)
в тканях медицинских пиявок *H. verbana* из гирудокультуры
при хроническом голодании (ANOVA)

Обобщая вышеизложенные результаты однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) можно заключить, что хроническое голодание оказывает наибольшее влияние на уровень содержания в тканях медицинских пиявок эссенциальных макро- и микроэлементов: меди ($F_{5, 24} = 524,74, p = 0,000$), кальция ($F_{5, 24} = 511,14, p = 0,000$), железа ($F_{5, 24} = 344,68, p = 0,000$), наименьшее – токсичных металлов никеля ($F_{5, 24} = 82,31, p = 0,000$) и кадмия ($F_{5, 24} = 58,24, p = 0,000$), а также стронция ($F_{5, 24} = 43,59, p = 0,000$), что свидетельствует о регулирующей роли эссенциальных элементов в поддержании гомеостаза голодающих особей аптечных пиявок (Ковалчук и др., 2011).

Корреляционный анализ показал, что хроническое голодание медицинских пиявок сопровождается направленным ростом в их тканях концентраций эссенциальных элементов меди, кальция, магния и токсиканта кадмия ($r_S = 0,46-0,81, p < 0,05$), а также существенным снижением содержания биологически активных металлов железа и марганца ($r_S = -0,43$ и $-0,50$, соответственно, $p < 0,05$). Для остальных исследуемых макро- и микроэлементов характерна фазовая динамика концентраций в тканях, связанная с биологическими свойствами отдельных элементов и физиологическими потребностями в них медицинских пиявок на разных этапах хронического голодания.

Оценка характера и силы корреляционных связей между микроэлементами в тканях медицинских пиявок при хроническом голодании позволила выявить синергетический и антагонистический эффект взаимодействия первых (табл. 6.2.2).

В ходе исследования было установлено, что для изучаемых макро- и микроэлементов в тканях медицинских пиявок при хроническом голодании характерен, как правило, синергизм, антагонистический характер связей выявлен только для токсичных металлов никеля и кадмия с биоэлементами цинком и марганцем, соответственно. При этом большинство выявленных статистически значимых корреляционных связей отмечены для эссенциальных макро- и микроэлементов: меди, цинка, кальция, магния, кобальта, что подкрепляет наше умозаключение о важной роли данных биоэлементов в поддержании гомеостаза голодающих особей *H. verbana* (табл. 6.2.2).

Таблица 6.2.2 – Корреляционные связи между макро- и микроэлементами в тканях медицинских пиявок *H. verbana* из гирудокультуры при хроническом голодаании (12 месяцев), $p < 0,05$

	Cu	Zn	Mn	Fe	Ca	Mg	Cd	Pb	Ni	Co	Sr
Cu		0,55			0,75	0,94	0,40	0,71		0,48	
Zn	0,55				0,72	0,62		0,92	-0,40	0,65	
Mn							-0,51				
Fe									0,75	0,45	0,63
Ca	0,75	0,72				0,78	0,45	0,76		0,68	
Mg	0,94	0,62			0,78		0,41	0,80		0,52	
Cd	0,40		-0,51		0,45	0,41					
Pb	0,71	0,92			0,77	0,80				0,70	
Ni		-0,40		0,75							0,43
Co	0,48	0,65		0,45	0,68	0,52		0,70			
Sr				0,63					0,43		

Сравнительный анализ экспериментальных данных показал, что, относительно исходных значений (контроль), содержание практически всех биоэлементов (за исключением железа и никеля) в тканях голодающих пиявок, как правило, существенно повышалось ($p < 0,05$).

Метод главных компонент (PCA) позволил обобщить массив результатов лабораторного исследования и визуализировать специфику микроэлементной структуры тканей медицинских пиявок *H. verbana* из гирудокультуры на разных этапах принудительного хронического голодаания.

Показано, что 47,84% общей дисперсии приходится на первую главную компоненту (PC1), 21,34% – на вторую (PC2) (рис. 6.2.12, табл. 6.2.3).

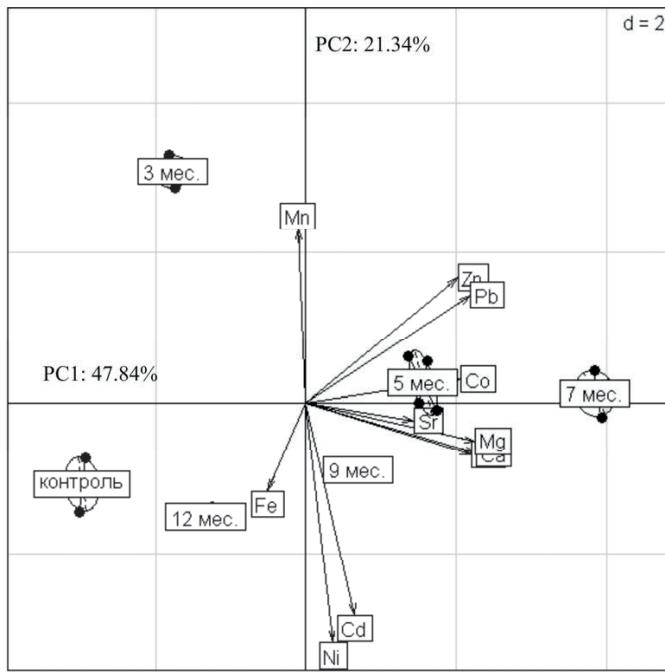


Рисунок 6.2.12 – Содержание эссенциальных и токсичных металлов в тканях медицинских пиявок *H. verbana* из гирудокультуры при влиянии хронического голодаания в пространстве главных компонент

Как видно из рисунка, все экспериментальные наблюдения оформились в шесть экспериментальных групп медицинских пиявок, в соответствии со спецификой их микроэлементного состава тканей.

По первой компоненте (PC1) отмечена существенная пространственная отдаленность сытых особей *H. verbana* (контроль) от опытных групп пиявок, голодящих семь и пять месяцев, для которых характерны минимальные и максимальные концентрации Cu, Zn, Ca, Mg, Pb, соответственно.

Наибольший вклад в дисперсию данных, объясненной первой компонентой, вносят макроэлементы Ca (16,61%) и Mg (16,30%), для которых выявлена очень высокая корреляция с PC1 ($0,93, p = 0,000$).

Таблица 6.2.3 – Результаты компонентного анализа микроэлементного спектра тканей медицинских пиявок *H. verbana* из гирудокультуры при влиянии хронического голодаания

МЭ, лг мкг/г ($i = 11$)	Нагрузки (loadings, a_{ij})		Вклад в главную компоненту (Contribution = $(a_{ij}^2 * 100) / \lambda_j, \%$)	
	Главные компоненты (Principal Components – PC), $j = 1, 2$			
	1	2	1	2
Cu	0,90**	-0,19	15,50	1,53
Zn	0,83**	0,46*	13,19	8,89
Mn	-0,04	0,64**	0,03	17,34
Fe	-0,21	-0,32	0,83	4,45
Ca	0,93**	-0,18	16,61	1,45
Mg	0,93**	-0,14	16,30	0,85
Cd	0,27	-0,78**	1,35	25,74
Pb	0,90**	0,39*	15,40	6,62
Ni	0,15	-0,88**	0,41	32,65
Co	0,85**	0,09	13,71	0,31
Sr	0,59**	-0,06	6,66	0,18
	Собственные значения (eigenvalues, λ_j) PC		Дисперсия, объясненная PC (%)	
	5,26	2,35	47,84	21,34

Примечание: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,001$

Со второй компонентой (PC2) сильнее всего коррелируют токсичные металлы Cd (-0,78, $p = 0,000$) и Pb (-0,78, $p = 0,000$), их вклад в дисперсию данных, объясненной PC2 составил 25,74% и 32,65%. В связи с высоким уровнем содержания этих тяжелых металлов в тканях, группы пиявок, голодающих девять и двенадцать месяцев, отличаются по PC2.

В целом, данные, представленные с использованием компонентного анализа, адекватно и информативно визуализируют вариабельность концентраций макро- и микроэлементов в тканях медицинских пиявок из гирудокультуры в экстремальных условиях хронического голодаания.

Результаты наших исследований могут быть целенаправленно использованы в фармакологии и косметологии. Тем более что ранее нами было установлено, что при хроническом голодаании в тканях пиявок *H. verbana*, на фоне повышенного уровня минерального и основного обмена, значимо возрастают суммарные концентрации свободных аминокислот, достигая максимальных значений после пяти месяцев (Черная и др., 2009; Ковальчук и др., 2011).

Учитывая, что в этот период были отмечены и высокие тканевые концентрации эссенциальных макро- и микроэлементов (на фоне пониженного содержания токсичных металлов), в качестве оптимального срока голодаания при использовании гомогенатов тканей пиявок в производстве лекарственных и косметических средств можно рекомендовать пять месяцев.

6.3. Сравнительный анализ влияния хронического голодаания на МЭ спектр тканей медицинских пиявок из природных популяций и гирудокультуры

Экспериментальные данные, обсуждаемые выше, установили более высокую устойчивость к хроническому голодаанию у медицинских пиявок из гирудокультуры (12 месяцев), нежели у особей *H. verbana* из природных популяций (7 месяцев). В данном контексте особенный интерес представляют особенности формирования микроэлементного состава тканей природных и искусственно выращенных особей медицинской пиявки в равных условиях лабораторного эксперимента.

Таблица 6.3.1 – Содержание эссенциальных и токсичных микроэлементов (МЭ, мкг/г влажной ткани) в тканях пиявок *H. verbana* из природных популяций и гирудокультуры при хроническом голодании (7 месяцев)

МЭ, мкг/г	Природные популяции n = 10	Гирудокультура n = 5	p Tukey test
Cu	$1,53 \pm 0,09$ [1,32-1,73]	$3,57 \pm 0,08$ [3,36-3,79]	0,000
Zn	$53,28 \pm 1,17$ [50,63-55,93]	$72,44 \pm 2,54$ [65,38-79,50]	0,000
Mn	$0,78 \pm 0,03$ [0,72-0,84]	$0,85 \pm 0,01$ [0,81-0,89]	0,205
Fe	$124,80 \pm 4,86$ [113,81-135,79]	$186,45 \pm 2,64$ [179,13-193,76]	0,000
Cd	$0,37 \pm 0,01$ [0,36-0,39]	$0,43 \pm 0,01$ [0,39-0,47]	0,000
Pb	$1,83 \pm 0,06$ [1,69-1,98]	$2,44 \pm 0,06$ [2,26-2,61]	0,000
Ni	$1,11 \pm 0,05$ [1,00-1,21]	$2,57 \pm 0,02$ [2,51-2,63]	0,000

Обнаружено, что в тканях особей *H. verbana* из гирудокультуры концентрации всех элементов (исключая Mn) существенно выше, чем у природных пиявок ($p < 0,001$) (табл. 6.3.1).

Наибольшие различия между тканевыми концентрациями опытных групп медицинских пиявок отмечены для меди (в 2,33 раз) и никеля (в 2,32 раз), наименьшие – для кадмия (в 1,16 раз) ($p < 0,001$).

Методом главных компонент показана специфика элементного профиля тканей пиявок из гирудокультуры и естественных ландшафтов после семимесячного голодания (рис. 6.3.1, табл. 6.3.2).

Таблица 6.3.2 – Результаты компонентного анализа биоэлементного спектра тканей медицинских пиявок из природных популяций (ПП) и гирудокультуры (ГК) при влиянии хронического голода

МЭ, лг мкг/г (i = 7)	Нагрузки (loadings, a_{ij})		Вклад в главную компоненту (Contribution = $(a_{ij}^2 * 100) / \lambda_j$, %)	
	Главные компоненты (Principal Components – PC), j = 1,2			
	1	2	1	2
Cu	-0,97**	0,16	19,33	2,57
Zn	-0,94**	-0,03	17,17	0,10
Mn	-0,61*	-0,44	7,75	19,06
Fe	-0,53*	0,78**	5,71	60,04
Cd	-0,84**	-0,15	14,50	2,34
Pb	-0,87**	-0,36	15,64	12,65
Ni	-0,96**	0,18	18,90	3,24
	Собственные значения (eigenvalues, λ_j) PC		Дисперсия, объясненная PC (%)	
	4,85	1,01	69,30	14,38

Примечание: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,001$

Показано, что 69,30% общей дисперсии приходится на первую главную компоненту (PC1), 14,38% – на вторую главную компоненту (PC2).

На рисунке визуализирована четкая дифференциация природных и искусственно выращенных особей медицинской пиявки *H. verbana* по уровню содержания в тканях эссенциальных и токсичных МЭ.

Наибольший вклад в различия по первой компоненте вносят эссенциальные металлы Cu (19,33%), Zn (18,17%) и Ni (18,90%), по второй PC2 – биофильное железо (60,04%).

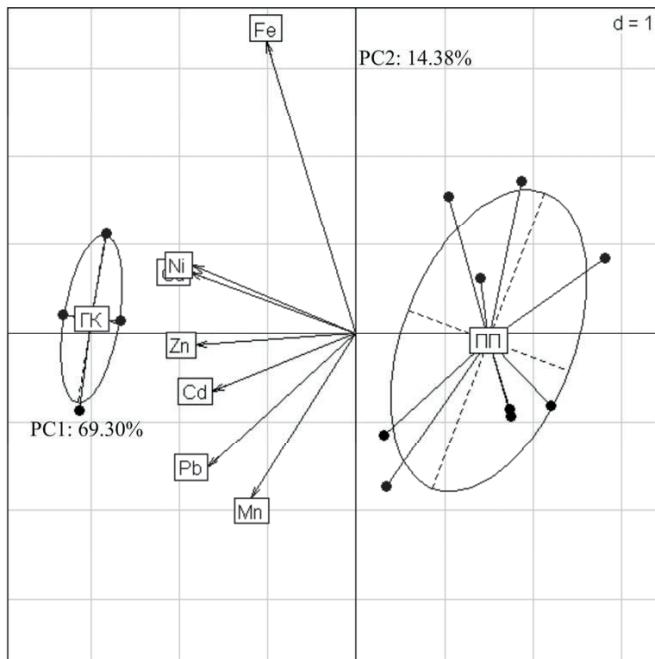


Рисунок 6.3.1 – Содержание микроэлементов в тканях медицинских пиявок из природных популяций (ПП) и гирудокультуры (ГК) при влиянии хронического голодаания в пространстве главных компонент

Авторами ранее было показано, что уровень основного обмена медицинских пиявок *H. verbana*, выращенных на биофабрике ($0,86 \pm 0,069$ млО₂/г·час) вдвое превышает аналогичные показатели этого же вида пиявок ($0,41 \pm 0,027$ млО₂/г·час) из природных популяций при одинаковом физиологическом состоянии особей двух опытных групп ($p < 0,001$) (Глава 5, рис. 5.1.1).

Таким образом, можно заключить, что пиявки, выращенные в искусственно созданных условиях на биофабриках, отличаются от своих предков – пиявок из природных популяций повышенным уровнем микроэлементного обмена, что согласуется с особенностями их метаболизма. Вместе с тем, сравнительный анализ аккумуляционных способностей голодающих пиявок обеих эксперименталь-

ных групп позволил выявить и общие закономерности формирования микроэлементного спектра их тканей (рис. 6.3.2).

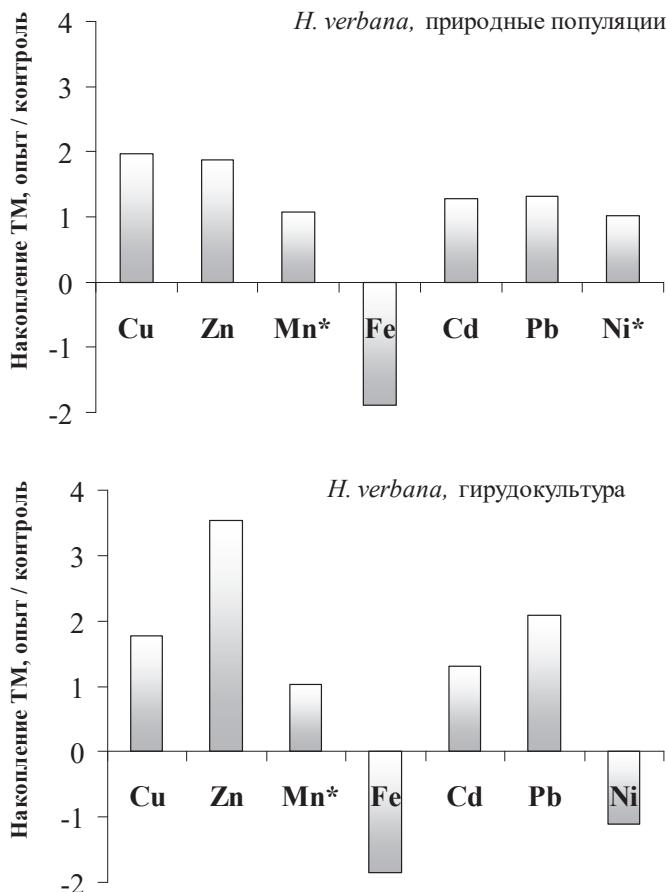


Рисунок 6.3.2 – Специфика накопления эссенциальных и токсичных металлов в тканях медицинской пиявки *H. verbana* из природных популяций и гирудокультуры при хроническом голодаании (семь месяцев). По оси Y указано отношение концентраций МЭ в тканях голодных особей (опыт) к контрольным показателям

Установлено, что в равных условиях лабораторного эксперимента (семь месяцев принудительного голодания), в тканях аптечных пиявок, независимо от их происхождения, существенно повышается, относительно контрольных показателей, содержание эссенциальных МЭ меди и цинка и токсичных металлов кадмия и свинца, а также значительно снижаются концентрации биологически активного железа ($p < 0,001$). Важно отметить, что для марганца характерны стабильные и сопоставимые концентрации в тканях сытых и голодных особей *H. verbana*, как из природных популяций, так и выращенных в гирудокультуре ($p > 0,05$) (рис. 6.3.2, табл. 6.1.1, 6.3.1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование эколого-физиологического подхода впервые позволило дать оценку микроэлементного обмена экологически и физиологически контрастных групп медицинских пиявок, отличающихся, как филогенетической спецификой (виды: лечебная медицинская пиявка *H. medicinalis* и аптечная *H. verbana*), так и особенностями условий роста и развития (водные экосистемы естественных ландшафтов и гирудокультура биофабрик).

