

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

**Свободные аминокислоты тканей  
медицинских пиявок  
(ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ АСПЕКТ)**



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

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

**Свободные аминокислоты тканей  
медицинских пиявок  
(ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ АСПЕКТ)**

**Коллективная монография**

Екатеринбург 2024

УДК 595.143.6+615.811.2+577.112.3

ББК Е691.444+Е072.511.11

Ч49

Рекомендовано Ученым советом федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Уральский государственный педагогический университет» в качестве *научного* издания (Решение № 54 от 09.12.2024)

**Рецензенты:**

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

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

Черная, Л. В.

Ч49 **Свободные аминокислоты тканей медицинских пиявок (Эколого-физиологический аспект)** : коллективная монография / Л. В. Черная, Л. А. Ковальчук, Н. В. Микшевич ; Институт экологии растений и животных УрО РАН ; Уральский государственный педагогический университет. – Екатеринбург : УрГПУ, 2024. – 360 с. – Текст : непосредственный.

ISBN 978-5-7186-2320-8

В монографии представлены результаты многолетних исследований авторов по эколого-физиологическим аспектам формирования аминокислотного спектра тканей медицинских пиявок из природных популяций и гирудокультуры биофабрик различных регионов России. Обсуждается роль свободных аминокислот в механизмах адаптации пиявок к воздействию стресс-факторов. Показано, что состояние аминокислотного спектра тканей пиявок служит маркером физиологического статуса и здоровья. Материалы работы послужили основой рекомендаций по оптимизации технологии разведения и рационального использования природных ресурсов медицинских пиявок.

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 (№ 122021000091-2) 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+615.811.2+577.112.3

ББК Е691.444+Е072.511.11

© Черная Л. В., Ковальчук Л. А., Микшевич Н. В., 2024

© Институт экологии растений и животных УрО РАН, 2024

© ФГАОУ ВО «УрГПУ», 2024

ISBN 978-5-7186-2320-8

# ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений .....	5
Введение.....	6
<b>Глава 1. Современное состояние проблемы .....</b>	<b>13</b>
1.1. Экологическая обусловленность аминокислотного обмена гидробионтов.....	13
1.2. Экологические и физиологические особенности челюстных пиявок .....	37
1.3. Технология выращивания медицинской пиявки .....	61
<b>Глава 2. Материалы и методы исследования.....</b>	<b>70</b>
2.1. Общая характеристика объектов исследования.....	70
2.2. Физико-географическая и экологическая характеристика регионов исследования .....	76
2.3. Методы исследования .....	91
2.3.1. Методика определения основного обмена .....	91
2.3.2. Анализ аминокислотного состава биосубстратов пиявок.....	92
2.3.3. Методика отбора секрета слюнных желез медицинских пиявок .....	94
2.3.4. Статистические методы обработки результатов .....	95
<b>Глава 3. Видовые, трофические и климатогеографические особенности</b> <b>аминокислотного состава тканей челюстных пиявок</b> <b>из природных популяций .....</b>	<b>97</b>
3.1. Видовая и трофическая специфика аминокислотного спектра тканей медицинских пиявок.....	98
3.2. Климатогеографические особенности аминокислотного фонда тканей кровососущих и хищных гирудинид .....	110
<b>Глава 4. Сезонная и возрастная изменчивость свободных аминокислот</b> <b>в тканях медицинских пиявок из природных популяций.....</b>	<b>146</b>
4.1. Сезонная динамика содержания свободных аминокислот в тканях медицинской пиявки <i>H. verbana</i> .....	146
4.2. Сезонная динамика содержания свободных аминокислот в тканях большой ложноконской пиявки <i>H. sanguisuga</i> .....	172
4.3. Возрастные особенности аминокислотного спектра тканей кровососущих и хищных пиявок .....	193
<b>Глава 5. Эколого-физиологические аспекты формирования аминокислотного фонда</b> <b>тканей и секрета слюнных желез медицинских пиявок в гирудокультуре .....</b>	<b>204</b>
5.1. Эколого-физиологические особенности энергетического обмена челюстных пиявок .....	206
5.2. Видовые и региональные особенности аминокислотного спектра тканей медицинских пиявок, выращенных в искусственно созданных условиях на биофабриках .....	209
5.3. Исследование аминокислотного фонда секрета слюнных желез медицинских пиявок <i>H. verbana</i> , выращенных на биофабрике .....	222
5.4. Сравнительный анализ содержания свободных аминокислот в тканях медицинских пиявок из природных популяций и гирудокультуры .....	226
5.5. Возрастная динамика свободных аминокислот в тканях медицинской пиявки <i>H. verbana</i> в условиях ускоренного роста и развития на биофабрике .....	239
<b>Глава 6. Влияние хронического голодания на формирование</b> <b>аминокислотного спектра тканей медицинских пиявок .....</b>	<b>265</b>
6.1. Содержание свободных аминокислот в тканях сытых и голодных особей <i>H. verbana</i> и <i>H. sanguisuga</i> из природных популяций.....	265
6.2. Влияние хронического голодания на аминокислотный состав тканей медицинской пиявки <i>H. verbana</i> из гирудокультуры.....	272

<b>Заключение .....</b>	<b>299</b>
<b>Практические рекомендации .....</b>	<b>306</b>
<b>Библиографический список.....</b>	<b>307</b>

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АК – аминокислота/аминокислоты  
АКРУЦ – аминокислоты с разветвленной углеводородной цепью  
АРАК – ароматические аминокислоты  
БАС – биологически активные соединения  
БЛП – большие ложноконские пиявки  
БФ – биофабрика  
ГК – гирудокультура  
ЗАК – заменимые аминокислоты  
ИЗ – индикатор зрелости  
ИФ – индекс Фишера  
МП – медицинские пиявки  
МТ – металлотioneины  
МЭ – макро- и микроэлементы  
НАК – незаменимые аминокислоты  
ПП – природные популяции  
ССАК – серосодержащие аминокислоты  
ССЖ – секрет слюнных желез  
ТМ – тяжелые металлы  
Ala – Alanine, аланин  
Arg – Arginine, аргинин  
Asp – Aspartic Acid, аспарагиновая кислота  
CA – Cysteic Acid, цистеиновая кислота  
Cit – Citrulline, цитруллин  
Cys – Cysteine, цистеин  
GABA – Гамма-аминомасляная кислота  
Gln – Glutamine, глутамин  
Glu – Glutamic Acid, глутаминовая кислота  
Gly – Glycine, глицин  
His – Histidine, гистидин  
Ile – Isoleucine, изолейцин  
Leu – Leucine, лейцин  
Lys – Lysine, лизин  
Met – Methionine, метионин  
Orn – Ornithine, орнитин  
РСА – анализ главных компонент  
РС – главная компонента  
Phe – Phenylalanine, фенилаланин  
Pro – Proline, пролин  
Ser – Serine, серин  
Tau – Taurine, таурин  
Thr – Threonine, треонин  
Trp – Tryptophan, триптофан  
Tyr – Tyrosine, тирозин  
Val – Valine, валин

## ВВЕДЕНИЕ

«Научная гипотеза всегда выходит за пределы фактов,  
послуживших основой для ее построения».

В.И. Вернадский

Важнейшая задача современного природопользования состоит в сохранении водных биологических ресурсов в условиях глобального антропогенного загрязнения гидросферы (Павловская, 2007; Моисеенко, 2009; Акимова и др., 2012; Морози и др., 2012; Пряхин и др., 2012; Большаков, Иванова, 2013; Литвиненко и др., 2013; Богданов и др., 2015; Комов и др., 2017; Микшевич, Ковальчук, 2014; 2018; Остроумов и др., 2018; Богатов и др., 2019; Голованова, Аминов, 2019; Трапезников и др., 2019). Для оперативной оценки экологической безопасности среды обитания и поддержания благоприятных условий развития гидробионтов необходимы надежные критерии физиологического состояния животных (Немова, Высоцкая, 2004; Пронина, 2012; Кожаева и др., 2015; Рудакова, 2016; Чуйко, 2017; Романова и др., 2019; Розенберг, 2020; Донец и др., 2020). Проблема особенно актуальна для редких и исчезающих видов, имеющих ресурсное значение, среди которых особое место занимают медицинские пиявки, широко используемые в медицине и ветеринарии. Являясь официальным лекарственным средством, медицинские пиявки входят в Перечень подконтрольных товаров, подлежащих сопровождению ветеринарными сопроводительными документами, и относятся к группе живые животные прочие (код 0106) (Приказ ..., 2015).

Представители двух видов медицинских пиявок *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758 и *H. verbana* Carena, 1820, обитающих на территории Евразии, в настоящее время внесены в Международную и региональные Красные книги (CITES, 2017; Красная книга..., 2007; Кустов, Шаповалов, 2012; Красная книга..., 2017). В природоохранных документах определены факторы, лимитирующие численность и распространенность медицинских пиявок – массовый вылов в коммерческих целях, загрязнение и уничтожение водоемов, снижение плотности популяции лягу-

шек, служащих источником питания для молодых пиявок, мелиоративные мероприятия, неблагоприятные условия на северной границе ареала. Основные меры охраны медицинских пиявок – выявление и сохранение биотопов, использование искусственного воспроизводства для восстановления природных популяций (Кустов и др., 2005; Красная книга..., 2017; Федорова, 2021).

Разведение медицинских пиявок в искусственно созданных условиях на биофабриках, как одна из мер, направленных на сохранение и восстановление природных популяций, практикуется в России еще с середины прошлого века (Синева, 1949; Щеголев, Федорова, 1955; Никонов, 1992; Кустов и др., 2014). Однако высокий спрос на медицинских пиявок как натурального средства оздоровления на данный момент опережает предложение официально действующих предприятий отрасли гирудокультуры. Сегодня природные ресурсы медицинских пиявок продолжают стремительно сокращаться, что обусловлено, наряду с массовым браконьерским промыслом, усиливающейся антропогенной нагрузкой на пресноводные экосистемы, приобретающей в последние десятилетия глобальный характер (Михайлов, 2006; Elliot, Kutschera, 2011; Saglam et al., 2016; Федорова, 2021). Известно, что медицинские пиявки весьма чувствительны к химическому загрязнению водной среды и являются биоиндикаторами загрязнения водоемов (Лукин, 1976; Романова, Климина, 2010; Романенко и др., 2010), в том числе и такими приоритетными поллютантами, как тяжелые металлы (Флеров, 1989; Каменев, 2007; Нохрина, 2010; Черная и др., 2019).

Очевидно, что стратегия рационального использования природных ресурсов медицинских пиявок должна иметь комплексный характер, включая экологический мониторинг не только среды их обитания, но и изучение адаптационно-компенсаторных механизмов, формирующихся в их организме при сочетанном влиянии абиотических и биотических факторов. Это важно и потому, что современная технология гирудокультуры требует регулярного изъятия половозрелых особей из природных популяций в качестве маток-производителей.

Эффективность функционирования отрасли гирудокультуры во многом обеспечивается реализацией биоресурсного потенциала адаптивных, продуктив-



ных и репродуктивных качеств медицинских пиявок и напрямую зависит от их эколого-физиологических особенностей, что естественным образом предполагает поиск надежных критериев состояния здоровья, как их отдельных особей, так и популяции в целом. В этом плане наиболее перспективными маркерами являются биохимические параметры, поскольку любому физиологическому, а тем более морфологическому отклонению от нормы предшествуют метаболические процессы, которые являются первопричиной изменения состояния организма, ухудшения качества его потомства или гибели.

Одним из информативных и адекватных биохимических показателей физиологического состояния животных и их адаптивных возможностей является уровень аминокислотного обмена и содержание отдельных свободных аминокислот в тканях (Maneiro, 2000; Brucet et al., 2005; Джабаров, 2006; Головина и др., 2016; Каранова, 2017; Parvathi, Karthegaa, 2017; Черная и др., 2020; Kovalchuk et al., 2021; Ковальчук и др., 2022). Свободные аминокислоты тканей используются в синтезе белка, нуклеиновых кислот, гормонов, углеводов, а также обладают иммуностимулирующими и антиоксидантными свойствами. Отдельные аминокислоты, либо самостоятельно, либо в составе глутатиона и металлотионеинов, являются природными детоксикантами (Павловская, Шестаков, 2004; Столяр и др., 2004; Van Campenhout et al., 2003; Данилов, 2010). Показано, что на уровень обеспеченности тканей свободными аминокислотами у различных видов гидробионтов оказывают существенное влияние климатические, сезонные и антропогенные факторы, степень трофической обеспеченности, энергетические потребности, а также ряд других онтогенетических, экологических и филогенетических особенностей организма (Джабаров, 2006; Каранова, 2006; Ковальчук и др., 2011; Черная и др., 2015; 2016; Rodrigues et al., 2021).

В мировой литературе представлен обширный фактический материал по зоогеографии, биологии, проблемам искусственного воспроизводства и лечебным свойствам медицинских пиявок, исследован широкий спектр биологически активных соединений слюнной жидкости и гомогенатов тканей, оказывающих благотворное влияние на организм человека и домашних животных (Рассади́на, Рома-

нова, 2008; Баскова и др., 2011; Зиненко и др., 2012; Кустов и др., 2014; Каменев, Каменев, 2014; Utevsky et al., 2014; Никишов и др., 2015; Никонов и др., 2015; Мортеза, 2016; Malek et al., 2019; Ceylan et al., 2019; Lemke, Vilcinskas, 2020; Аминов и др., 2020; Филатова, 2021; Крячко, Лукоянова, 2023; Димитров, 2023). Однако исследованиям аминокислотного обмена пиявок, как в нативных условиях, так и при экстремальных нагрузках, не уделено должного внимания. До настоящего времени проблема влияния природных и антропогенных факторов на обменные процессы экологически и физиологически контрастных групп медицинских пиявок систематически не исследовалась, они остаются специфическими и наименее изученными объектами аквакультуры в плане их способности к поддержанию гомеостаза и формированию адаптивных стратегий к стресс-факторам различного генеза. Следует учитывать, что видовая специфика обменных процессов, а также экологические особенности обитания могут существенно сказываться на физиологическом статусе этих ценных гидробионтов. С этих позиций эколого-физиологический подход к исследованию оптимального соотношения свободных аминокислот в тканях медицинских пиявок из природы и их потомства в гирудокультуре на разных этапах онтогенеза и при изменении экологических факторов среды позволят использовать его в качестве критерия физиологического состояния и здоровья особей, а также оценить адаптивный потенциал этих ценных гидробионтов. Новая информация об аминокислотном статусе особей *H. medicinalis* и *H. verbanana* различных эколого-физиологических групп позволит более эффективно использовать их биоресурсный потенциал, тем более что сегодня особую актуальность приобретает широкое применение гомогенатов тканей медицинских пиявок в гирудофармакологии и косметологии.

С учетом вышесказанного была определена цель наших исследований – изучение закономерностей формирования аминокислотного спектра тканей двух видов медицинских пиявок в условиях природных популяций и при искусственном воспроизводстве на биофабриках. Для получения достоверных данных о влиянии искусственно созданных условий разведения на аминокислотный обмен особей *H. medicinalis* и *H. verbanana*, используемых в практической медицине, необходимо

определение референтных концентраций незаменимых и заменимых аминокислот в их организме при выращивании в гирудокультуре биофабрик, расположенных на территории различных регионов России. В задачи наших исследований входило создание теоретической и практической базы для разработки рекомендаций по оптимизации искусственного воспроизводства и рационального использования природных ресурсов медицинских пиявок на основе комплексного анализа эколого-физиологической изменчивости аминокислотного состава их тканей.

Предлагаемая читателям монография является результатом обобщения многолетних материалов 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 аминокислотного состава тканей медицинских пиявок. Установлено влияние условий искусственного разведения на уровень содержания биологически активных свободных аминокислот в тканях пиявок *H. medicinalis* и *H. verbana*. Проведена сравнительная оценка уровней содержания свободных аминокислот в тканях и секрете слюнных желез особей *H. verbana* из природных популяций и гирудокультуры. Изучены закономерности формирования аминокислотного спектра тканей аптечных пиявок в условиях принудительного хронического голодания как одной из фаз существования организма. Установлена регуляторная роль свободных аминокислот в поддержании гомеостатических реакций челюстных пиявок при влиянии экстремальных природных и антропогенных факторов. Представлены результаты, подтверждающие возможность использования данных по экологической специфике аминокислотного спектра тканей при оценке физиологического состояния и благополучия медицинских пиявок в природе и в аквакультуре.

Авторы посчитали целесообразным уделить внимание эколого-физиологическим аспектам формирования аминокислотного состава тканей ближайшей родственницы медицинских пиявок – большой ложноконской пиявки *Haemopsis sanguisuga* (Linnaeus, 1758), которая ведет хищнический образ жизни, характеризуется более широким ареалом и достаточно высокой резистентностью к

экстремальным нагрузкам (Лукин, 1976; Флеров, 1989; Черная, Ковальчук, 2014). Кроме того, в естественных ландшафтах этот вид челюстных пиявок является фоновым для *H. medicinalis* и *H. verbana* в силу сходства их биологии развития. Считается, что большие ложноконские пиявки могут быть использованы в качестве биологического маркера присутствия в водных экосистемах медицинских пиявок (Зиненко и др., 2012). Наши многолетние исследования подтвердили принципиальную 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; 2019; 2021). Наш интерес к этому виду пиявки 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, результаты наших исследований по особенностям формирования аминокислотного состава тканей пиявок *H. sanguisuga* при влиянии абиотических и биотических факторов среды представляют интерес не только в научном плане, но и в качестве дополнительных критериев при мониторинге водных объектов в случае использования этого вида в качестве биоиндикатора.

На основании результатов комплексных эколого-физиологических исследований авторами сформулировано концептуальное положение о том, что состояние аминокислотного спектра тканей челюстных пиявок может служить маркером физиологического статуса и здоровья особей в изменяющихся условиях среды. Полученные новые данные по эколого-физиологическим особенностям *H. medicinalis* и *H. verbana* легли в основу разработки практических рекомендаций и предложений по оптимизации технологии разведения и рационального использования природных ресурсов медицинских пиявок.

Результаты исследований авторов внедрены в производственные процессы искусственного выращивания медицинских пиявок на биофабриках «Международный 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., Мищенко В.А. Авторы глубоко признательны академику РАН Большакову В.Н., чл.-корр. Богданову В.Д., д.б.н. Васильеву А.Г., 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» – Дугенцу М.П. за предоставленный материал и многолетнее сотрудничество.

# Глава 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ

## 1.1. Экологическая обусловленность аминокислотного обмена гидробионтов

Известно, что одним из наиболее информативных и адекватных биохимических показателей физиологического состояния гидробионтов и их адаптивных возможностей является уровень аминокислотного обмена в тканях (Джабаров, 2006; Chernaya et al., 2016; Каранова, 2017; Ковальчук и др., 2021; 2022; Rodrigues et al., 2021; Kovalchuk et al., 2021). Аминокислоты (АК) – важнейшие биологически активные соединения, осуществляющие интеграцию основных метаболических потоков в организме. По количеству и разнообразию функций в пластическом, энергетическом обмене и синтезе вторичных продуктов аминокислотный обмен занимает первое место в метаболических процессах живого организма (Браунштейн, 1949; Артюх, Штуцман, 1972; Власюк и др., 1974; Западнюк и др., 1982; Ленинджер, 1985; Розанов и др., 1985; Young, 1987; Nogushi, Naito, 1990; Северин, 2003; Тарханова, Ковальчук, 2009).

Значение аминокислот для организма в первую очередь определяется тем, что они используются для синтеза белков, метаболизм которых занимает особое место в процессах обмена веществ между организмом и внешней средой. В ходе эволюции животные утратили способность синтезировать почти половину из двадцати аминокислот, входящих в состав белков. К их числу относят те АК, синтез которых включает много стадий и требует большого количества ферментов, кодируемых многими генами. Такие аминокислоты относят к незаменимым (НАК): треонин, валин, метионин, лизин, лейцин, изолейцин, фенилаланин, триптофан. Аргинин и гистидин у взрослых особей образуются в достаточных количествах, однако в период роста и развития организма, или при усиленном выведении из организма (периоды его патологического состояния), или в процессе детоксикации при экстремальных поражениях, необходимо дополнительное поступление этих АК с пищей, и их называют условно незаменимыми. Остальные аминокислоты

легко синтезируются в клетках и называются заменимыми (ЗАК). К ним относят аспарагиновую кислоту, аспарагин, глицин, глутаминовую кислоту, глутамин, серин, пролин, аланин, цистеин, тирозин (Неттахата, Ляпун, 1973; Ленинджер, 1985; Неклюдов, 1990; Уголев, 1991; Stein, Settle, 1986; Deijen, Orlebeke, 1994; Северин, 2003). По характеру продуктов катаболизма у животных протеиногенные аминокислоты делят на три группы: глюконеогенные – при распаде дают метаболиты, не повышающие уровень кетоновых тел, способные относительно легко становиться субстратом для глюконеогенеза (глицин, аланин, валин, пролин, серин, треонин, цистеин, метионин, аспартат, аспарагин, глутамат, глутамин, аргинин, гистидин); кетогенные – распадаются до ацетил-КоА и ацетоацетил-КоА, повышающие уровень кетоновых тел в крови животных и человека и преобразующиеся в первую очередь в липиды (лейцин, лизин); глюко-кетогенные – при распаде образуются метаболиты обоих типов (изолейцин, фенилаланин, тирозин, триптофан) (Северин, 2013).

#### *Краткая характеристика аминокислот и их производных*

Для построения всех белков, как белков из самых древних линий бактерий, так и из высших организмов, используется один и тот же набор из 20 различных аминокислот, ковалентно связанных друг с другом в определенной, характерной только для данного белка последовательности. Каждая аминокислота благодаря специфическим особенностям ее боковой цепи наделена химической индивидуальностью. Поистине, яркое свойство клеток – это их способность соединять 20 аминокислот в различных комбинациях и последовательностях, в результате чего образуются пептиды и белки, обладающие совершенно разными свойствами и биологической активностью. Характеристики 20 аминокислот представлены в таблице 1.1.1 (Ленинджер, 1985).





В белках встречаются только L-стереоизомеры, соответствующие по своей конфигурации L-глицеральдегиду.

Некоторые животные имеют 1-2 дополнительных незаменимых аминокислот. Большая вариабельность характерна для беспозвоночных: некоторые представители ракообразных, моллюсков и нематод оказались способны синтезировать одну или несколько аминокислот, незаменимых для позвоночных. В целом, имеющаяся информация о синтезе аминокислот показывает, что соотношение незаменимых/заменимых аминокислот одинаково среди большинства истинно многоклеточных животных (Fitzgerald, Szmant, 1997; Dabrowski, Guderley, 2002).

Классификация аминокислот основана на различиях в полярности их R-групп. К классу неполярных аминокислот принадлежат аланин, лейцин, изолейцин, валин, пролин, фенилаланин, триптофан и метионин. В класс полярных нейтральных аминокислот входят глицин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин и глутамин. Класс отрицательно заряженных (кислых) аминокислот включает аспарагиновую и глутаминовую кислоты, а класс положительно заряженных (основных) аминокислот – аргинин, лизин и гистидин (Гараева и др., 2009).

Аминокислоты, ковалентно соединенные друг с другом при помощи пептидных связей, образуют пептиды, которые могут быть получены также как продукты неполного гидролиза полипептидов. Кислотно-основные свойства пептида определяются его концевыми  $\text{NH}_2$ - и  $\text{COOH}$ -группами, а также входящими в его состав ионизируемыми R-группами. При полном гидролизе пептидов образуются свободные аминокислоты. Взаимодействие аминоконцевого остатка пептида с 1-фтор-2,4-динитробензолом приводит к образованию производного, имеющего характерную желтую окраску. Некоторые пептиды присутствуют в свободном состоянии в клетках и тканях и выполняют специфические биологические функции. К ним относятся многие гормоны, антибиотики и другие соединения, обладающие высокой биологической активностью (Гараева и др., 2009).

Аланин (Alanine, Ala) –  $\alpha$ -аминопропионовая аминокислота, обнаруживается как в белках, так и в свободном состоянии. Заменимая аминокислота. Синтезируется из разветвленных аминокислот, а также может образовываться из аспараги-

новой кислоты и кинуренина. Аланин может быть сырьем для синтеза глюкозы в организме, в процессе трансаминирования легко обмениваясь на пируват, что делает его важным источником энергии и регулятором уровня сахара в крови (Салтанов, 2003).

Аргинин (Arginine, Arg) –  $\alpha$ -амино- $\alpha$ -гуанидинвалериановая кислота, относится к группе диаминомонокарбоновых кислот. Условно незаменимая аминокислота. Обладает ярко выраженными основными свойствами, что обеспечивает основной характер белков, где содержится в довольно больших количествах, особенно в гистонах и протаминах клеточных ядер. Аргинин играет важную роль в обменных процессах печени. Это один из самых эффективных стимуляторов синтеза соматотропного гормона (Салтанов, 2003). Он непосредственно связывает аммиак, ускоряя восстанавливаемость после больших нагрузок. Препятствует образованию кровяных сгустков и адгезии этих сгустков на внутренних стенках артерий. Наконец, аргинин ускоряет метаболизм жиров, снижает концентрацию холестерина в крови. Недостаток аргинина в питании приводит к замедлению роста и полового созревания.

Аспарагин (Asparagine, Asn) –  $\beta$ -моноамид аспарагиновой кислоты или  $\alpha$ -аминоянтарная кислота, природная аминокислота, которая обнаруживаемся и в составе белков, и в свободном состоянии. Заменяемая аминокислота. Синтезируется из аспарагиновой кислоты и аммиака с использованием АТФ. Аспарагин способен к образованию ионных и водородных связей. Аспарагин играет важную роль в процессах связывания, обезвреживания и переноса аммиака в тканях.

Аспарагиновая кислота (Aspartic Acid, Asp) – аспартат,  $\alpha$ -аминоянтарная кислота. Относится к заменимым аминокислотам. Из всех природных аминокислот у неё наиболее выражены кислотные свойства, является важной составной частью белков. Обеспечивает гидрофильные свойства белков, способна образовывать ионные и водородные связи. Играет важную роль в обмене азотсодержащих веществ. Участвует в образовании мочевины, пиримидиновых оснований. Аспарагиновая кислота участвует в работе иммунной системы, синтезе ДНК и РНК, про-

цессе регенерации организма. Кроме того, она способствует превращению углеводов в глюкозу и последующему запасанию гликогена (Чалисова и др., 2011).

Валин (Valine, Val) –  $\alpha$ -аминоизовалериановая кислота. Придает белкам гидрофобные свойства, относится к аминокислотам с разветвленной цепью. Незаменимая аминокислота. Входит в состав практически всех белков. Особенно много валина содержится в альбумине, казеине, белках соединительной ткани. Вместе с лейцином и изолейцином валин служит источником энергии в мышечных клетках, а также препятствует снижению уровня серотонина. Используется для лечения депрессий, так как действует в качестве слабого стимулирующего соединения, а также для лечения множественного склероза.

Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК, GABA) – непротеиногенная аминокислота, важнейший тормозной нейромедиатор центральной нервной системы (ЦНС) человека и животных. Не является альфа-аминокислотой и не входит в состав белков. Действие ГАМК в ЦНС осуществляется путем ее взаимодействия со специфическими ГАМКергическими рецепторами (подразделяются на ГАМК-А- и ГАМК-Б-рецепторы), приводящего к ингибированию нервного импульса. Под влиянием ГАМК активируются также энергетические процессы мозга, повышается дыхательная активность тканей, улучшается утилизация мозгом глюкозы, улучшается кровоснабжение. За пределами нервной системы ГАМКергическая система была описана в различных тканях и органах тела человека (кишечнике, желудке, поджелудочной железе, почках, легких, печени и других). Гамма-аминомасляная кислота в организме образуется из другой аминокислоты, L-глутамата, с помощью фермента глутаматдекарбоксилазы в ходе необратимой реакции альфа-декарбоксилирования; кофактором является пиридоксаль 5'-фосфат (активная форма витамина B<sub>6</sub>). ГАМК обнаружена у растений, животных, микроорганизмов (бактерий, грибов, дрожжей) (Wong et al., 2003).

Гистидин (Histidine, His) –  $\alpha$ -амино-5-имидазолпропионовая кислота, гетероциклическая аминокислота. Организм человека способен к ограниченному синтезу гистидина. Для многих животных является незаменимой аминокислотой. Обладает основными свойствами. В большом количестве содержится в гемоглобине.

В живых организмах входит в структуру белков и в свободном виде. Входит в состав активных центров многих ферментов, в частности рибонуклеазы, транскетоллазы (Салтанов, 2003; Чалисова и др., 2012). Недостаток гистидина приводит ко многим нарушениям обмена веществ, в том числе к торможению синтеза гемоглобина. Он играет важную роль в метаболизме белков, синтезе гемоглобина, красных и белых кровяных телец, является одним из регуляторов свертывания крови.

Глицин (Glycine, Gly) – гликокол или аминокислотная кислота, относится к группе заменимых аминокислот, входит в состав белков. Является постоянной составной частью тканей животных, его особенно много в протаминах и гистонах, обеспечивая основной характер белков. Глицин способен к образованию ионных и водородных связей. Особенно велико его содержание в фибриллярных белках (в коллагене – до 25%, в фиброине – до 40%). В глобулярных белках его нет или следовое содержание. В тканях и биологических жидкостях содержится в свободном состоянии или в виде производных. Играет важную роль в азотистом обмене. Биологическое значение глицина обусловлено участием его в построении белков и биосинтезе многих физиологических активных соединений (глутатиона, гишпуровой и гликохолевой кислот, порфиринов). Является одним из основных ингибирующих нейромедиаторов центральной нервной системы. В спинном мозге и стволе мозга он участвует в различной двигательной и сенсорной деятельности (Зайцев и др., 2012).

Глутамин (Glutamine, Gln) –  $\alpha$ -аминоглутаровая кислота, заменимая аминокислота, содержится как в белках (протаминах, гистонах), так и в свободном виде. Глутамин образуется из глутаминовой кислоты присоединением аммиака. Он может синтезироваться в организме и из некоторых других аминокислот – валина и изолейцина. При повышенном катаболизме белков глутамин становится незаменимой аминокислотой, поскольку поддерживает их синтез и стабилизирует уровень жидкости внутри клеток. Он принимает участие в биосинтезе аminosахаридов. Глутамин является переносчиком энергии для работы мукозных клеток тонкого кишечника, Т- и В-лимфоцитов, а также для синтеза гликогена и энергообме-

на в клетках мышц (Гараева и др., 2009; Чалисова и др., 2011; Смирнов и др., 2010).

Глутаминовая кислота (Glutamic Acid, Glu) – глутамат,  $\alpha$ -аминоглутаровая кислота. Обладает слабокислой реакцией и придает белкам гидрофильные свойства, способна к образованию ионных и водородных связей. Эта заменимая аминокислота присутствует в растительных и животных тканях в белках, а также в свободном состоянии. Глутаминовая кислота служит источником аминогруппы в метаболических процессах и принимает непосредственное участие в реакциях переаминирования, в образовании глутатиона, орнитина и цитруллина, пролина и оксипролина, а также является промежуточной ступенью при расщеплении этих аминокислот. Глутаминовая кислота участвует в процессах образования гликогена из глюкозы, жиров, а также является связующим звеном между обменом углеводов и нуклеиновых кислот.

Изолейцин (Isoleucine, Ile) –  $\alpha$ -амино- $\beta$ -метилвалериановая кислота, протеиногенная незаменимая алифатическая моноаминокарбоновая аминокислота с разветвленной цепью. Входит в состав многих белков животных и растительных организмов, а также находится в свободном состоянии. Придает белкам гидрофобные свойства. Он играет важную роль в формировании мышечной ткани и, кроме того, может служить источником энергии для ее клеток. Дефицит изолейцина выражается в потере мышечной массы, поскольку он играет значительную роль в получении энергии за счет расщепления гликогена мышц, недостаток изолейцина также приводит к проявлению гипогликемии.

Лейцин (Leucine, Leu) –  $\alpha$ -аминоизокапроновая кислота. Придает белкам гидрофобные свойства. Относится к протеиногенным незаменимым аминокислотам. Также является разветвленной аминокислотой, необходимой для построения и развития мышечной ткани. Лейцин, как и изолейцин, может служить источником энергии на клеточном уровне. Он также тормозит синтез серотонин, предотвращая наступление усталости. У животных лейцин, как и глюкоза, является мощным стимулятором  $\beta$ -клеток панкреатита, синтезирующих инсулин. Понижает со-

держание сахара в крови и способствует быстрейшему заживлению ран и костей (Чалисова и др., 2012).

Лизин (Lysine, Lys) –  $\alpha$ ,  $\epsilon$ -диаминокапроновая кислота, относится к незаменимым протеиногенным аминокислотам. Лизин способствует накоплению кальция в организме и обеспечивает должное его усвоение. Лизин является предшественником карнитина, участвует в образовании коллагена, а также выработке антител, гормонов и ферментов. Отсутствие лизина в пище замедляет рост у детей, у взрослых – приводит к отрицательному балансу азота и нарушению нормальной жизнедеятельности организма. Дефицит лизина неблагоприятно сказывается на синтезе белков, что приводит к быстрой утомляемости, неспособности к концентрации, раздражительности, повреждению сосудов глаз, потере волос, анемии и проблемам в репродуктивной сфере. Отсутствие этой аминокислоты в пище сопровождается у людей тошнотой, головокружением, головной болью и повышенной чувствительностью к шуму.

Метионин (Methionine, Met) –  $\alpha$ -амино- $\gamma$ -метил-меркаптомасляная кислота, незаменимая протеиногенная серосодержащая аминокислота, в организме находится как в свободном, так и в связанном в белках состоянии. Содержание его в белках, как правило, невелико. Эта аминокислота обладает лимитрофными свойствами, способствуя предотвращению жировых отложений в печени. Она также усиливает синтез лецитина в печени и ускоряет синтез белка. Чрезмерное потребление метионина приводит к ускоренной потере кальция.

Орнитин (Ornithine, Orn) – диаминовалериановая кислота, непротеиногенная аминокислота, не входящая в состав белков, играет важную роль в биосинтезе мочевины (орнитин важный промежуточный продукт на пути синтеза аргинина). При декарбоксилировании молекулы орнитина при гниении трупов образуется путресцин – одно из нескольких составляющих так называемого трупного яда. Орнитин – важный промежуточный продукт азотистого обмена; как и другие аминокислоты, может служить источником энергии для животных организмов, окисляясь в цикле Трикарбоновых кислот, в который включается после превращения в глутаминовую кислоту. Биосинтетически связан с пролином и оксипролином (Ленин-

джер, 1985). Присутствует в свободном виде в организмах, входит в состав некоторых антибиотиков (D-орнитин – в бацитрацин, D- и L-орнитин – в грамицидин S).

Пролин (Proline, Pro) – 2-пирролидин- $\alpha$ -карбоновая кислота, протеиногенная заменимая иминокислота, является производным пирролидина. Впервые обнаружена в казеине. Пролин влияет на характер укладки полипептидной цепи белка при формировании его третичной структуры. Является предшественником оксипролина. Биосинтез пролина в живом организме протекает через полуальдегид глутаминовой кислоты или из орнитина. Пролин – важный компонент коллагенов, которые в высоких концентрациях содержатся в костях и соединительной ткани. При длительных и интенсивных физических нагрузках пролин может использоваться организмом как источник энергии для мышц. Дефицит пролина повышает утомляемость.

Серин (Serine, Ser) –  $\alpha$ -амино- $\beta$ -оксипропионовая кислота, это заменимая аминокислота относится к группе протеиногенных. Группа OH серина способна участвовать в образовании водородных связей, стабилизируя вторичную и третичную структуры белка. Кроме того, остаток серина в полипептидной цепи белка способен вступать в реакции нуклеофильного замещения, приводящие к образованию ковалентного промежуточного соединения. Благодаря этому серин входит в состав активного центра некоторых ферментов. Играет важную роль в проявлении каталитической активности многих расщепляющих белки ферментов. Он является структурным элементом фосфатидов мозга и других тканей, а также предшественником холина и коламина.

Таурин (Taurine, Tau) – 2-аминоэтансульфоновая кислота, сульфокислота, образующаяся в организме из цистеина и метионина. Биологические свойства таурина: один из основных антиоксидантов; противовоспалительный фактор; антиапоптотический фактор; физиологический стабилизатор клеточных мембран; регулятор передачи сигналов ионами кальция, гомеостаза жидкости в клетках; регулятор активности фоторецепторов сетчатки; стимулятор неврологического развития; ингибирующий нейротрансмиттер в центральной нервной системе – компонент

проводимости в нервной и мышечной системах; регулятор гомеостаза жидкости в клетках – вносит вклад в осморегуляцию клеток. В целом таурин способствует улучшению энергетических процессов, стимулирует регенеративные процессы в клетках и тканях, стимулирует нервную систему, оказывает благотворное воздействие на сердечно-сосудистую систему в целом и сердечную мышцу в частности (Коденцова, 2022).

Тирозин (Tyrosine, Tyr) –  $\alpha$ -амино- $\beta$ -пара-окси-фенилпропионовая кислота, относится к ароматическим аминокислотам. Заменяемая протеиногенная аминокислота. Тирозин образуется из фенилаланина, а также поступает в организм человека с пищей. В организме человека и животных является исходным субстратом для синтеза гормонов щитовидной железы, адреналина и др. Тирозин входит в состав структурных белков, ферментов, является предшественником катехоламинов, тироксина и меланина. Участвует в образовании водородных связей. Эта аминокислота необходима для нормальной работы надпочечников, щитовидной железы, гипофиза, а также синтеза красных и белых кровяных телец. В организме тирозин превращается в ДОФА, а затем в дофамин, регулирующий давление крови и мочеиспускание. Он также вызывает усиленное выделение гипофизом гормона роста. При заболеваниях почек синтез тирозина в организме ослабляется.

Треонин (Threonine, Thr) –  $\alpha$ -амино- $\beta$ -оксимасляная кислота. Треонин участвует в образовании водородных связей. Оксигруппа треонина служит местом присоединения сахарных колец в гликопротеидах. Треонин, как и метионин, обладает липотрофными свойствами, а также повышает реакционную способность белковых ферментов. Из него синтезируются глицин и серин, одни из конечных продуктов его метаболизма является аспарагиновая кислота.

Триптофан (Tryptophan, Trp) –  $\alpha$ -амино-3-индолпропионовая кислота. Способствует образованию  $\beta$ -спирали белка, формирует его вторичную структуру. Водородный атом у азота пиррольного кольца обладает свойствами образовывать связи с плоскими молекулами, а также с группами, локализованными внутри глобул белков. Относится к незаменимым протеиногенным аминокислотам, входит в состав молекул белков, ферментов. Являясь естественным релаксантом, он помо-



гает бороться с бессонницей, с состоянием беспокойства и депрессии; помогает при лечении головных болей при мигренях; укрепляет иммунную систему; уменьшает риск спазмов артерий и сердечной мышцы; вместе с лизином снижает уровень холестерина.

Фенилаланин (Phenylalanine, Phe) –  $\alpha$ -амино- $\beta$ -фенилпропионовая кислота, принимает участие в формировании вторичной структуры белков. В молекуле гемоглобина фенольное кольцо фенилаланина обеспечивает контакты с плоской структурой гема. Фенольная боковая цепь остатка фенилаланина в ферментах, белковых субстратах, участвует в гидрофобных взаимодействиях, обеспечивая образование фермент-субстратного комплекса. В печени фенилаланин подвергается гидроксилированию, ведущему к образованию тирозина, играя тем самым важную роль в синтезе тироксина, который, как гормон щитовидной железы, регулирует скорость обмена веществ (Гараева и др., 2009; Чалисова и др., 2011; 2012).

Цистеин (Cysteine, Cys) –  $\beta$ -меркаптоаланин. Нейтральная заменимая протеиногенная серосодержащая аминокислота. Благодаря наличию SH-группы он способен образовывать дисульфидные мостики, тем самым стабилизируя вторичную и третичную структуры белков. Цистеин важен для проявления биологической активности многих ферментов и белковых гормонов. Цистеин активно участвует в метаболизме хрусталика глаза. Нарушения содержания этой аминокислоты и его обмена в тканях глаза могут приводить к различным патологиям, в частности, к катаракте. Выполняет защитную функцию в организме.

Цистеиновая кислота (Cysteic Acid, CA) – 3-сульфо-1-аланин. Ее часто называют цистеатом, который при нейтральном pH принимает форму  $O_3SCH_2CH(NH_3^+)CO_2^-$ . Это аминокислота, образующаяся в результате окисления цистеина, при котором тиольная группа полностью окисляется до сульфоновой кислоты. Далее метаболизируется с образованием 3-сульфолактата, который превращается в пируват и сульфит/бисульфит. Цистеиновая кислота является биосинтетическим предшественником таурина в микроводорослях. У животных, напротив, большая часть таурина производится из сульфината цистеина (Ленинджер, 1985).

Источники свободных аминокислот в клетках – белки пищи, собственные белки тканей и синтез АК из углеводов (рис. 1.1.1). Какой-либо специальной формы депонирования свободных аминокислот, подобно глюкозе (в виде гликогена) или жирных кислот (в виде триацилглицеролов), не существует. Поэтому резервом АК могут служить все функциональные и структурные белки тканей, но преимущественно белки мышц, поскольку их больше, чем всех остальных (Северин, 2013).

Помимо синтеза белка, аминокислоты участвуют в образовании многих других важных биологических соединений: пуриновых нуклеотидов (глутамин, глицин, аспарагиновая кислота) и пиримидиновых нуклеотидов (глутамин, аспарагиновая кислота), серотонина (триптофан), меланина (фенилаланин, тирозин), гистамина (гистидин), адреналина и норадреналина (тирозин), полиаминов (аргинин, метионин), холина (метионин), порфиринов (глицин), креатина (глицин, аргинин, метионин), коферментов, сахаров и полисахаридов, липидов и т.д.

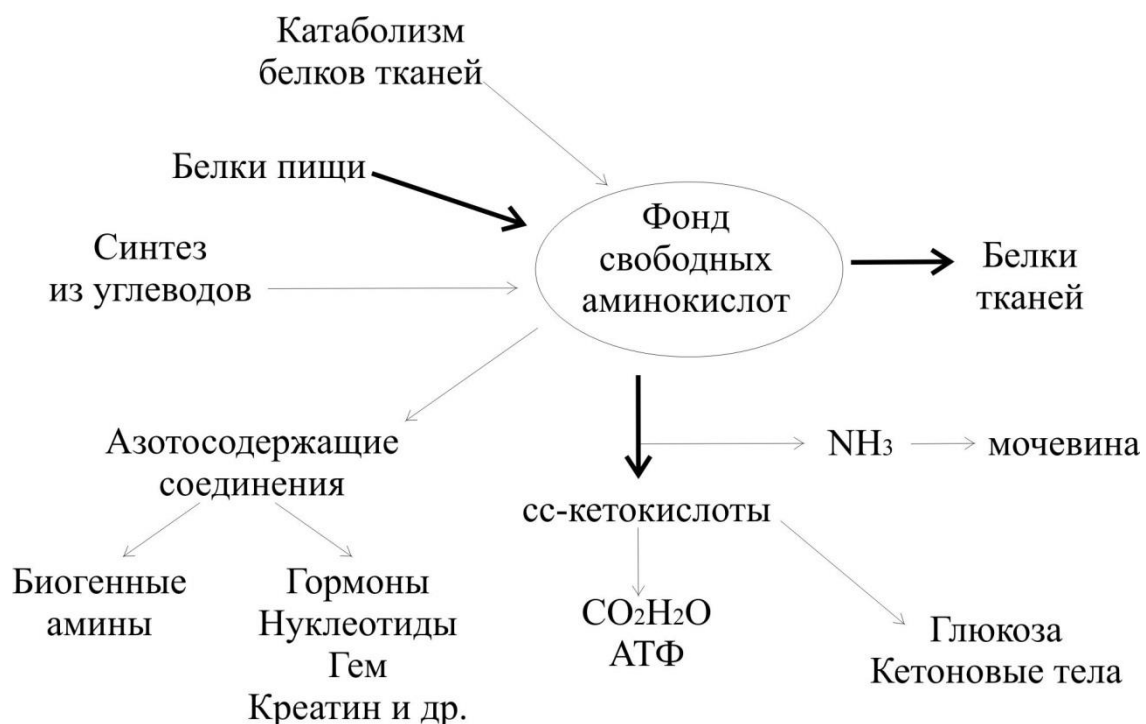


Рисунок 1.1.1 – Схема метаболизма аминокислот в организме

### *Роль свободных аминокислот в поддержании гомеостаза животных*

Аминокислоты, наряду с ионами, являются наиболее древними регуляторами метаболизма. Поддержание определенного азотистого баланса является одним из основополагающих свойств живых организмов, их стационарного состояния в каждый данный момент существования. Спектр свободных АК обладает высоким постоянством в организме, и его изменения свидетельствуют о значительных нарушениях в метаболических и защитных механизмах. В силу этого, концентрация свободных АК и их производных в тканях может являться своеобразным интегральным показателем гомеостаза, характеризующим обмен веществ, а закономерности формирования аминокислотного фонда в организме – объективно отражать состояние метаболического баланса (Нефедов, 1993).

Показано, что аминокислоты повышают устойчивость организма к действию экстремальных факторов внешней среды, которое проявляется через регуляцию активности ряда ферментов, свободнорадикальных реакций, интенсивности перекисного окисления, стабилизацию биомембран и защиту биополимеров от деградации (Майстер, 1961; Глотов, 1973; Баскович и др., 1978; Koyuncuoglu et al., 1979; Горизонтов, 1981; Bender, 1975; Harper, 1983; Huxtable, 1992; Нефедов, 1993; Тарханова и др., 2007; Ковальчук и др., 2009; Kurbat, 2009).

В мировой литературе приводятся данные об иммуно- и фагоцитозстимулирующих свойствах аминокислот (Fu et al., 2003; Oehler, Roth, 2003; Чалисова и др., 2005; Северьянова, Бобынцев, 2006; Бокша, 2008).

Доказаны иммуностимулирующие свойства аспарагиновой и глутаминовой кислоты, цистеина, триптофана и аргинина (Varbul et al., 1980; Суджян, Горбунова, 1983; Nigriotis et al., 1991; Белокрылов и др., 1994). Установлено, что введение аспарагиновой кислоты, глицина и аргинина понижает уровень холестерина в плазме крови (Рыженков и др., 1984; Чистякова и др., 1990).

Показано, что глицин стимулирует синтез белка и, повышая количество фибробластов в ране экспериментальных животных, активизирует репарационные процессы (Зайденберг и др., 1981).

Нарушения баланса свободных аминокислот могут привести к развитию патологического процесса в организме, что отражается на аминокислотном пуле ткани-мишени (Нечипоренко и др., 1990; Мискевич, 2001; Фау, 1975; Li, 1991; Чалисова и др., 2002; Dimitrova et al., 2002).

Экспериментально установлено, что аминокислоты, входящие в состав пептидов и белков в качестве структурных элементов, сами обладают некоторыми регуляторными свойствами в отношении тканей-мишеней, и, в связи с выраженной их способностью стимулировать процессы клеточной пролиферации иммунокомпетентной ткани, предложено использовать сочетание АК для коррекции иммунологического статуса. Так, при тестировании АК в органотипической культуре ткани было установлено, что стимулирующим влиянием обладали лизин, увеличивающий индекс площади клеточной пролиферации на 28%, аспарагин – на 18%, глутаминовая кислота – на 30%, аргинин – на 28% (Чалисова, Авелев, 2013). Было обнаружено, что в культурах тканей старых крыс каждая из стимулирующих аминокислот встречалась в 1,5–6,0 раз реже по сравнению с тканями молодых животных (Чалисова и др., 2003; Соловьев и др., 2013).

Обоснована возможность использования отдельных аминокислот и их солей в качестве высокоэффективных и малотоксичных лекарственных средств профилактики и лечения различных заболеваний (нарушения обмена, заболевания ЦНС, острые и хронические отравления различными веществами и промышленными ядами) (Западнюк и др., 1982; Машковский, 1993).

Имеются сведения о том, что пул свободных аминокислот, осуществляя конъюгацию с реактивными метаболитами, образующимися в клетке и поступающими извне, выполняет функции активного детоксиканта в организме (Нетяхата, Ляпун, 1973; Гринберг, 1971; Шемякина и др., 1998; Гоголь и др., 2001; Deyl et al., 1986; Azuoma et al., 1988).

Следует отметить высокую биохимическую активность аминокислот по отношению к тяжелым металлам (ТМ) (Щербань, 1977; Tabata, 1969; Bordas et al., 1976; Briggs, Baron, 1979; Servisi, Marteus, 1978; Halatcheva, Nikolova, 1980; Kasschau et al., 1980; Loeb, Zakour, 1980; Pecon, Powell, 1981; Lewis, McIntonsh, 1986;

Шемякина и др., 1998; Трудникова и др., 2006; Цветков, 2009; Моисеенко, 2009; Черкесова, 2013).

Так, 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, Михайлив, 2003; Ньюкканов, 2004; Павловская, Шестакова, 2004; Столяр 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 кадмием (Подгурская, 2006).

Экспериментально установлено, что беззубки *Anodonta 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).

Аминокислоты имеют тесную биохимическую связь с микроэлементами (МЭ) непосредственно или через ферментные системы, где МЭ активируют их специфические функции. Обнаружено, что при недостатке Zn нарушается синтез белка, в результате чего в тканях животных увеличивается количество свободных АК: аспартата, фенилаланина, лизина, гистидина, аргинина, валина, лейцина (Школьник, Давыдова, 1959).

Показано, что внутрибрюшинное введение композиции, состоящей из таурина и сульфата цинка, в организм животных приводит к значительному повышению уровня таурина в плазме крови, модулирует обмен серосодержащих аминокислот (Шейбак и др., 2007).

Активное участие в синтезе аминокислот принимают эссенциальные металлы Mn и Mo, под влиянием которых повышаются концентрации треонина, аланина, глутамата (Hendrici, 1954; Possingham, 1954).

Методом электронной спектроскопии было изучено образование смешанно-лигандных комплексов меди (II) с аспарагиновой кислотой, серином и валином и определено преимущественное образование комплексов состава Cu-Asp-Ser и Cu-Asp-Val при  $pH > 7$  (Трудникова и др., 2006).

Имеются данные, что ряд двухвалентных металлов, таких, как Ca, Mg, Co, Mn оказывают стабилизирующее действие на скорость обмена белков (Власюк и др., 1974).

Ионы тяжелых металлов (ТМ), образующих хелаты, могут служить специфическими носителями АК. Образовавшиеся при этом менее токсичные хелатные соединения участвуют в обезвреживании токсичных промежуточных продуктов обмена, а также элиминируют из организма достаточно реакционные металлы. Кроме того, являясь оксидантами, они защищают клетку от свободных радикалов и перекисных соединений (Воскресенский и др., 1982; Голиков и др., 1998).

Чрезвычайно высокой способностью образовывать устойчивые связи с металлами обладают две аминокислоты: гистидин (благодаря наличию в его молекуле имидазольного кольца) и цистеин (за счет его сульфгидрильной группы) (Альберт, 1971; Bordas et al., 1976). Имеются данные о влиянии гистидина на поглоще-

ние ТМ: введение этой аминокислоты повышало скорость всасывания ионов Cd из пищеварительной системы голубого краба *Callinectes sapidus* (Peson, Powell, 1981).

Поскольку избыточное поступление токсичных металлов в ткани может вызывать признаки отравления, сопровождающиеся снижением активности ферментов и их синтеза, реактивное участие свободных АК в детоксикационных процессах становится определяющим в коррекции биоэлементного статуса организма (Cousins, 1979; Prasad, 1979; Loeb, Zakour, 1980; Chang, Kan, 1982; Eichhorn, 1984; Schrauser, 1994).

Известно, что в отношении свободных АК металлы обладают специфичным действием. Так, введение крысам внутрь соединений Pb и Mn снижает содержание цистеина и метионина в печени экспериментальных животных, в то время как Hg вызывает повышение концентраций этих АК, особенно цистеина (на 230%) (Halatcheva, Nikolova, 1980).