Авторами впервые выявлена видовая специфика микроэлементного состава тканей совместно обитающих медицинских пиявок *H. verbana* и *H. medicinalis*, обусловленная особенностями их метаболизма. Установлено, что аптечная пиявка, тяготеющая к обитанию в южных широтах, отличается от лечебной более высоким уровнем микроэлементного обмена. Полученные нами новые данные о видоспецифичности микроэлементного спектра тканей медицинских пиявок *H. verbana* и *H. medicinalis* из природных популяций могут быть использованы в качестве дополнительного критерия таксономической самостоятельности этих видов.

Показано, что географический фактор оказывает существенное влияние на микроэлементный обмен медицинских пиявок. Было установлено, что в географическом аспекте микроэлементный спектр тканей медицинских пиявок *H. medicinalis* и *H. verbana* теряет видовую специфику, выявленную при их совместном обитании, и в значительной мере зависит от экологических условий мест обитания и от их трофических особенностей (гематофагия).

На основании обширного экспедиционного материала авторами были определены фоновые концентрации тяжелых металлов Cu, Zn, Fe, Mn, Cd, Pb, Ni в тканях двух видов медицинских пиявок *H. medicinalis* и *H. verbana* и в донных отложениях из мест их обитания, как в оптимальных климатогеографических условиях, так и на восточной и северной границах ареала. Анализ биоаккумуляционных способностей медицинских пиявок из водоемов различных природных зон позволил установить общие закономерности накопления эссенциальных и токсичных МЭ в их организме, обусловленные как климатогеографическими особен-

ностями изучаемых регионов, так и степенью антропогенной трансформации ландшафтов. Показано снижение биоаккумуляционной активности к тяжелым металлам у особей *H. medicinalis* и *H. verbana*, обитающих в неблагоприятных климатических условиях на границах ареала. Вместе с тем выявлена высокая кумулятивная активность лечебных и аптечных пиявок по отношению к тяжелым металлам Cd, Pb и Ni в водных экосистемах промышленных регионов, свидетельствующая о биологической доступности экотоксикантов в этих условиях.

Согласно полученным данным, географические особенности микроэлементного состава тканей пиявок объективно отражают региональную специфику экологического состояния гидробиоценозов, что указывает на возможность использования медицинских пиявок *H. medicinalis* и *H. verbana* в качестве биоиндикаторов при проведении мониторинга за загрязнением водных экосистем тяжелыми металлами в пределах их ареала.

Показано, что качественные и количественные изменения микроэлементного спектра в тканях медицинских пиявок *H. verbana* обусловлены физиологическими процессами, связанными с сезонными особенностями их биологического цикла. Установлено, что медицинские пиявки при смене времен года способны регулировать в своих тканях содержание Zn, Mn и Pb, независимо от изменчивости концентраций этих металлов в окружающей среде. Содержание Cu, Fe, Ni, Cd в тканях *H. verbana* находится в прямой зависимости от сезонной динамики концентраций этих металлов в донных отложениях, что подтверждает целесообразность использования медицинских пиявок в качестве биоиндикаторов при проведении мониторинга загрязнения тяжелыми металлами водных экосистем, в которых они обитают.

Количественная оценка уровня содержания эссенциальных и токсичных металлов в тканях молоди и половозрелых особей *H. verbana* из природных популяций показала, что возрастная специфика микроэлементного обмена обусловлена, как особенностями пищевого рациона, так и физиологическими особенностями медицинских пиявок в онтогенезе.

Авторы полагают, что новые данные по диапазону фоновых концентраций тяжелых металлов Cu, Zn, Fe, Mn, Ni, Cd, Pb в тканях медицинских пиявок из природных популяций, а также в среде их обитания (донные отложения), представленные в монографии с учетом климатогеографической, сезонной и возрастной специфики микроэлементного обмена гирудинид, могут быть использованы в экологическом мониторинге для оптимизации мер по сохранению медицинских пиявок и восполнению их природных ресурсов, а также в качестве физиологической нормы для особей-производителей и их потомства в гирудокультуре.

В настоящее время медицинские пиявки, поступающие на фармацевтический рынок, выращиваются в искусственно созданных условиях на биофабриках методом ускоренного роста и развития. В гирудокультуре используют, как правило, особей двух видов медицинских пиявок *H. medicinalis* и *H. verbana*, различающихся между собой, как по географическому происхождению, так и по некоторым физиологическим параметрам.

Показано, что видовая специфика микроэлементного профиля тканей медицинских пиявок, выявленная авторами у природных особей *H. medicinalis* и *H. verbana*, наблюдается и при их искусственном разведении. Более того, обнаружено, что при стандартизированном режиме питания и содержания медицинских пиявок в гирудокультуре, видоспецифичность их микроэлементного обмена проявляется более четко.

Результаты исследования внутривидовой изменчивости уровня содержания эссенциальных и токсичных металлов в тканях медицинских пиявок, выращенных на различных биофабриках России, показали, что специфика технологии разведения, экологические особенности изучаемых регионов, а также географическое происхождение производителей из природных популяций оказывают значительное влияние на микроэлементный обмен *H. medicinalis* и *H. verbana* в гирудокультуре.

По нашим данным условия искусственного разведения также оказывают существенное влияние на уровень содержания эссенциальных и токсичных металлов в тканях медицинских пиявок. Установлено, что медицинские пиявки из

гирудокультуры, будучи потомками первого поколения особей из природных популяций, отличаются повышенным уровнем микроэлементного обмена.

Медицинские пиявки из гирудокультуры являются уникальными модельными объектами для изучения физиологических особенностей пиявок в онтогенезе, поскольку возраст на разных этапах развития у них четко определен. Это позволило нам оценить уровень содержания макро- и микроэлементов в тканях аптечной пиявки *H.verbana* на разных стадиях развития и роста. А сравнительный анализ онтогенетических особенностей микроэлементного обмена аптечных пиявок из естественных ландшафтов и гирудокультуры, выявил общие для них тенденции: при росте и развитии в их тканях повышается содержание эссенциальных металлов Zn и Fe, и снижаются – токсичного Cd.

Наши исследования показали, что медицинские пиявки при интенсивном росте и развитии проявляют высокую кумулятивную активность как к эссенциальным, так и к токсичным металлам. В этой связи у специалистов гирудологов зачастую возникает вполне закономерный вопрос, насколько высоко содержание токсичных металлов в секрете слюнных желез медицинских пиявок, и возможен ли риск поступления избыточного количества ксенобиотиков со слюной кровососущих гирудинид в организм человека.

Изучение закономерностей формирования микроэлементного профиля в биологической системе «ткань – слюнные железы – секрет слюнных желез» организма аптечной пиявки *H. verbana* из гирудокультуры показало, что спектр слюнной жидкости медицинской пиявки характеризуется крайне низким паттерном тяжелых металлов. На основании полученных результатов у медицинской пиявки *H. verbana* из гирудокультуры выявлена барьерная функция слюнных желез и депонирующая роль тканей по отношению к экотоксицантам, что обеспечивает их содержание в секрете слюнных желез на уровне сотых и тысячных долей процента. Таким образом, авторами научно обоснована и доказана экологическая безопасность использования слюны медицинских пиявок в гирудофармакологии и косметологии.

Результаты наших исследований показали, что хроническое голодание оказывает существенное влияние на состояние микроэлементного обмена медицинской пиявки *H. verbana*. Принимая во внимание то, что в настоящее время медицинские пиявки используются не только нативно, при гирудотерапии, но и гомогенаты ее тканей служат сырьем для фармацевтической и косметологической продукции, результаты наших исследований по уровню содержания эссенциальных и токсичных металлов в их тканях в разные сроки голодания актуальны и востребованы, и будут способствовать более эффективному и направленному использованию приоритетных микроэлементов при производстве новых лекарственных препаратов, пищевых биологических добавок, косметологических средств.

Результаты комплексных натурных и лабораторных исследований по эколого-физиологической специфике микроэлементного обмена медицинских пиявок из природных популяций и гирудокультуры, представленные авторами в монографии, помимо теоретической новизны имеют практическое значение и могут быть использованы при решении ряда научно-прикладных задач.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Определенный в ходе исследования диапазон фоновых концентраций тяжелых металлов в тканях медицинских пиявок различных эколого-физиологических групп рекомендуется использовать для оптимизации мер по сохранению природных популяций *H. medicinalis* и *H. verbana* и восполнению их биологических ресурсов, а также в качестве физиологической нормы для пиявок-производителей и их потомства в гирудокультуре.

2. Результаты выполненных исследований позволяют рекомендовать использование медицинских пиявок в качестве биоиндикаторов при мониторинге загрязнения водных экосистем тяжелыми металлами (Cu, Fe, Ni, Cd, Pb) в различных регионах России. В водных экосистемах с низкой численностью медицинских пиявок в качестве организма-биоиндикатора целесообразно использование особей фонового для них вида – большой ложноконской пиявки *H. sanguisuga*.

3. Выявленные физиологические потребности аптечной пиявки *H. verbana* в эссенциальных МЭ на разных этапах роста и развития могут использоваться для оптимизации технологии разведения медицинских пиявок в гирудокультуре.

4. Материалы по региональным особенностям микроэлементного спектра тканей медицинских пиявок *H. medicinalis* и *H. verbana*, выращенных на биофабриках России, можно рекомендовать к использованию для направленного подбора приоритетных эссенциальных МЭ при разработке новых гирудофармакологических и косметических препаратов.

5. Для практического использования гомогенатов тканей пиявок *H. verbana* в фармакологии и косметике рекомендован пятимесячный период голодаания, обеспечивающий высокий уровень содержания эссенциальных МЭ и низкие концентрации экотоксикантов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

Абрамова Л. А Прикладная геоэкология: учебное пособие / Л. А. Абрамова, М. М. Кузьмина. – Тамбов: Издательский дом ТГУ им. Г.Р. Державина, 2010. – 71 с.

Авакян А. Б. Водохранилища мира / А. Б. Авакян, В. А. Шарапов, В. П. Сатланкин. – М.: Наука, 1979. – 288 с.

Авцын А. П. Патология человека на Севере / А. П. Авцын, А. А. Жаворонков, А. Г. Марачев, А. П. Милованов. – М.: Медицина, 1985. – 415 с.

Авцын А. П. Микроэлементы человека: этиология, классификация, органопатология / А. П. Авцын, А. А. Жаворонков, М. А. Риш, Л. С. Строчкова. – М.: Медицина, 1991. – 496 с.

Агаджанян Н. А. Химические элементы в среде обитания и экологический портрет человека / Н. А. Агаджанян, А. В. Скальный. – М.: КМК, 2001. – 83 с.

Агрехимия / под ред. Б. А. Ягодина. – М.: Агропромиздат, 1989. – 639 с.

Акимова А. А. Постановка задачи исследования закономерностей жизнедеятельности пиявок / А. А. Акимова, В. П. Бирюков, Н. С. Жукова // Х Міжнародна Конференція Асоціації гірудологів: мат-лы конф. – Харків, 2012. – С. 6-7.

Алехина Г. П. Иммунологическая реакция пресноводных двустворчатых моллюсков на неблагоприятное воздействие среды / Г. П. Алехина, Е. Г. Логинова, И. А. Мисетов // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2010. – № 6 (112). – С. 52-54.

Алиев Ш. К. Фаунистический анализ пиявок предгорного Дагестана / Ш. К. Алиев, М. А. Магомедов // Известия Дагестанского госуниверситета. Естественные и точные науки. – 2012. – № 1. – С. 26-28.

Альберт Э. Избирательная токсичность. – М.: Мир, 1971. – 431 с.

Андреев П. Н. О сохраняемости микроорганизмов и иммунных тел в пищеварительном канале пиявок и о роли последних в распространении заразных болезней // Арх. науч. и практ. ветеринарии. – 1923. – № 1. – С. 38-45.

Анищенко О. В. Распределение и миграция металлов в трофических цепях экосистемы реки Енисей в районе г. Красноярска / О. В. Анищенко, М. И. Глазьев, Е. С. Кравчук, Н. Н. Сущик, И. В. Грибовская // Водные ресурсы. – 2009. – Т. 36. – № 5. – С. 623-632.

Атарская Л. И. Противогипоксическая и нейронная активность смешанно-лигандных соединений кобальта и с аскорбиновой кислотой и аминокислотами / Л. И. Атарская, Я. Д. Фридман, Т. Г. Немальцева // Хим.-фарм. журн. – 1990. – № 10. – С. 34-38.

Бабенко Г. А. Микроэлементозы человека: патогенез, профилактика, лечение // Микроэлементы в медицине. – 2001. – Т. 2. – № 1. – С. 2-5.

Балог К. В. Использование ракового зоопланктона (Crustacea) для оценки загрязнения оз. Балатон тяжелыми металлами / К. В. Балог, Я. Шаланки // Гидробиол. журн. – 1984. – Т. 20. – № 2. – С. 56-63.

Баскова И. П. Биологически активные вещества, продуцируемые медицинской пиявкой (*Hirudo medicinalis*) и механизмы их действия: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – М., 1988. – 46 с.

Баскова И. П. Влияние препаратов из медицинских пиявок на показатели атерогенеза / И. П. Баскова, Г. И. Никонов, В. В. Долгов, В. В. Тертов, А. Н. Орехов, А. М. Олферьев, Н. В. Перова, Г. Г. Базазьян, Н. П. Сытина, В. С. Репин // Кардиология. – 1989. – Т. 29. – С. 75-79.

Баскова И. П. Белки системы гомеостаза // Белки и пептиды. – М.: Наука, 1995. – С. 397-433.

Баскова И. П. Гирудотерапия. Наука и практика / И. П. Баскова, Г. С. Исаханян. – М., 2004. – 508 с.

Баскова И. П. Белки и пептиды секрета слюнных желез медицинской пиявки видов *H.verbana*, *H.medicinalis* и *H.orientalis* / И. П. Баскова, Е. С. Кострюкова, М. А. Власова, О. В. Харитонова, С. А. Левицкий, Л. Л. Завалова, С. А. Мошковский, В. Н. Лазарев // Биохимия. – 2008. – Т. 73. – № 3. – С. 388-394.

Баскова И. П. Стероиды, гистамин и серотонин в составе секрета слюнных желез медицинской пиявки / И. П. Баскова, З. Фернер, Л. С. Балкина, С. Козин,

О. В. Харитонова, Л. Л. Завалова, В. Г. Згода // Биомедицинская химия. – 2008а. – Т. 54. – Вып. 2. – С. 127-139.

Баскова И. П. Белок-липидные частицы секрета слюнных желез медицинской пиявки, их размеры и морфология / И. П. Баскова, Т. Г. Юдина, Л. Л. Завалова, А. С. Дудкина // Биохимия. – 2010. – Т. 75. – № 5. – С. 682-688.

Баскова И. П. Лизоцимная активность слюнных желез медицинской пиявки видов: *H. verbana*, *H. medicinalis* и *H. orientalis* / И. П. Баскова, О. В. Харитонова, Л. Л. Завалова // Биомедицинская химия. – 2011. – Т. 57. – № 5. – С. 511-518.

Бауман В. К. Всасывание двухвалентных катионов. Физиология всасывания. – Л.: Наука, 1977. – С. 152-222.

Баянов М. Г. К фауне пиявок Башкирии / М. Г. Баянов, Н. А. Кусая // Материалы по фауне водоемов Башкирии. – Уфа, 1975. – С. 19-24.

Безель В. С. Экологическая токсикология: популяционный и биоценотические аспекты. – Екатеринбург: Гоцицкий, 2006. – 279 с.

Беличенко Ю. П. Экологические проблемы охраны водных ресурсов в цветной металлургии / Ю. П. Беличенко, В. Г. Березюк, Н. В. Микшевич. – Свердловск, 1987. – 55 с.

Березина Н. А. Влияние pH среды на пресноводных беспозвоночных в экспериментальных условиях // Экология. – 2001. – № 5. – С. 372-381.

Березовская И. В. Изучение общетоксического действия «Пиявита» / И. В. Березовская, В. И. Рымарцева, В. В. Тычинин // Лечение медицинскими пиявками и препаратами из них: сб. ст. – Люберцы, 2003. – Кн. 2. – С. 51-52.

Бикташева Ф. Х. Содержание тяжелых металлов в донных отложениях озера Асылкуль Республики Башкортостан / Ф. Х. Бикташева, Г. Ф. Латыпова // Изв. Оренбургского ГАУ. – 2012. – Т. 2. – № 34-1. – С. 208-210.

Биоэлементный статус населения Беларуси: экологические, физиологические и патологические аспекты / под ред. Н. А. Гресь, А. В. Скального – Минск: Харвест, 2011. – 352 с.

Богатов В. В. Аккумуляция тяжелых металлов пресноводными гидробионтами в горнорудном районе Юга Дальнего Востока России / В. В. Богатов, Л. В. Богатова // Экология. – 2009. – № 3. – С. 202-208.