Установлено, что разные дозы одного металла вызывают неоднозначные изменения в аминокислотном фонде животных. Так, после экспозиции мидий *Mytilus edulis* в растворе ионов Cd с концентрациями 0,1 и 1,0 мг/л наблюдалось снижение уровня аланина, глицина и суммарных концентраций свободных АК, а повышение дозы Cd до 5 мг/л вызывало их увеличение (Briggs, 1979).

Ю.В. Щепиным (1985) было установлено, что хроническая кадмиевая интоксикация вызывает изменения концентраций свободных аминокислот в гонадах морских ежей в зависимости от дозы токсиканта и времени его воздействия. Так, при минимальной концентрации Cd (0,1 мг/л) снижался уровень 11-ти свободных АК, что связано с активацией биосинтетических процессов под влиянием малых доз металла. Максимальная доза токсиканта (5,0 мг/л) приводит к наиболее сильным изменениям аминокислотного пула: повышению суммарных концентраций свободных АК на 13% в основном за счет метионина, гистидина, изолейцина, фенилаланина, аргинина, и снижению концентраций аспарагиновой кислоты, треонина, серина, глутамата, пролина, глицина, аланина и цистеина (Щепин, 1985).

В работе М.Р. Kasschau с соавторами (1980) показано, что через 24 часа после обработки анемон хлоридом кадмия, в их тканях на 50% повышались, по сравнению с контролем, концентрации глутаминовой кислоты и аланина.

При изучении содержания свободных аминокислот в мышцах плотвы *Rutilus rutilus* L. из экологически неблагоприятного водохранилища, в достаточном количестве были обнаружены только лейцин, изолейцин и фенилаланин, что связывают с высоким уровнем загрязнения водной среды тяжелыми металлами и другими токсикантами (Видягина, 2008).

В мировой литературе имеются данные о состоянии аминокислотного пула животных при действии стрессорных факторов биогенной и абиогенной природы. Установлено, что в процессе адаптации к экстремальным нагрузкам, в том числе и к токсическим, наблюдается повышение суммарной концентрации свободных аминокислот, обусловленное катаболическими процессами в организме (Западнюк и др., 1982).

Обнаружено, что при инвазийных инфекциях у животных, например в процессе жизнедеятельности гельминтов *Echinococcus granulosus*, в органах и тканях происходит повышение концентрации свободных АК (Гугушвили, Инюкина, 2009).

Показано, что действие гипоксии на организм, независимо от ее генеза, также приводит к увеличению суммарного количества свободных АК плазмы крови и эритроцитов белых крыс (Слотвицкий, Зуев, 1971). Для глутаминовой кислоты, триптофана, аргинина, гистидина, метионина и цистеина были выявлены противогипоксические свойства (Атарская и др., 1990).

Отмечен обвальный рост в плазме крови свободных АК: лейцина, треонина, аланина, глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты, гистидина, цистеина, фенилаланина и тирозина на фоне снижения концентрации аргинина и лизина при прогрессирующей недостаточности кровообращения (Сивков, Лебедева, 1974).

Изучено содержание свободных АК в тканях печени и сердца белых беспородных крыс на 15, 30 и 45-е сутки экспериментальной гипокинезии (ГК). Показано, что в печени по мере увеличения срока ГК количество моноаминодикарбоно-



вых кислот (глутамата и аспартата) резко уменьшается. Повышение уровня глицина наблюдается лишь на 30-е сутки ГК, оставаясь в пределах контрольных величин на 15 и 45 сутки ГК. В отличие от сдвигов, наблюдаемых в печеночной ткани, в миокарде было установлено увеличение содержания моноаминодикарбоновых кислот. Количество таурина во все сроки ГК было снижено по сравнению с контролем, в особенности на 15 сутки ГК (Акопян и др., 2007).

Свободные аминокислоты играют существенную роль в адаптации пойкилотермных животных к зимовке при околонулевых температурах. Так, М.В. Карановой (2006) было изучено влияние осенне-зимнего понижения температуры окружающей среды на изменение содержания свободных АК в тканевых жидкостях пресноводного моллюска *L. stagnalis*. Осенью было отмечено возрастание концентрации аланина, глутамата, глицина, гистидина и серина. Зимой, когда моллюски в течение 2,5 мес. находились в гипометаболическом состоянии, пулы всех АК снижались в 4-8 раз, а незаменимые АК, за исключением лизина, не обнаруживались совсем (Каранова, 2006).

Аналогичная картина наблюдалась у пресноводной рыбы ротана *Perccottus glehni*: за несколько дней до начала зимней спячки в природных условиях в его крови и в мышцах обнаружено исчезновение или резкое снижение концентрации незаменимых АК. Существенной особенностью изменения состава свободных АК после гибернации явилось значительное увеличение концентрации аланина в мышцах – в 3,5 раза по сравнению с июлем, и в 1,4-1,8 по сравнению с декабрьскими измерениями. Общий пул свободных аминокислот в мышцах, в сравнении с июльским, увеличился в декабре почти в 1,5 раза ( $34,76 \pm 1,12$  мкмоль/г), а после гибернации в 2 раза (Каранова, 2009).

Экспериментально исследовано влияние холодового шока на пулы свободных аминокислот *P. glehni*, еще не подготовленных к зимней спячке. Показано, что в начале сентября спустя 4 суток шока в крови происходит снижение уровня незаменимых АК, повышение аланина и  $\gamma$ -аминомасляной кислоты. Изменение пулов АК в мышцах происходит в 2 этапа: значительное их снижение (через 2 су-

ток) и последующее (через 4 суток), еще более радикальное, повышение (Karanova, 2011).

Влияние теплового стресса оказывает влияние на содержание свободных АК и гормональный статус в плазме крови крыс с экспериментальным гипотиреозом. Обнаружено, что тепловое воздействие (на протяжении 2-х часов при 40-42°C) вызвало выраженную стрессовую реакцию организма экспериментальных животных. Тепловой стресс у эутиреоидных животных сопровождался возрастанием концентраций большинства исследуемых АК. Экспериментальный гипотиреоз сопровождался выраженным увеличением содержания в плазме крови крыс триптофана, фенилаланина, аспарагиновой и глутаминовой кислот. При тепловом стрессе на фоне гипотиреоза наблюдалось снижение адаптационных возможностей организма экспериментальных животных, что проявлялось в повышении уровня трийодтиронина, инсулина, отсутствии адекватного изменения уровня кортизола в сыворотке крови экспериментальных животных, а также изменении аминокислотного состава плазмы крови (уменьшении содержания глутаминовой и аспарагиновой кислот, метионина, серина, треонина) (Глинник и др., 2007).

К настоящему времени многие вопросы биохимического гомеостаза при экстремальных воздействиях остаются открытыми, в том числе отсутствуют точные данные об изменениях аминокислотного обмена и адаптивной направленности отдельных аминокислот (Нефедов, 1993; Martinez, Giraldez, 1993).

В мировой литературе имеются сведения о качественной и количественной структуре аминокислотного спектра, а также его видоспецифичности у различных эколого-физиологических групп беспозвоночных и гидробионтов.

Так, было отмечено, что дождевые черви являются белковыми телами в почве, где содержание АК невелико, и большую часть аминокислотного фонда в тканях этих олигохет составляют аспарагиновая кислота, треонин, изолейцин, глутамат, аланин, лейцин, лизин. При этом было показано, что содержание аминокислот в дождевых червях имеет межвидовые различия (Pokarzhevskii et al., 1997).

При изучении аминокислотного состава у двух широко распространенных в Молдавии рачков *Daphnia magna* и *Simocephalus vetulus*, несмотря на различия в условиях обитания, был выявлен одинаковый качественный состав аминокислотного пула. Вместе с тем, было установлено, что на количественный состав свободных АК рачков существенное влияние оказывают экологические условия обитания и характер трофической обеспеченности. Так, при содержании исследуемых рачков в состоянии голодания, наблюдалось резкое снижение фенилаланина, лейцина, валина, аланина, лизина, гистидина и глутаминовой кислоты (Степанова и др., 1970). Аналогичная зависимость аминокислотного состава от физиологического состояния была выявлена у морской копеподы *Calanus helgolandicus* (Cowey, Corner, 1963).

При исследовании физиологического состояния пресноводных рыб была выявлена видоспецифичность аминокислотного спектра тканей: у леща в мышцах, и особенно, в печени, концентрация свободных аминокислот была выше, чем у сазана. При этом в печени обнаружено более высокое содержание АК, чем в мышцах. В мышцах обоих исследованных видов преобладающими компонентами оказались лизин, гистидин, аспарагиновая кислота, серин, аланин, лейцин, цистеин. Полученные результаты обусловлены функциональными различиями печеночной и мышечной ткани и, соответственно, специфической направленностью в них метаболических процессов (Воробьев, 2008).

Обнаружены половые различия аминокислотного спектра у различных групп гидробионтов. Так, у белого амура в период начала формирования половых продуктов в мышцах самок, в сравнении с самцами, отмечены повышенные концентрации свободных АК (Воробьев, Воробьев, 2008). В работе В.А. Мищенко (2013) показано, что содержание свободных аминокислот в печени самок озерных лягушек *Pelophylax ridibundus* в брачный период достоверно выше, чем у самцов. Предполагается, что повышенное содержание свободных АК в печени самок амфибий является благоприятным метаболическим условием, обеспечивающим адекватную субстратную поддержку усиления биосинтеза и в том числе, регене-

раторных и детоксикационных процессов в организме в период подготовки животных к икрометанию (Мищенко, 2013).

В качестве модельных объектов при изучении избирательного поглощения и выделения свободных АК зарубежные и отечественные исследователи используют кольчатых червей различных таксонов.

Так, на дождевых червях было показано, что через стенки их тела поступают нейтральные, кислые и основные аминокислоты. При этом основные аминокислоты имеют преимущество над кислыми, а нейтральные – над основными и наблюдается явление конкурирующего торможения: присутствие аланина, аспарагиновой кислоты и аргинина ингибировало поглощение метионина, глутамата и лизина соответственно (Richards, Arme 1979).

У полихет *Pareurythoe californica* также наблюдались взаимоконкурентные связи свободных АК: в присутствии всех основных классов АК снижалось поглощение аспартата, серина, глицина, аланина и лизина на 20-40% (O`Dell, Stephens, 1986).

При содержании полихет *N. succinea*, *N. virens*, *N. diversicolor* в течение 48 часов без кислорода, было обнаружено, что выделение аминокислот повышается через 12 часов эксперимента, но в дальнейшем снижается. При этом динамика скорости выделения аммония у всех трех видов червей была идентична динамике скорости выделения АК, что указывает на принадлежность аминокислот к продуктам метаболизма. Среди выделенных аминокислот преобладали аланин, глицин, таурин, причем концентрации аланина в анаэробных условиях возрастали, а динамика таурина и глицина была неоднозначной (Jorgensen, Kristensen, 1980a; 1980b). Изучение поглощения через эпидермис аланина, серина и глутаминовой кислоты исследуемыми полихетами, выявило, что при низкой солености среды обитания сродство АК выше, а потенциальная скорость поглощения ниже, чем при высокой солености. Обнаружено, что глутамин поглощается всеми видами полихет в малых количествах (Jorgensen, Kristensen, 1980a; 1980b).

У морских полихет *Marphysa sanguinea*, *Pareurythoe californica*, обитающих в аноксических условиях скорость поступления и чистого притока аминокислот падала на 40% (Costopulos et al. 1979).

Е.В. Рассединой (2006) при исследовании метаболитов, выделяемых медицинскими пиявками в воду, показано, что аминокислоты были доминирующими компонентами водной среды, в которой находились эти гирудиницы. Причем спектр выявленных АК был сопоставим с аминокислотным фондом плазмы крови человека и млекопитающих (Гольдберг, Гольдберг 1980; Ковальчук, 2008). Более высокое содержание всех АК отмечалось в воде, где содержались голодные особи, что связано с их физиологическими особенностями: у голодных пиявок выделение в воду продуктов обмена происходит интенсивнее, чем у сытых. В опыте было отмечено, что наиболее высокие концентрации свободных АК характерны для воды, в которой содержались особи *H. verbanus* (Рассединой, 2006).

Обзор мировой литературы выявил незначительное число работ, посвященных изучению аминокислотного обмена у представителей водных беспозвоночных. Отсутствуют литературные данные по специфике белкового обмена и метаболизма азотсодержащих соединений у кровососущих и хищных пиявок, нет сведений об изменениях аминокислотного обмена гирудиниц как в естественной среде, так и в экстремальных условиях.

Вместе с тем изучение структуры аминокислотного фонда тканей гирудиниц позволит оценить состояние их регуляторных и адаптивных возможностей при воздействии экстремальных природных и антропогенных факторов. В связи с практическим отсутствием научных материалов по данной проблематике, необходимость исследования фонда свободных АК у кровососущих и хищных пиявок очевидна. Результаты исследования аминокислотного спектра тканей и слюнной жидкости медицинских пиявок, выращенных на биофабриках, имеют и практическую ценность для клинической медицины, ветеринарии, фармакологии и косметологии.

## 1.2. Экологические и физиологические особенности челюстных пиявок

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.

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 представителей класса Hirudinea, в том числе и о большой ложноконской пиявке *Haemopsis 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 факто-

рам 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; Neseemann, 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.

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* (Йогансон, 1935; Herter, 1968; Лукин, 1976; Слока, 1983 и мн. др.). Однако современные молекулярно-генетические исследования ученых Р. Trontelj et al. (2004), Р. Trontelj and S.U. Utevsky (2005), М. Е. 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, гаплоид-

ное число хромосом у которого составляет, как и у *H. verbana* – 13 (Wendrowsky, 1928; Vitturi et al., 2002).

### *Морфологические особенности челюстных пиявок*

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 юге России 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, какие 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 полосы (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).

Окраска тела взрослых особей *H. sanguisuga* на спинной стороне черная, черно-коричневая 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 суше и совершать сухопутные миграции (Лукин, 1976; Шарова, 2002). Довольно высокую мобильность пиявок 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 бóльшую 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* сказывается и на величине ее анального отверстия, которое в отличие от медицинских пиявок, велико и хорошо заметно (Лукин, 1976).

На брюшной стороне тела гирудиниид 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 (Стойновский, 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) (рис. 1.2.1).

Показано, что из всех видов медицинских пиявок *H. medicinalis* – самый северный, ее ареал достигает Норвегии и Швеции. Ширина ареала этого вида со-

ставляет 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) (рис. 1.2.1).

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; Kasperek et al., 2000; Demirsoy et al., 2001; Juhasz et al., 2008; Utevsky et al., 2008; Gagi, 2010; Kovalenko, Utevsky, 2011; Saglam et al., 2011). Предположительно 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) (рис. 1.2.1).

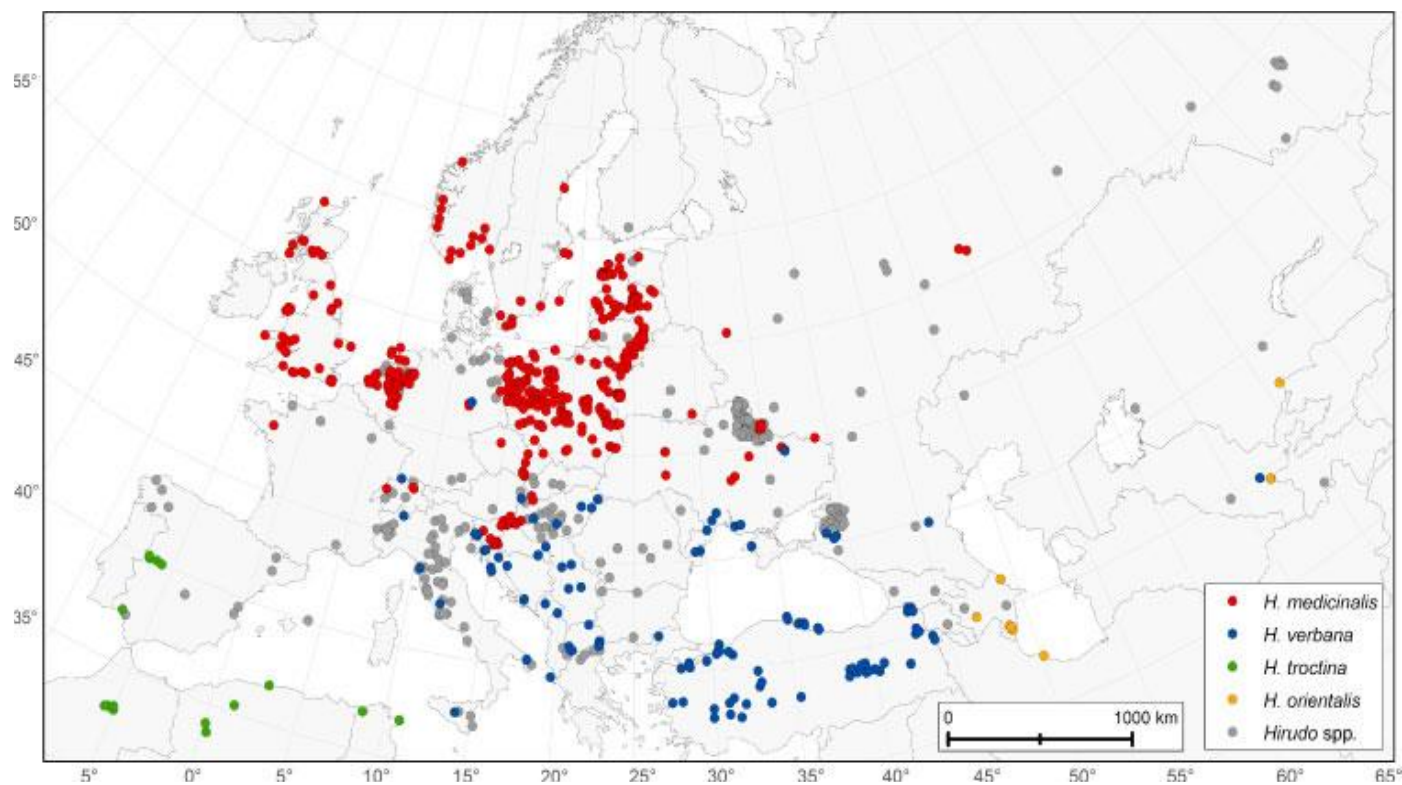


Рисунок 1.2.1 – Распространение медицинских пиявок в Палеарктике (Utevsky et al., 2010)

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 насто-

ящее 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; Кадастр..., 2007; Чужекова и др., 2008; Романова, Климина, 2010; Кучина, Антоненко, 2010; Алиев, Магомедов, 2012; Шаповалов и др., 2012; Черная и др., 2023; 2024). 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 вылов 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 (Rawlowski, 1936), она проходит между Московской и Смоленской областью, по Самарской области, отклоняясь к югу по мере продвижения на восток. В Калининградской, Ярославской и 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, Кусая, 1975; Лагунов, 2009; Красуцкий, Гашек, 2023; Черная и др., 2024a). 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). Особенно многочисленны МП на Северном Кавказе, в Краснодарском и Ставропольском краях, в Ростовской области (Хатухов и др., 2001; Михайлов, 2006; Шаповалов и др., 2012; Черная и др., 2024), на юге центральных областей России и в районе нижней Волги (Астраханская, Саратовская, Волгоградская области) встречается часто, нередко 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).

Спорадичные находки МП, с довольно низкой численностью, отмечены в регионах Казахстана, Киргизии, Таджикистана и Узбекистана (Лукин, 1976; Михайлов, 2006; Утевский и др., 2008). В Туркменистане медицинские пиявки 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 «пиявочного 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; Ока, 1935; Moore, 1930).

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

На протяжении большей части Европы, в особенности на юге, *H. sanguisuga* обычна и многочисленна (Лукин, 1976; Neseemann, 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 пиявка *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, Щеголева, 1951; Лукин, 1976; Хатухов и др., 2001; Романова, Климина, 2010; Вундцеттель, Кузнецова, 2012; Шаповалов и др., 2012).

В Европейской части России к северу и к северо-востоку *H. sanguisuga* становится все более редким компонентом гирудофауны, но она отмечена в Карелии, в бассейнах северных рек С. Двина, Ухта, Уса, М. Сосьва (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 вы-

сокой 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 гирудинид*

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, который 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. Медицинские пиявки 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 встречается, 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, 1936a).

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, пиявка *H. sanguisuga* индифферентна к химическому составу растворенных в воде веществ и к колебаниям содержания кислорода в воде (Лукин, 1929; Vennike, 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 коконов. Кроме того, в прибрежной зоне она может охотиться на дождевых червей и наземных моллюсков (Shikov, 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. Рассединой (2006) при температуре +15°C...+16°C пиявки совсем не откладывают коконы.

При исследовании температурных предпочтений различных физиологических групп *H. verbanus* было обнаружено, что голодные пиявки выбирают места с прохладной водой, не превышающей +12°C, а сытые особи, напротив, устремля-

ются в более теплые воды (до + 24°C), тем самым сокращая затраты энергии на пищеварение (Petersen et al., 2011).

Высокие требования к температуре имеют ключевое 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 эвритермным организмам. Тот же факт, что в условиях сурового климата она встречается очень редко, объясняется, вероятно, не ее чувствительностью к холоду, 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 данные, 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 ( $\text{млO}_2/\text{г}\cdot\text{час}$  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 (рН), наряду с температурным и кислородным режимами, является одним из важнейших абиотических факторов среды для гидробионтов. Как правило, колебания рН, 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 рН: 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 рН от 6,4 до 9,0. Оптимальным для МП показатель рН 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 (Запкунене, 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 наблюдается агрессивное поведение, известны случаи каннибализма (Kutschera, Roth, 2005; Кучера, Рот, 2005).

В отличие от медицинских пиявок, *H. sanguisuga* принадлежит к числу весьма прожорливых 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, околородные 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 (Pawłowski, 1936).

Гирудиниды откладывают коконы во влажной земле прибрежной полосы водоемов, немного выше уреза воды. Имеются сведения о нахождении коконов медицинских пиявок в гнездах околородных 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 нитчат-

ки, 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 (Petrauskiene 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 месяцев (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 с 93-го дня и достигала максимума к 120-му дню (Запкунене, 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 Oligocheta 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 организации последних, обеспечивающие, в том числе, и возможность длительного голодания (Лукин, 1976).

Гирудинида, 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 определяют 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; 2015; Аминов и др., 2020; Крячко, Лукоянова, 2023).

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, 2006; 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 российских 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, дегидроэпиандростерон) и важные нейромедиаторы серотонин и гистамин (Баскова и др., 2008).

Основным параметром для медицинских пиявок, 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).

Сегодня медицинские пиявки используются не только при гирудотерапии, но и гомогенаты ее тканей служат сырьем для фармацевтической и косметологической продукции (Селезнев, 1996; Самойлов, 2001). К настоящему времени в тканях медицинских пиявок 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; Chernaya et al., 2010; Chernaya, Kovalchuk, 2013; Maksimova et al., 2010; Pletneva et al., 2011; Черная и др., 2019; Ковальчук и др., 2021).

В пищеварительной системе медицинских пиявок 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, микрофилярии, 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 голодания 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 отличалась от контроля: концентрация макроэлементов К, 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, Vg и S; кроме того, в «пиявочной» воде содержался селен, отсутствующий в контроле (Рассадина, 2006). Среди метаболитов, продуцируемых 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 бóльшую 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 седиментов, показана возможность их использования для идентификации отдельных экотоксикантов (Лапкина, Флеров, 1979, 1980; Флеров, 1989; Petrauskiene, 2003).

К настоящему времени медицинские пиявки 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 современной 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 медицинских пиявок – 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 сход-

ство, 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.

### 1.3. Технология выращивания медицинской пиявки

Организм медицинской пиявки – это, по сути, естественная биофабрика по производству целого комплекса уникальных биологически активных соединений, оказывающих разностороннее благотворное воздействие на организм человека и животных (Баскова, Исаханян, 2004; Никонов, 2007; Рассадина, Романова, 2008; Ковальчук и др., 2021). 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 (боло-

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 выращивания *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 обычных 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 открытия 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 Blu-



tegelzucht GmbH (Германия), Biorica (Франция), Biopharm Leeches (Великобритания), Leeches Turkey / Ustunay Pzarlama (Турция).

Медицинская пиявка является довольно простым в содержании и разведении объектом. Своеобразие 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 воспроизводства 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; Никон, 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 сосуды 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 салфет-

ками, 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 (Запкунене, 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 на 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 гиродукультуре 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, пиявки переводятся в цех готовой продукции, где выдерживаются без пищи три месяца, а затем 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. (Стойновский, 2002). Смерть обычно наступает на 11-й день. Желтуха пиявок – болезнь, сопровождающаяся их вздутием и дряблостью тела. Иницируется 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.

Искусственное разведение медицинских пиявок имеет свои безусловные достоинства: существенно снижает отлов пиявок из природных популяций, гарантирует «чистоту» пиявки, то есть отсутствие в ней различных инфекций. Сертифицированный медицинский «природный лекарь» – защита пациента от СПИДа, а также от гепатита, которым могли быть заражены животные, ставшие жертвой пиявки. Невозможно каждую медицинскую пиявку, выловленную в естественных водоемах, подвергнуть биохимическому анализу с целью выявления инфекционных заболеваний, переносчиком которых она может быть.

Самым крупным современным центром искусственного разведения пиявок на сегодняшний день является «Международный центр медицинской пиявки», который расположен в поселке Удельная Московской области. Сотрудники научно-исследовательской лаборатории этого центра ведут интенсивную работу по совершенствованию и развитию технологического процесса. Производственные помещения, где производят, содержат и хранят готовую продукцию – медицинских пиявок, занимают сегодня 2200 м<sup>2</sup>. Производство сертифицировано по стандартам GMP. Кроме специализированных производственных помещений, которые специально предназначены для выращивания пиявок, в Центре пиявки есть и научно-исследовательская лаборатория, и цех по первичной переработке медицинских пи-

явок для создания косметических средств, и экспериментальный цех по содержанию пиявок-маток в период между откладыванием коконов.

Все производство Международного центра медицинской пиявки оборудовано по последнему слову науки и техники. В научно-исследовательской лаборатории есть все необходимое для решения вопросов модернизации технологии выращивания пиявок в искусственных условиях, ее сотрудники изучают биологически активные вещества, продуцируемые медицинскими пиявками, создают лекарственные и косметические препараты на их основе, популяризируют методы гирудотерапии. Цех по первичной переработке медицинских пиявок оснащен морозильными установками, лиофильной сушкой, гомогенизаторами и другим современным оборудованием. Существуют в центре также технические цеха водоснабжения, упаковки, транспорта и другие производственные службы. Следит за «готовой продукцией» аккредитованная лаборатория отдела контроля качества.