Богатов В. В. Особенности биоаккумуляции тяжелых металлов у двустворчатых моллюсков (*Bivalvia*) в природных водоемах Восточной Азии / В. В. Богатов, Л. А. Прозорова, Е. Н. Чернова, Е. В. Лысенко // Вестник дальневосточного отделения РАН. – 2018. – № 4 (200). – С. 79-87.

Большаков В. Н. Пути приспособления мелких млекопитающих к горным условиям – М.: Наука, 1972. – 202 с.

Большаков В. Н. Энергетический обмен у полевок и его изменения в экстремальных условиях / В. Н. Большаков, Л. А. Ковальчук, А. П. Ястребов – Свердловск: УНЦ АН СССР, 1984. – 115 с.

Большаков В. Н. Развитие идей академика С.С. Шварца в современной экологии / В. Н. Большаков, Л. Н. Добринский, Б. С. Кубанцев – М.: Наука, 1991. – 276 с.

Большаков В. Н. Антропогенная эволюция животных: факты и их интерпретация / В. Н. Большаков, Т. И. Моисеенко // Экология. – 2009. – № 5. – С. 323-332.

Большая советская энциклопедия. – М.: Советская энциклопедия, 1969-1978.

Боровик Л. П. Современные особенности режима сохранения эталонных сообществ в заповеднике Стрельцовская степь // Режимы степных особо охраняемых природных территорий: мат-лы межд. науч. конф. Курск, 2012. – С. 11-14.

Брагин Б. И. Роль донных отложений в самоочищении пресноводных водоемов // Биологические основы рыбного хозяйства водоемов Средней Азии и Казахстана: тез. докл. конф. – Ашхабад, 1986. – С. 41-42.

Буданов И. С. Динамика химических показателей воды при разных режимах содержания медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis*) / И. С. Буданов, А. А. Никишов, Н. А. Волкова, В. А. Багиров, Е. К. Кунаева, Н. А. Зиновьева // Вестник Казанского ГАУ. – 2011. – № 2 (20). – С. 117-119.

Ваганов А. С. Накопление тяжелых металлов тканями и органами промысловых видов рыб различных экологических групп Куйбышевского водохранилища: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Нижний Новгород, 2012. – 23 с.

Вернадский В. И. Очерки геохимии. – М.: Наука, 1983. – 422 с.

Вершинин В. Л. Адаптивные и микроэволюционные процессы в популяциях амфибий урбанизированных территорий // Праці Українського герпетологічного товариства. – 2009. – № 2. – С. 7-20.

Вигдорович В. И. История и экология г. Тамбова / В. И. Вигдорович, Л. Е. Цыганкова. – Тамбов, 1996. – 216 с.

Виноградов А. П. Среднее содержание химических элементов в главных типах изверженных пород земной коры // Геохимия. – 1962. – № 7. – С. 555-571.

Власова Т. В. Физическая география материков и океанов: учебное пособие для студ. высш. пед. учеб. заведений / Т. В. Власова, М. А. Аршинова, Т. А. Ковалева. – М.: Академия, 2005. – 640 с.

Войнар А. И. Биологическая роль микроэлементов в организме животных и человека. – М.: Высш. шк., 1960. – 544 с.

Воробьев Д. В. Физиологическая характеристика карповых рыб в условиях дельты р. Волги / Д. В. Воробьев, В. И. Воробьев // Естеств. науки: журн. фундам. и прикл. исследований. – 2008. – № 1 (22). – С. 15-17.

Воробьев Д. В. Функциональные особенности метаболизма металлов у рыб в современных биогеохимических условиях дельты Волги: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Астрахань, 2008. – 22 с.

Воскресенский А. Монография врачебных пиявок. – СПб., 1859. – 500 с.

Вредные химические вещества. Неорганические соединения I-IV групп: справ. изд. / под ред. В. А. Филова [и др.]. – Л.: Химия, 1988. – 512 с.

Вредные химические вещества. Неорганические соединения V-VIII групп: справ. изд. / под ред. В. А. Филова [и др.]. – Л.: Химия, 1989. – 592 с.

Вундцеттель М. Ф. Экологическая характеристика реки Яхромы и ее бентофауны / М. Ф. Вундцеттель, Н. В. Кузнецова // Вестник АГТУ. Сер.: Рыбное хозяйство. – 2012. – № 1. – С. 15-21.

Габибов М. М. Влияние хронического воздействия ионов свинца и кадмия на содержание общего белка и его фракций в тканях сеголеток карпа (*Cyprinus carpio* L.) / М. М. Габибов, А. И. Рабаданова, И. К. Курбанова, Н. М. Абдуллаева, У. З. Сулейманова, Г. С. Алиева // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2009. – Т. 11. – № 1 (5). – С. 1066-1069.

Гамуля Ю. Г. Заметки к флоре уроцища «Горелая долина» (Змиевской район, Харьковской области) // Мат-лы науч. конф. молодых ученых биол. ф-та и науч.-исслед. инст-та биологии. – Харьков: ХГУ, 1994. – С. 10-11.

Гаранина С. Н. Действие тяжелых металлов на некоторые элементы углеводного обмена каспийских гаммарид // Гидробиол. журн. – 1984. – Т. 20. – № 4. – С. 67-69.

Гашев С. Н. Тяжелые металлы и радионуклиды как фактор риска для биоты в экологическом мониторинге Тюменской области / С. Н. Гашев, Т. И. Моисеенко // Вестник Тюменского государственного университета. – 2012. – № 12. – С. 26-37.

Гвоздецкий Н. А. Физическая география СССР. Общий обзор. Европейская часть СССР. Кавказ. – М.: Мысль, 1969. – 461 с.

Гвоздецкий Н. А. Физическая география СССР. Азиатская часть / Н. А. Гвоздецкий, Н. И. Михайлов. – М.: Мысль, 1970. – 543 с.

Георгиевский В. И. Минеральное питание животных / В. И. Георгиевский, Б. П. Анненков, В. Т. Самохин. – М.: Колос, 1979. – 471 с.

Геращенко Л. Вам поможет медицинская пиявка: энциклопедия гирудотерапии: лечение без лекарств / Л. Геращенко, Г. Никонов. – М.: АСТ: Астрель; Транзит книга, 2005. – 334 с.

Герд С. В. Обзор гидробиологических исследований озер Карелии // Труды Карело-Финского отд. ВНИОРХ. – 1946. – Т. II. – С. 29-132.

Гидрографическое районирование территории Российской Федерации. – М.: НИА-Природа, 2008. – Книга 1. – 541 с.

Гоголь Е. Л. Исследование острой токсичности аминокислотного комплекса хрома (III) / Е. Л. Гоголь, В. Э. Новиков, Е. В. Шемякина, В. К. Курочкин // Токсикологический вестник. – 2001. – № 2. – С. 18-19.

Голованова И. Л. Влияние абиотических факторов (температура, pH, тяжелые металлы) на активность глюкозида у беспозвоночных животных // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2011. – Т. 47. – № 1. – С. 15-20.

Голубева Е. М. Экосистемный подход к оценке загрязнения реки Амур токсичными элементами: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Хабаровск, 2012. – 23 с.

Гомбоева С. В. Возрастные изменения содержания тяжелых металлов (Cu, Zn, Cd, Pb) в органах и тканях плотвы сибирской и щуки Селенгинского мелководья оз. Байкал / С. В. Гомбоева, Н. М. Пронин // Экология. – 2007. – № 4. – С. 314-316.

Горбатова О. Н. Атлас Алтайского края. – Барнаул: НИИГП, 1998. – 137 с.

Горизонтов П. Д. Гомеостаз. – М.: Медицина. 1981. – 576 с.

Горшнев К. А. Путешествия по Краснодарскому краю. – М.: Физкультура и спорт, 1983. – 177 с.

Государственный доклад о состоянии окружающей природной среды и влияние факторов среды обитания на здоровье населения Свердловской области в 2009 г. – Екатеринбург, 2010. – 318 с.

Григорян С. С. Влияние медицинской пиявки на реологические показатели крови крыс в норме и при развитии экспериментального липоидоза / С. С. Григорян, И. А. Соколова, А. А. Шахназарова, С. Н. Сергеев, Д. В. Давыдов, Г. И. Никонов, Е. А. Титова, Н. Н. Фирсов // Физиология. – 1995. – Т. 340. – № 6. – С. 830-831.

Гринберг А. А. Введение в химию комплексных соединений. – Л.: Химия, 1971. – 326 с.

Гронь В. А. Мониторинг загрязнения гидросферы металлургическим предприятием / В. А. Гронь, В. В. Коростовенко, Н. М. Капличенко // Международный журнал экспериментального образования. – 2013. – № 10. – С. 309-311.

Давид О. Ф. Морфофизиологические основы локомоции аннелид. – Л.: Наука, 1990. – 168 с.

Дажо Р. Основные экологии. – М.: Мир, 1975. – 415 с.

Данилин И. А. Металлотионеины как биомаркеры при действии на организмы тяжелых металлов и ионизирующего излучения: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – М., 2010. – 39 с.

Данилин И. А. Удельное содержание металлотионеинов в тканях моллюсков – биоиндикатор загрязнения водоема тяжелыми металлами / И. А. Данилин, В. В. Павловская // Вестн. РУДН. Серия «Экология и безопасность жизнедеятельности». – 2006. – № 2 (14). – С. 87-92.

Данилин И. А. Экспериментальное обоснование нового метода биотестирования пресноводных водоемов по содержанию белков-металлотионеинов в органах и тканях двустворчатых моллюсков / И. А. Данилин, Б. И. Сынзыныс, Г. М. Козьмин // Экология. – 2002. – № 5. – С 383-386.

Даувальтер В. А. Халькофильные элементы (Hg, Cd, Pb, As) в озере Умбозеро, Мурманская область / В. А. Даувальтер, Н. А. Кацулин // Водные ресурсы. – 2010. – Т. 37. – № 4. – С. 461-467.

Демченко М. А. Гидрография Харьковской области // Мат-лы Харьковского отд. Геогр. Общ-ва Украины. – Харьков, 1971. – Выпуск VIII. Харьковская область. Природа и хозяйство. – С.125-149.

Дину М. И. Тяжелые металлы в пресных водах различных природно-климатических зон // Труды института геологии Дагестанского научного центра РАН. – 2009. – № 55. – С. 44-45.

Добринская Л. А. Рост мальков карпа в экспериментальных условиях / Л. А. Добринская, Т. В. Следь // Экология. – 1974. – № 6. – С. 62-68.

Добровольский В. В. География микроэлементов: глобальное рассеяние. – М., 1983. – 246 с.

Довженко Н. В. Реакция антиоксидантной системы в процессе адаптации двустворчатых моллюсков (на примере *Ctenomytilus grayanus*) к антропогенному загрязнению / Н. В. Довженко, Н. Н. Бельчева, А. В. Столетняя, В. Я. Кавун,

В. П. Челомин // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов: мат-лы Междунар. конф. – Петрозаводск, 2004. – С. 41-43.

Догель В. А. Зоология беспозвоночных: учебник для ун-тов / под ред. проф. Ю. И. Полянского. – 7-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. школа, 1981. – 606 с.

Другов Ю. С. Пробоподготовка в экологическом анализе: практическое руководство / Ю. С. Другов, А. А. Родин. – 3-е изд. доп. и перераб. – М.: БИНОМ, 2009. – 855 с.

Дьюсбери Д. Поведение животных. – М.: Мир, 1981. – 479 с.

Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ets n 123) (Страсбург, 18 марта 1986 года) [Электронный ресурс]. – URL: <http://conventions.coe.int/Treaty/Commun/QueVoulezVous> (дата обращения: 16.08.2010).

Егоршина Т. Л. Накопление тяжелых металлов в водных экосистемах разной степени загрязненности / Т. Л. Егоршина, Л. Н. Шихова, Е. М. Лисицын, А. С. Жиряков // Проблемы региональной экологии. – 2007. – № 2. – С. 17-23.

Ёркина Н. В. Влияние техногенного загрязнения урбосреды на показатели жизненности городской биоты (пресноводной малакофауны, почвенной мезофауны, эпифитной лихенофлоры) // Вестник Московского университета. Сер. 16. Биология. – 2016. – № 3. – С. 73-80.

Ермохин М. В. Редкие и исчезающие виды водных беспозвоночных на страницах Красной книги Саратовской области / М. В. Ермохин, Н. А. Евдокимов // Поволжский экологический журнал. – 2006. – № 6. – С. 41-46.

Еськов Е. К. Содержание и миграция тяжелых металлов в компонентах экосистем Волгоградского водохранилища / Е. К. Еськов, В. М. Зубкова, Н. Ю. Белозубова, В. П. Болотов // Аграрная наука. – 2015. – № 1. – С. 14-16.

Жаров Д. Г. Секреты гирудотерапии или как лечиться пиявками. – Ростов-на-Дону, 2003. – 318 с.

Жернов В. А. Восстановительная медицина. Гирудотерапия: учебно-методическое пособие. / В. А. Жернов, М. М. Зубакина. – М.: Изд-во РУДН, 2004. – 106 с.

Живогляд Р. Н. Гирудотерапия при эндометриозе, гиперпластических процессах эндометрия и хронического сальпингофорита в стадии обострения по инфекционно-токсическому типу // Гирудотерапия и гирудофармакотерапия. – 2001. – Т. 3. – С. 65-71.

Завалова Л. Л. Появление неспецифической протеолитической активности у дестабилазы – эндо-ε-(γ-глутамил)-лизил-изопептидазы в присутствии DS-Na / Л. Л. Завалова, Е. В. Кузина, И. П. Баскова // Биохимия. – 1994. – Т. 59. – Вып. 6. – С. 905-910.

Загузова Т. В. Пиявки Кондо-Сосьвинского Приобья // Водные экосистемы Урала, их охрана и рациональное использование. – Свердловск, 1989. – С. 42.

Залозный Н. А. Итоги изучения водных олигохет и пиявок Западной Сибири // Водоемы Сибири и перспективы их рыб.хоз использования. – Томск, 1973. – С. 182-183.

Залозный Н. А. Итоги изучения водных олигохет и пиявок Западной Сибири // Новые данные о фауне и флоре Сибири. – Томск, 1979. – С. 182-183.

Залозный Н. А. Роль олигохет и пиявок в экосистемах водоемов Западной Сибири //Биол. ресурсы водоемов Сибири и Дальнего Востока.– М.: Наука, 1984. – С. 124-143.

Запкувене Д. В. Разведение и выращивание медицинских пиявок в лабораторных условиях // Тр. АН Лит. ССР. Серия В. – 1972. – Т. 3. – № 59. – С. 71-84.

Захарова О. А. Влияние гирудотерапии на функции эндотелия и некоторые показатели гемостаза при ревматоидном артрите / О. А. Захарова, В. В. Горбунов, И. В. Росин // Сибирский медицинский журнал. – 2006. – № 7. – С. 20-23.

Зверев В. П. Гидрогохимия осадочного процесса. – М.: Наука, 1993. – 184 с.

Зеленский В. Д. Исследования по морфологии и систематике *Hirudinea*. I. Организация *Ichthyobdellidae*. – Пгр., 1915. – 256 с.

Зенин А. А. Гидрохимический словарь / А. А. Зенин, Н. В. Белоусова. – Л.: Гидрометеоиздат, 1988. – 240 с.

Зенкевич Л. А. Очерки по эволюции двигательного аппарата животных // Журн.общ.биол. – 1944. – Т. 3. – С. 129-170.

Зиненко А. И. Экология медицинских пиявок / А. И. Зиненко, С. Ю. Утевский, А. А. Атемасов, О. М. Утевская, А. Ю. Утевский // Х Міжнародна Конференція Асоціації гірудологів: мат-лы конф. – Харків, 2012. – С. 10-11.

Зоология беспозвоночных: в 2 томах / под ред. В. Вестхайде и Р. Ригера. – М.. 2008. – Том 1: от простейших до моллюсков и артропод. – 512 с.

Иванов В. К. Макрозообентос малых озер Дарвинского заповедника в условиях ацидификации // Тез. докл. междун. конф. – Петрозаводск, 1995. – С. 30.

Иванов С. Д. Железо как канцерогенный экотоксикант // Токсикологический вестник. – 2011. – № 2 (107). – С. 34-40.

Иванова Н. Л. Сравнительное изучение роста и развития личинок некоторых видов амфибий в контролируемых условиях: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Свердловск, 1975. – 24 с.

Иогансон Л. Определитель пиявок. – Л.: Изд-во АН СССР, 1935. – 95 с.

Исаханян Г. С. Гирудотерапия в клинике внутренних болезней / под ред. В. М. Арутюнян. – Ереван: Айстан, 1991. – 176 с.

Кавун В. Я. Изменение микроэлементного состава органов и тканей двустворчатого моллюска *Crenomytilus grayanus* при акклиматизации в биотопе, хронически загрязненном тяжелыми металлами / В. Я. Кавун, В. М. Шулькин // Биология моря. – 2005. – Т. 31. – № 2. – С. 123-128.

Кадастр беспозвоночных животных Самарской Луки: учеб. пособие / под ред. Г. С. Розенберга. – Самара, 2007. – 471 с.

Казначеев В. П. Современные аспекты адаптации. – Новосибирск: Наука, 1980. – 192 с.

Каменев О. Ю. Ресурсы медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis* L.) в акваториях Западного Предкавказья и их рациональное использование: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Кубан. гос. аграр. ун-т. – Краснодар, 2007. – 24 с.

Каменев О. Ю. Теория и практика гирудотерапии: лечение пиявками: руководство для врачей / О. Ю. Каменев, А. Ю. Барановский. – СПб.: Весь, 2006. – 302 с.

Каменев Ю. Я. Вам поможет пиявка: практик. руководство по гирудотерапии / Ю. Я. Каменев, О. Ю. Каменев. – СПб.: Весь, 2014. – 192 с.

Капусткина Н. И. *Aeromonas hydrophila* как бактерия-симбионт пиявок *Hirudo medicinalis*. Микробиологические особенности «дикой» и выращенной в искусственно созданных условиях пиявок / Н. И. Капусткина, Е. А. Титова, Г. И. Никонов // Молекулярно-клеточные механизмы патогенного и иммуногенного действия *Aeromonas* spp: сб. науч. тр. Рос.-Китайс. семинара. – М.: Медицина для всех, 2007. – С. 45-58.

Каталог річок України, Видавництво Академії наук Української РСР. – Київ, 1957. – 122 с.

Кесслер К. Материалы для познания Онежского озера и Обонежского края, преимущественно в зоологическом отношении // Прилож. К Тр. 1-го съезда русск. естествоиспыт. – СПб., 1868. – С. 1-144.

Клишко О. К. Токсикологический подход в биогеохимической оценке состояния водных экосистем // Экологические системы: фундаментальные и прикладные исследования: мат-лы конф. – Нижний Тагил, 2008. – С. 178-183.

Кобахидзе Д. Н. К выяснению местообитаний медицинской пиявки в природных условиях Грузии // Сообщ. АН Груз. ССР. – 1942. – Т. 3. – Вып. 1. – С. 69-72.

Кобахидзе Д. Н. К изучению гидростойкости медицинской пиявки // Сообщ. АН Груз. ССР. – 1944. – Т. 5. – Вып. 4. – С. 423-429.

Кобахидзе Д. Н. Материалы к инвентаризации гидрофауны Грузии // Тр. Зоол. ин-та АН Груз. ССР. – 1946. – Т. 6. – С. 291-297.

Ковалев С. И. Тяжелые металлы в почвах Алтайского края / С. И. Ковалев, М. А. Мальгин, Ф. В. Сухоруков, И. Н. Маликова, С. В. Мельгунов // Ядерные испытания, окружающая среда и здоровье населения Алтайского края. – Барнаул: Изд-во Алт. ГУ, 1993. – Т. 2. – Кн. I. – С. 64-95.

Коваленко Н. В. Использование пропионо-гематоксилина в изучении зародышевой линии медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* (*Clitellata*, *Hirudinea*) / Н. В. Коваленко, К. А. Дорошенко, В. В. Клименко, А. Ю. Утевский,

С. Ю. Утевский // Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія: біологія. – 2007. – Вип. 6. – № 788. – С. 44-47.

Ковальский В. В. Геохимическая среда и жизнь. – М.: Наука, 1982. – 77 с.

Ковальский В. В. Современные направления и задачи биогеохимии // Биологическая роль микроэлементов. – М.: Наука, 1983. – С. 3-17.

Ковальчук Л. А. Особенности окислительного метаболизма хвостатых и бесхвостых амфибий в период постэмбрионального развития: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Свердловск, 1977. – 24 с.

Ковальчук Л. А. Энергетический обмен мелких млекопитающих в зоне действия выбросов медеплавильного комбината / Л. А. Ковальчук, Н. В. Микшевич // Экология. – 1988. – № 4. – С. 86-88.

Ковальчук Л. А., Сатонкина О. А., Тарханова А. Э. Тяжелые металлы в окружающей среде Среднего Урала и их влияние на организм // Экология. – 2002. – № 5. – С. 358-361.

Ковальчук Л. А. Экологическая физиология мелких млекопитающих Урала / Л. А. Ковальчук, А. П. Ястребов. – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2003. – 204 с.

Ковальчук Л. А. Видовое разнообразие пиявок, обитающих в водоемах Среднего Урала / Л. А. Ковальчук, Л. В. Черная // Экология. – 2003. – № 2. – С. 158-160.

Ковальчук Л. А. Основной обмен и содержание микроэлементов в тканях медицинских пиявок (*Hirudo medicinalis* L.) из природных популяций и выращенных в искусственных условиях биофабрики / Л. А. Ковальчук, Л. В. Черная, А. Э. Тарханова, Е. С. Нохрина // Вестн. Урал. мед. акад. науки. – 2007. – № 4 (18). – С. 49-53.

Ковальчук Л. А. Эколо-физиологические аспекты адаптации к условиям техногенных экосистем. – Екатеринбург: УрО РАН, 2008. – 215 с.

Ковальчук Л. А. Элементный и аминокислотный состав тканей медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* L. при хроническом голодании / Л. А. Ковальчук,

Л. В. Черная, Е. С. Нохрина // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2011. – № 6. – С. 61-64.

Ковальчук Л. А. Исследование аминокислотного спектра сокрета слюнных желез медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis* L.) / Л. А. Ковальчук, Л. В. Черная, Г. И. Никонов, Е. А. Титова // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2011а. – № 3 (36). – С. 71-73.

Ковальчук Л. А. Содержание макро- и микроэлементов и свободных аминокислот в тканях медицинской пиявки *Hirudo verbana* Carena на разных этапах развития и роста / Л. А. Ковальчук, Л. В. Черная, Г. И. Никонов // X Міжнародна Конференція Асоціації гірудологів 2012, мат-лы конф. – Харків, 2012. – С. 57-58.

Ковальчук Л. А. Элементный и аминокислотный спектр сокрета слюнных желез и тканей медицинских пиявок. Значение для гирудотерапии / Л. А. Ковальчук, Л. В. Черная // Вестник восстановительной медицины. – 2013. – № 2. – С. 36-39.

Колчинский Э. И. Эволюция биосфера. – Л.: Наука, 1990. – 236 с.

Кольчугина О. А. Сезонные и пространственные аспекты распределения металлов и проявления токсикоза у рыб в Волховском водохранилище: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Казань, 2010. – 24 с.

Константинов А. С. Общая гидробиология: учебник. – М.: Высш. шк., 1979. – 480 с.

Красная книга Краснодарского края [Электронный ресурс]. – 2007. – URL: <https://cicon.ru/kk-krasnodarskogo-kray.html>.

Красная книга России [Электронный ресурс]. – 2017. – URL: <https://cicon.ru/piyavka-aptechnaya-krym.html>.

Кулаев С. И. К биологии *Herpobdella testacea* Savigny, 1820 // Рус. гидробиол. журн. – 1925. – Т. 4. – С. 102-103.

Кустов С. Ю. Изучение плодовитости медицинской пиявки при закладке маток в различные субстраты и оценка эффективности их использования в масштабах производства: отчет о НИР (заключит.). – Орджоникидзе, 2003. – 34 с.

Кустов С. Ю. Медицинская пиявка в Краснодарском крае: современное состояние популяции и проблемы ее охраны / С. Ю. Кустов, О. Ю. Каменев, В. А. Ярошенко // Актуальные вопросы экологии и охраны природы экосистем южных регионов России и сопредельных территорий. – Краснодар: КубГУ, 2005. – С. 118-121.

Кустов С. Ю. Обоснование необходимости включения медицинской пиявки в Красную книгу Краснодарского края / С. Ю. Кустов, О. Ю. Каменев, С. В. Михайлов // Актуальные вопросы экологии и охраны природы экосистем южных регионов России и сопредельных территорий – Краснодар: КубГУ, 2006. – С. 118.

Кустов С. Ю. Пиявка медицинская *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758 / С. Ю. Кустов, М. И. Шаповалов // Красная книга Республики Адыгея. Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения объекты животного и растительного мира. – Майкоп, 2012. – С. 41.

Кустов С. Ю. Оптимизация процесса выращивания медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis* L.) в искусственных условиях / С. Ю. Кустов, Ю. К. Горбунова, Л. Э. Вардо // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2014. – № 48. – С. 69-72.

Кучера У. Каннибализм в популяции медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis* L.) / У. Кучера, М. Рот // Известия РАН. Серия биологическая. – 2005. – № 6. – С. 751-753.

Кучина Е. А. Распространение вида медицинская пиявка (*Hirudo medicinalis* L. 1758) в водоемах Западной Сибири / Е. А. Кучина, Т. В. Антоненко // Естествознание и гуманизм: сб. науч. тр. – 2010. – Т. 6. – № 1. – С. 75-76.

Лагунов А. В. Охраняемые беспозвоночные животные Южного Урала: попытка метаанализа // Вестник оренбургского госуниверситета. – 2009. – № 6. – С. 186-189.

Лапенко Л. А. Метод атомно-абсорбционной спектрофотометрии в фоновом мониторинге тяжелых металлов / Л. А. Лапенко, М. Г. Виленский // Мони-

торинг фонового загрязнения природной среды / под ред. Ю. А. Израэля, Ф. Я. Ровинского. – Л.: Гидрометеоиздат, 1986. – Вып. 3. – С. 216-223.

Лапкина Л. Н. Исследование острого отравления пиявок некоторыми токсическими веществами / Л. Н. Лапкина, Б. А. Флеров // Тр. Института биол. внутр. вод АН СССР. – 1979. – № 38-41. – С. 50-59.

Лапкина Л. Н. Использование пиявок для идентификации пестицидов в воде / Л. Н. Лапкина, Б. А. Флеров // Гидробиологический журнал. – 1980. – Т. 16. – № 3. – С. 113-119.

Ларионов М. В. Влияние степени загрязнения окружающей среды на здоровье населения в Саратовской области / М. В. Ларионов, Н. В. Ларионов // Вестн. ОГУ. – 2009. – № 4. – С. 122-126.

Лебедев С. В. Влияние кобальта на обмен химических элементов в мышечной ткани / С. В. Лебедев, Е. А. Сизова, О. Ю. Сипайлова, Д. В. Нестеров // Вестник ветеринарии. – 2013. – № 2 (65). – С. 25-27.

Леонова Г. А. Биогеохимическая индикация загрязнения водных экосистем тяжелыми металлами // Водные ресурсы. – 2004. – Т. 31. – № 2. – С. 215-222.

Ливанов Н. А. Пиявки – *Hirudinea* // Животный мир СССР. – Л., 1937. – С. 558-561.

Линник П. Н. Адсорбция тяжелых металлов донными отложениями в присутствии гумусовых веществ / П. Н. Линник, А. В. Зубко, И. Б. Зубенко, Л. А. Малиновская / Гидробиол. журн. – 2005. – Т. 41. – № 3. – С. 104-119.

Линник П. Н. Содержание лабильной фракции металлов в поверхностных водах как важный элемент при оценке их потенциальной токсичности // Гидробиол. журн. – 2010. – Т. 46. – № 6. – С. 90-103.

Линник П. Н. Формы миграции металлов в пресных поверхностных водах / П. Н. Линник, Б. И. Набиванец. – Л.: Гидрометеоиздат, 1986. – 270 с.

Литвиненко Л. И. Влияние факторов внешней среды на структуру и функционировании биоценозов гипергальванических водоемов юга Западной Сибири / Л. И. Литвиненко, А. И. Литвиненко, Е. Г. Бойко, К. В. Куцанов // Сибирский экологический журнал. – 2013. – Т. 20. – № 3. – С. 321-332.

Лукашев Д. В. Фоновое содержание тяжелых металлов в двустворчатых моллюсках украинского участка р. Десны // Гидробиол. журн. – 2011. – Т. 47. – № 3. – С. 44-57.

Лукашев Д. В. Накопление тяжелых металлов моллюсками *Lymnaea stagnalis* как показатель загрязнения малых водоемов // Гидробиол. журн. – 2015. – № 2. – Т. 51. – С. 74-81.

Лукин Е. И. К вопросу о распространении медицинской пиявки в СССР // Зоол. журн. – 1957. – Т. 36. – Вып. 5. – С. 658-669.

Лукин Е. И. Географическое распространение пресноводных пиявок на территории СССР // Проблемы зоогеографии суши. – Львов, 1958. – С. 144-149.

Лукин Е. И. Класс пиявки (*Hirudinea*) // Жизнь животных. – М.: Просвещение, 1968. – Т. 1. – С. 509-526.

Лукин Е. И. Пиявки пресных и солоноватых водоемов. – Л., 1976. – Т. 1. – 484 с. – (Фауна СССР, № 109).

Лукин Е. И. Определитель пресноводных беспозвоночных Европейской части СССР: Класс пиявки *Hirudinea* – Л.: Гидрометеоиздат, 1977. – 204 с.

Лысенкова З. Современные ландшафты в региональной системе природопользования. – Смоленск, 2010. – 273 с.

Лябзина С. Н. Беспозвоночные-некробионты литоральной зоны пресных водоемов Карелии // Биология внутренних вод. – 2013. – № 2. – С. 51-59.

Лябзина С. Н. Особенности разложения трупов животных в воде / С. Н. Лябзина, С. Д. Узенбаев // Структурно-функциональные особенности биосистем Севера (особи, популяции, сообщества): мат-лы конф. – Петрозаводск, 2005. – Ч. I. – С. 227-229.

Майстренко В. Н. Эколого-аналитический мониторинг супертоксикантов / В. Н. Майстренко, Р. З. Хамитов, Г. К. Будников. – М.: Химия, 1996. – 319 с.

Максимова Е. А. Животные водоемов Челябинской области (беспозвоночные) // Доклады к научно-краеведческой конференции, посвященной 95-летию со дня рождения В.И. Ленина. – Челябинск, 1965. – С. 67-70.

Мартынова М. В. Донные отложения как составляющая лимнических экосистем. – М.: Наука, 2010. – 243 с.

Меерсон Ф. З. Концепция адаптационной медицины. – М.: Дело, 1993. – 137с.

Метелев В. В. Водная токсикология / В. В. Метелев, А. И. Канаев, Н. Г. Дзасохова. – М.: Пищ. пром-сть, 1971. – 248 с.

Мешкова А. М. Пиявки озера Севан: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Баку, 1956. – 13 с.

Мицкевич Н. В. Водная среда и экологическая безопасность человека: учеб. пособие по курсу «Экология и безопасность жизнедеятельности» / Н. В. Мицкевич, Л. А. Ковальчук. – Екатеринбург, 2014. – Ч. 1. – 128 с.

Мицкевич Н. В. Водная среда и экологическая безопасность человека: учеб. пособие по курсу «Экология и безопасность жизнедеятельности» / Н. В. Мицкевич, Л. А. Ковальчук. – Екатеринбург, 2018. – Ч. 2. – 152 с.

Мингазова Н. М. Критерии восстановления биотических сообществ нефтезагрязненных малых рек (на примере р. Шава Нижегородской области) / Н. М. Мингазова, О. Ю. Деревенская, О. В. Палагушкина, Э. Г. Набеева, Л. В. Блатт // Биология внутренних вод. – 2014. – № 3. – С. 12.

Михайлов С. В. Особенности биологии, экологии и распространения кубанской медицинской пиявки / С. В. Михайлов, В. А. Ярошенко // Актуальные вопросы экологии и охраны природы экосистем южных регионов России и со-пределльных территорий. – Краснодар, 2005. – С. 136-138.

Михайлов С. В. Распространение и биология медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis* L.) в краснодарском крае: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Ставрополь, 2006. – 24 с.

Мищук Е. В. Роль металлотионеинов в тканях двусторчатого моллюска *Anodonta cygnea* в детоксикации ионов меди / Е. В. Мищук, Р. Л. Мыхайлов // Биология – наука XXI века: 7 Пущин. шк.-конф. молодых ученых: сб. тез. – Пущино, 2003. – С. 193-194.

- Моисеенко Т. И. Рассеянные элементы в поверхностных водах суши / Т. И. Моисеенко, Л. П. Кудрявцева, Н. А. Гашкина. – М.: Наука, 2006. – 476 с.
- Моисеенко Т. И. Водная экотоксикология: теоретические и прикладные аспекты / Ин-т водных проблем РАН. – М.: Наука, 2009. – 400 с.
- Морузи И. В. Влияние низких температур и длительного голодания на зимующих сеголетков карпа / И. В. Морузи, Г. А. Ноздрин, П. Н. Смирнов, Е. В. Пищенко, А. Б. Иванова, П. В. Белоусов // Вестник Новосибирского государственного аграрного университета. – 2012. – № 1-2 (22). – С. 80-82.
- Москалев Ю. И. Минеральный обмен. – М.: Медицина, 1985. – 288 с.
- Мур Дж. В. Тяжелые металлы в природных водах / Дж. В. Мур, С. Рамамурти. – М.: Мир, 1987. – 288 с.
- Насибулина Б. М. Трансформация биоресурсов в пресноводных гидрологических объектах / Б. М. Насибулина, Т. Ф. Курочкина // Геология, география и глобальная энергия. – 2018. – № 4 (71). – С. 198-202.
- Некрасова Л. С. Экспериментальное изучение влияния плотности поселений личинок кровососущих комаров *Aedes communis* Deg. на их биологические характеристики // Экология. – 2004. – № 3. – С. 223-228.
- Немова Н. Н. Влияние токсических факторов на протеолитическую активность в икре и ранних личинках рыб / Н. Н. Немова, М. Ю. Крупнова, Е. И. Кайвяряйнен, И. В. Волков // Известия АН. Серия Биологическая. – 1994. – № 4. – С. 605-610.
- Немова Н. Н. Биохимическая индикация состояния рыб / Н. Н. Немова, Р. У. Высоцкая. – М.: Наука, 2004. – 212 с.
- Никаноров А. М. Биомониторинг тяжелых металлов в пресноводных экосистемах / А. М. Никаноров, А. В. Жулидов, А. Д. Покаржевский. – Л., 1985. – 144 с.
- Никаноров А. М. Гидрохимия: учеб. пособие. – Л.: Гидрометеоиздат, 1989. – 351 с.
- Никаноров А. М. Биомониторинг металлов в пресноводных экосистемах / А. М. Никаноров, А. В. Жулидов. – Л.: Гидрометеоиздат, 1991. – 312 с.