В настоящее время с каждым годом растет интерес к медицинской пиявке со стороны биологов, медиков, ветеринаров, косметологов, фармакологов, гирудотерапевтов и бизнесменов. В силу высокого спроса медицинских пиявок, как лечебного средства, в последние десятилетия в России проводятся многочисленные исследования по оптимизации и усовершенствованию технологии их воспроизводства 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; Мортеза, 2016; Филатова, 2021).

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Общая характеристика объектов исследования

В работе использованы материалы многолетних (2003-2019 гг.) полевых и лабораторных исследований авторов по изучению влияния естественных и антропогенных факторов на состояние аминокислотного спектра тканей у трех видов челюстных пиявок (сем. Hirudinidae): медицинских пиявок *Hirudo medicinalis* (Linnaeus, 1758) и *Hirudo verbana* (Carena, 1820) различных эколого-физиологических групп (из природных популяций и гирудокультуры); и большой ложноконской пиявки *Haemoris sanguisuga* (Linnaeus, 1758) (рис. 2.1.1-2.1.3).

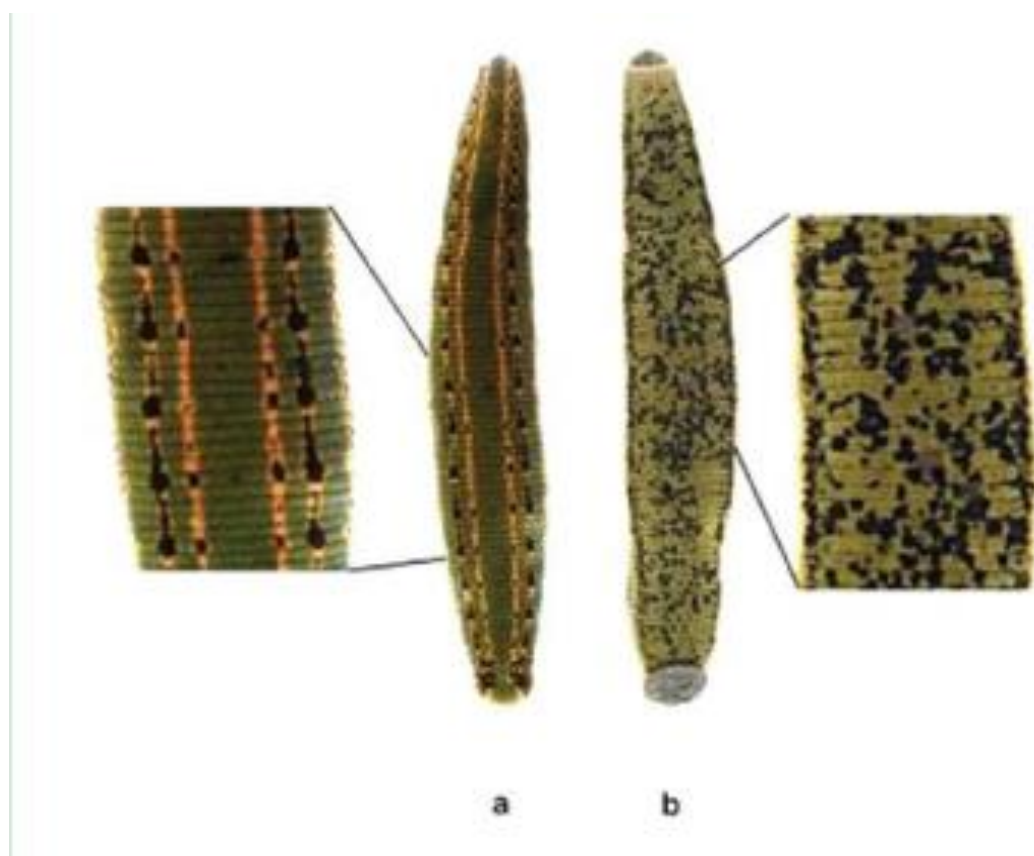


Рисунок 2.1.1 – Пиявка лечебная *Hirudo medicinalis* (Фото С.Ю. Утевского).

Условные обозначения: а – спинная сторона, б – брюшная сторона

Пиявка лечебная *H. medicinalis* – довольно крупный кольчатый червь, длина тела около 12 см, ширина до 1 см. Диаметр задней присоски больше половины

наибольшей ширины тела. Окраска тела изменчива – от темной до светлой, на спинной стороне характерный узор, образованный продольными полосами. Посередине спины идут две продольные узкие оранжевые полосы с неровными краями. Кнаружи от этих полосок расположены оранжево-черные полосы, черная полоса которых имеет явственные пережимы. Края тела желто-оранжевые. Брюшная сторона пестрая, вдоль боков – светлые полосы (Лукин, 1976) (рис. 2.1.1)

Пиявка *H. medicinalis*, как было указано выше, обладает международным природоохранным статусом (CITES, 2017), а также внесена в перечень региональных Красных книг 15 субъектов Российской Федерации: Тверской области – под категорией I (находящийся под угрозой исчезновения вид); Белгородской, Нижегородской и Пензенской областей – под категорией II (уязвимый вид, сокращающийся в численности), Республики Башкортостан, Республики Калмыкия, Луганской Народной Республики, Удмуртской Республики, Алтайского края, Воронежской, Курской, Смоленской и Саратовской областей – под категорией III (редкий вид); Республики Марий Эл и Калужской области – под категорией IV (неопределенного статуса вид) (Красная книга Луганской..., 2017; Федорова, 2021). Ожидается внесение пиявки *H. medicinalis* в третье издание Красной книги Челябинской области в категории природоохранного статуса III – редкий, распространенный на ограниченной территории вид (Красуцкий, Гашек, 2023).

Представители вида пиявка аптечная *H. verbanda* – пиявки больших размеров. Тело длиной до 10 см, с обоих концов заканчивается присосками, сильно уплощенное, однако после насыщения кровью становится более округлым. Окраска с характерным рисунком из оранжевых полос с неровными краями и темных пятен. На спине четко обозначены оранжевые полосы с перетяжками; брюхо оливковое, с двумя широкими черными полосами в виде краевой каймы, и, в отличие от лечебной пиявки *H. medicinalis*, без темных пятен (Лукин, 1976) (рис. 2.1.2).



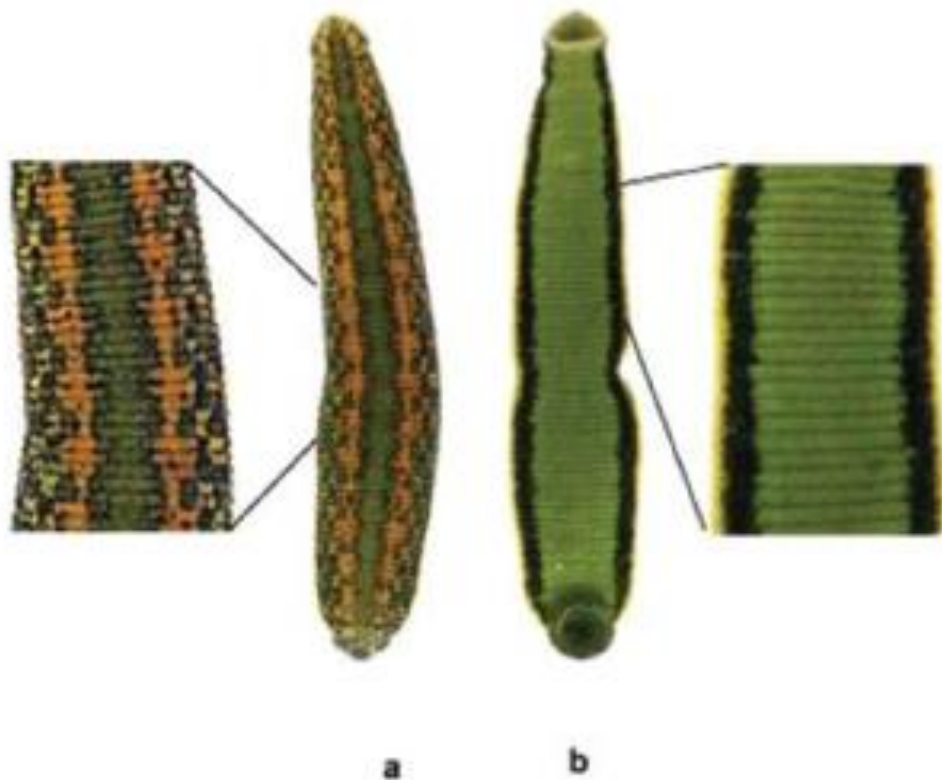


Рисунок 2.1.2 – Пиявка аптечная *Hirudo verbana* Carena, 1820 (Фото С.Ю. Утевского). Условные обозначения: а – спинная сторона, б – брюшная сторона

На многих территориях европейской части России пиявка *H. verbana* – редкий, либо исчезающий вид. Она включена в Красные книги трех субъектов Российской Федерации: Республика Адыгея (III), Волгоградская область (V), Республика Крым (III) (Красная книга..., 2015; Федорова, 2021).

В природоохранных документах в качестве основных лимитирующих факторов для медицинских пиявок называют нарушение местообитаний из-за осушения и загрязнения заболоченных лугов и болот, пересыхания водоемов, а также сбор населением. Факторы угроз – массовый вылов в коммерческих целях, загрязнение и уничтожение водоемов, мелиоративные мероприятия. Меры охраны – выявление и сохранение биотопов, использование искусственного воспроизводства для восстановления природных популяций.

Целесообразность включения в данную работу материалов по эколого-физиологическим особенностям формирования аминокислотного состава тканей большой ложноконской пиявки, ближайшей родственницы медицинских пиявок,

обусловлена тем, что она, имея сходную биологию развития, обитая в тех же биотопах, в отличие от них 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 кровососущих пиявок *H. medicinalis* и *H. verbana* в силу сходства их биологии развития. Есть мнение, что большие ложноконские пиявки могут быть использованы в качестве биологического маркера присутствия в водных экосистемах медицинских пиявок (Зиненко и др., 2012).



Рисунок 2.1.3 – Большая ложноконская пиявка *Haemopsis sanguisuga*

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).

Взрослые особи большой ложноконской пиявки достигают в длину 10 см, при ширине 1,5 см; иногда попадаются гигантские экземпляры – до 15-16 см в длину. Спина взрослой особи *H. sanguisuga* черная с коричневатым оттенком, на ее поверхности могут быть разбросаны темные пятна, а у молодых экземпляров основ-

ной фон спины более светлый, чем у взрослых, и на нем нередко виден правильный узор. Брюхо серое или зеленовато-серое, боковые желтые ленты часто отсутствуют. Задняя присоска невелика (меньше половины наибольшей ширины тела) (Лукин, 1976).

Пиявки были отловлены в девяти водных объектах различных климатогеографических зон Евразии и приобретены на четырех биофабриках России (рис. 2.1.4).



Рисунок 2.1.4 – Картограмма регионов мест отлова и приобретения пиявок: кружками обозначены водные объекты, звездами – биофабрики

Для изучения видовой и климатогеографической изменчивости аминокислотного обмена кровососущих и хищных пиявок исследовано восемь водных объектов различных регионов Евразии, в шести из которых отловлены особи лечебной пиявки *H. medicinalis*: р. Лесной Воронеж (Тамбовская область), оз. Горелое (Харьковская область 1), р. Уды (Харьковская область 2), оз. Глубокое (Луганская Народная Республика), оз. Дамба (Алтайский край 1), р. Тогул (Алтайский край 2); в трех – особи аптечной пиявки *H. verbana*: оз. Горелое, ерик Судомойка (Волгоградская область), р. Челбас (Краснодарский край); в шести – особи ложноконской

пиявки *H. sanguisuga*: оз. Горелое, р. Уды, оз. Глубокое, р. Лесной Воронеж, ер. Судомойка, р. Челбас.

Оценку влияния сезонного и возрастного факторов и хронического голодания (семь месяцев у гематофагов и пять месяцев у хищников) на аминокислотный состав тканей проводили с использованием особей *H. verbana*, отловленных в р. Челбас (Краснодарский край) и *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 аминокислотного состава тканей на разных этапах онтогенеза особи аптечной пиявки *H. verbana* («нитчатки», вышедшие из коконов, и пиявки в возрасте 1, 3, 5, 7 и 9 месяцев) были предоставлены администрацией биофабрики «МЦМП».

Секрет слюнных желез отбирали у взрослых особей *H. verbana*, выращенных на биофабрике «МЦМП», и у аптечных пиявок из природных популяций Краснодарского края, доставленных на данное производство для размножения.

Влияние хронического голодания (в течение 3, 5, 7, 9 и 12 месяцев) на динамику содержания свободных аминокислот в тканях *H. verbana* исследовали у особей, выращенных на предприятии «Гирудо-Мед.Юг».

Всего в исследованиях было использовано 943 особи пиявок. Из них 120 особей *H. medicinalis* (60 из природных популяций и 60 выращенных на биофабрике), 678 пиявок *H. verbana* (230 из природных популяций и 448 из гирудокультуры), 145 экземпляров *H. sanguisuga*.

## *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).

Для исследования географической изменчивости аминокислотного спектра тканей все три вида пиявок были отловлены в первую (регионы европейской части России) и последнюю (Алтайский край) декады мая. Для изучения сезонных особенностей аминокислотного 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. Физико-географическая и экологическая характеристика регионов исследования**

### *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  $-10,5^{\circ}\text{C}$  на юго-западе,  $-11,5^{\circ}\text{C}$  на востоке; июля  $19,5^{\circ}\text{C}$  на севере и  $20,5^{\circ}\text{C}$  на юге. Среднегодовая температура составляет  $6,1^{\circ}\text{C}$ . Осадков выпадает на юге и юго-востоке до 450 мм, на севе-

ре 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 (бассейн Дона). Водные ресурсы включают также порядка 900 прудов и водохранилищ с общим объемом воды 534,5 млн. м<sup>3</sup> (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 водоохранный объект города Мичуринска, 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°38'с.ш.; 40°15'в.д.), расположенном 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*.

### *Харьковская область*

Харьковская область расположена 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  $-8,4^{\circ}\text{C}$ , июля  $20-21,4^{\circ}\text{C}$ . Среднегодовая температура составляет  $8,1^{\circ}\text{C}$ . Среднегодовое количество 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 реки: Уды, Мжа, Берека, Балаклея, Волчья, Великий Бурлук. Имеются озера: Лиман, Боровое, Чайка, Лебяжье и др. Созданы 2 крупных водохранилища – Печенежское (380 млн. м<sup>3</sup>) на Северском Донце и Краснооскольское (480 млн. м<sup>3</sup>) 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, расположенное 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: *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 распаханна. 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 промышленности, 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°23'с.ш.; 37°37'в.д.). Отловлены особи медицинских пиявок *H. medicinalis* и хищных *H. sanguisuga*.

### ***Луганская Народная Республика***

Луганская Народная Республика (ЛНР) расположена на юго-западе России. Поверхность региона представляет собой волнистую равнину, повышающуюся от долины Северского Донца к северу (высота до 200 м и более) и к югу, где расположен Донецкий кряж. ЛНР 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 природного заповедника. 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 ЛНР 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 природного заповедника в 500 м от станции Луганская, на границе лесной и лесостепной зон (48°40'с.ш.; 39°28'в.д.).

### ***Волгоградская область***

Волгоградская область расположена на юго-востоке Восточно-Европейской равнины. Делится рекой Волгой на 2 части: западную – правобережную и восточную – Заволжье. Правобережье более возвышенно, 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°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 весеннее 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 полынь 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 искусственному 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 беспозвоночных 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°35'с.ш.; 45°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°C. Сумма осадков за период активной вегетации составляет 270-300 мм. Осадки летнего периода в условиях высоких температур и низкой относительной влажности (62-65%) усилен-

но 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 км<sup>2</sup> (Парахуда, 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).

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 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 предгорья (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  $-20^{\circ}\text{C}$  на севере до  $-17^{\circ}\text{C}$  на юго-востоке и  $-15^{\circ}\text{C}$  на юге. Лето умеренно теплое; на юго-востоке жаркое. Средняя температура июля  $16^{\circ}\text{C}$  на севере и  $1^{\circ}\text{C}$  на юго-востоке. Среднегодовая температура составляет  $2,3^{\circ}\text{C}$ . 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 водоемов – 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 протекают 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 гор-

ную 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 км<sup>2</sup>. На реках построено 122 водохранилища с объемом более 1,0 млн. м<sup>3</sup> каждое, с общим суммарным объемом воды 2445 млн. м<sup>3</sup>. Имеется также более 400 прудов с объемом от 50 до 900 тыс. м<sup>3</sup>. 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 горнометаллургическим 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..., 2022).

Между тем на Урале сохранились в достаточном количестве заповедные, охранные, антропогенно ненарушенные экосистемы, на территории которых изучение и сохранение биоразнообразия являются приоритетными задачами (Экологический контроль..., 2019; Мониторинг..., 2022).

**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 км<sup>2</sup>. В водоем впадают речки Пушкариха, Черемшанка, Черная, Марья, Липовка и др. Берега водоема преимущественно пологие, местами каменистые, в основном заняты лесом, кое-где встречаются кустарниковые болота и пастбищно-луговые угодья. По качеству воды водоем можно отнести к гидрокарбонатно-кальциевому типу со средней степенью минерализации и сла-

бощелочной 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; Чеботина, 2022).

По литературным данным, концентрация радионуклида  $^{137}\text{Cs}$  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°49'с.ш.; 61°19'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 орошается реками бассейна Оби и ее истоков – Бии и Катунь, 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  $-19^{\circ}\text{C}$ , 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 межгорных 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 вы-

сокогорных 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 хозяйственно-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. sanguisuga*, располагается в Косихинском районе, вблизи села Красиловое, 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 суходольного 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 ча-

сти, 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°26'с.ш.; 85°54'в.д.) – правый приток р. Уксуеная, 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 первую декаду мая 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 первую декаду мая 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  $+22^{\circ}\text{C}$ . Размеры респираторной камеры позволяли проводить эксперимент при нахождении животного в состоянии покоя (рис. 2.3.1).

Расчёт количества кислорода, потребляемого пиявками, проводили по формуле:

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

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

$P$  – масса пиявки в граммах;

$V$  – объем газовой смеси, мл;

60 – пересчётный 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. verbanus* в респираторной камере

### 2.3.2. Анализ аминокислотного состава биосубстратов пиявок

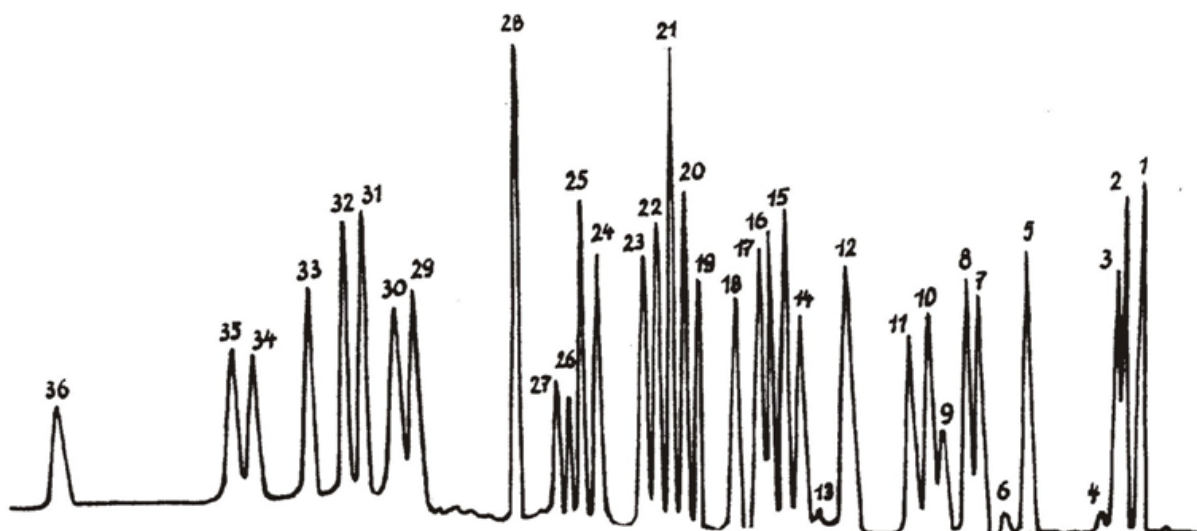
Концентрацию свободных аминокислот в кожно-мышечной ткани и в секрете слюнных желез (ССЖ) пиявок определяли методом ионообменной жидкостной хроматографии на автоматическом анализаторе ААА-339М (Чехия, Микротехна) (Козаренко, 1975) при температуре 38°C, 57°C и 64°C в системе, состоящей из пятиступенчатого градиента литий-цитратного буфера: № 1 – 0,18 *n*, рН 2,90, № 2 – 0,20 *n*, рН 3,1, № 3 – 0,35 *n*, рН 3,35, № 4 – 0,33 *n*, рН 4,05, № 5 – 1,2 *n*, рН 4,9. Колонка: 0,47 × 24,0 см, неподвижная фаза – катионообменная смола Ostion LG FA. Рабочие параметры анализатора: пределы концентраций 0,5-100 нМ, воспроизводимость – лучше, чем 3% при 25 наномолях, чувствительность – 0,05 наномолей.

Послеколоночная модификация аминокислот проводилась с нингидрином, интенсивность его окрашивания измеряли при 525 нм. Для каждой серии опытов

прописывали хроматограмму стандартной смеси АК из 36 компонентов (0,1  $\mu\text{моль/л}$ ): цистеиновая кислота, таурин, фосфоэтанолламин, мочеви́на (10x), аспараги́новая кислота, гидроксипролин, треонин, серин, аспарагин, глутами́новая кислота, глутамин,  $\alpha$  – аминокадипи́новая кислота, пролин, глицин, аланин, цитруллин,  $\alpha$ -аминома́сляная кислота, валин, 1,2-цистин, метионин, цистатионин, изолейцин, лейцин, тирозин, фенилаланин,  $\beta$ -аланин,  $\beta$ -аминоизома́сляная кислота,  $\gamma$ -аминома́сляная кислота, этаноламин, аммиак, орнитин, лизин, гистидин, 1-метилгистидин, 3-метилгистидин, аргинин (LaChema, Чехия) (рис. 2.3.1). В качестве внутреннего стандарта использовали норлейцин (2,5  $\mu\text{моль/л}$ , LaChema, Чехия).

Для количественной оценки рассчитывали коэффициент цветности АК (отношение площади пика отдельной аминокислоты к площади пика норлейцина). Концентрацию свободных аминокислот в образцах определяли соотношением полученных коэффициентов цветности в пробе и в стандартной смеси. Для каждого исследуемого образца на хроматограмме прописывали весь спектр свободных АК (каждая аминокислота представлена отдельным пиком) и определяли концентрацию каждой из них в  $\mu\text{моль/100г}$   $\mu\text{моль/мл}$  и в % от суммарного содержания. Рассчитывали суммарные концентрации метаболических групп аминокислот: заменимых (ЗАК), незаменимых (НАК), с разветвленной углеродной цепью (АКРУЦ: валин, лейцин, изолейцин), ароматических (АРАК: фенилаланин, тирозин), серосодержащих (ССАК: цистеиновая кислота, цистеин, метионин).

Подготовка проб. Для анализа брали 1 грамм охлажденной влажной ткани и гомогенизировали в 3 мл фосфатного буфера (рН 7,4). Гомогенаты тканей и нативный секрет слюнных желез центрифугировали при 10000 об/мин 15 минут в рефрижераторной ультрацентрифуге К-23D. К супернатанту в количестве 0,4-1,0 мл добавляли 0,1 мл 30%-й сульфосалициловой кислоты для осаждения белков и вторично центрифугировали при 8000 об/мин 30 минут на ультрацентрифуге. К полученному супернатанту (в количестве 1 мл) добавляли 0,2 мл 7%-го гидроксида лития и 0,1 мл норлейцина. Супернатант, подготовленный для анализа, наносили на колонку аминокислотного анализатора.



- |                                   |                                 |                                       |
|-----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|
| 1. цистеиновая кислота            | 13. пролин                      | 25. фенилаланин                       |
| 2. таурин                         | 14. глицин                      | 26. <u>β-аланин</u>                   |
| 3. <u>фосфоэтаноламин</u>         | 15. аланин                      | 27. <u>β-аминоизомасляная кислота</u> |
| 4. мочевина                       | 16. <u>цитруллин</u>            | 28. <u>γ-аминомасляная кислота</u>    |
| 5. аспарагиновая кислота          | 17. <u>α-аминомасляная к-та</u> | 29. <u>этаноламин</u>                 |
| 6. <u>гидроксипролин</u>          | 18. валин                       | 30. аммиак                            |
| 7. треонин                        | 19. цистеин                     | 31. орнитин                           |
| 8. серин                          | 20. метионин                    | 32. лизин                             |
| 9. аспарагин                      | 21. <u>цистатионин</u>          | 33. гистидин                          |
| 10. глютаминовая кислота          | 22. изолейцин                   | 34. 1-метилгистидин                   |
| 11. глютамин                      | 23. лейцин                      | 35. 3-метилгистидин                   |
| 12. <u>α-аминоадипиновая к-та</u> | 24. тирозин                     | 36. аргинин                           |

Рисунок 2.3.2 – Стандартный спектр свободных аминокислот

### 2.3.3. Методика отбора секрета слюнных желез медицинских пиявок

Закономерности формирования аминокислотного спектра секрета слюнных желез изучали на примере модельного вида аптечной пиявки *H. verbana* различных эколого-физиологических групп: особи, выращенные на предприятии «Международный центр медицинской пиявки» («МЦМП», Московская область, Раменский район, ст. Удельная) и пиявки из природных популяций Краснодарского края, доставленные на биофабрику для размножения. Период голодания экспериментальных особей составил пять месяцев.

Секрет слюнных желез (ССЖ) получали согласно общепринятой методике (Патент..., 1995). На головной конец зафиксированной пиявки клали несколько

кристалликов хлористого натрия для стимуляции 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).

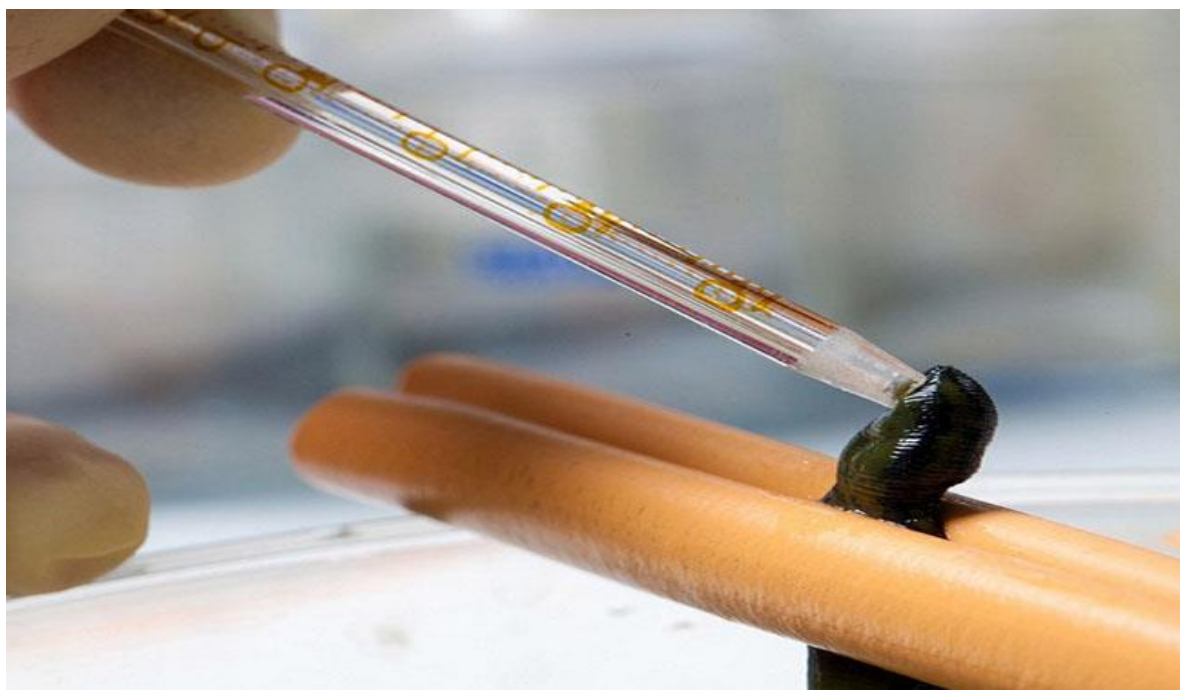


Рисунок 2.3.3 – Отбор секрета слюнных желез у медицинской пиявки

Для исследования аминокислотного состава ССЖ было использовано 200 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, Ink., 1984–2001) и «Microsoft Excel».

Данные представлены как среднее арифметическое и стандартная ошибка ( $\bar{X} \pm SE$ ).

При статистической обработке использовали однофакторный дисперсионный и корреляционный анализы; исходные показатели концентраций свободных аминокислот 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). Различия с контролем оценивали тестом Даннета (Dunnet test). Допущения, существенные для применения дисперсионного анализа, проверяли с помощью тестов: Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk test) – нормальное распределение; Левена (Levene's test) – однородность дисперсий.

Корреляционные связи между уровнем содержания свободных аминокислот в тканях пиявок и их возрастом, а также продолжительностью голодания оценивали с помощью рангового коэффициента корреляции Спирмена –  $r_s$ . В этом случае использовали номинальные показатели концентраций.

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. ВИДОВЫЕ, ТРОФИЧЕСКИЕ И КЛИМАТОГЕОГРАФИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ТКАНЕЙ ЧЕЛЮСТНЫХ ПИЯВОК ИЗ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

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. Изменение 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).

К настоящему времени в научной литературе практически отсутствуют сведения об аминокислотном составе тканей медицинских пиявок из природных популяций, тем более в географическом аспекте, а закономерности адаптивных особенностей по отношению к абиотическим и биотическим факторам изучены недостаточно полно.

В данном разделе обсуждаются видовые, популяционные, географические особенности содержания свободных аминокислот и их производных в тканях медицинских пиявок *H. medicinalis* и *H. verbana*. Для оценки трофических особенностей аминокислотного обмена гирудинид нами представлены данные и по аминокислотному 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 аминокислотного спектра тканей челюстных 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).

Однако 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* – r-стратег (Petrauskiene et al., 2011).

Согласно зоогеографическим данным, ареалы *H. verbana* и *H. medicinalis* пересекаются крайне редко и синтопия, как таковая, является необычным фактом для медицинских пиявок, которые имеют довольно разделенные ареалы с неболь-

шими точками перекрытия (Utevsky et al., 2010; Kovalenko, Utevsky, 2012) (рис. 3.1.1).

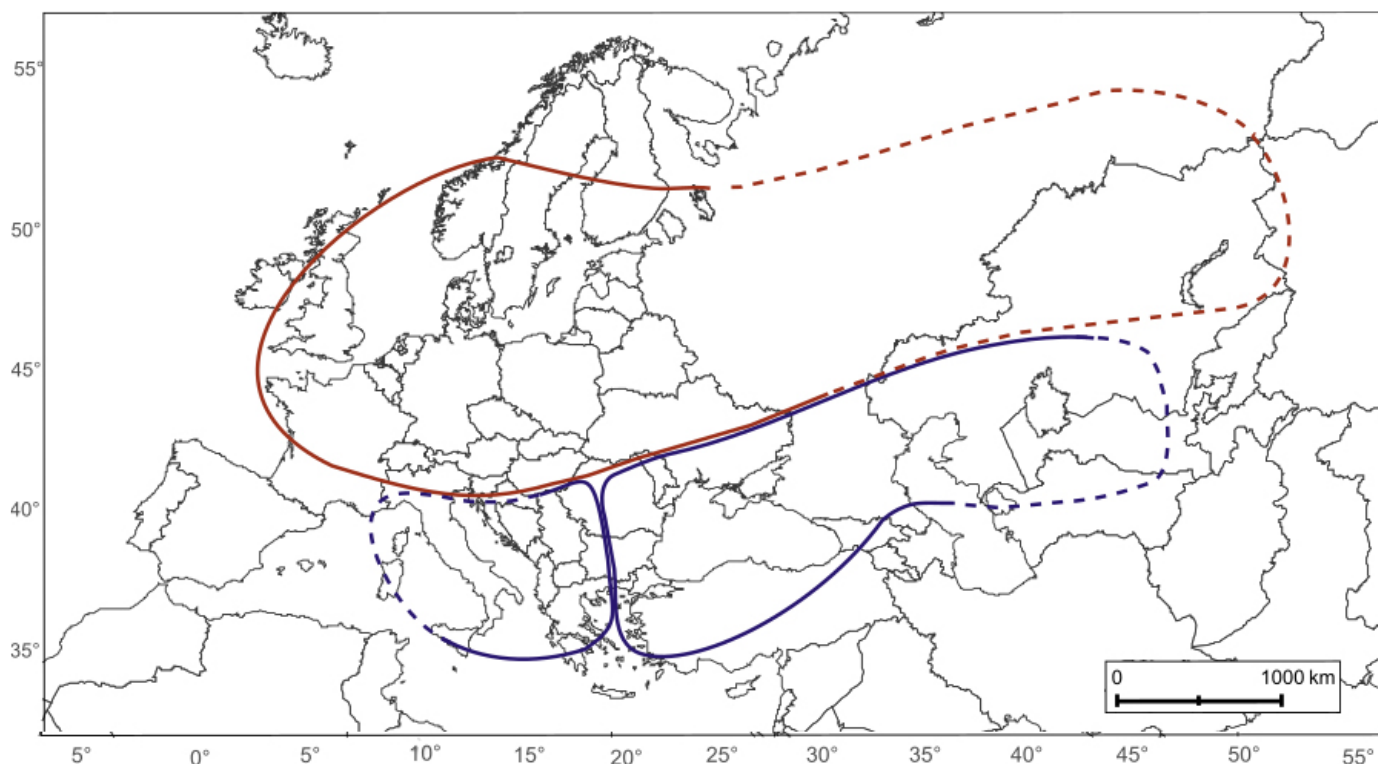


Рисунок 3.1.1 – Ареалы *Hirudo medicinalis* (на севере) и *H. verbana* (на юге) с западной и восточной филогруппами последнего (Kovalenko, Utevsky, 2012)

Первый случай совместного обитания медицинских пиявок *H. verbana* и *H. medicinalis* был зафиксирован в районе оз. Балатон в Венгрии (Nesemann, Neubert, 1999), а второй известный случай был отмечен в озере Горелое (Харьковская область) (Kovalenko, Utevsky, 2012). В одном из этих водоемов, в озере Горелое, авторами были отловлены особи обоих видов медицинских пиявок, а также хищные пиявки *H. sanguisuga*, что предоставило уникальную возможность оценить видовую и трофическую специфику их аминокислотного статуса.

Методом ионообменной хроматографии определено 23 аминокислоты и их производных в тканях медицинских пиявок *H. verbana* и *H. medicinalis* и ложноконской пиявки *H. sanguisuga*, обитающих в равных экологических условиях одного водоема (озеро Горелое, Харьковская обл.) (табл. 3.1.1).

Таблица 3.1.1 – Содержание свободных аминокислот (АК, мкмоль/100г) в тканях медицинских и большой ложноконской пиявок при совместном обитании (оз. Горелое, Харьковская область)

АК, мкмоль/100г	1. <i>H. medicinalis</i> n = 10	2. <i>H. verbana</i> n = 10	3. <i>H. sanguisuga</i> n = 10	ANOVA F (2, 27); p
Cysteic Acid	24,60±0,17 <sup>2</sup>	23,66±0,28 <sup>1</sup>	11,46±0,41	395,5; 0,000
Taurine	следы	следы	следы	–
Aspartic Acid	360,31±7,21	502,65±10,03	115,43±3,89	924,4; 0,000
Threonine	67,80±1,88	88,65±2,25	114,28±2,49	107,4; 0,000
Serine	91,81±2,11	105,02±2,08	143,43±4,10	87,68; 0,000
Asparagine	следы	следы	следы	–
Glu+ Gln	623,84±6,84	521,05±4,85 <sup>3</sup>	540,50±6,70 <sup>2</sup>	75,05; 0,000
Proline	11,40±0,43	21,24±0,44	36,48±3,65	70,78; 0,000
Glycine	117,71±3,01 <sup>2</sup>	126,37±3,45 <sup>1</sup>	154,28±4,20	27,11; 0,000
Alanine	246,50±2,47	218,99±3,33	292,31±4,87	102,9; 0,000
Valine	59,70±0,82	65,98±1,67	114,27±3,94	177,9; 0,000
Cystine	8,06±0,05	6,73±0,05	10,10±0,46	50,18; 0,000
Methionine	14,10±0,05	15,96±0,60	18,23±0,45	20,91; 0,000
Isoleucine	16,50±0,06	13,21±0,04	38,30±3,02	106,4; 0,000
Leucine	56,50±2,45	67,59±1,61	109,01±3,52	95,64; 0,000
Tyrosine	11,30±0,06	15,21±0,19	30,38±2,81	68,09; 0,000
Phenylalanine	30,11±0,16 <sup>2</sup>	28,98±0,06 <sup>1</sup>	45,30±1,92	94,24; 0,000
GABA	2,52±0,19 <sup>2</sup>	2,43±0,02 <sup>1</sup>	10,55±0,39	383,9; 0,000
Ornithine	21,30±0,06	26,34±0,16 <sup>3</sup>	26,49±2,29 <sup>2</sup>	4,85; 0,016
Lysine	23,40±0,05	27,50±0,09	108,49±4,67	1061; 0,000
Histidine	1,65±0,03	2,38±0,03	17,32±0,44	4074,1; 0,000
Arginine	3,04±0,03 <sup>2</sup>	2,93±0,02 <sup>1</sup>	7,47±0,22	758,56; 0,000
Фонд АК	1792,15±14,78	1882,87±22,76 <sup>3</sup>	1944,08±31,97 <sup>2</sup>	9,93; 0,001
НАК	272,80±3,51	313,18 ± 3,23	572,67±11,11	717,92; 0,000
ЗАК	1470,93±11,75 <sup>2</sup>	1517,27 ± 20,74 <sup>1</sup>	1322,91±22,85	28,34; 0,000
НАК/ЗАК	0,19	0,21	0,43	

Примечание: надстрочными цифрами обозначено отсутствие статистически значимых различий между группами (Tukey HSD test,  $p > 0,05$ )

При этом суммарный фонд свободных АК у аптечной пиявки *H. verbana* оказался значимо выше, чем у лечебной *H. medicinalis* ( $p < 0,05$ ), что согласуется с ранее полученными данными по видовым различиям показателей основного и микроэлементного обмена этих медицинских пиявок (Черная и др., 2012, 2019а).

Показано, что общей тенденцией для представителей обоих видов МП является следовое содержание аспарагина и таурина (табл. 3.1.1). Ранее нами было установлено, что серосодержащая аминокислота таурин играет важную роль в обменных процессах пиявок на ранних этапах онтогенеза (Ковальчук и др., 2012, Черная, Ковальчук, 2014а).

Поскольку в данном случае исследовался АК спектр тканей взрослых особей МП, невысокий уровень таурина в их организме вполне объясним. А крайне низкое тканевое содержание аспарагина, который является амидом аспарагиновой кислоты, компенсируется высоким содержанием последней.

Обнаружено, что основу аминокислотного пула тканей обоих видов МП составляют аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота и глутамин, аланин, общее содержание которых достигает у *H. medicinalis* 69% от суммарного фонда АК, у *H. verbana* – 67%. Данные заменимые АК принято называть первичными, поскольку они синтезируются в природе путем реакций прямого или восстановительного аминирования; остальные АК образуются в результате их переаминирования и являются вторичными.

Высокий уровень триады «Glu-Asp-Ala» отмечен авторами не только в тканях пиявок различных таксонов, но и в организме земноводных и млекопитающих (Черная, Ковальчук, 2008; Ковальчук, 2008; Мищенко и др., 2018; Ковальчук и др., 2018, 2019, 2021, 2022, 2023, 2024).

Глутаминовая кислота (глутамат) служит предшественником при синтезе белков и других биологически активных соединений, обладает противогипоксическими свойствами, повышая компенсаторные возможности организма. Она в определенной мере берет на себя биохимические функции иммуностимулирующего аргинина, который содержится в тканях медицинских пиявок в небольших количествах.

Аспарагиновая кислота (аспартат) обладает антигипертензивным свойством, снижая токсичность чужеродных соединений, способствуя нормализации функционального состояния организма при токсических поражениях. Отмечена ключевая роль аспартата и глутамата в обезвреживании аммиака, образующегося в процессе жизнедеятельности животных тканей (Ленинджер, 1985).

Аланин является одним из источников глюкозы в организме. Усиленное образование аланина в мышцах и выход его в циркуляцию наблюдается при мышечной деятельности и гипоксии, и наиболее характерно для плавающих и ныряющих животных (Шарманов, Мухамеджанов, 1981; Западнюк и др., 1982). Высокое содержание аланина и глутамината идет на поддержание азотистого баланса и уровня глюкозы, что обеспечивает организм пиявок необходимым количеством энергии, требуемой для жизнеобеспечения.

Значительный вклад в аминокислотный фонд тканей обоих видов медицинских пиявок вносят глицин и серин. Глицин вместе с глутаминовой кислотой и цистеином обеспечивают биосинтез глутатиона, который участвует в ферментативных и неферментативных реакциях, снижающих токсичность свободных радикалов и перекисей в организме (Зайко и др., 1996; Мазо, 1998). Протеиногенная АК серин активно участвует в укреплении иммунной системы, обеспечивая ее антителами, и способствует запасанию гликогена в мышцах.

В тканях обоих видов медицинских пиявок отмечено достаточно высокое содержание незаменимых АК треонина, валина и лейцина (табл. 3.1.1). Треонин поддерживает нормальный белковый баланс в организме, играет важную роль в образовании коллагена и эластина, участвует в синтезе антител, повышает иммунитет. Валин необходим для восстановления тканей и поддержания азота в организме, участвует в синтезе гликогена, оказывает иммуностимулирующее действие. Лейцин способствует репарации кожно-мышечной ткани, и наряду с валином и изолейцином, используется мышцами в качестве дополнительного источника энергии.

Высокий уровень тканевого содержания вышеупомянутых аминокислот (Asp, Glu + Gln, Ala, Gly, Ser, Thr, Val, Leu) обеспечивает медицинским пиявкам

интенсивное наращивание мышечной массы и высокую иммунную и энергетическую поддержку в период выхода из продолжительного зимнего анабиоза, когда реализуются наиболее важные этапы их биологического цикла (размножение и рост).

Несмотря на сходство качественной структуры аминокислотного фонда тканей медицинских пиявок, была выявлена его видовая специфика. По нашим данным, в тканях особей *H. medicinalis* и *H. verbana* сопоставимы концентрации только пяти аминокислот – цистеиновой кислоты, глицина, фенилаланина,  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, аргинина ( $p > 0,05$ ) (табл. 3.1.1).

У лечебной пиявки *H. medicinalis*, по сравнению с аптечной *H. verbana*, отмечены более высокие концентрации глутамата, аланина, цистеина, изолейцина на фоне значимо низкого содержания аспарагиновой кислоты, серина, пролина, тирозина и орнитина ( $p < 0,001$ ). Существенный вклад в количественные различия свободных АК у медицинских пиявок вносит пул незаменимых АК аптечной пиявки, повышенный за счет треонина, лейцина, лизина и гистидина ( $p < 0,001$ ).

Наибольшие видовые различия характерны для тканевого содержания пролина и гистидина, концентрации которых у *H. verbana* превосходит таковые у *H. medicinalis* в 1,9 и 1,4 раз, соответственно ( $p < 0,001$ ). Пролин является составным элементом коллагена, поддерживает в нормальном состоянии соединительные ткани, и, вероятно, у аптечной пиявки *H. verbana* компенсирует пониженный уровень изолейцина, обладающего аналогичными свойствами. Гистидин, благодаря чрезвычайно высокой способности образовывать устойчивые связи с тяжелыми металлами, участвует в процессах их детоксикации и элиминации (Peson, Powell, 1981). Значительный рост гистидина у *H. verbana* обусловлен, скорее всего, повышенным содержанием в ее тканях токсичных металлов Ni и Cd (Черная и др., 2019а).

Таким образом, показано, что в равных экологических условиях одного водоема для представителей двух видов медицинских пиявок характерна специфика аминокислотного обмена, обусловленная их физиологическими особенностями, в том числе приуроченностью к обитанию в разных климатогеографических усло-



виях. Полученные результаты представляются особенно важными, поскольку могут служить дополнительными критериями самостоятельности видов медицинских пиявок *H. medicinalis* и *H. verbana*, которые, как было отмечено, до недавнего времени имели подвидовой статус.

Методом главных компонент визуализирована четкая дифференциация аптечной *H. verbana* и лечебной *H. medicinalis* пиявок согласно видоспецифичности аминокислотного спектра их тканей (рис. 3.1.2, табл. 3.1.2).

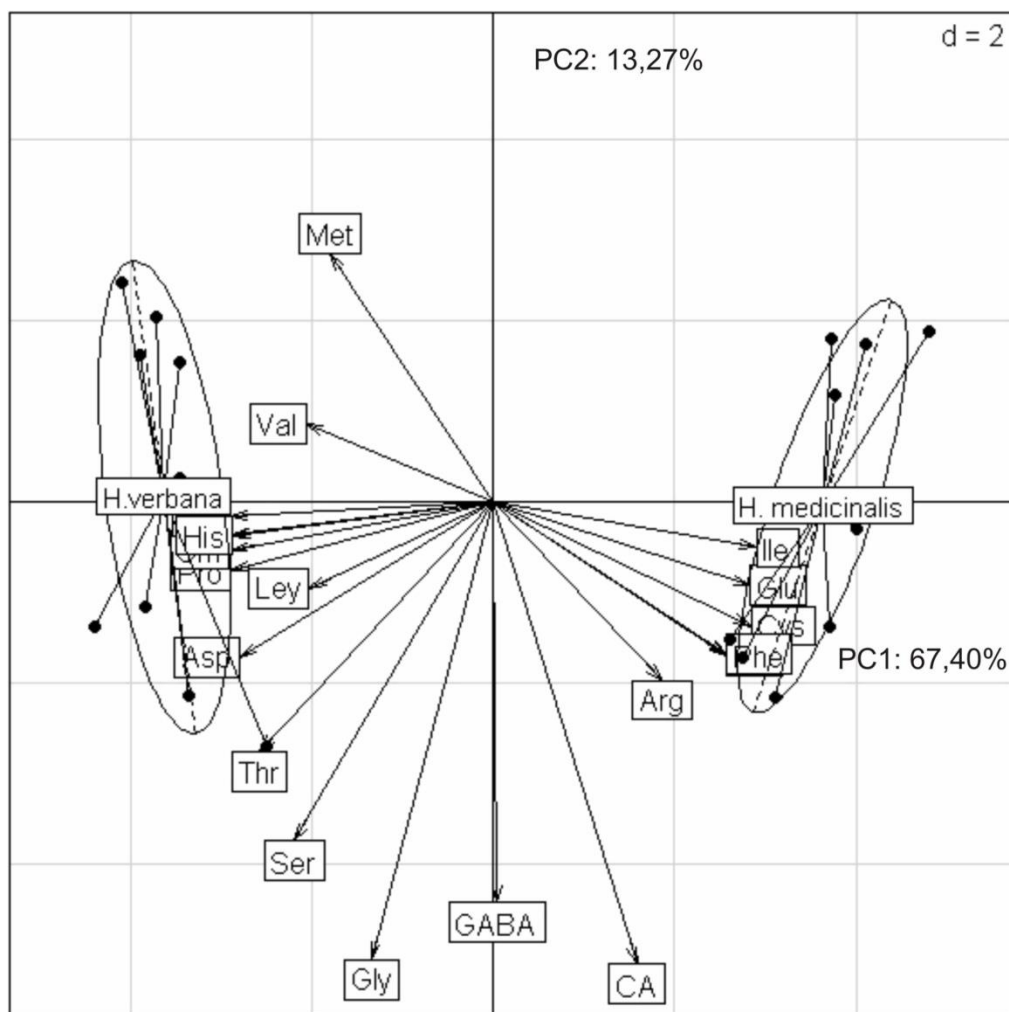


Рисунок 3.1.2 – Свободные аминокислоты (1г мкмоль/100г) тканей симпатричных видов медицинских пиявок *H. verbana* и *H. medicinalis* в пространстве главных компонент

На рисунке показана существенная пространственная удаленность особей *H. verbana* и *H. medicinalis* по первой главной компоненте (PC1), на которую при-

ходится 67,40% общей дисперсии данных, определяющей видовые различия аминокислотного состава тканей медицинских пиявок.

Таблица 3.1.2 – Результаты компонентного анализа свободных аминокислот (АК, 1г мкмоль/100г) в тканях симпатричных видов медицинских пиявок

АК, 1г мкмоль/100г ( $i = 20$ )	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
Cysteic Acid	0,53*	-0,76***	2,11	21,92
Aspartic Acid	-0,94***	-0,26	6,61	2,48
Threonine	-0,87***	-0,41	5,62	6,41
Serine	-0,74***	-0,56*	4,08	11,82
Glu+ Gln	0,96***	-0,13	6,80	0,72
Proline	-0,98***	-0,11	7,07	0,49
Glycine	-0,46*	-0,76***	1,54	21,52
Alanine	0,87***	-0,25	5,59	2,42
Valine	-0,70***	0,13	3,61	0,62
Cystine	0,96***	-0,21	6,81	1,59
Methionine	-0,61**	0,41	2,72	6,34
Isoleucine	0,98***	-0,08	7,15	0,22
Leucine	-0,69***	-0,14	3,51	0,78
Tyrosine	-0,97***	-0,06	7,05	0,12
Phenylalanine	0,87***	-0,25	5,59	2,39
GABA	0,01	-0,66**	0,00	16,49
Ornithine	-0,98***	-0,08	7,10	0,24
Lysine	-0,98***	-0,02	7,10	0,02
Histidine	-0,97***	-0,06	6,98	0,11
Arginine	0,63**	-0,30	2,94	3,29
	Собственные значения (eigenvalues, $\lambda_j$ ) PC		Дисперсия, объясненная PC (%)	
	13,48	2,65	67,40	13,27

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

Наибольший вклад в PC1, более 6,60%, вносят аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота и глутамин, пролин, цистеин, изолейцин, тирозин, орнитин, ли-

зин, гистидин, коэффициенты корреляции которых с первой компонентой превышают  $\pm 0,90$  (табл. 3.1.2).

Наиболее значимый вклад, более 16,48%, во вторую главную компоненту (PC2), на которую приходится 13,27% общей дисперсии данных, вносят цистеиновая кислота, глицин и  $\gamma$ -аминомасляная кислота, для концентраций которых не было выявлено межвидовых различий (табл. 3.1.2, рис. 3.1.2).

При анализе **трофических особенностей** было обнаружено, что суммарные концентрации свободных АК тканей челюстных пиявок изменяются в ряду *H. medicinalis* < *H. verbana*  $\leq$  *H. sanguisuga*. Показано, что у аптечной пиявки *H. verbana* суммарный фонд АК сопоставим с таковым хищной пиявки *H. sanguisuga* ( $p > 0,05$ ) (табл. 3.1.1). Для тканей хищных пиявок, также как и для гематофагов, характерно следовое содержание таурина и аспарагина, а доминирующими аминокислотами являются аспарагиновая кислота и аланин.

Невысокие различия в исходном уровне азотистого метаболизма и идентичный качественный состав аминокислотного спектра тканей хищных и кровососущих гирудинид обусловлены, скорее всего, общностью эволюционного происхождения и биологии развития семейства челюстных пиявок. Ранее авторами было показано, что пиявки, принадлежащие к различным семействам (*Erpobdellidae*, *Glossiphoniidae*, *Hirudinidae*), при совместном обитании отличаются видовой спецификой аминокислотного состава тканей, а суммарный фонд свободных АК в тканях глоточной пиявки *Erpobdella octoculata* и плоской пиявки *Glossiphonia complanata* был в 1,5-2,5 раз ниже, чем у челюстных пиявок *H. verbana* и *H. sanguisuga* (Черная, Ковальчук, 2008).