Никаноров А. М. Биомониторинг тяжелых металлов в пресноводных экосистемах / А. М. Никаноров, А. В. Жулидов, А. Д. Покаржевский. – Л.: Гидрометеоиздат, 1993. – 291 с.

Никишов А. А. Сравнительная оценка поведения медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis*) при разных режимах содержания / А. А. Никишов, Б. Абтахи, Юсефичаходеши Мортеза // Вестник российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство. – 2015. – № 2. – С. 81-87.

Никонов Г. И. Медицинская пиявка: вчера, сегодня, завтра... – М.: Электроника, 1992. – 123 с.

Никонов Г. И. Медицинская пиявка: основы гирудотерапии. – СПб.: СДС, 1998. – 294 с.

Никонов Г. И. Гирудотерапия: наука и практика // Гирудотерапия и гирудофармакотерапия. – 2007. – Т. 5. – С. 8-22.

Никонов Г. И. Экстракт пиявок *Hirudo medicinalis* – биогенная субстанция для создания эффективных лекарственных средств / Г. И. Никонов, Е. А. Титова, А. О. Лебедева // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. – Т. 78. – № 2. – С. 15-19.

Нотова С. В. Особенности элементного статуса при некоторых неспецифических реакциях адаптации (повышенной активации и переактивации) / С. В. Нотова, О. В. Кван, С. В. Мирошников // Вестник ОГУ. – 2011. – № 15. – С. 88-90.

Нохрина Е. С. Эколо-физиологические особенности медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis* L.) из природных популяций и выращенной на биофабрике: автореф. дис. ... канд. биол. Наук. – Екатеринбург, 2010. – 20 с.

Нохрина Е. С. Сравнительная характеристика физиологических особенностей медицинских пиявок (*Hirudo medicinalis* L.) из природной популяции и выращенных в искусственных условиях биофабрики / Е. С. Нохрина, Е. А. Басмаджян, Л. В. Черная, Л. А. Ковальчук // Экология в меняющемся мире: мат-лы докл. конф. – Екатеринбург, 2006. – С. 170-171

Нохрина Е. С. 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.

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

Нюкканов А. Н. Воздействие природных экотоксикантов на гидробионты Республики Саха (Якутия): автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Красноярск, 2004. – 30 с.

Оберлис Д. Биологическая роль макро- и микроэлементов у человека и животных / Д. Оберлис, Б. Харланд, А. Скальный. – СПб.: Наука, 2008. – 543 с.

Одум Ю. Основы экологии. – М.: Мир, 1975. – 740 с.

ООПТ Нижней Волги как важнейший механизм сохранения биоразнообразия: итоги, проблемы и перспективы. – Волгоград, 2010. – 288 с.

Открывая Алтай / сост.: Д. В. Боровиков [и др.]; ред. М. Б. Аврамова. – Барнаул: РИО АКУНБ, 2006. – 117 с.

Павловская В. В. К вопросу изучения видового и полового различия в содержании металлотионеинов в моллюсках *Dreissena polymorpha* и *Mytilus edulis*, обитающих в водоемах Калининградской области / В. В. Павловская, И. А. Шестакова // Молодежь и наука: моск. междунар. телекоммуникац. конф. молодых ученых и студентов. – М.: МИФИ, 2004. – С. 143-145.

Павловская В. В. Экологические аспекты реакции моллюсков *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) на действие ионов тяжелых металлов: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Калининград, 2007. – 25 с.

Павлюк Т. Е. Методика оценки экологического состояния водных экосистем на основе анализа состояния донных биоценозов / Т. Е. Павлюк, А. Н. Попов // Отчет о НИР Рос НИИВХ. – Екатеринбург, 2001. – 115 с.

Парахода Н. А. Оценка ландшафтных систем административного района и предложения по улучшению их экологического состояния: на примере Каневского района Краснодарского края: дис. ... канд. биол. наук. – Краснодар, 2005. – 203 с.

Патент 2045954 РФ. Способ получения секрета слюнных желез кровососущих пиявок, обладающего способностью ингибировать адгезию, агрегацию тромбоцитов, снижать реологические свойства крови и оказывать иммуностимулирующее действие / И. П Баскова. Опубл. 20.10.1995. – Бюл. № 31. – 3 с.

Петухова Г. А. Моллюски как чувствительные тест-индикаторы состояния перифитона при действии антропогенного пресса загрязнителей // Вестник Тюменского государственного университета. – 2005. – № 5. – С. 97-100.

Плотников В. *Glossiphoniidae, Hirudinidae* и *Herpobdellidae* Зоологического музея Академии Наук // Ежегодн. Зоол. муз. Акад. наук. – 1907. – Т. 10. – С. 133-158.

Подгурская О. В. Механизмы детоксикации тяжёлых металлов у моллюсков семейства *Mytilidae*: автореф. дис. ... канд. биол. наук – Владивосток, 2006. – 22 с.

Попов А. П. Использование водных беспозвоночных для определения токсического загрязнения вод / А. П. Попов, И. Л. Цветков, А. С. Коничев // Биология в школе. – М., 2010. – № 3. – С. 42-45.

Правила использования водных ресурсов р. Северский Донец, Укргидро-проект. – Харьков, 2010. – 112 с.

Прокаев В. И. Физико-географическое районирование Свердловской области. – Свердловск: Свердл. гос. пед. ин-т, 1976. – 137 с.

Пронина Г. И. Физиолого-иммунологическая оценка культивируемых гидробионтов: карпа, сома обыкновенного, речных раков: автореф. дис. ... д-ра биол. наук – Москва, 2012. – 37 с.

Проссер Л. Сравнительная физиология. – М.: Мир, 1977. – 153 с.

Пряхин Е. А. Оценка уровня патологии эритроцитов в периферической крови у плотвы (*Rutilus rutilus* L.) из водоемов с разным уровнем радиоактивного загрязнения / Е. А. Пряхин, Г. А. Тряпицына, Е. В. Стяжкина, И. А. Шапошни-

кова, Д. И. Осипов, А. В. Аклеев // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2012. – Т. 52. – № 6. – С. 616.

Раковская Э. М. Физическая география России: учеб. для студ. пед. выс. учеб. заведений: в 2 ч./ Э. М. Раковская, М. И. Давыдова. – М.: Гуманит. изд. центр «Владос», 2001. – Ч. 1. – 288 с.; Ч. 2. – 304 с.

Рассадина Е. В. Выделение и исследование микрофлоры и пищеварительного канала *Hirudo medicinalis* / Е. В. Рассадина, Е. М. Романова, А. В. Ионова, О. М. Климина // Вестник Ульяновской гос. сельхоз. академии. – 2007. – № 1. – С. 56-61.

Рассадина Е. В. Экологически обоснованная биотехнология воспроизводства *Hirudo medicinalis* L. в лабораторных условиях: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Ульяновск, 2006. – 23 с.

Рассадина Е. В. Особенности биологии, экологии, этологии и разведения медицинской пиявки в лабораторных условиях / Е. В. Рассадина, Е. М. Романова. – Ульяновск: Изд-во УлГУ, 2008. – 185 с.

Рахманин Ю. А. Актуальные задачи экологии человека и гигиены окружающей среды / Ю. А. Рахманин, Н. В. Русаков, Ю. А. Ревазова, С. И. Иванов, С. М. Новиков // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2005. – № 2. – С. 18-23.

Ревякин В. С. География Алтайского края / В. С. Ревякин, В. М. Пушкирев. – Барнаул: Алт. книж. изд-во, 1989. – 223 с.

Реймерс Н. Ф. Азбука природы: микроэнциклопедия биосферы. – М.: Знание, 1980. – 208 с.

Решетняк О. С. Многолетняя изменчивость содержания соединений кадмия и свинца в речных экосистемах России / О. С. Решетняк, В. А. Брызгало, Л. С. Косменко // География и природные ресурсы. – 2017. – № 1. – С. 71-80.

Рождественская Т. А. Тяжелые металлы в почвах и растениях юго-западной части Алтайского края: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Барнаул, 2003. – 24 с.

Романенко В. Д. Биоиндикация экологического состояния водоемов в черте г. Киева / В. Д. Романенко, А. В. Ляшенко, С. А. Афанасьев, Е. Е. Зорина-Сахарова // Гидробиол. журн. – 2010. – Т. 46. – № 2. – С. 3-7.

Романова Е. М. Роль пиявок в биологическом механизме аккумуляции токсикантов / Е. М. Романова, О. М. Климина // Вестник Ульяновской ГСХА. – 2009. – № 1 (9). – С. 85-88.

Романова Е. М. Биоресурсы класса Hirudinea в зоне Среднего Поволжья: экологическая значимость и перспективы использования / Е. М. Романова, О. М. Климина // Известия Самарского научного центра РАН. – 2010. – Т. 12. – № 1. – С. 208-211.

Романова Е. М. Морфофизиологические адаптации *Carassius auratus Gibelio* Bloch в биоиндикации состояния пресноводных экосистем / Е. М. Романова, Е. В. Спирина // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2010. – № 2. – С. 31-36.

Руководство по химическому анализу поверхностных вод суши / под ред. А. Д. Семенова. – Л.: Гидрометеоиздат, 1977. – 354 с.

Рункова Г. Г. О влиянии метаболитов водной среды головастиков на их эндогенный метаболизм и чувствительность к гипоксии в зависимости от возраста и условий донора и реципиента / Г. Г. Рункова, Л. А. Ковальчук // Докл. АН СССР. – 1975. – Т. 220. – № 5. – С. 1199-1202.

Савинов В. А. Гирудотерапия в гастроэнтерологии. – Брянск: Асклепейон, 2002. – 51 с.

Салтыков В. П. Выращивание медицинских пиявок в искусственных субстратах / Х Міжнародна Конференція Асоціації гірудологів: мат-лы конф. – Харків, 2012. – С. 12-14.

Самойлов А. Н. «Пиявит»: сравнительная оценка эффективности при травме роговицы в эксперименте // Гирудотерапия и гирудофармакотерапия. – 2001. – Т. 3. – С. 103-109.

Самонова О. А. Формы соединений тяжелых металлов в почвах Среднего Поволжья / О. А. Самонова, Н. А. Кулешова, Е. Н. Асеева, Т. М. Кудерина. – Казань, 1988. – 128 с.

Сборник санитарно-гигиенических нормативов и методов контроля вредных веществ в объектах окружающей среды / Центр. экол. пробл. – М., 1991. – 225 с.

Северцов А. С. Эволюционный стазис и микроэволюция. Москва: Товарищ-во научн. изд. КМК; Авторская Академия, 2008. – 176 с.

Северцова Е. А. Механизмы адаптационной регуляции эмбриогенеза бесхвостых амфибий, обитающих в условиях антропогенного загрязнения водоемов / Е. А. Северцова, А. С. Северцов // Журнал общей биологии. – 2007. – Т. 68. – № 5. – С. 323-331.

Селезнев К. Г. Сравнительный анализ эффективности лекарственных препаратов «Пиявит» и «Супер-пиявит» по результатам клинических испытаний // Гирудотерапия и гирудофармакотерапия. – 1996. – С. 30-43.

Сидоровский С. А. Видовое разнообразие зоопланктона во временных водоемах урочища Горелая долина, Харьковская область, Украина / С. А. Сидоровский, М. Ю. Колесникова, М. В. Коваленко, С. Ю. Утевский // Мат-лы Межд. конф. – 2010. – С. 362-363.

Сидоровский С. А. Новая находка пресноводных жаброногов *Tanymastix stagnalis* и *Drepanosurus birostratus* (Branchiopoda, Anostraca) в Харьковской области (Украина) // Вестник зоологии. – 2012. – Т. 46 (1) – С. 82.

Силкина Н. И. Влияние сублетальных концентраций ионов кадмия на некоторые показатели липидного обмена рыб / Н. И. Силкина, В. Р. Мицкяров // Токсикол. вестн. – 2006. – № 1. – С. 20-24.

Синева М. В. Наблюдения над выращиванием медицинских пиявок // Зоол. журн. – 1944. – Т. 23. – Вып. 6. – С. 293-303.

Синева М. В. Биологические наблюдения над размножением медицинской пиявки // Зоол. журн. – 1949. – Т. 28. – Вып. 3. – С. 213-224.

Сідоровський С. А. Нова знахідка прісноводної каланоїдної копеподи *Hemidiaptomus hungaricus* (Copepoda, Calanoida) в урочищі «Горіла долина» (Україна) // Вестник зоологии. – 2011. – Т. 45 (3) – С. 208.

Скальный А. В. Химические элементы в физиологии и экологии человека. – М.: Мир, 2004. – 215 с.

Скальный А. В. Региональные особенности элементного гомеостаза как показатель эколого-физиологической адаптации / А. В. Скальный, С. А. Мирошников, С. В. Нотова, И. П. Болодурина, С. В. Мирошников, И. Э. Алиджанова // Экология человека. – 2014. – № 9. – С. 14-17.

Скальская И. А. Реакция зооперифита озер Дарвинского заповедника на ацидификацию. – СПб.: Наука, 1994. – С. 170-185.

Скурлатов Ю. И. Введение в экологическую химию / Ю. И. Скурлатов, Г. Г. Дука, А. Мизити. – М.: Высш. шк., 1994. – 399 с.

Слока Н. А. Определитель животных Латвийской ССР. Пиявки (*Hirudinea*). – Рига: ЛГУ, 1983. – 63 с.

Слоним А. Д. Энергетические основы адаптации организма животных к горным условиям: устойчивость к холоду и гипоксии // Экология горных млекопитающих. – Свердловск, 1982. – С. 105.

Сова Т. В. Луганський природний заповідник НАН України // Екологія та природні багатства України. – Київ: Новий світ, 2008. – С. 176-177.

Среднеуральская гидроэкспедиция [Электронный ресурс]. – URL: <http://uralidrogeo.ru/interes/Sverdlovsk.htm> (дата обращения: 19.02.2013).

Степанова З. Л. Изучение белково-пептидных веществ водной среды экспериментальных популяций личинок амфибий: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 1982. – 24 с.

Степанова Н. Ю. Заобентос как индикатор экотоксикологической обстановки в Куйбышевском водохранилище / Н. Ю. Степанова, В. А. Яковлев, В. З. Латыпова // Вестник РУДН. Сер. Экология и безопасность жизнедеятельности. – 2007. – № 2. – С. 50-57.

Степанова Н. Ю. Механизмы детоксикации тяжелых металлов в компонентах водной экосистемы Куйбышевского водохранилища / Н. Ю. Степанова, В. З. Латыпова // Ученые записки Казанского госуниверситета. Естественные науки. – 2005. – Т. 147. – Кн. 3. – С. 18-26.

Степанова Н. Ю. Факторы и критерии оценки экологического риска для устойчивого функционирования Куйбышевского водохранилища: автореф. дис. д-ра биол. наук. – Ульяновск, 2008. – 40 с.

Степанова Н. Ю. Экологическое нормирование содержания загрязняющих веществ в донных отложениях / Н. Ю. Степанова, В. А. Яковлев, В. З. Латыпова, О. К. Анохина // Проблемы региональной экологии. – 2007. – № 4. – С. 40-47.

Столяр О. Б. Роль металлотионеинов в детоксикации ионов Cu^{2+} Zn^{2+} Mn^{2+} в тканях двустворчатого моллюска *Anodonta cygnea* при их действии в отдельности и в смеси / О. Б. Столяр, В. В. Грубинко, Р. Л. Мысхайлив, Е. В. Мищук // Гидробиологический журнал. – 2004 – № 3. – С. 91-102.

Стояновский Д. Н. Медицинская пиявка. Кровопускание. – Донецк, 2002. – 125 с.

Стрельников В. В. Оценка и динамика ресурсов медицинской пиявки в акваториях Западного Предкавказья / В. В. Стрельников, О. Ю. Каменев // Труды КубГАУ. – 2007. – № 5. – С. 190-112.

Схема охраны вод реки Уды. – Х.: Харьковгипроводхоз, 1985. – Книга 4: Гидрология и гидрография. – 60 с.

Тер-Григорян М. А. Некоторые наблюдения над распространением медицинской пиявки в Армении // Зоол. сб. – 1950. – Т. 7. – С. 122-126.

Тимофеев М. А. Экологические и физиологические аспекты адаптации к абиотическим факторам среди эндемичных байкальских и палеарктических амфипод: автореф. дис. д-ра биол. наук – Томск, 2010. – 44 с.

Тимофеев-Ресовский Н. В. Избранные труды: Генетика. Эволюция. Биосфера / под ред О. Г. Гозенко, В. И. Иванова. – М.: Медицина, 1996. – 480 с.

Титова Е. А. Биология медицинской пиявки // Гирудотерапия и гирудо-фармакотерапия. – 2002. – Т. 4.– С. 12-17.

Титова Е. А. Краткие сведения по биологии медицинских пиявок / Е. А. Титова, Г. И. Никонов // Гирудотерапия и гиуродофармакотерапия. – 2007. – Т. 5. – С. 207-247.

Трапезников А. В. Пресноводная радиоэкология / А. В. Трапезников, В. Н. Трапезникова. – Екатеринбург: Изд-во «АкадемНаука», 2012. – 544 с.

Трудникова Н. М. Спектрофотометрическое исследование смешаннолигандных комплексных соединений меди (II) с двумя аминокислотами / Н. М. Трудникова, С. Н. Болотин, А. А. Скляр, В. Т. Панюшкин // Изв. Высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Серия Естественные науки. – 2006. – № 1. – С. 71-73.

Утевский С. Ю. Новая находка пресноводного вида пиявок *Fadejewobdella quinqueannulata* (Hirudinea: Erpobdellidae) в урочище «Горелая долина», Харьковская область, Украина / С. Ю. Утевский, Ю. Г. Гамуля, А. Ю. Утевский // Актуальные проблемы современной науки в исследованиях молодых ученых г. Харькова. – Харьков, 1998. – С. 216-218.