Результаты однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) показали, что уровень содержания всех свободных АК зависит от видовой принадлежности пиявок ( $p < 0,05$ ). Наибольшая изменчивость выявлена для цистеиновой кислоты, аспарагиновой кислоты,  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, лизина, гистидина, аргинина и пула незаменимых АК ( $F_{2, 27} > 383,9$ ;  $p < 0,001$ ), наименьшая – для орнитина и суммарного фонда АК ( $F_{2, 27} < 10,0$ ;  $p < 0,05$ ) (табл. 3.1.1). Высокая межвидовая вариабельность обусловлена в первую очередь трофическим статусом пиявок.

Показано, что концентрации практически всех свободных аминокислот (исключая орнитин) в тканях хищников значимо отличаются от их содержания в тканях гематофагов ( $p < 0,01$ ).

Так, у *H. sanguisuga*, по сравнению с *H. medicinalis* и *H. verbana*, отмечено кратное снижение цистеиновой кислоты (более чем в 2 раза) и аспарагиновой кислоты (более чем в 3 раза) ( $p < 0,001$ ) и более низкий уровень глутамата, относительно такового у *H. medicinalis* ( $p < 0,001$ ). Концентрации остальных АК в тканях БЛП значимо выше, чем у МП ( $p < 0,001$ ). В тканях пиявки *H. sanguisuga* наибольшее превышение концентраций относительно особей *H. medicinalis* и *H. verbana* характерно для гистидина – в 10,5 и в 7,3 раз, лизина – в 4,6 и 4,1 раз,  $\gamma$ -аминомасляной кислоты – в 4,2 и 4,3 раз, изолейцина – в 2,3 и 2,9 раз, тирозина – в 2,7 и 2,0 раз, аргинина – в 2,5 раз, валина в – 1,9 и 1,7 раз, лейцина в – 1,9 и 1,6 раз, соответственно ( $p < 0,001$ ). Высокий уровень содержания гистидина, лизина, изолейцина, аргинина, валина, лейцина вносит существенный вклад в пул незаменимых АК тканей *H. sanguisuga*, который превышает эти показатели у МП в 2,1 и 1,8 раз ( $p < 0,001$ ) (табл. 3.1.1).

Авторами было показано, что у хищной глоточной пиявки *E. octoculata* пул незаменимых АК также выше, чем у кровососов различных семейств (Черная, Ковальчук, 2008). Вероятно, это связано с потенциальной способностью кровососущих пиявок к длительному голоданию, обусловленной, в свою очередь, редкими, не всегда гарантированными актами кровососания. Можно предположить, что изначально низкий уровень пула НАК в тканях гематофагов «настраивает» организм на дефицитное поступление этих АК извне в перспективе. У хищных пиявок, как правило, нет недостатка в пищевых ресурсах, поскольку спектр их жертв довольно широк – от беспозвоночных до мелких позвоночных. Таким образом, количественное состояние пула незаменимых АК является специфическим маркером эколого-физиологических особенностей хищных и кровососущих пиявок.

Многомерный анализ (РСА) исходных данных наглядно показал трофические различия аминокислотного состава тканей медицинских и ложноконских пиявок (рис. 3.1.3, табл. 3.1.3).

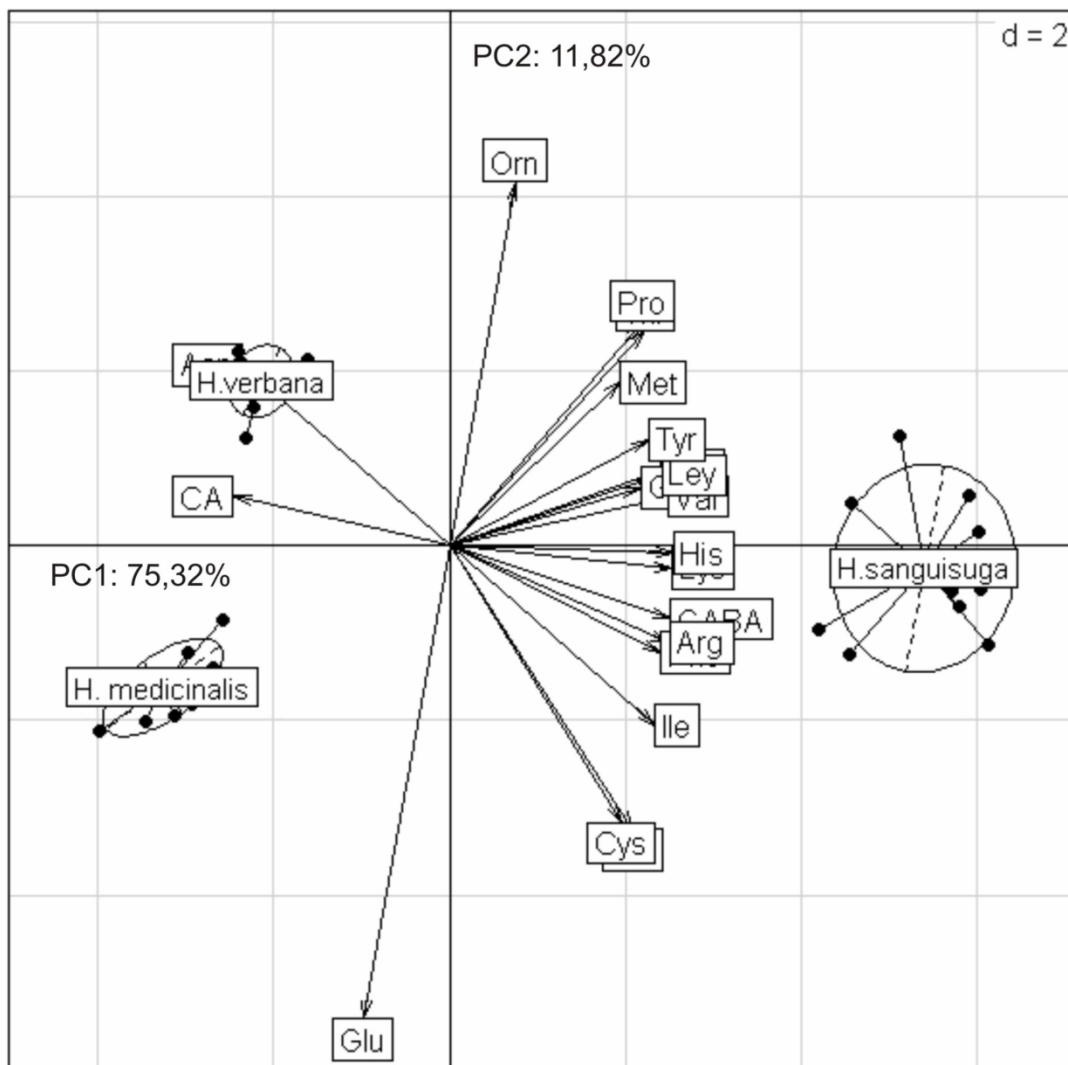


Рисунок 3.1.3 – Свободные аминокислоты (1g мкмоль/100г) тканей симпатричных видов челюстных пиявок в пространстве главных компонент

На рисунке отражена существенная пространственная удаленность хищной пиявки *H. sanguisuga* от медицинских пиявок по первой главной компоненте (PC1), на которую приходится 75,32% общей дисперсии исходных данных.

Таблица 3.1.3 – Результаты компонентного анализа свободных аминокислот (АК, 1г мкмоль/100г) в тканях симпатричных видов кровососущих и хищных пиявок

АК, 1г мкмоль/100г ( $i = 20$ )	Нагрузки (loadings, $a_{ij}$ )		Вклад в главную компоненту (Contribution = ( $a^2_{ij} \cdot 100$ )/ $\lambda_j$ , %)	
	Главные компоненты (Principal Components – PC), $j = 1, 2$			
	1	2	1	2
Cysteic Acid	-0,96***	0,09	6,08	0,32
Aspartic Acid	-0,92***	0,32	5,63	4,29
Threonine	0,86***	0,38*	4,94	6,09
Serine	0,93***	0,13	5,77	0,74
Glu+ Gln	-0,38*	-0,84***	0,98	29,51
Proline	0,85***	0,40*	4,84	6,60
Glycine	0,85***	0,10	4,74	0,45
Alanine	0,81***	-0,50**	4,36	10,57
Valine	0,97***	0,09	6,20	0,32
Cystine	0,76***	-0,49**	3,86	10,12
Methionine	0,76***	0,29	3,83	3,53
Isoleucine	0,91***	-0,32	5,53	4,24
Leucine	0,94***	0,12	5,89	0,65
Tyrosine	0,89***	0,19	5,20	1,49
Phenylalanine	0,94***	-0,19	5,85	1,52
GABA	0,98***	-0,13	6,38	0,71
Ornithine	0,29	0,64***	0,56	17,52
Lysine	0,99***	-0,04	6,49	0,07
Histidine	0,99***	-0,01	6,55	0,01
Arginine	0,98***	-0,17	6,32	1,26
	Собственные значения (eigenvalues, $\lambda_j$ ) PC		Дисперсия, объясненная PC (%)	
	15,06	2,36	75,32	11,82

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

Наиболее значимый вклад, более 5,60%, в PC1 вносят цистеиновая и аспарагиновая кислоты, повышенное содержание которых характерно для гематофагов, а также серин, валин, фенилаланин, ГАВА, лизин, гистидин, аргинин, максимальные концентрации которых отмечены в тканях хищной пиявки. Для этих АК выявлены очень высокие коэффициенты корреляции с первой компонентой (табл. 3.1.3).

Со второй компонентой (PC2) довольно сильно коррелируют глутаминовая кислота с глутамином и орнитин, а также отмечен наиболее значимый вклад этих АК в PC2, что наглядно демонстрирует отсутствие трофических различий по уровню содержания этих аминокислот, обсуждаемое выше.

Таким образом, несмотря на сходство качественной структуры аминокислотного спектра тканей трех симпатричных видов челюстных пиявок, количественные различия большинства свободных аминокислот свидетельствуют о трофической и видовой специфике азотистого метаболизма представителей *H. medicinalis*, *H. verbana*, *H. sanguisuga*.

## **3.2. Климатогеографические особенности аминокислотного фонда тканей кровососущих и хищных гирудинид**

Для оценки влияния климатогеографического фактора на формирование аминокислотного спектра тканей челюстных пиявок, или гирудинид, использованы взрослые особи *H. medicinalis*, *H. verbana*, *H. sanguisuga* из водных объектов различных регионов, отличающихся между собой широтной зональностью и среднегодовыми температурами: р. Лесной Воронеж (Тамбовская область, лесостепная зона, среднегодовая температура +6,1°C), оз. Горелое и р. Уды (Харьковская обл., лесостепь, +8,1°C), оз. Глубокое (ЛНР, лесостепь, +8,5°C), ерик Судомойка (Волгоградская обл., степь, +8,8°C), р. Челбас (Краснодарский край, степь, +11,9°C), оз. Дамба и р. 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 распространения более теплолюбивой аптечной пиявки *H. verbana* (Лукин, 1976).

Ранее авторами было показано (Черная и др., 2019, 2019а), что концентрации тяжелых металлов (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Pb) в донных отложениях рассматриваемых водоемов значительно ниже их кларков и соответствуют фоновым показателям, указанным для водных объектов европейской части бывшего СССР (Виноградов, 1962; Никаноров и др., 1993). Отмечено незначительное превышение фонового содержания Cd в донных отложениях водоемов Луганской Народной Республики (ЛНР), Волгоградской области, Краснодарского края (Черная и др., 2019а), что согласуется с литературными данными о высоком уровне накопления этого поллютанта за последние десятилетия в абиотических и биотических компонентах водных экосистем не только на импактных, но и на фоновых территориях (Степанова и др., 2007; Моисеенко, 2009; Решетняк и др., 2017). Было обнаружено, что концентрации ТМ в донных отложениях всех исследуемых водоемов располагаются в единой последовательности:  $Fe > Mn > Zn > Ni > Pb \geq Cu > Cd$ , и в то же время характеризуются значительной географической вариабельностью ( $F_{6,63} > 63,47$ ;  $p < 0,01$ ), что обусловлено разнообразием природных условий и степенью антропогенной трансформации ландшафтов изучаемых регионов (Черная и др., 2019а).

Авторами было показано, что географический фактор оказывает существенное влияние на микроэлементный состав тканей медицинских пиявок *H. medicinalis* и *H. verbana* ( $p < 0,05$ ) (Черная и др., 2019; 2019а). Установлено, что наибольшая географическая вариабельность концентраций в тканях медицинских пиявок, независимо от их видовой принадлежности, характерна для Fe, Ni ( $p <$



0,001), наименьшая – для Zn ( $p < 0,05$ ). Отмечена тенденция к изменению элементного баланса в тканях медицинских пиявок, обитающих в водных объектах промышленных регионов – повышенное содержание токсичных Ni, Cd, Pb и дефицит эссенциальных Zn, Mn, Fe, наиболее ярко выраженная у особей *H. verbana* (Волгоградская обл.) (Черная и др., 2019а).

Дисперсионный анализ (ANOVA) показал, что климатогеографический фактор оказывает существенное влияние и на состояние аминокислотного спектра тканей лечебной пиявки *H. medicinalis* ( $p < 0,001$ ) (табл. 3.2.1 и 3.2.1а) (Нохрина, Черная, 2009; Черная и др., 2016). В таблицах представлены данные по европейской (водные объекты Тамбовской и Харьковской областей, ЛНР) и сибирской (водные экосистемы Алтайского края) формам лечебной пиявки.

Суммарные концентрации свободных АК в тканях *H. medicinalis* из различных регионов изменяются в ряду географических популяций: тамбовская < харьковская<sub>1</sub> ≤ харьковская<sub>2</sub> ≤ луганская ≤ алтайская<sub>2</sub> ≤ алтайская<sub>1</sub>.

Примечательно, что у медицинских пиявок, обитающих в территориально близких водных объектах одного региона (оз. Горелое и р. Уды – Харьковская область; оз. Дамба и р. Тогул – Алтайский край), не выявлено статистически значимых различий между суммарными концентрациями АК ( $p > 0,05$ ).

Не обнаружено существенных различий и между аминокислотным фондом тканей *H. medicinalis* из оз. Глубокое (ЛНР) и пиявками из р. Уды (Харьковская обл. 1), оз. Дамба, р. Тогул (Алтайский край) (табл. 3.2.1-3.2.1а) ( $p > 0,05$ ).

В целом следует отметить повышенный уровень аминокислотного обмена у пиявок, обитающих в неблагоприятных климатических условиях на восточной границе ареала (Алтайский край), а также в экосистемах, отличающихся повышенным уровнем тяжелых металлов в среде обитания (ЛНР). Наиболее низкий уровень фонда АК отмечен у медицинских пиявок из р. Лесной Воронеж (Тамбовская обл.), для которых ранее были отмечены минимальные концентрации экотоксикантов Ni, Cd, Pb в тканях (Черная и др., 2019а).

Таблица 3.2.1 – Климатогеографическая вариабельность свободных аминокислот в тканях медицинской пиявки *H. medicinalis* (европейская форма)

АК, мкмоль/100г	1. Тамбовская область n = 10	2. Харьковская область 1 n = 10	3. Харьковская область 2 n = 10	4. ЛНР n = 10
Cysteic Acid	9,91±0,32 <sup>4</sup>	24,60±0,17 <sup>6</sup>	30,55±1,40	10,95±0,36 <sup>1</sup>
Aspartic Acid	343,73±7,49 <sup>2</sup>	360,31±7,21 <sup>1</sup>	407,01±7,53	448,73±8,83
Threonine	24,12±0,31	67,80±1,88 <sup>5,6</sup>	53,36±2,34	35,68±0,30
Serine	34,70±0,58	91,81±2,11 <sup>5</sup>	73,39±4,64 <sup>4</sup>	66,52±0,61 <sup>3</sup>
Glu+ Gln	486,78±3,36	623,84±6,84 <sup>5</sup>	586,56±7,76	800,55±3,76
Proline	20,58±0,53	11,40±0,43	50,53±2,91	33,75±0,17
Glycine	93,33±0,76 <sup>5</sup>	117,71±3,01 <sup>4</sup>	104,14±3,70 <sup>5</sup>	119,05±1,31 <sup>2</sup>
Alanine	171,85±0,82	246,50±2,47 <sup>5,6</sup>	275,01±6,96 <sup>4</sup>	264,97±1,17 <sup>3,5,6</sup>
Valine	26,99±0,69 <sup>4</sup>	59,70±0,82 <sup>3</sup>	61,71±4,43 <sup>2</sup>	27,17±0,54 <sup>1</sup>
Cystine	0,61±0,03	8,06±0,05	11,23±0,46	4,02±0,15 <sup>6</sup>
Methionine	14,88±0,32 <sup>2,3</sup>	14,10±0,05 <sup>1</sup>	16,66±0,75 <sup>1,5</sup>	8,27±0,47
Isoleucine	22,51±0,48	16,50±0,06 <sup>3</sup>	16,79±0,67 <sup>2</sup>	10,90±0,24
Leucine	46,64±0,71 <sup>4</sup>	56,50±2,45 <sup>3,4</sup>	60,73±2,42 <sup>2</sup>	50,58±2,02 <sup>1,2</sup>
Tyrosine	10,37±0,45 <sup>2</sup>	11,30±0,06 <sup>1</sup>	14,66±0,69 <sup>6</sup>	6,17±0,46
Phenylalanine	14,53±0,43	30,11±0,16 <sup>5</sup>	22,61±0,91	19,32±0,77
GABA	4,38±0,24 <sup>5</sup>	2,52±0,19	5,76±0,08 <sup>5</sup>	7,63±0,28
Ornithine	15,32±0,50 <sup>4,5,6</sup>	21,30±0,06	17,72±0,65 <sup>4,5</sup>	16,67±0,46 <sup>1,3,5,6</sup>
Lysine	22,53±0,58 <sup>2</sup>	23,40±0,05 <sup>1</sup>	36,53±2,36	16,29±0,57
Histidine	1,82±0,06	1,65±0,03	3,16±0,05	1,51±0,01
Arginine	следы	3,04±0,03 <sup>3</sup>	2,94±0,18 <sup>2</sup>	0,004±0,001
Фонд АК	1365,57±4,94	1792,2±14,78 <sup>3</sup>	1851,0±50,42 <sup>2,4</sup>	1948,7±11,47 <sup>3,6</sup>
НАК	174,02±2,14 <sup>4</sup>	272,80±3,51 <sup>3</sup>	274,48±8,41 <sup>2</sup>	169,72±2,77 <sup>1</sup>
ЗАК	1161,95±6,79	1470,9±11,75 <sup>3</sup>	1522,53±24,47 <sup>2</sup>	1743,75±8,18 <sup>5</sup>
АКРУЦ	96,14±1,67 <sup>4</sup>	132,70±2,54 <sup>3</sup>	139,23±4,13 <sup>2</sup>	88,65±1,78 <sup>1</sup>
АРАК	24,91±0,49 <sup>4</sup>	41,40±0,19	37,27±1,41	25,48±0,76 <sup>1</sup>
ССАК	25,40±0,59 <sup>4</sup>	46,76±0,27 <sup>6</sup>	58,45±2,33	23,24±0,18 <sup>1</sup>
НАК/ЗАК	0,15	0,19	0,18	0,10
ИФ	3,86	3,21	3,74	3,48

Примечание: надстрочными цифрами обозначено отсутствие статистически значимых различий между группами (Tukey HSD test,  $p > 0,05$ ) (см. таблицу 3.2.1а)

Таблица 3.2.1а – Климатогеографическая вариабельность свободных аминокислот  
в тканях медицинской пиявки *H. medicinalis* (сибирская форма)

АК, мкмоль/100г	5. Алтайский край 1 n = 10	6. Алтайский край 2 n = 10	ANOVA, группы 1-6	
			F (5, 54)	p
Cysteic Acid	60,23±2,02	26,33±1,07 <sup>2</sup>	383,50	0,000
Aspartic Acid	591,91±7,88	521,73±5,06	143,26	0,000
Threonine	62,46±2,31 <sup>2,6</sup>	69,50±1,19 <sup>2,5</sup>	225,96	0,000
Serine	101,48±2,52 <sup>2</sup>	116,64±2,13	182,53	0,000
Glu+ Gln	634,99±5,74 <sup>2,6</sup>	651,98±6,34 <sup>5</sup>	287,17	0,000
Proline	1,58±0,02	1,09±0,04	1887,8	0,000
Glycine	97,97±2,16 <sup>1,3</sup>	85,26±1,21	36,57	0,000
Alanine	249,57±4,86 <sup>2,4,6</sup>	255,05±4,80 <sup>2,4,5</sup>	112,80	0,000
Valine	75,48±1,77 <sup>6</sup>	71,26±1,01 <sup>5</sup>	176,68	0,000
Cystine	4,63±0,10	3,96±0,02 <sup>4</sup>	952,13	0,000
Methionine	17,88±0,27 <sup>3</sup>	12,23±0,25	73,90	0,000
Isoleucine	38,21±1,23 <sup>6</sup>	35,51±1,14 <sup>5</sup>	301,98	0,000
Leucine	86,33±2,25	71,41±1,20	48,82	0,000
Tyrosine	18,07±0,23 <sup>6</sup>	15,75±0,28 <sup>3,5</sup>	90,99	0,000
Phenylalanine	33,66±1,15 <sup>2</sup>	42,32±1,14	151,31	0,000
GABA	5,03±0,23 <sup>1,3</sup>	1,03±0,01	231,15	0,000
Ornithine	16,47±0,23 <sup>1,3,4,6</sup>	15,90±0,24 <sup>1,4,5</sup>	23,22	0,000
Lysine	54,58±2,23	45,45±2,24	121,26	0,000
Histidine	8,85±0,10	6,96±0,07	2176,3	0,000
Arginine	7,06±0,08	3,46±0,05	1826,3	0,000
Фонд АК	2166,45±36,41 <sup>6</sup>	2051,56±28,41 <sup>4,5</sup>	117,26	0,000
НАК	384,50±4,02 <sup>6</sup>	358,11±5,32 <sup>5</sup>	407,68	0,000
ЗАК	1700,22±12,71 <sup>4,6</sup>	1651,47±8,13 <sup>5</sup>	268,17	0,000
АКРУЦ	200,02±1,21	178,18±3,10	265,17	0,000
АРАК	51,73±1,26	58,08±1,22	194,88	0,000
ССАК	82,75±2,04	42,52±1,11 <sup>2</sup>	394,09	0,000
НАК/ЗАК	0,23	0,22		
ИФ	3,87	3,07		

Примечание: надстрочными цифрами обозначено отсутствие статистически значимых различий между группами (Tukey HSD test,  $p > 0,05$ ) (см. таблицу 3.2.1)

При количественном анализе аминокислотного пула обнаружены существенные различия для концентраций всех свободных аминокислот в тканях пиявок *H. medicinalis*, обитающих в водных экосистемах различных регионов (табл. 3.2.1-3.2.1a) ( $p < 0,001$ ).

Наибольшая климатогеографическая изменчивость характерна для тканевых концентраций гистидина, пролина, аргинина, цистеина, цистеиновой кислоты, изолейцина, глутаминовой кислоты и глутамина,  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, треонина, а также для метаболических групп АК – незаменимых (НАК) и серосодержащих (ССАК) ( $F_{5,54} > 225,00$ ;  $p < 0,001$ ). Наименьшая вариабельность отмечена для тканевых концентраций лейцина, глицина и орнитина ( $F_{5,54} < 49,00$ ;  $p < 0,001$ ).

В контексте влияния экологических факторов на формирование аминокислотного спектра тканей медицинских пиявок из водных биогеоценозов различных регионов, для нас особый интерес представляли особи *H. medicinalis*, обитающие на восточной границе ареала (климатический фактор) и на промышленно развитых территориях (антропогенный фактор). Известно, что изменения климатических условий в направлении понижения среднегодовых температур является основным лимитирующим фактором распространения и численности особей медицинских пиявок, поскольку для них 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). Антропогенное загрязнение мест обитания МП также является ключевым фактором, ограничивающим распространение и численность природных популяций этих ценных гидробионтов.

Показано, что аминокислотный фонд тканей *H. medicinalis* алтайских популяций, обитающих в экстремальных климатических условиях (суровые зимы, короткий безморозный период, глубокое промерзание грунта при среднегодовой температуре среды  $+2,6^{\circ}\text{C}$ ), повышен в основном за счет незаменимых АК (валин, изолейцин, лейцин, лизин, гистидин, аргинин) ( $p < 0,001$ ) (табл. 3.2.1a). Данные аминокислоты тесно связаны с энергетическими процессами, и, кроме того, вы-

полняют криопротекторную роль при поддержании адаптивных механизмов к низким положительным температурам и функцию защиты клеточных структур от гипотермической дестабилизации (Каранова, 2006; Karanova, 2011).

Следует отметить также в тканях сибирских особей *H. medicinalis* высокий уровень аспарагиновой кислоты, обладающей антиоксидантными и иммуностимулирующими свойствами ( $p < 0,001$ ) (табл. 3.2.1а). Полученные данные позволяют предполагать, что повышенное содержание перечисленных аминокислот представляется как специфический фактор в обеспечении механизмов низкотемпературной адаптации и, следовательно, возможности существования медицинских пиявок в условиях холодного климата Сибири. В то же время для этой группы МП характерно пониженное содержание в тканях пролина, что возможно, является одним из звеньев компенсаторного ответа на экстремальные условия их обитания.

Лечебные пиявки, обитающие на территории промышленного Донбасса (оз. Глубокое, ЛНР), содержат в тканях максимальные концентрации глутаминовой кислоты и глутамина, обладающих детоксикационными способностями и  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, участвующей в тканевом дыхании ( $p < 0,001$ ) (Nokhrina et al., 2011). Кроме того, следует отметить в тканях этой группы медицинских пиявок достаточно высокое содержание пролина, глицина и аспарагиновой кислоты – метаболически активных антиоксидантов (табл. 3.2.1).

Особи *H. medicinalis* из оз. Горелое (Харьковская обл.1) отличаются от медицинских пиявок других географических популяций повышенными тканевыми концентрациями орнитина, а пиявки, населяющие р. Уды (Харьковская обл.2) – пролина (табл. 3.2.1-3.2.1а) ( $p < 0,001$ ).

Сравнительный анализ фонда АК у особей *H. medicinalis*, обитающих в неоднозначных экологических условиях, выявил некоторые сходства и различия в соотношении основных метаболических групп АК (табл. 3.2.1-3.2.1а). Обнаружено, что благодаря высокому содержанию пула незаменимых аминокислот (НАК), самые высокие показатели НАК/ЗАК характерны для тканей пиявок сибирских популяций – 0,23 и 0,22.

Аминокислотный фонд пиявок, обитающих в водоеме индустриально развитого региона (оз. Глубокое, ЛНР), напротив, повышен в основном за счет пула заменимых АК, вследствие чего в их тканях наблюдается нарушение аминокислотного баланса, критерием которого являются низкие показатели соотношения незаменимых АК к заменимым – 0,10 (табл. 3.2.1).

Имеются данные, что в условиях нарушения утилизации стандартных энергетических субстратов (углеводов и жиров) окисление аминокислот с разветвленной углеродной цепью (АКРУЦ – валин, лейцин, изолейцин) становится главным источником энергии (Жадкевич и др., 1989; Fisher, 1980). Соотношение метаболитических групп АКРУЦ/АРАК (ароматические АК – тирозин и фенилаланин) – индекс Фишера (ИФ), является критерием аминокислотного дисбаланса в тканях и характеризует уровень развития эндогенного токсикоза в организме (Западнюк и др., 1982). В норме ИФ составляет  $3,0 \pm 0,5$ , и полученные нами показатели индекса в целом свидетельствуют об отсутствии процессов эндотоксикоза в тканях лечебных пиявок *H. medicinalis* всех изучаемых популяций (табл. 3.2.1-3.2.1a).

Визуализация климатогеографической вариабельности аминокислотного спектра тканей лечебной пиявки *H. medicinalis* представлена на рисунке 3.2.1. Показано, что все экспериментальные данные оформлены в шесть самостоятельных групп. Вместе с тем, на фоне значительной пространственной удаленности сибирских особей *H. medicinalis* от тамбовских и луганских, для региональных групп пиявок Харьковской области и Алтайского края характерна минимальная пространственная дистанция.

Первая главная компонента (PC1), на которую приходится 53,12% общей дисперсии данных, совершенно четко отделяет пиявок, обитающих на восточной периферии ареала (Алтайский край), от остальных региональных групп *H. medicinalis*. Наибольший вклад, более 6,53%, в климатогеографические различия аминокислотного спектра тканей лечебных пиявок по PC1 вносят аминокислоты, наиболее сильно коррелирующие с первой компонентой: цистеиновая кислота, треонин, серин, валин, лейцин, тирозин, фенилаланин, лизин, гистидин, аргинин, повышенное содержание которых отмечалось у сибирских особей (рис. 3.2.1, табл. 3.2.2).

Со второй компонентой (PC2) наиболее значимо коррелируют заменимые АК: глутаминовая кислота, глицин, аланин, цистеин, вклад для каждой из которых в PC2 составил более 13,38%.

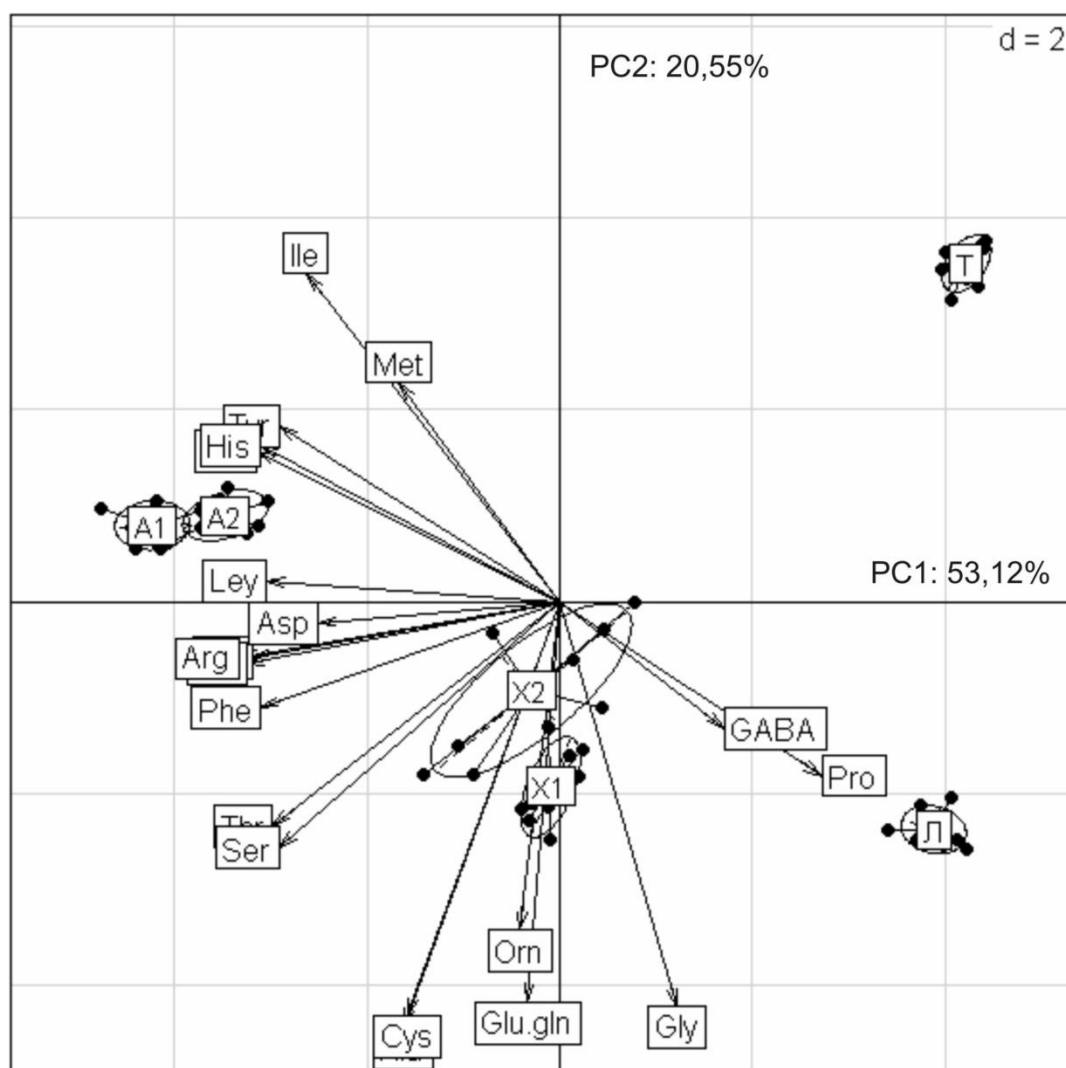


Рисунок 3.2.1 – Свободные аминокислоты (1г мкмоль/100г) тканей *H. medicinalis* различных климатогеографических зон в пространстве главных компонент.

Условные обозначения: Т – Тамбовская область, Л – Луганская Народная Республика, X1, X2 – Харьковская область, A1, A2 – Алтайский край

Таблица 3.2.2 – Результаты компонентного анализа свободных аминокислот (АК, Ig мкмоль/100г) в тканях *H. medicinalis* различных климатогеографических зон

АК, Ig мкмоль/100г ( $i = 20$ )	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
Cysteic Acid	-0,92***	-0,10	7,87	0,26
Aspartic Acid	-0,72***	-0,04	4,87	0,04
Threonine	-0,85***	-0,41**	6,87	4,19
Serine	-0,83***	-0,45***	6,54	5,04
Glu + Gln	-0,10	-0,74***	0,09	13,39
Proline	0,78***	-0,32*	5,70	2,53
Glycine	0,35**	-0,75***	1,15	13,69
Alanine	-0,47***	-0,79***	2,05	15,11
Valine	-0,93***	-0,11	8,18	0,32
Cystine	-0,46***	-0,77***	1,94	14,33
Methionine	-0,48***	0,41**	2,15	4,01
Isoleucine	-0,75***	0,61***	5,34	9,00
Leucine	-0,87***	0,04	7,14	0,04
Tyrosine	-0,84***	0,32*	6,57	2,56
Phenylalanine	-0,89***	0,20	7,48	0,94
GABA	0,49***	-0,23	2,24	1,33
Ornithine	-0,12	-0,61***	0,13	8,99
Lysine	-0,90***	0,28*	7,64	1,91
Histidine	-0,89***	0,29*	7,49	2,06
Arginine	-0,95***	-0,11	8,56	0,27
	Собственные значения (eigenvalues, $\lambda_j$ ) PC		Дисперсия, объясненная PC (%)	
	10,62	4,11	53,12	20,55

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



Из рисунка видно, что для этих аминокислот характерно повышенное содержание в тканях медицинских пиявок, обитающих в водных экосистемах Харьковской области и ЛНР (рис. 3.2.1, табл. 3.2.2).

Поскольку суммарный фонд свободных аминокислот в тканях медицинских пиявок исследуемых популяций показал высокую климатогеографическую вариабельность, для получения более полной информации при сравнительном анализе данных целесообразно рассмотреть и процентное содержание (% от суммарного фонда АК) отдельных АК и метаболических групп (рис. 3.2.2).

Из рисунка 3.2.2 видно, что фонд свободных АК тканей медицинских пиявок сибирской формы, обитающих в экстремальных климатических условиях (Алтайский край), отличается от особей *H. medicinalis* европейских популяций повышенным содержанием незаменимых АК: лизина, гистидина, аргинина, а также суммарных пулов незаменимых аминокислот (НАК), аминокислот с разветвленной углеродной цепью (АКРУЦ), ароматических аминокислот (АРАК). В то же время в тканях алтайских пиявок отмечено пониженное процентное содержание заменимых АК: пролина, глутаминовой кислоты и глутамина, глицина, аланина (рис. 3.2.2).

Следует обратить внимание на то, что медицинские пиявки тамбовской популяции, обитающие на северной окраине ареала, накапливают в тканях значительное процентное содержание серосодержащей АК метионина и, наряду с сибирскими особями *H. medicinalis*, высокий уровень аспарагиновой кислоты, изолейцина, но пониженный – аланина.

Для тканей медицинских пиявок *H. medicinalis*, обитающих на территории промышленного Донбасса (ЛНР), характерно максимальное содержание пула заменимых аминокислот, в основном за счет существенного роста процентного содержания глутаминовой кислоты и глутамина (41,09% от суммарного фонда АК), а также гамма-аминомасляной кислоты – производной глутамата (рис. 3.2.2).

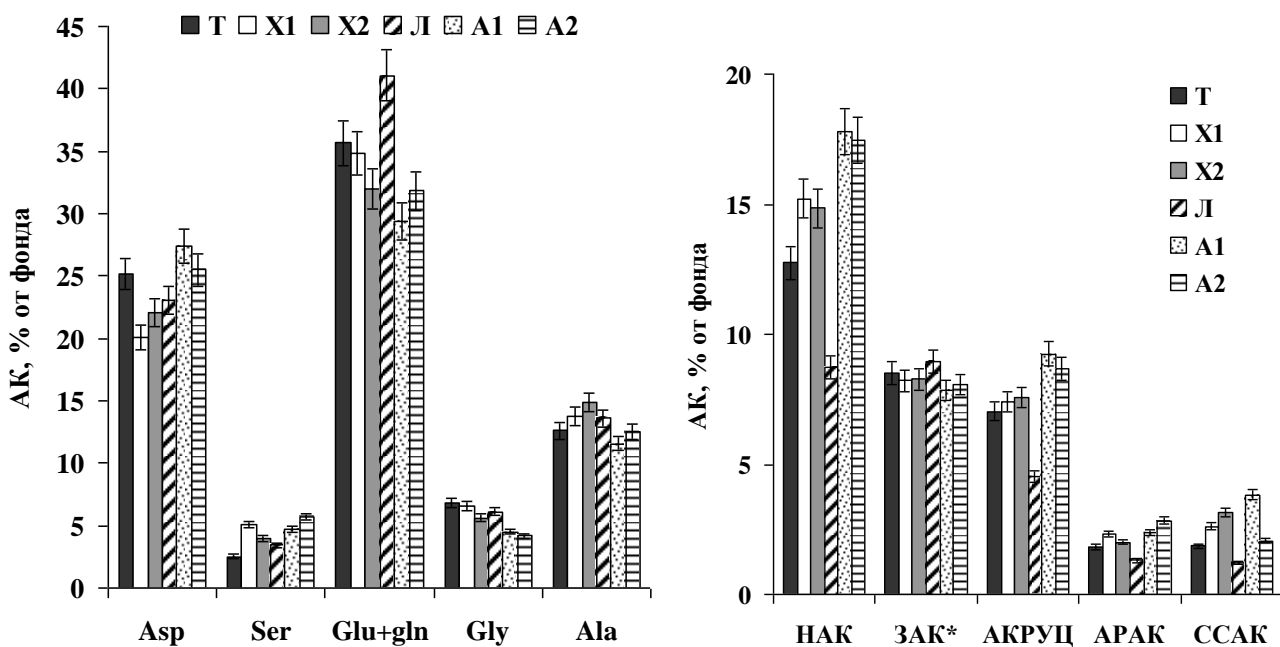
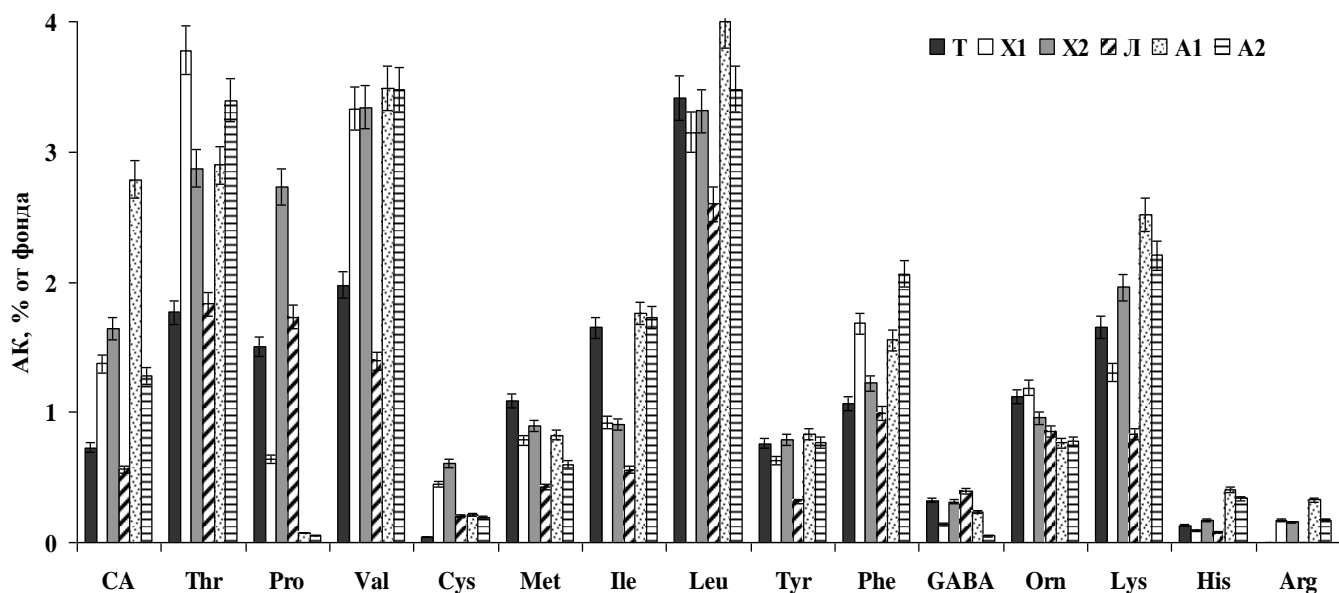


Рисунок 3.2.2 – Содержание свободных аминокислот (АК, % от суммарного фонда) в тканях медицинской пиявки *H. medicinalis*, обитающей в водных экосистемах различных регионов. Условные обозначения: Т – Тамбовская область, Л – Луганская Народная Республика, X1, X2 – Харьковская область, А1, А2 – Алтайский край; \* – значения ЗАК уменьшены в 10 раз

При сравнительной оценке аминокислотного спектра в тканях аптечной пиявки *H. verbana*, обитающей в различных водных экосистемах, также были получены неоднозначные результаты (Черная, 2010; Черная и др., 2012).

Так, суммарные концентрации фонда АК тканей *H. verbana* зависят от места обитания пиявок ( $F_{2, 27} = 12,87, p = 0,000$ ) и повышаются в популяционном ряду: краснодарская < харьковская-1  $\leq$  волгоградская. Особи *H. verbana* из кубанской реки Челбас отличаются от МП других географических популяций пониженным уровнем азотистого обмена. Суммарный фонд свободных АК в ее тканях самый низкий ( $p < 0,05$ ), а пул незаменимых АК сопоставим с таковым обитательниц ерика Судомойка (Волгоградская обл.) ( $p > 0,05$ ). В то же время, соотношение НАК/ЗАК у краснодарских пиявок (0,17) выше, чем у волгоградских особей (0,16) (табл. 3.2.3).

Необходимо особо отметить, что климатогеографические условия водных экосистем Краснодарского края являются наиболее оптимальными и комфортными для обитания аптечных пиявок *H. verbana*. Было показано, что представители этого вида достигают массового развития именно здесь, и Краснодарский край остается практически единственным местом на территории России, где численность краснокнижного аптечной пиявки *H. verbana* достаточно высокая, хотя в последнее десятилетие отмечена тенденция его резкого снижения в силу несанкционированного перепромысла (Михайлов, Ярошенко, 2005; Каменев, 2007; Кустов, Шаповалов, 2012).

Самый высокий уровень суммарного фонда АК выявлен в тканях волгоградских пиявок, который повышен в основном за счет пула заменимых АК. Напомним, что при исследовании микроэлементного обмена, в тканях *H. verbana*, обитающих в Волгоградской области, авторами были отмечены максимальные концентрации тяжелых металлов Ni, Cd (Черная и др., 2019а). Однако, в отличие от пиявок *H. medicinalis*, также обитающих на индустриально развитой территории (ЛНР), суммарный пул незаменимых АК у пиявок *H. verbana* не снижен, а наблюдается только незначительный спад в соотношении НАК/ЗАК до 0.16 (табл. 3.2.3). Вместе с тем, в тканях МП волгоградской популяции на фоне повышенного содержания АКРУЦ отмечено некоторое снижение концентраций АРАК, что приводит к отклонению от нормы значения индекса Фишера (ИФ = 4.00), который является критерием эндогенного токсикоза в организме.

Таблица 3.2.3 – Климатогеографическая вариабельность свободных аминокислот в тканях медицинской пиявки *H. verbana*

АК, мкмоль/100г	1. Харьковская область n =10	2. Волгоградс- кая область n =10	3. Краснодарс- кий край n =10	ANOVA F (2, 27); p
Cysteic Acid	23,66±0,28 <sup>2</sup>	24,41±2,41 <sup>1</sup>	15,10±0,41	16,65; 0,000
Aspartic Acid	502,65±10,03	369,98±11,58 <sup>3</sup>	349,70±2,20 <sup>2</sup>	79,45; 0,000
Threonine	88,65±2,25	39,09±2,47 <sup>3</sup>	39,24±1,51 <sup>2</sup>	109,14; 0,000
Serine	105,02±2,08	62,44±2,46	66,93±1,46	98,88; 0,000
Glu + Gln	521,05±4,85	760,65±10,19	690,81±5,71	345,94; 0,000
Proline	21,24±0,44	13,36±0,46	30,82±0,58	263,44; 0,000
Glycine	126,37±3,45 <sup>3</sup>	114,65±4,49	128,36±1,47 <sup>1</sup>	5,05; 0,014
Alanine	218,99±3,33 <sup>3</sup>	263,31±9,35	230,04±1,10 <sup>1</sup>	16,71; 0,000
Valine	65,98±1,67	41,44±2,28	49,97±0,54	44,36; 0,000
Cystine	6,73±0,05	26,30±2,32	8,53±0,46	123,53; 0,000
Methionine	15,96±0,60 <sup>3</sup>	8,23±0,24	16,02±0,44 <sup>1</sup>	130,58; 0,000
Isoleucine	13,21±0,04	27,46±2,28	18,50±0,35	45,65; 0,000
Leucine	67,59±1,61 <sup>3</sup>	82,27±4,73	63,19±0,36 <sup>1</sup>	12,36; 0,000
Tyrosine	15,21±0,19	28,22±2,50	12,49±0,20	53,69; 0,000
Phenylalanine	28,98±0,06	9,57±0,31	22,31±0,43	746,16; 0,000
GABA	2,43±0,02	3,30±0,22 <sup>3</sup>	3,43±0,12 <sup>2</sup>	15,36; 0,000
Ornithine	26,34±0,16	19,48±0,65	20,50±0,31	56,98; 0,000
Lysine	27,50±0,09 <sup>2</sup>	31,30±2,34 <sup>1</sup>	38,24±0,97	12,44; 0,000
Histidine	2,38±0,03	12,49±0,40	2,05±0,05	1614,5; 0,000
Arginine	2,93±0,02	8,26±0,26	1,75±0,02	1357,8; 0,000
Фонд АК	1882,87±22,76 <sup>2</sup>	1946,21±23,33 <sup>1</sup>	1807,98±7,71	12,87; 0,000
НАК	313,18±3,23	260,11±6,70 <sup>2</sup>	251,29±2,26 <sup>3</sup>	50,20; 0,000
ЗАК	1517,27±20,74 <sup>3</sup>	1638,92±20,58	1517,68±6,98 <sup>1</sup>	15,91; 0,000
АКРУЦ	146,78±2,18 <sup>2</sup>	151,17±5,91 <sup>1</sup>	131,67±0,77	8,16; 0,002
АРАК	44,20±0,21	37,79±2,63 <sup>3</sup>	34,81±0,50 <sup>2</sup>	8,87; 0,001
ССАК	46,35±0,54	58,95±3,06	39,65±0,60	34,62; 0,000
НАК/ЗАК	0,21	0,16	0,17	
ИФ	3,32	4,00	3,78	

Примечание: надстрочными цифрами обозначено отсутствие статистически значимых различий между группами (Tukey HSD test,  $p > 0,05$ )

При этом в тканях волгоградских МП отмечены самые высокие концентрации аминокислот, участвующих в детоксикации ТМ – глутаминовой кислоты и глутамина, цистеина, гистидина и аргинина ( $p < 0,01$ ) (табл. 3.2.3).

Как было отмечено ранее, у особей *H. medicinalis* из луганской популяции функции детоксиканта, по всей видимости, выполняют в основном глутаминовая кислота и глутамин, содержание которых в тканях, достигает 41%. Вероятно, у двух видов медицинских пиявок: лечебной *H. medicinalis* и аптечной *H. verbana*, обитающих в водных экосистемах промышленных регионов, при высоком уровне микроэлементного и аминокислотного обменов, функционируют видоспецифичные адаптивно-компенсаторные механизмы детоксикации и элиминации тяжелых металлов.

Самые высокие концентрации пула незаменимых АК обнаружены в тканях *H. verbana* из оз. Горелое (Харьковская обл.1) ( $p < 0,001$ ), при этом показатель соотношения НАК/ЗАК также самый высокий – 0,21 (табл. 3.2.3). Высокое содержание суммарного фонда незаменимых АК в тканях харьковских особей *H. verbana* может быть обусловлено, как и в случае с сибирскими особями лечебной пиявки *H. medicinalis*, расположением данного водоема на северной границе ареала аптечной пиявки, для которой нетипично обитание в лесостепной зоне, а также пониженной биоаккумуляционной активностью к Fe, Cd и Pb (Черная и др., 2019, 2019а).

Детальный сравнительный анализ аминокислотного спектра тканей пиявки *H. verbana* трех географических популяций показал значимые различия концентраций большинства свободных АК ( $p < 0,05$ ) (табл. 3.2.3).

Наибольшая географическая изменчивость характерна для тканевых концентраций глутаминовой кислоты и глутамина, пролина, фенилаланина, гистидина, аргинина ( $F_{2,27} > 263,43$ ;  $p = 0.000$ ), наименьшая – для тканевых концентраций цистеиновой кислоты, глицина, аланина, лейцина,  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, лизина ( $F_{2,27} < 16,72$ ;  $p = 0.000$ ).

Установлено, что особи *H. verbana* из оз. Горелое (Харьковская обл.1) отличаются самыми высокими тканевыми концентрациями аспарагиновой кислоты,

треонина, серина, валина, фенилаланина и орнитина ( $p < 0,001$ ). Пиявки из ер. Судомойка (Волгоградская обл.) содержат максимальные тканевые концентрации глутаминовой кислоты и глутамина, изолейцина, тирозина, гистидина и аргинина ( $p < 0,05$ ). Для тканей краснодарских особей МП характерны самые высокие значения пролина и лизина ( $p < 0,01$ ) (табл. 3.2.3).

Географическая вариабельность свободных АК в тканях аптечных пиявок визуализирована с помощью анализа главных компонент (РСА) (рис. 3.2.3, табл. 3.2.4). На рисунке показана ярко выраженная пространственная дифференциация исследуемых региональных групп *H. verbana*.