Утевский С. Ю. Новые данные о распространении медицинской пиявки, *Hirudo* (Hirudinea) в Украине, Центральной Азии и на Северном Кавказе / С. Ю. Утевский, А. А. Атемасов, Г. А. Мазепа, А. Ю. Утевский, О. М. Утевская, А. М. Зиненко // Вестник зоологии. – 2008. – Т. 42. – № 1. – С. 56-58.

Фальфушинская Г. И. Аккумуляция тяжелых металлов в тканях двустворчатого моллюска *Anodonta cygnea* в водоемах аграрной и урбанизированной территории // Экологическая химия. – 2008. – Т. 17. – № 4. – С. 218-227.

Филенко О. Ф. Водная токсикология. – М.: МГУ., 1988. – 154 с.

Филенко О. Ф. Загрязнение металлами / О. Ф. Филенко, В. Г. Хоботьев // Водн. токсикология. – М.: ВИНИТИ, 1976. – Т. 3. – С. 110-150.

Флеров Б. А. Эколо-физиологические аспекты токсикологии пресноводных животных. – Л.: Наука, 1989. – 144 с.

Хавезов И. Атомно-абсорбционный анализ / И. Хавезов, Д. Цалев; пер. с болг. Г. А. Шейниной; под ред. С. З. Яковлевой. – Л.: Химия, 1983. – 144 с.

Хатухов А. М. Пиявки Кабардино-Балкарии: метод. указания к изучению спецкурса «Фауна КБР» / А. М. Хатухов, А. В. Якимов, Е. А. Барагунова. – Нальчик, 2001. – 23 с.

Химия тяжелых металлов, мышьяка и молибдена в почвах / под ред. Н. Г. Зырина и Л. К. Садовниковой. – М.: Изд-во МГУ, 1985. – 208 с.

Цветков И. Л. Биохимические параметры стресс-редуцирующей реакции гидробионтов при интоксикации: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Москва, 2009. – 46 с.

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

Чеботина М. Я. Тритий в экосистеме водоема-охладителя АЭС / М. Я. Чеботина, О. А. Николин // Уральский геофизический вестник. – 2003. – № 1 (5). – С. 93-97.

Чеботина М. Я. Индикация химического загрязнения водоема-охладителя АЭС с помощью планктонных организмов / М. Я. Чеботина, Л. В. Черная, В. П. Гусева, Л. А. Ковальчук // Водное хозяйство России: пробл., технологии, управление. – 2007. – № 2. – С. 34-42.

Червона книга України, Тваринний світ. – К.: Глюбалконсалнинг, 2009. – 624 с.

Черкесова Д. У. Физиологические аспекты клеточно-молекулярных закономерностей адаптации животных организмов к экстремальным ситуациям: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Астрахань, 2013. – 31 с.

Черная Л. В. Возможность использования некоторых видов пиявок в качестве биониндикаторов на загрязнение водных экосистем тяжелыми металлами / Л. В. Черная, Л. А. Ковальчук // Экологические проблемы северных регионов и пути их решения: мат-лы межд. конф. – Апатиты, 2004. – Ч. 1. – С. 221-222.

Черная Л. В. Содержание свободных аминокислот в тканях медицинских пиявок различных физиологических групп / Л. В. Черная, Л. А. Ковальчук, Е. А. Басмаджян // Вестник Уральской медицинской академии наук. – 2006. – № 3-2 (15). – С. 123-124.

Черная Л. В. Пиявки как индикаторы загрязнения водных объектов Свердловской области тяжелыми металлами / Л. В. Черная, Л. А. Ковальчук // Водное хозяйство России: пробл., технологии, управление. – 2007. – № 3. – С. 85-92.

Черная Л. В. Физиологические особенности медицинских пиявок (*Hirudo medicinalis L.*) из природной популяции и выращенных в искусственных условиях биофабрики / Л. В. Черная, Л. А. Ковальчук // XX съезд физиологического общества им. И. П. Павлова: тез. докл. – М.: Русский врач, 2007б. – С. 473.

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

Черная Л. В. Распространение пиявок в водных экосистемах города Екатеринбурга и его окрестностей / Л. В. Черная, Л. А. Ковальчук // Экология. – 2009. – № 2. – С. 122-126.

Черная Л. В. Особенности распределения тяжелых металлов в водной трофической цепи на примере моллюсков и пиявок / Л. В. Черная, Л. А. Ковальчук // Актуальные проблемы экологической физиологии, биохимии и генетики животных: материалы II Междунар. науч. конф. – Саранск, 2009а. – С. 143-145.

Черная Л. В. Оценка состояния аминокислотного пула в тканях медицинской пиявки при хроническом голодании / Л. В. Черная, Л. А. Ковальчук, Н. Т. Казиев, Е. С. Нохрина // Вестн. Урал. мед. акад. науки. – 2009. – № 2 (25). – С. 171-172.

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

Черная Л. В. Содержание тяжелых металлов в тканях пиявок, обитающих в озерах Южного Урала / Л. В. Черная, Л. А. Ковальчук // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2010. – № 12 (118). – С. 65-68.

Черная Л. В. Пиявки водных объектов Екатеринбурга и их биоаккумуляционные возможности / Л. В. Черная, Л. А. Ковальчук // Экология урбанизированных территорий. – 2010а. – № 3. – С. 17-21.

Черная Л. В. Адаптационно-компенсаторные возможности медицинских пиявок к экстремально высоким концентрациям тяжелых металлов в модельном эксперименте / Л. В. Черная, Л. А. Ковальчук, Е. С. Нохрина // Проблемы экологии: чтения памяти проф. М. М. Кожова: тез. докл. Междунар. науч. конф. – Иркутск, 2010. – С. 479.

Черная Л. В. Возрастная динамика макро- и микроэлементов в тканях медицинской пиявки (*Hirudo verbana* Carena) / Л. В. Черная, Л. А. Ковальчук // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2011. – № 12. – С. 169-171.

Черная Л. В. Сезонная динамика биологически активных соединений в тканях медицинских пиявок / Л. В. Черная, Л. А. Ковальчук // Эколого-физиологические проблемы адаптации: сб. док. симпозиума. – М.: РУДН, 2012. – С. 78-80.

Черная Л. В. Оценка физиологического состояния медицинских пиявок *Hirudo medicinalis* L. и *Hirudo verbana* Carena, обитающих в водных экосистемах России и Украины / Л. В. Черная, Л. А. Ковальчук, Е. С. Нохрина // X Міжнародна Конференція Асоціації гірудологів: мат-лы конф. – Харків, 2012. – С. 27-28.

Черная Л. В. Влияние тяжелых металлов на состояние аминокислотного пула тканей пиявок *Haemopis sanguisuga* (L. 1758) в модельном эксперименте / Л. В. Черная, Л. А. Ковальчук // Вода: химия и экология. – 2014. – № 9. – С. 68-71.

Черная Л. В. Аминокислотный фонд тканей медицинских пиявок *Hirudo medicinalis* L. 1758 и *Hirudo verbana* Carena, 1820, выращенных в искусственных условиях региональных биофабрик России (значение для гирудофармакотерапии) / Л. В. Черная, Л. А. Ковальчук, Е. С. Нохрина, Г. И. Никонов, Г. В. Дегу-

нец, М. П. Дегунец // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2014. – № 3 (49). – С. 65-66.

Черная Л. В., Ковальчук Л. А., Микшевич Н. В. Пиявки *Haemopis sanguisuga* Linnaeus, 1758 как биоиндикаторы при мониторинге загрязнения водных экосистем Урала тяжелыми металлами // Биоиндикация в мониторинге пресноводных экосистем: мат-лы III междунар. конф., Санкт-Петербург. – 2017. – С. 362-365.

Черная Л. В. Географическая вариабельность содержания тяжелых металлов в тканях медицинских пиявок (*Hirudo medicinalis*, *Hirudo verbana*) и в донных отложениях из мест их обитания / Л. В. Черная, Л. А. Ковальчук, Н. В. Микшевич // Nature Conservation Research. Заповедная наука. – 2019. – Т. 4. – № 3. – С. 67-77.

Чуйко Г. М. Биомаркеры в системе оценки токсического воздействия на гидробионтов и в экологическом мониторинге водных экосистем // Вода Magazine. – 2017. – № 7 (119). – С. 66-77.

Чужекова Т. А. О макрозообентосе ручьев г. Жигулевска и его окрестностей / Т. А. Чужекова, Е. В. Шатских, Л. Б. Зимарева // Водные и наземные экосистемы: probl. и перспективы исследований: материалы Всерос. конф. с междунар. участием. – Вологда, 2008. – С. 234-237.

Шаплыгина Ю. Н. Особенности воздействия тяжелых металлов на донные организмы дельты р. Волга / Ю. Н. Шаплыгина, Т. Ф. Курочкина, Б. М. Насибулина // Естественные науки. – 2013. – № 3 (44). – С. 51-61.

Шаповалов М. И. Пиявки (*Hirudinea*) в условиях антропогенной трансформации водных экосистем Северо-Западного Кавказа / М. И. Шаповалов, А. А. Моторин, А. У. Тхабисимова // Вода: химия и экология. – 2012. – № 4. – С. 61-67.

Шарова И. Х. Зоология беспозвоночных – М.: Владос, 2002. – 592 с.

Шварц С. С. Экологические закономерности эволюции. – М.: Наука, 1980. – 278 с.

Шемякина Е. В. Влияние состава аминокислотных соединений меди на жизнедеятельность гидромикрофлоры / Е. В. Шемякина, Е. А. Никольская, А. Д. Фридман // Вопросы физико-химической биологии в ветеринарии: сб. науч. тр. МГАВМиБ им. К.И. Скрябина. – М., 1998. – С. 47-52.

Шестаков В. В. Метод определения качества медицинских пиявок / В. В. Шестаков, Е. А. Титова, Н. И. Капусткина, Г. И. Никонов // Вестник Международного центра медицинской пиявки. Гирудотерапия и гирудофармакотерапия. – 2007. – Т. 5. – С. 247-285.

Шибкова Д. З. Адаптационно-компенсаторные реакции системы кроветворения при хроническом радиационном воздействии / Д. З. Шибкова, А. В. А克莱ев. – М.: РАДЭКОН; Челябинск: ЧГПУ, 2006. – 346 с.

Шишкина И. Д. Влияние медицинских пиявок на микроорганизмы и на организм человека: автореф. дис. канд. мед. наук. – Рязань, 1953. – 24 с.

Школьник М. Я. Применение микроэлементов в сельском хозяйстве и медицине / М. Я. Школьник, В. Н. Давыдова. – Рига, 1959. – С. 37.

Шляпников Д. С. Минеральные компоненты донных отложений озер Урала / Д. С. Шляпников, И. Г. Демчук, П. В. Окунев. – Свердловск: Изд-во Уральского унив-та, 1990. – 104. с.

Щеголев Г. Г. Жизнь пресных вод СССР. – М., 1949. – Т. 2: Пиявки (*Hirudinea*). – С. 131-145.

Щеголев Г. Г. Медицинская пиявка и ее применение / Г. Г. Щеголев, М. С. Федорова. – М., 1955. – 67 с.

Щеголев Г. Г. Наблюдения над многократной откладкой коконов медицинскими пиявками // Зоологич. журн. – 1948. – Т. 27. – № 1 – С. 13-16.

Щеголев Г. Г. О применении видоизмененного метода Лонера для выкормки медицинских пиявок // Зоологич. журн. – 1946. – Т. 25 – № 2. – С. 111-114.

Щеголев Г. Г. Пиявки Туркменистана / Г. Г. Щеголев, З. А. Щеголова // Тр. Мургаб. гидробиол. станции. – 1951. – Т. 1. – С. 77-102.

Щербакова Е. Н. Возрастные изменения содержания тяжелых металлов в органах и тканях русского осетра: автореф. дис. ...канд. биол. наук. – Астрахань, 2004. – 24 с.

Щербань Э. П. Токсичность ионов некоторых тяжелых металлов для *Daphnia magna* Straus в зависимости от температуры // Гидробиол. журн. – 1977. – Т. 13. – № 4. – С. 86-91.

Эпштейн В. М. Рыбы пиявки пресных вод и морей СССР: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1963. – 16 с.

Яковлев А. М. Исследование комбинированного воздействия ионов тяжелых металлов на планктонные и бентосные организмы в условиях эксперимента / А. М. Яковлев, Э. Р. Зайнулгабидинов, Т. В. Кузнецова // Токсикол. Вестник. – 2001. – № 6. – С. 13-16.

Яковлев В. А. Воздействие тяжелых металлов на пресноводный зообентос: 1 бионакопление // Экол. химия. – 2002. – Т. 11. – Вып. 1. – С. 27-39.

Яковлев В. А. Оценка качества вод верхних плесьев кудышевского водохранилища по зообентосу / В. А. Яковлев, В. З. Латыпова, А. В. Яковлева // Вода: химия и экология. – 2012. – № 7. – С. 3-6.

Ярошенко В. А. Об изучении и сохранении медицинской пиявки на территории Краснодарского края / В. А. Ярошенко, С. В. Михайлов, С. Ю. Кустов. – Отчет о НИР Кубан. гос. ун-та (заключит.). – Краснодар, 2003. – 94 с.

Abbas Zaidi S. M. A Systematic Overview of the Medicinal Importance of San-guivorous Leeches / S. M. Abbas Zaidi, S. S. Jameel, F. Zaman, S. Jilani, A. Sultana, Shariq A. Khan // Alternative Medicine Review. – 2011. – Vol. 16. – № 1. – P. 59-65.

Anke M. Essential and toxic effects of macro, trace and ultratrace elements in the nutrition of man / M. Anke, E. Merrian, M. Ihnat, M. Stoeppler // Elements and Their Compounds in the Environment. – 2004. – Vol. 1. General Aspects. – P. 343-367.

Ascenzi P. Protease inhibitors from European medicinal leech Hirudo medicinalis, structural and biomedical aspects / P. Ascenzi, G. Amiconi, W. Bode, M. Bolognesi, M. Coletta, E. Menegatti // Mol. Aspect Med. – 1995. – Vol. 16. – P. 215-313.

Autrum H. Hirudinea // Die Tierwelt Mitteleuropas. – Leipzig, 1958. – Vol. 1. – № 7b. – S. 1-30.

Bazyluk W. Przyczynek do znajomosci fauny pijawek (*Hirudinea*) Podlasia // Fragm. faun. Mus. Zool. Polonici. – 1957. – Vol. 6. – S. 129-133.

Bennike S. A. Contribution to the ecology of Danish freshwater leeches (*Hirudinea*). – Kobenhawn, 1943. – 109 p.

Bere T. Cadmium and lead toxicity on tropical freshwater periphyton communities under laboratory-based mesocosm experiments / T. Bere, J. G. Tundisi // Hydrobiologia. – 2012. – Vol. 680. – P. 187-197.

Betzer S. B. Copper toxicity in *Busycon canaliculatum* / S. B. Betzer, P. P. Yevich // Biol. Bull. – 1975. – Vol. 48. – № 1. – P. 16-25.

Bordas E. Die Rolle der Thioaminsäuren bei durch Cadmium hervorgerufenen experimentellen Hoden schädigungen / E. Bordas, S. Gabor, V. V. Papilian // Arch. Toxicol. – 1976. – Vol. 36. – № 2. – P. 163-168.

Borgmann U. Accumulation, regulation and toxicity of copper, zinc, lead and mercury in *Hyalella azteca* / U. Borgmann, W. P. Norwood, C. Clarke // Hydrobiologia. – 1993. – Vol. 259. – P. 79-89.

Bradley R. W. Heavy metals in fish from a series of metal contaminated lakes near Sudbury, Ontario / R. W. Bradley, J. R. Morris // Water, Air and Soil Pollut. – 1986 – Vol. 27. – № 3/4. – P. 341-354.

Bratton J. H. *Placobdella costata* and *Hirudo medicinalis*. British Red Data Books: 3. Invertebrates other than insects (ed. J. H. Bratton) / J. H. Bratton, J. M. Elliot // Joint Nature Conservation Committee, Peterborough. – 1991. – P. 87-92.

Briggs Le. Effect of cadmium on the intracellular pool of free amino acids in *Mytilus edulis* / Le. Briggs, R. Baron // Bull. Environ. Contam. and Toxicol. – 1979. – Vol. 22. – № 6. – P. 838-845.

Buczynski P. Occurrence of European Medicinal Leech (*Hirudo medicinalis* L., 1758) in birds nests / P. Buczynski, G. Tonczyk, A. Jablonska // Hirudinea: biology, taxonomy, faunistics: 4th intern. Conf., Poland, Wierzba. – 2011. – P. 11-12.

Budzinski A. Z. Interaction of hementin with fibrinogen and fibrin // Fibrinolysis. – 1991. – Vol. 2. – P. 149-152.

Burk R. F. Selenoprotein metabolism and function: Evidence for more than one function for selenoprotein P / R. F. Burk, K. E. Hill, A. K. Motley // J. Nutr. – 2003. – Vol. 133. – № 5. – Supple.1. – P. 1517-1520.

Cadmium in Ferstilizers. Risk to Human Health and Enviroment. – Stockgolm: Publ. Swed. Ministry of Agriculture and Forestry, 1997. – 168 p.

Cairo G. Iron regulatory proteins in pathobiology / G. Cairo, A. Pietrangelo // Biochem. J. – 2000. – Vol. 352. – № 2. – P. 241-250.

Campbell P. G. C. Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model // Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic System / Ed. A. Tessier, D.R. turner. – Chichester: Wiley, 1995. – P. 45-102.

Ceylan M. Reproduction efficiency of the Hors leech, *Haemopis sanguisuga* (Linnaeus, 1758) / M. Ceylan, R. Küçükkara, U. Akçimen, O. Yener // Invertebrate Reproduction and Development. – 2017. – № 61 (3). – P. 182-188.

CITES. Convention on the International Trade in Endangered Species of the Wild Fauna and Flora. Appendices I, II and III valid from 4 April 2017. – URL: <https://cites.org/eng/app/applications.php>.

Chapman Peter M. Utility and relevance of aquatic oligochaetes in Ecological Risk Assessment // Hydrobiologia. – 2001. – Vol. 463. – P. 149-169.

Chernaya L. V. Macro- and microelements in tissues of the medical leech (*Hirudo verbana* Carena), grown at a biofarm in the starvation dynamics // Микроэлементы в медицине. – 2010. – Т. 11. – Вып. 2. – С. 6.

Chernaya L. V. Peculiarities of microelement metabolism in the medical leech (*Hirudo medicinalis* L.) tissues from natural populations / L. V. Chernaya, L. A. Kovalchuk, E. S. Nokhrina // Микроэлементы в медицине. – 2010. – Т. 11. – Вып. 2. – С. 6.

Chernaya L. V. Investigation of trace elements in the salivary gland secret and in the tissues of the medical leech (*Hirudo verbana* Carena) / L. V. Chernaya, L. A. Kovalchuk // Fifth International Congress of the Federation of the European Societies for Trace Elements and Minerals. FESTEM – Avignon. – 2013. – P. 208.

Chernaya L. V. Seasonal variability of free amino acids in tissues of the medicinal leech (*Hirudo verbana* Carena 1820) / L. V. Chernaya, L. A. Koval'chuk, E. S. Nokhrina // Russian Journal of Ecology. – 2015. – T. 46. – № 4. – C. 385-387.

Chernaya L. V. Role of the tissue free amino acids in adaptation of medicinal leeches *Hirudo medicinalis* L., 1758 to extreme climatic conditions / L. V. Chernaya, L. A. Kovalchuk, E. S. Nokhrina // Doklady Biological Sciences. – 2016. – Vol. 466. – P. 42-44.

Chernaya L. V. Seasonal bioaccumulation of heavy metals by medicinal leech *Hirudo verbana* / L. V. Chernaya, L. A. Kovalchuk, N. V. Mikhnevich // Hydrobiological Journal. – 2018. – Vol. 54 (5). – P. 56-62.

Chessel D. The ada 4 package-I: One-table methods / D. Chessel, A. B. Dufour, J. Thioulouse // R News. – № 4. – P. 5-10.

Clason B. Bioaccumulation of trace metal in the Antarctic amphipod *Paramoera walkeri* (Stebbing, 1906): comparison of two-compartment and hyperbolic toxicokinetic models / B. Clason, S. Duquesne, M. Liess, R. Schulz, G.-P. Zauke // Aquat. Toxicol. – 2003. – Vol. 65. – № 2117. – C. 140.

Conte Cinier C. Cadmium Bioaccumulation in Carp (*Cyprinus carpio*) tissues during long-term exposure: Analysis by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry / C. Conte Cinier, M. Petit-Ramel, R. Faure, D. Garin // Toxicol. And Environ. Saf. – 1997. – V. 38. – P. 137-143.

Cousins R. J. Regulatory aspects of zinc metabolism in liver and metabolism in liver and intestine // Nutr. Rev. – 1979. – Vol. 37. – № 4. – P. 97-103.

Crisp K. M. Distribution and development of dopamine- and octopamine-synthesizing neurons in the medicinal leech / K. M. Crisp, K. A. Klukas, L. S. Gilchrist // Comp. Neurol. – 2002. – № 1. – P. 115-129.

Cullota V. C. Disorders of copper transport / V. C. Cullota, J. D. Gitlin // The Molecular and Metabolic Basis of Inherited Disease / Ed. A. L. Scriver et al. – Wash.: McGraw-Hill, 1999. – P. 210-221.

Dath H. Beitrag zum Vorkommen von *Hirudo medicinalis* in Mitteleuropa // Zool. Anz. – 1934. – Vol. 106. – S. 94.

Davies R. W. The effects of feeding regime on the growth and reproduction of the medicinal leech, *Hirudo medicinalis* / R. W. Davies, N. J. McLoughlin // Freshwater Biology. – 1996. – Vol. 36. – P. 563-568.

Demirsoy A. Phenology of the medicinal leech, *Hirudo medicinalis* L., in north-western Turkey / A. Demirsoy, M. Kasperek, A. Akbulut, Y. Durmus, M. E. Akbuluk, M. Calskan / Hydrobiologia. – 2001. – V. 462. – P. 19-24.

Dobrowolski K. A. Pasozyty pijawek jeziora Druzno // Acta Parasitolog. Polon. – 1958. – Vol. 6. – P. 11-13.

Dykes I. M. Molecular basis of gap functional communication in the CNS of the leech *Hirudo medicinalis* / I. M. Dykes, F. M. Freeman, J. P. Bacon, J. A. Davis // Neurol. – 2004. – № 1 – P. 886-894.

Eichhorn G. L. Intra metal ions and genetic regulation // Metabolism of trace metal in man / ed. O. M. Rennert., W. Y. Chan. – Boca Raton, 1984. – P. 1-6.

Elliott J. M. A Key to the British Freshwater Leeches with Notes on their Life Cycles and Ecology / J. M. Elliott, K. H. Mann // Freshwater Biological Association, scientific Publication. – 1979. – № 40. – P. 72.

Elliott J. M. The status of the medicinal leech *Hirudo medicinalis* in Europe and especially in the British Isles / J. M. Elliott, P. A. Tullett // Biological Conservation. – 1984. – V. 29. – P. 15-26.

Elliott J. M. The effects of temperature, atmospheric pressure and season on the swimming activity of the medicinal leech, *Hirudo medicinalis* (Hirudinea; Hirudinidae), in Lake District tarn / J. M. Elliott, P. A. Tullett // Freshwater Biology. – 1986. – V. 16. – P. 405-415.

Elliott J. M. Population size, weight distribution and food in a persistent population of the rare medicinal leech, *Hirudo medicinalis* // Freshwater Biology. – 2008. – V. 53. – P. 1502-1512.

Elliot J. M. Medicinal leeches: historal use, ecology, genetics and conservation / J. M. Elliot, U. Kutschera // Freshwater Reviews. – 2011. – V. 4. – P. 21-41.

Elumalai M. Effects of single metals and their mixtures on selected enzymes of *Carcinus maenas* / M. Elumalai, C. Antunes, L. Guilhermino // Water, Air, and Soil Pollut. – 2002. – Vol. 141. – № 1/4. – C. 273-280.

Erseus C. Clitellate diversity in nationalstadsparken, an urban park in Stockholm, Sweden / C. Erseus, R. Grimm, B. Healy, S. Lundberg, E. Rota, T. Timm // Hydrobiologia. – 1999. – Vol. 406. – P. 101-110.

Febe E. Metabolic changes in the medical leech *Hirudo medicinalis* following feeding / E. Febe, F.-J. Roters, B. Koeiping // Comp. Biochem. and Physiol. A. – 1986. – Vol. 84. – № 1. – S. 49-55.

Frazier John M. Cadmium-binding proteins in the mussel, *Mytilus edulis* // Environ. Health Perspect. – 1986. – Vol. 65. – P. 39-43.

Gagiu A. The first recorded occurrence of *Hirudo verbana* Carena, 1820 (Hirudinea: Arhynchobdellida: Hirudinidae) in Romania // Travaux du Museum National d'Histoire Naturelle "Grigore Antipa". – 2010. – V. LIII. – P. 7-11.

Gama-Flores J. L. Effect of pulsed exposure to heavy metals (copper and cadmium) on some population variables of *Brachionus calyciflorus* Pallas (Rotifera: Brachionidae: Monogononta) / J. L. Gama-Flores, M. E. Castellanos-Paez, S. S. S. Sarma, S. Nandini // Hydrobiologia. – 2007. – Vol. 593. – P. 201-208.

Gerry S. P. Serotonin modulates muscle function in the medicinal leech *Hirudo verbana* / S. P. Gerry, D. J. Ellerby // Biology Letters. – 2011. – Vol. 4. – P. 25-28.

Goyer R. A. Biology and nutrition of essential elements // Risk assessments of essential elements / R. A. Goyer, W. Mertz, C. O. Abernathy, S. S. Olin / Washington: DC.: Int. Life Sci. Inst. – 1997. – P. 13-19.

Graf J. The effect of the symbionts on the physiology of *Hirudo medicinalis*, the medicinal leech // Invert. Reprod. Dev. – 2002. – Vol. 41. – P. 269-275.

Grosser C. Rote List der Egel (Hirudinidae) des Landes Sachen-Anhalt // Berichte des Landesamtes für Umweltschutz Sachen-Anhalt. – 2004. – V. 39. – S. 161-164.

Gunn A. M. The effect of heavy metal speciation in sediment on bioavailability to tubificid worms / A. M. Gunn, D. T. E. Hunt, D. A. Winnard // Hydrobiologia. – 1989. – Vol. 188-189. – P. 487-496.

Halatcheva L. The effect of heavy metals (Lead, Manganese, Mercury) on the concentration of free amino acid in the liver of rats / L. Halatcheva, P. Nikolova // Arch. Toxicol. – 1980. – Suppl. 4 – P. 355-357.

Hambidge K. M. Zinc / K. M. Hambidge, C. E. Casey, N. F. Krebs // Trace Elements in Human and Animals Nutrition, 5th / ed. W. Mertz. – New York: Academic Press, 1986. – Vol. 2. – P. 1-137.

Han J. Bioavailability of zinc in the sediment to the estuarine amphipod *Grandidierella japonica* / J. Han, D. Ma, X. Quan, J. Wang, Q. Yan // Hydrobiologia. – 2005. – Vol. 541. – P. 149-154.

Heath A. G. Water pollution and fish physiology. – L.: Lewis Publ., 2002. – 506 p.

Hecht G. Beiträge zur Verbreitung von *Hirudo medicinalis* in Deutschland // Zool. Anz. – 1929. – Vol. 85. – S. 105-110.

Herter K. Hirudineen // Egel. Biologie der Tiere Deutschland. – 1932. – Vol. 35. – Bd. 12. – S. 1-158.

Herter K. Die Physiologie der Hirudineen // Bronn Klassen und Ordnungen des Tierreichs. – Leipzig, 1936. – Bd. 4. – Abt. 4. – Teil 2. – S. 123-319.

Herter K. Die Ökologie der Hirudineen // Bronn Klassen und Ordnungen des Tierreichs. – 1937. – Teil 2. – S. 321-496.

Herter K. Der medicinische Blutegel und seine Verwandten. A. Zeinsen Verlag. – Wittenberg; Lutherstadt, 1968. – 199 s.

Hesse E. Über einige faunistische Vorkommen aus dem Leipziger Gebiet // Zool. Anz. – 1920. – Vol. 51. – S. 258.

Hoffman J. Notules Hirudinologiques // Archives de la Section des Sciences Naturelle, Physiques et Mathematiques de Institut Grand-Ducal de Luxemburg. – 1960. – V. 27. – P. 285-291.

Indergand S. Ingested blood contributes to the specificity of the symbiosis of *Aeromonas veronii* biovar sobria and *Hirudo medicinalis*, the medicinal leech / S. Indergand, J. Graf // Appl. and Environ. Microbiol. – 2000. – Vol. 66. – № 11. – P. 4735-4741.

Juhasz P. Faunistical data to Hungarian Hirudinea fauna carried out on nationwide surveys in 2006 and 2007 / P. Juhasz, B. Kiss, Z. Müller, R. Csipkes // Folia Historico Naturalia Mussei Matraensis. – 2008. – V. 32. – P. 69-75.

Kaiser F. Beiträge zur Bewegungphysiologie der Hirudineen // Zoologisch Jahrbücher – 1954. – V. 65. – S. 59-90.

Kasperek M. Distribution and status of medicinal leech (*Hirudo medicinalis* L.) in Turkey / M. Kasperek, A. Demirsoy, A. Akbulut, M.E. Akbuluk, M. Calskan, Y. Durmus // Hydrobiologia. – 2000. – V. 441. – P. 37-44.

Kasschau M. R. Accumulation of glutamate in sea anemones exposed to heavy metals and organic amines / M. R. Kasschau, M. M. Skaggs, Edward C. M. Chen // Bull. Environ. Contam. And Toxicol. – 1980. – Vol. 25. – № 6. – P. 873-878.

Kaygorodova I. A revised checklist of the Lake Baikal Hirudinida fauna // Lauterbornia. – 2012. – Heft 75. – P. 49-62.

Kazlauskine N. Behavioral responses of medicinal leech and rainbow trout exposed to crude oil and heavy fuel oil in ontogenesis / N. Kazlauskine, G. Svecevicius, L. Petrauskiene, M. Z. Vosyliene // Polish J. of Environmental Studies. – 2010. – Vol. 19. – Iss. 2. – P. 429-433.

Klemm D. L. Leeches (*Annelida: hirudinea* of North America) – Washington: Gov. print. off., 1982. – 350 p.

Kostial K. Cadmium // Trace elements in human and animal nutrition. 5th / Ed W. Mertz. – Acad Press NY, 1986. – № 2. – P. 319-345.

Kovalchuk L. A. Accumulation of heavy metals by small mammals the background and polluted territories of the Urals / L. A. Kovalchuk, N. V. Mikshevich, L. V. Chernaya // Vestnik zoologii. – 2017. – T. 51 (4). – P. 325-334.

Kovalenko M. Size structures and comparative phenology of syntopic populations of *Hirudo verbana* and *H. medicinalis* in eastern Ukraine / M. Kovalenko, S. Utevsky // Hirudinea: biology, taxonomy, faunistics. 4th intern. Conf. – Poland, Wierzba, 2011. – P. 15-16.

Kutschera U. Cannibalism in a population of the medicinal leech (*Hirudo medicinalis* L.) / U. Kutschera, M. Roth // Biology Bulletin. – 2005. – Vol. 32. – P. 626-628.

Kutschera U. Leeches underline the need for Linnaean taxonomy // Nature. – 2007. – Vol. 447. – P. 775.

Kutschera U. Feeding on Bufoid Toads and Occurrence of Hyperparasitism in a Population of the Medicinal Leech (*Hirudo verbana* Carena 1820) / U. Kutschera, M. Roth, J. P. Ewert // Research Journal of Fisheries and Hydrobiology. – 2010. – Vol. 5 (1). – P. 9-13.

Laufer A. S. Characterization of the digestive-tract microbiota of *Hirudo orientalis*, a European medicinal leech / A. S. Laufer, M. E. Siddall, J. Graf // Applied and Environmental Microbiology. – 2008. – № 74. – P. 6151-6154.

Laurila A. Predator-induced plasticity in early life history and morphology in two anuran amphibians / A. Laurila, S. Pakkasama, P-A. Crochet, J. Merila // Oecologia. – 2002. – Vol. 132. – P. 524-530.

Lent Charles M. On the termination of ingestive behaviour by the medicinal leech / Charles M. Lent, Michael H. Dickinson // J. Exp. Biol. – 1987. – Vol. 131. – P. 1-15.

Lent Charles M. The neurobiology of feeding in leeches / Charles M. Lent, Michael H. Dickinson // Scientific American. – 1988. – Vol. 258. – P. 78-83.

Lewis T. E. Uptake of sediment-bound lead and Zinc by the freshwater Isopod *Asellus communis* at three Different pH levels / T. E. Lewis, A. W. Mc Intosh // Arch. Environ. Contam. and Toxicol. – 1986. – Vol. 15. – № 5. – P. 495-504.

Lithner G. Bioconcentration factors for metals in humic waters at different pH in the Ronnskar area (N, Sweden) / G. Lithner, K. Holm, H. Borg // Water, Air and Soil Pollut. – 1995. – Vol. 85. – P. 785-790.

Loeb L. A. Metals and genetic miscoding / L. A. Loeb, R. A. Zakour // Nucleic acid – metal ion interactions / ed. T. G. Spiro. – New York, 1980. – P. 145-178.

Maksimova T. V. Elementome of *Hirudo medicinalis* / T. V. Maksimova, A. A. Mokrousov, T. V. Pletneva, T. F. Kosyрева, V. V. Safroshkina, I. S. Lisanova, A. V. Syroeshkin // Микроэлементы в медицине. – 2010. – Т. 11. – № 2. – С. 79.

Mann K. H. Leeches (*Hirudinea*), their structure, physiology, ecology and embryology. – Oxford, 1962. – Т. 10. – 201 p.

Markward F. Pharmacology of Hirudin: one hundred years after the first report of the anticoagulant agent in medicinal leeches // Biomedica Biochimica Acta. – 1985. – Vol. 44. – P. 1007-1013.

Matteucci G. Recent evolution of sedimentary heavy metals in a coastal lagoon contaminated by industrial wastewaters (Pialassa Baiona, Ravenna, Italy) / G. Matteucci, P. Rossini, S. Guerzoni, A. Arcangeli, P. Fonti, L. Langone, S. Miserocchi // Hydrobiologia. – 2005. – Vol. 550. – P. 167-173.

McGeer J. C. Effects of chronic sublethal exposure to water-borne Cu, Cd, or Zn in rainbow trout 2: Tissue specific metal accumulation / J. C. McGeer, C. Szebedinszky, D. G. McDonald, C. M. Wood // Aquat. Toxicol. – 2000. – Vol. 50. – P. 245-256.

Merilä J. Medicinal leeches (*Hirudo medicinalis*) attacking and killing adult amphibians / J. Merilä, M. Sterner // Annales Zoologici Fennici. – 2002. – V. 39. – P. 343-349.

Mertz W. Metabolism and metabolic effect of trace elements. Trace elements in Nutrition of Children / Ed by R. K. Chandra. – New York: Vevery Raven Press, 1985. – P. 107-117.

Michalsen A. Blutegeltherapie / A. Michalsen, M. Roth. – Karl F. Haug Verlag, Stuttgart, 2006. – 145 p.

Momcilovic B. The epistemology of trace elements balance and interaction // TEMA-6. Pacific Grove, California. – 1987. – P. 173-176.

Monahan C. The effect of weed control practices on macroinvertebrate communities in Irish Canal / C. Monahan, J. M. Caffrey // Hydrobiologia. – 1996. – Vol. 340. – P. 205-211.

Moore J. P. Leeches (Hirudinea) from China with descriptions of new species // Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia. – 1930. – V. 82. – P. 169-192.

Moquin-Tandon A. Monographie de la famille des Hirudinees. – Paris, 1846. – 448 p.

Musibono D. E. The effect of Mn on mortality and growth in the freshwater amphipod *Paramelita nigroculus* (Barnard) exposed to a mixture of Al and Cu in acidic waters / D. E. Musibono, J. A. Day // Toxicology. – 1995. – Vol. 33. – № 1. – P. 207-213.

- Nesemann H. Annelida, Clitellata: Branchiobdellida, Acanthobdellea, Hirudinea / H. Nesemann, E. Neubert. – Heidelberg: Spectrum Akademischer Verlag, 1999. – 178 p.
- Nielsen F. H. Nickel // Trace Elements in Human and Animal Nutrition, 5th / ed. W. Mertz. – New York: Academic Press. – 1988. – Vol. 1. – P. 245-273.
- Oberleas D. Mechanism of Zinc Homeostasis // J. Inorg. Biochem. – 1996. – Vol. 62 – P. 231-241.
- Oka A. Vertrockung und Wiederbelebung bei einer Süsswasser-Hirudineen // Zool. Anz. – 1935. – Bd. 54. – S. 92-94.
- Padovan A. Trace metal concentrations in the tropical sponge *Spheciospongia vagabunda* at a sewage outfall: synchrotron X-ray imaging reveals the micron-scale distribution of accumulated metals / A. Padovan, N. Munksgaard, B. Alvarez, K. McGuinness, D. Parry, K. Gibb // Hydrobiologia. – 2012. – Vol. 687. – P. 275-288.
- Pan Lu-qing. Влияние тяжелых металлов на активность антиокислительных ферментов в гепатопанкреасе и жабрах краба *Eriocheir sinensis* / Lu-qing Pan, Jia-Yun Ren, Zhong-wang Wu // J. Ocean Univ. China. – 2004. – Vol. 34. – № 2. – C. 189-194.
- Paspaleff G. Durch rickettsiehahnliche Mikroorganismen hervorgerufene entzündlich-nekrotische Veränderungen in Seefrosch (*Rana ridibunda* Pall.) / G. Paspaleff, V. Dokov, E. Tchacarof, D. Boschkow, T. Todorov // Докл. Болг. АН. – 1961. – Т. 14. – № 3. – С. 317-320.
- Paspaleff G. *Batracobdella algira* (Moquin-Tandon), 1846 (*Hirudinea, Glos-siphoniidae*) Übertragen einer Infektions Erkrankung an Froschen in Bulgarien / G. Paspaleff, V. Dokov, E. Tchacarof, D. Boschkow // Biologia. – 1963. – Bd. 18. – № 10. – S. 781-786.
- Pawlowski L. K. Pijawki (*Hirudinea*). – Warszawa, 1936. – 176 c. – (Fauna slodkowodna Polski).
- Pawlowski L. K. Zur Okologie der Hirudineenfauna der Wigryseen // Arch. Hydrobiol. Ryb., Suwalki. – 1936a. – Bd. 10. – S. 1-47.

Peca M. M. A delicate balance: Homeostatic control of copper uptake and distribution / M. M. O. Peca, J. L. Lee, D. J. Thiele // J. Nutr. – 1999. – Vol. 129. – P. 1251-1260.

Pecon J. Effect of amino acid histidine on the uptake of cadmium from the digestive system of blue crab *Callinectes sapidus* / J. Pecon, E. N. Powell // Bull. Environ. Contam. And Toxicol. – 1981. – Vol. 27. – № 1. – P. 34-41.

Petersen A. M. Leeches run cold, then not / A. M. Petersen, W. Chin, K. L. Feilich, G. Jung, J.L. Quist, J. Wang, D. J. Ellerby // Biology letters. – 2011. – V. 4. – P. 3-7.

Petrauskienė L. Water and sediment toxicity assessment by use of behavioral responses of medicinal leeches // Environ. Int. – 2003. – Vol. 28. – № 8. – C. 729-736.

Petrauskienė L. Reproductive biology and ecological strategies of three species of medicinal leeches (genus Hirudo) / L. Petrauskienė, O. Utevska, S. Utevsky // J. of Natural History. – 2011. – V. 45. – Issue 11-12. – P. 737-747.

Pletneva T. V. Elemental analysis of the medicinal leech / T. V. Pletneva, T. V. Maksimova, M. A. Tambovtseva, A. V. Syroeshkin, A. A. Mokrousov, I. S. Lisanova // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2011. – T. 44. – № 11. – P. 632-634.

Prasad A. S. Clinical, biochemical and pharmacological role of zinc // Annu. Rew. Pharm. Toxicol. – 1979. – Vol. 19. – P. 241-269.

Remy P. Sangsues de Yugoslavie // Bull.Soc. Zool. France. – 1937. – Vol. 62. – P. 140-148.

Reshetnikov A. N. The introduced fish, rotan (*Percottus glenii*), depresses populations of aquatic animals (macroinvertebrates, amphibians, and a fish) // Hydrobiologia. – 2001. – T. 510. – P. 83-90.

Reynoldson T. B. A comparison of reproduction, growth and acute toxicity in two populations of *Tubifex tubifex* (Müller, 1774) from the North American Great Lakes and Northern Spain / T. B. Reynoldson, P. Rodriguez, M. M. Madrid // Hydrobiologia. – 1996. – Vol. 334. – P. 199-206.

Rodriguez M. J. Modulation of mechanosensory responses by motoneurons that regulate skin surface topology in the leech / M. J. Rodriguez, I. R. Iscla, L. Szczupak // J. Neurophysiol. – 2004. – № 5. – P. 2366-2375.

Roth M. Biologie der Blutegel und ihre therapeutische Wirksamkeit // Erfahrungsheilkunde. – 2002. – T. 9. – S. 615-623.

Rutt G. P. The macrozoobenth communities of acidic streams / G. P. Rutt, N. S. Wetherley, S. J. Osmerod // Freshwater Biol. – 1990. – Vol. 24. – № 3. – P. 463-480.

Saglam N. Freshwater leech species from some wetland of Turkey / N. Saglam, M. Dorucu, M. Sarieyyugoglu, G. Keser // Hirudinea: biology, taxonomy, faunistics: 4th intern. Conf. – Poland, Wierzba, 2011. – P. 20.

Saglam N. A new species of *Hirudo* (Annelida: Hirudinidae): historical biogeography of Eurasian medicinal leeches / N. Saglam, R. Saunders, S. A. Lang, D. H. Shain // BMC Zoology. – 2016. – Vol. 1 (1). – P. 1-12.

Sandner H. Badania nad fauna pijawek // Acta zool. et oecol. Univ. Iodzoeensis. – 1951. – Vol. 4. – S. 5-50.

Satarug S. Cadmium levels in the lung, liver, kidney cortex and urine sample from Australia without occupational exposure to metal / S. Satarug, J. R. Baker, P. Reilli // Arch. Environ. Health. – 2002. – V. 57. – P. 69-77.

Schrauser G. N. The discovery of the essential trace elements: An outline of the history of biological trace elements research // Biochemistry of the ultratrace elements / ed. E. Freiden. – New York; London: Plenum Press, 1994. – P. 17-32.

Schröder H. C. Stress response in Baikalian sponges exposed to pollutants / H. C. Schröder, S. M. Efremova, B. A. Margulis, I. V. Guzhova, V. B. Itsikovich, W. E. G. Müller // Hydrobiologia. – 2006. – Vol. 568. – P. 277-287.

Servisi I. A. Effects of selected heavy metals on early life of sockeye and pink salmon / I. A. Servisi, D. W. Marteau. – Progress Report, Intern. Pacific Salmon Fisheries Commission. New Westmuler, B. C. – Geneva, 1978. – 20 p.

Shikov E. V. *Haemopis sanguisuga* (Linnaeus, 1758) (Hirudinea) – the first observation of a leech predation on terrestrial gastropods // Folia Malacologica. – 2011. – V. 19 (2). – P. 103-106.

Siddall Mark E. Diverse molecular data demonstrate that commercially available medicinal leeches are not *Hirudo medicinalis* / Mark E. Siddall, Peter Trontelj, Serge Y. Utevsky, Mary Nkamany, Kenneth S Macdonald. // Proc. R. Soc. B. – 2007. – № 274. – P. 1481-1487.

Sket B. Global diversity of leeches (Hirudinea) in freshwater / B. Sket, P. Trontelj // Hydrobiologia. – 2008. – V. 595. – P. 129-137.

Smith S. Concentration and distribution of copper and cadmium in water, sediments, detritus, plants and animals in a hardwater lowland river / S. Smith, M.-H. Chen, R. G. Bailey, W. P. Williams // Hydrobiologia. – 1996. – Vol. 341. – Is. 1. – P. 71-80.

Spry D. J. Metal Bioavailability and toxicity to fish in low-alkalinity lakes: A critical review / D. J. Spry, J. G. Wiener // Environ. Pollut. 1991. – Vol. 71. – P. 243-304.

Strakosova J. The medicinal leech (*Hirudo medicinalis*) – its distribution in Central Europe and searching for causes of its status as critically endangered species in the Czech Republic / J. Strakosova, J. Schenkova // Hirudinea: biology, taxonomy, faunistics. 4th intern. Conf. – Poland, Wierzba, 2011. – P. 21-22.

Stumm W. Aquatic chemistry / W. Stumm, J. J. Morgan. – New York: Wiley&Sons, 1996. – 1022 p.

Tabata R. Studies on the toxicity of heavy metals to aquatic animals and the factors to decrease the toxicity the antagonistic action of hardness components in water on the toxicity of heavy metals ions // Bull. Tokai Regional Fish. Res. laborat. – 1969. – № 58. – P. 215-232.

Thouvenin B. Modeling Pb and Cd dynamics in the Seine estuary / B. Thouvenin, J. L. Gonzalez, J. F. Chiffolleau, B. Boutier, P. Le Hir // Hydrobiologia. – 2007. – Vol. 588. – P. 109-124.

Trontelj P. Genetic differentiation between two species of the medicinal leech, *Hirudo medicinalis* and the neglected *H. verbana*, based on random-amplified polymorphic DNA / P. Trontelj, M. Sotler, R. Verovnik // Parasitol Res. – 2004. – Vol. 94. – P. 118-124.

Trontelj P. Celebrity with a neglected taxonomy: molecular systematics of the medicinal leech (genus *Hirudo*) / P. Trontelj, S. U. Utevsky // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2005. – V. 34. – P. 616-624.

Trueta C. Somatic exocytosis of serotonin mediated by 1 – type calcium channels in cultured leech neurons / C. Trueta, B. Mendez, F. F. De Miguel // J. Physiol. – 2003. – Vol. 547. – P. 405-416.

Underwood E. J. Trace Elements in Human and Animal Nutrition: 3-rd Edition. – New York; London: Academic Press, 1977. – 312 p.

Utevsky S. U. A new species of the medicinal leech (Oligohaeta, Hirudinida, *Hirudo*) from Transcaucasia and identification key for the genus *Hirudo* / S. U. Utevsky, P. Trontelj // Parasitology Research. – 2005. – V. 98. – P. 61-66.

Utevsky S. Y. New information on the distribution of the medicinal leech (genus *Hirudo*) in the Iberian Peninsula, the Caucasus and Central Asia / S. Y. Utevsky, A. I. Zinenko, A. A. Atemasov, M. A. Huseynov, O. M. Utevska and A. Y. Utevsky // Lauterbornia. – 2008. – H. 65. – P. 119-130.

Utevsky S. Chromosome numbers for three species of medicinal leeches (*Hirudo* spp.) / S. Utevsky, N. Kovalenko, K. Doroshenko, L. Petrauskienė, V. Klymenko // Syst Parasitol. – 2009. – № 74. – P. 95-102.

Utevsky S. Distribution and status of medicinal leeches (genus *Hirudo*) in the Western Palaearctic: anthropogenic, ecological, or historical effects? / S. Utevsky et al. // Aquatic Conserv.: Mar. Freshw. Ecosyst. – 2010. – V. 20. – P. 198-210.

Utevsky S. *Hirudo medicinalis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2014 / S. Utevsky, M. Zagmajster, P. Trontelj // e.T10190A21415816. URL: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2014-1.RLTS.T10190A21415816.en>.

Van Campenhout K. Metallothionein concentrations in natural populations of gudgeon (*Gobio gobio*): relationship with metal concentrations in tissues and environment / K. Van Campenhout, L. Bervoets, R. Blust // Environ. Toxicol. and Chem. – 2003. – Vol. 22. – № 7. – C. 1548-1555.

Vitturi R. Chromosome analysis and FISH mapping of ribosomal DNA (rDNA). Telomeric (TTAGGG)_n and (GATA)_n repeats in the leech *Haemopis sanguisuga* (L.)

(Annelida: Hirudinea) / R. Vitturi, A. Libertini, F. Armetta, L. Sparacino, M. S. Colombo // Genetica. – 2002. – V. 115. – P. 189-194.

Wagoner D. J. The Role of copper in neurodegenerative disease / D. J. Wagoner, T. B. Bartnikas, J. D. Gitlin // Neurobiol. Disease. – 1999. – V. 6. – P. 221-230.

Walsch C. T. Nickel enzymes / C. T. Walsch, W. H. Orme-Johnson // Biochem. – 1987. – Vol. 26. – № 16 – P. 4901-4906.

Warwick T. The vice-county distribution of the Scottish freshwater leeches and notes of the ecology of *Trocheta bykowsky* and *Hirudo medicinalis* in Scotland // Glasgow Naturalist. – 1961. – V. 18. – № 3. – P.130-135.

Wei Wei. Влияние Cu²⁺ и Ca²⁺ на три фермента в печени устрицы / Wei Wei, Kewu Liu, Xinpeng Zhao // Chin. J. Appl. and Environ. Biol. – 2004. – Vol. 10. – № 2. – C. 170-173.

Wendrowsky V. Über die Chromosomenkomplexe der Hirudineen // Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie. – 1928. – V. 8. – S. 153-175.

Westendorff M. Occurrence of leeches (Hirudinea) in different types of water bodies in northeast Germany (Brandenburg) / M. Westendorff, T. Kalletka, U. Jueg // Lauterbornia. – 2008. – H. 65. – S. 153-162.

Whitaker I. S. Historal Article: *Hirudo medicinalis*: ancient origins of an trends in the use of medicinal leeches throughout histoty / I. S. Whitaker, J. Rao, D. Izadi, P. E. Bulter // British J. of Oral and Maxillofacial Surgery. – 2004. – Vol. 42. – P. 133-137.

Wiesner L. Temporal and spatial variability in the heavy-metal content of Dreissenida polymorpha (Pallas) (Mollusca: Bivalvia) from the Kleines Haff (northeastern Germany) / L. Wiesner, B. Günther, C. Fenske // Hydrobiologia. – 2001. – Vol. 443. – P. 137-145.

Wilkin P. J. The medicinal leech, *Hirudo medicinalis* (Hirudinea: Gnatobdella), at Dungeness, Kent // Botanical journal of the Linnean Society. – 1989. – V. 101. – P. 45-57.

Wilkin P. J. The use of a serological technique to examine host selection in a natural population of the medicinal leech, *Hirudo medicinalis* / P. J. Wilkin, A. M. Scofield // Freshwater Biology. – 1990. – V. 23. – № 2. – P. 165-169.

Wilkin P. J. Growth of the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*, under natural and laboratory conditions / P. J. Wilkin, A. M. Scofield // Freshwater Biology. – 1991. – V. 25. – P. 547-553.

Williams R. The distribution of freshwater leeches in the Glasgow region, with notes on their ecology // Glasgow Naturalist. – 1961. – V. 18. – № 3. – P. 136-146.

Wisniewski W. L. Characterization of the parasitofauna of an eutrophic lake // Acta Parasitol. Pol. – 1958. – Vol. 6. – P. 1-64.

Wright D. A. Cadmium and calcium interactions in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* // Freshwater Biol. – 1980. – Vol. 10. – P. 123-133.

Yap C. K. Accumulation, depuration and distribution of cadmium and zinc in the green-lipped mussel *Perna viridis* (Linnaeus) under laboratory conditions / C. K. Yap, A. Ismail, S. G. Tan, H. Omar // Hydrobiologia. – 2003. – Vol. 498. – P. 151-160.

Zick K. Zur Frage der Verbreitung des Medizinischen Blutegels (*Hirudo medicinalis*) in Deutschland // Zool. Anz. – 1931. – Vol. 96. – S. 328-330.

Научное издание

**Эссенциальные и токсичные металлы тканей
медицинских пиявок
(ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ АСПЕКТ)**

Компьютерная верстка Адясовой О.А.

Подписано в печать 13.11.2019. Формат 60x84¹/16.
Бумага для множ. аппаратов. Печать на ризографе.

Гарнитура «Times New Roman».
Усл. печ. л. 18,6. Уч.-изд. л. 11,9.
Тираж 500. Заказ