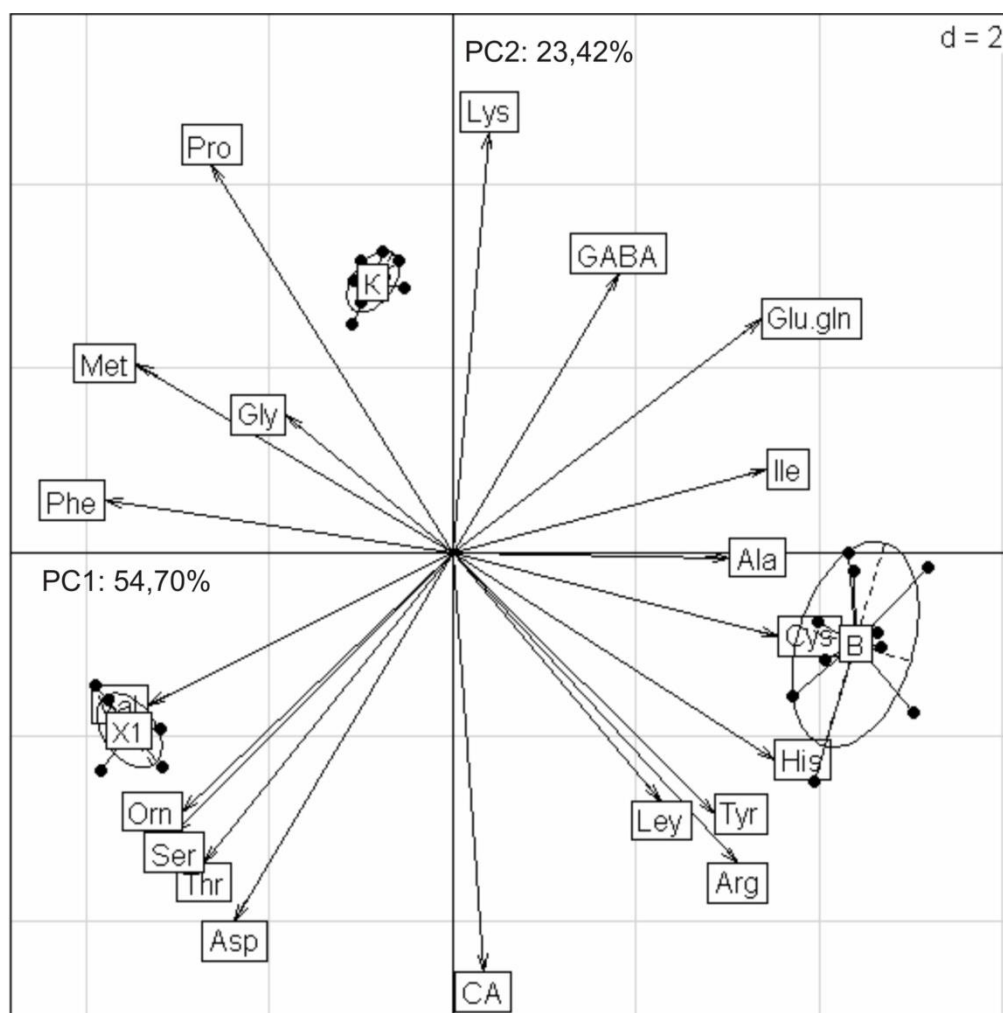


Рисунок 3.2.3 – Свободные аминокислоты (lg мкмоль/100г) тканей *H. verbana* различных климатогеографических зон в пространстве главных компонент. Условные обозначения: X1 – Харьковская область, B – Волгоградская область, K – Краснодарский край

Таблица 3.2.4 – Результаты компонентного анализа свободных аминокислот (АК,  $\mu\text{г мкмоль}/100\text{г}$ ) в тканях *H. verbana* различных климатогеографических зон

АК, $\mu\text{г мкмоль}/100\text{г}$ ( $i = 20$ )	Нагрузки (loadings, $a_{ij}$ )		Вклад в главную компоненту (Contribution = ( $a^2_{ij} \cdot 100$ )/ $\lambda_j$ , %)	
	Главные компоненты (Principal Components – PC), $j = 1, 2$			
	1	2	1	2
Cysteic Acid	0,09	-0,77***	0,07	12,76
Aspartic Acid	-0,62***	-0,68***	3,50	9,86
Threonine	-0,71***	-0,57**	4,55	6,99
Serine	-0,79***	-0,51**	5,67	5,72
Glu+ Gln	0,87***	0,43*	6,97	3,95
Proline	-0,68***	0,71***	4,26	10,88
Glycine	-0,47**	0,25	2,03	1,38
Alanine	0,79***	-0,01	5,64	0,00
Valine	-0,86***	-0,28	6,81	1,68
Cystine	0,92***	-0,16	7,79	0,52
Methionine	-0,90***	0,35	7,34	2,58
Isoleucine	0,89***	0,15	7,29	0,50
Leucine	0,59**	-0,46*	3,18	4,49
Tyrosine	0,74***	-0,48**	5,03	4,99
Phenylalanine	-0,98***	0,10	8,83	0,20
GABA	0,47**	0,51**	2,01	5,64
Ornithine	-0,77***	-0,48**	5,37	4,88
Lysine	0,10	0,78***	0,09	12,85
Histidine	0,91***	-0,38*	7,62	3,12
Arginine	0,81***	-0,57**	5,94	7,01
	Собственные значения (eigenvalues, $\lambda_j$ ) PC		Дисперсия, объясненная PC (%)	
	10,94	4,69	54,70	23,42

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

С первой главной компонентой (PC1), на которую приходится 54,70% общей дисперсии данных, наиболее сильно коррелируют валин, метионин, фенилаланин, гистидин, повышенное содержание которых отмечено у пиявок харьковской популяции, а также глутаминовая кислота и глутамин, цистеин, изолейцин, максимальные концентрации которых обнаружены у волгоградских особей *H. verbana*. Вклад перечисленных аминокислот в PC1 превышает 6,80%.

Наиболее весомый вклад (более 10,87%) во вторую компоненту (PC2), на которую приходится 23,42% общей дисперсии, вносят цистеиновая кислота, пролин и лизин, для концентраций которых в тканях *H. verbana* была выявлена невысокая географическая изменчивость.

Таким образом, метод главных компонент подтверждает результаты дисперсионного однофакторного анализа, представленные в таблице 3.2.3.

При изучении процентного содержания свободных аминокислот в тканях изучаемых географических групп аптечной пиявки *H. verbana* было показано, что особи наиболее северной популяции (Харьковская обл.1), в отличие от южных сородичей, содержат значительно больше аспарагиновой кислоты, треонина, серина, валина, фенилаланина и метаболитических групп незаменимых АК и ароматических АК, но меньше – глутаминовой кислоты и глутамина, аланина, изолейцина и лизина ( $p < 0,01$ ) (рис. 3.2.4).

Для тканей медицинских пиявок, обитающих на промышленной территории Волгоградской области, характерно наиболее высокое содержание аланина, цистеина, изолейцина, лейцина, тирозина, гистидина, аргинина и пула серосодержащих АК, однако пониженное содержание фонда незаменимых АК ( $p < 0,01$ ) (рис. 3.2.4).

У особей *H. verbana* краснодарской популяции, обитающих в оптимальных климатических условиях, содержится больше всего пролина, глицина, метионина и лизина ( $p < 0,01$ ) (рис. 3.2.4).



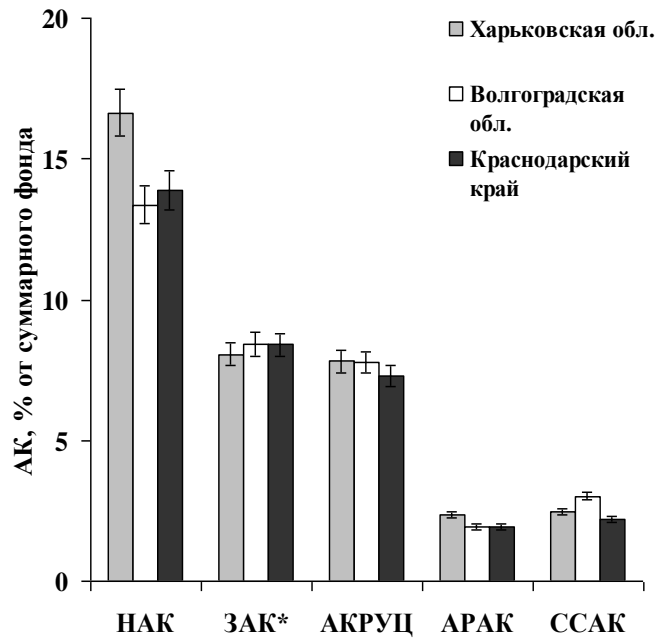
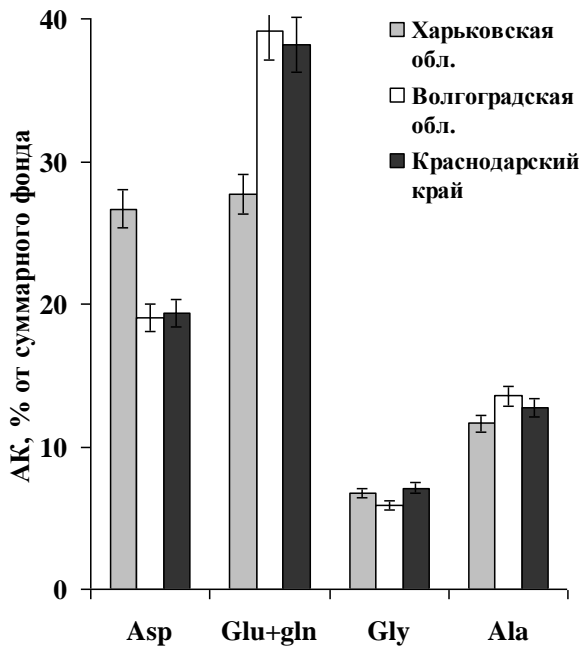
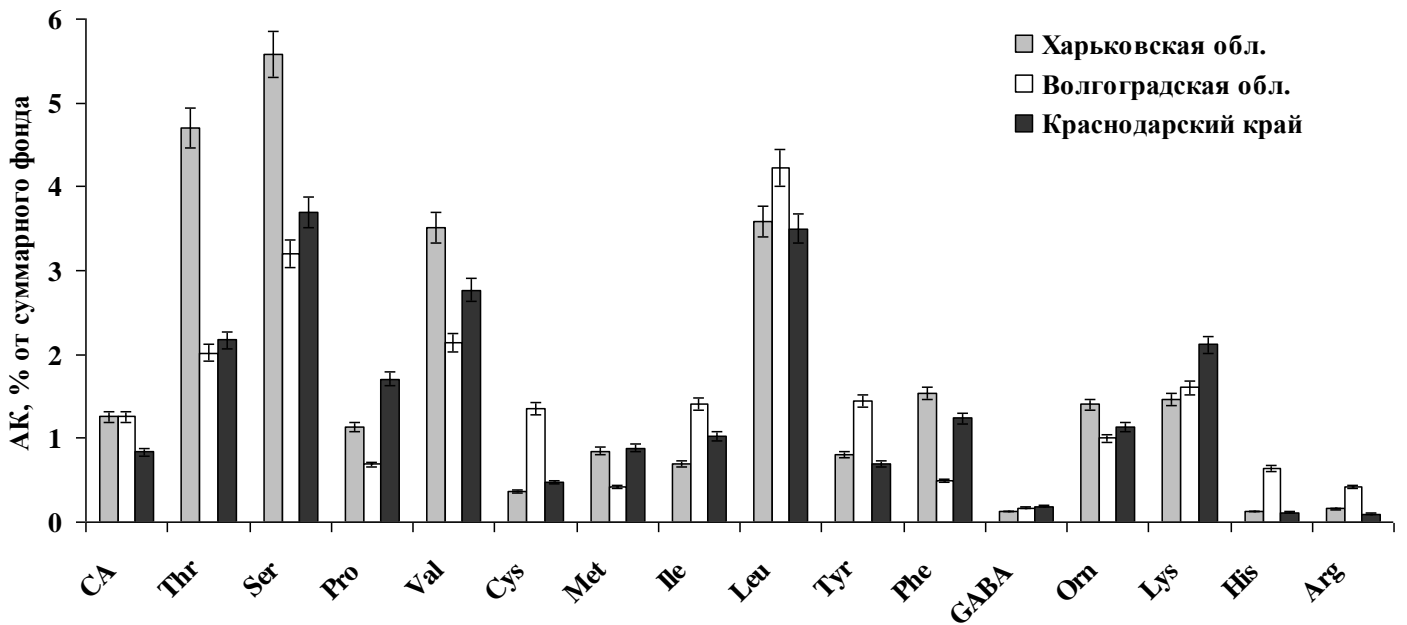


Рисунок 3.2.4 – Содержание свободных аминокислот (АК, % от суммарного фонда) в тканях медицинской пиявки *H. verbana*, обитающей в водных экосистемах различных регионов. Условные обозначения: \* – значения ЗАК уменьшены в 10 раз

Показано, что уровень суммарного фонда свободных АК в тканях хищной пиявки *H. sanguisuga*, как и у медицинских пиявок, зависит от эколого-географических особенностей их мест обитания ( $F_{5,54} = 94,01$ ;  $p = 0,000$ ), и образу-

ют популяционный ряд: тамбовская < харьковская-1 ≤ краснодарская ≤ харьковская-2 ≤ волгоградская < луганская. Статистически значимые различия выявлены при сравнении суммарного фонда АК в тканях большой ложноконской пиявки (БЛП) из тамбовской популяции и остальными группами *H. sanguisuga* ( $p < 0,001$ ). Значимо выше уровень суммарного пула пиявок из оз. Глубокое (ЛНР), в сравнении с особями *H. sanguisuga* других географических популяций ( $p < 0,001$ ).

Пониженное содержание свободных АК в тканях особей *H. sanguisuga* из р. Лесной Воронеж (Тамбовская обл.) согласуется с невысоким уровнем микроэлементного обмена – ранее авторами у этой группы БЛП были выявлены самые низкие концентрации всех изучаемых эссенциальных и токсичных металлов (Черная и др., 2019а). Вместе с тем пиявки тамбовской популяции содержат в тканях достаточно высокий уровень пула незаменимых АК, на что указывают высокие значения соотношения НАК/ЗАК – 0,44, а показатели индекса Фишера (ИФ) у этой группы находятся в границах нормы (ИФ = 3,23) (табл. 3.2.5). Полученные данные показателей ИФ свидетельствуют об оптимальном соотношении свободных АК в тканях тамбовских пиявок. По личным наблюдениям авторов, самая высокая численность *H. sanguisuga*, в сравнении с другими изучаемыми регионами, была в Тамбовской области – на некоторых участках реки Лесной Воронеж, особенно в ее старицах, можно было обнаружить одновременно до 100 особей.

При анализе аминокислотного спектра тканей *H. sanguisuga* из популяции харьковская-1 (оз. Горелое) наблюдалась картина аналогичная тамбовским особям – невысокий уровень фонда АК, высокие показатели НАК/ЗАК (0,43) и нормальные значения ИФ (3,46) (табл. 3.2.5). У этой группы ложноконских пиявок отмечены повышенные концентрации в тканях незаменимых АК: треонина, лейцина и лизина ( $p < 0,05$ ). Озеро Горелое также, как и река Лесной Воронеж, расположено на достаточном удалении не только от промышленных предприятий, но и от автомобильных и железных дорог, и населено большим количеством различных групп гидробионтов, в том числе краснокнижных видов беспозвоночных (Сидоровский, 2012).

Таблица 3.2.5 – Климатогеографическая вариабельность свободных аминокислот в тканях большой ложноконской пиявки *H. sanguisuga*

АК, мкмоль/100г	1. Тамбовская обл. n = 10	2. Харьковская обл. 1 n = 10	3. Харьковская обл. 2 n = 10	4. ЛНР n = 10
Cysteic Acid	8,55±0,42	11,46±0,41 <sup>5,6</sup>	27,28±1,84 <sup>4</sup>	29,38±2,37 <sup>3</sup>
Aspartic Acid	97,47±4,63	115,43±3,89 <sup>3,5,6</sup>	134,40±4,65 <sup>2,5,6</sup>	249,07±11,59
Threonine	79,15±3,91 <sup>4</sup>	114,28±2,49 <sup>3,6</sup>	106,37±4,70 <sup>2,5,6</sup>	81,22±2,38 <sup>1</sup>
Serine	125,93±2,41 <sup>3</sup>	143,43±4,10 <sup>3</sup>	132,29±2,46 <sup>1,2</sup>	105,25±3,41 <sup>5</sup>
Glu + Gln	397,97±7,73	540,50±6,70 <sup>6</sup>	587,37±4,74 <sup>5</sup>	675,24±7,73
Proline	27,45±1,81 <sup>2,3</sup>	36,48±3,65 <sup>1,3</sup>	35,49±2,11 <sup>1,2</sup>	82,43±4,63
Glycine	118,24±2,45 <sup>5</sup>	154,28±4,20 <sup>3,4,6</sup>	156,18±4,77 <sup>2,4,6</sup>	145,29±3,81 <sup>2,3,6</sup>
Alanine	220,35±4,00	292,31±4,87 <sup>6</sup>	343,14±4,69	370,96±5,66 <sup>5</sup>
Valine	93,78±4,83	114,27±3,94	130,30±2,34 <sup>5,6</sup>	157,79±2,15 <sup>6</sup>
Cystine	7,65±0,21 <sup>2</sup>	10,10±0,46 <sup>1</sup>	22,53±1,37 <sup>4,5</sup>	21,41±2,44 <sup>3,5</sup>
Methionine	27,50±2,03 <sup>3-6</sup>	18,23±0,45 <sup>3</sup>	21,30±0,97 <sup>1,2,4,6</sup>	25,37±1,21 <sup>1,3,5,6</sup>
Isoleucine	40,45±2,31 <sup>2,3</sup>	38,30±3,02 <sup>1,3</sup>	36,26±2,33 <sup>1,2</sup>	69,90±2,47 <sup>6</sup>
Leucine	91,07±3,83 <sup>3</sup>	109,01±3,52 <sup>3,5,6</sup>	98,51±4,60 <sup>1,2,5,6</sup>	60,24±2,01
Tyrosine	29,24±1,82 <sup>2,4-6</sup>	30,38±2,81 <sup>1,4,5,6</sup>	17,39±0,48	28,56±2,50 <sup>1,2,5,6</sup>
Phenylalanine	40,54±2,30 <sup>2-6</sup>	45,30±1,92 <sup>1,3,5,6</sup>	50,03±2,36 <sup>1,2,5,6</sup>	36,36±2,33 <sup>1,5,6</sup>
GABA	7,85±0,23 <sup>3,4</sup>	10,55±0,39	7,30±0,23 <sup>1,4</sup>	7,45±0,14 <sup>1,3</sup>
Ornithine	22,50±2,29 <sup>2,3</sup>	26,49±2,29 <sup>1,3</sup>	25,27±2,76 <sup>1,2</sup>	52,43±2,41 <sup>5,6</sup>
Lysine	66,33±2,31 <sup>4</sup>	108,49±4,67 <sup>3</sup>	96,21±3,98 <sup>2,5</sup>	63,42±2,41 <sup>1</sup>
Histidine	5,83±0,22	17,32±0,44 <sup>6</sup>	22,31±0,88 <sup>5,6</sup>	34,43±2,27
Arginine	4,56±0,18	7,47±0,22 <sup>6</sup>	18,47±0,45	14,43±0,38
Фонд АК	1512,44±18,79	1944,08±31,97 <sup>6</sup>	2068,40±32,82 <sup>5,6</sup>	2310,63±38,05
НАК	449,22±8,27	572,7±11,11 <sup>3-6</sup>	579,76±16,25 <sup>2,4-6</sup>	543,16±9,20 <sup>2,3,5</sup>
ЗАК	1024,33±11,98	1322,91±22,85 <sup>6</sup>	1428,79±14,74 <sup>5</sup>	1678,21±28,59
АКРУЦ	225,30±3,89	261,58±5,45 <sup>3</sup>	265,07±8,33 <sup>2,4</sup>	287,93±3,76 <sup>3,5</sup>
АРАК	69,78±2,60 <sup>2-6</sup>	75,68±4,26 <sup>1,2-6</sup>	67,42±2,29 <sup>1,2,4-6</sup>	64,92±3,59 <sup>1-3,5</sup>
ССАК	43,70±2,42 <sup>2,6</sup>	39,80±0,80 <sup>1,6</sup>	71,11±2,38 <sup>4,5</sup>	76,16±5,45 <sup>3,5</sup>
НАК/ЗАК	0,44	0,43	0,41	0,32
ИФ	3,23	3,46	3,93	4,43

Примечание: надстрочными цифрами обозначено отсутствие статистически значимых различий между группами (Tukey HSD test,  $p > 0,05$ ) (см. табл. 3.2.5а)

Таблица 3.2.5а – Климатогеографическая вариабельность свободных аминокислот

в тканях большой ложноконской пиявки *H. sanguisuga*

АК, мкмоль/100г	5. Волгоградская обл. n = 10	6. Краснодарский Край n = 10	ANOVA, группы 1-6	
			F(5, 54)	p
Cysteic Acid	12,46±0,46 <sup>2,6</sup>	11,77±0,34 <sup>2,5</sup>	82,54	0,000
Aspartic Acid	134,43±4,22 <sup>2,3,6</sup>	131,47±2,55 <sup>2,3,5</sup>	73,17	0,000
Threonine	96,40±4,10 <sup>3,6</sup>	110,19±2,34 <sup>2,3,5</sup>	19,09	0,000
Serine	102,47±4,66 <sup>4</sup>	168,21±2,61	44,00	0,000
Glu + Gln	614,48±4,74 <sup>3</sup>	557,06±6,75 <sup>2</sup>	210,72	0,000
Proline	14,56±0,46 <sup>6</sup>	13,26±0,43 <sup>5</sup>	107,32	0,000
Glycine	128,40±2,27 <sup>1,6</sup>	141,27±3,99 <sup>2,3,5</sup>	17,66	0,000
Alanine	376,67±4,49 <sup>4</sup>	284,77±5,09 <sup>2</sup>	167,17	0,000
Valine	138,33±3,66 <sup>3,6</sup>	145,35±3,80 <sup>3,5</sup>	37,78	0,000
Cystine	18,54±0,89 <sup>3,4</sup>	4,26±0,22	89,17	0,000
Methionine	31,33±2,33 <sup>1,4,6</sup>	25,46±2,33 <sup>1,3,5</sup>	7,55	0,000
Isoleucine	54,25±2,28	72,23±3,62 <sup>4</sup>	27,93	0,000
Leucine	107,36±2,76 <sup>2,3,6</sup>	107,84±3,85 <sup>2,3,5</sup>	37,92	0,000
Tyrosine	35,94±2,28 <sup>1,2,4,6</sup>	37,35±2,18 <sup>1,2,4,5</sup>	13,90	0,000
Phenylalanine	42,25±2,52 <sup>1-4,6</sup>	44,33±2,31 <sup>1-5</sup>	4,12	0,003
GABA	18,31±0,42	15,89±0,27	229,65	0,000
Ornithine	43,49±3,59 <sup>4,6</sup>	41,48±2,30 <sup>4,5</sup>	17,32	0,000
Lysine	84,57±2,41 <sup>3,6</sup>	81,25±2,25 <sup>5</sup>	31,79	0,000
Histidine	26,40±1,08 <sup>3</sup>	19,51±0,84 <sup>2,3</sup>	177,70	0,000
Arginine	10,54±0,33	7,63±0,15 <sup>2</sup>	311,57	0,000
Фонд АК	2091,18±27,21 <sup>3,6</sup>	2020,58±25,41 <sup>2,3,5</sup>	94,01	0,000
НАК	591,42±13,83 <sup>2-4,6</sup>	613,79±12,90 <sup>2,3,5</sup>	26,39	0,000
ЗАК	1425,50±12,67 <sup>3</sup>	1337,65±12,23 <sup>2</sup>	153,38	0,000
АКРУЦ	299,94±5,82 <sup>4,6</sup>	325,42±6,09 <sup>5</sup>	37,60	0,000
АРАК	78,19±4,34 <sup>1-4,6</sup>	81,68±4,03 <sup>1-3,5</sup>	3,24	0,013
ССАК	62,34±2,53 <sup>3,4</sup>	41,49±2,62 <sup>1,2</sup>	31,44	0,000
НАК/ЗАК	0,41	0,46		
ИФ	3,84	3,98		

Примечание: надстрочными цифрами обозначено отсутствие статистически значимых различий между группами (Tukey HSD test,  $p > 0,05$ ) (см. табл. 3.2.5)

Особь *H. sanguisuga* из другой харьковской популяции (р. Уды) отличаются более высокими показателями в их тканях, как аминокислотного фонда, так и высокими концентрациями цистеина, фенилаланина и аргинина ( $p < 0,05$ ). При изучении микроэлементного обмена в тканях этой группы пиявок были выявлены повышенные концентрации Cu и Mn (Черная и др., 2019а), что, вероятно, сказывается на снижении показателя НАК/ЗАК (0,41) и отклонении от нормы значения ИФ (3,93) (табл. 3.2.5).

У особей *H. sanguisuga*, обитающих на промышленной территории ЛНР выявлен самый высокий уровень аминокислотного обмена. В их тканях отмечены максимальные показатели суммарного фонда ( $p < 0,001$ ). Аминокислотный фонд луганских особей БЛП повышен в основном за счет пула заменимых АК, вследствие чего показатели соотношения НАК/ЗАК в их тканях самые низкие – 0,32. Кроме того, значения ИФ заметно отклонены от нормы (4,43) (табл. 3.2.5). Все это свидетельствует о том, что в тканях *H. sanguisuga* этой популяции нарушен баланс свободных АК, и в организме накапливаются токсичные продукты межучного обмена. Вероятно, это напрямую связано с максимальным содержанием в их тканях токсичных Ni, Cd и Pb и с пониженными концентрациями эссенциальных металлов Cu, Zn, Mn (Черная и др., 2019а). Высокие концентрации цистеата, аспартата, глутамата, пролина, валина, гистидина и суммарного пула серосодержащих АК, обнаруженные в тканях *H. sanguisuga* из оз. Глубокое (ЛНР), указывают на их приоритетное участие в процессах детоксикации чужеродных соединений, аккумулированных в организме этих пиявок.

У особей *H. sanguisuga*, обитающих в водных экосистемах Краснодарского края, суммарные концентрации свободных АК повышены не так существенно, но показатель НАК/ЗАК (0,46) самый высокий (табл. 3.2.5). У краснодарских пиявок больше, чем у особей *H. sanguisuga* остальных изучаемых групп, серина ( $p < 0,05$ ). У пиявок из волгоградской популяции соотношение НАК/ЗАК несколько понижено (0,41), а в тканях отмечены повышенные концентрации аланина, метионина и  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (табл. 3.2.5).

Дисперсионный анализ (ANOVA) показал высокую географическую вариативность концентраций всех свободных аминокислот в тканях *H. sanguisuga* (табл. 3.2.5а).

Наибольшая географическая изменчивость отмечена для тканевых концентраций глутамата, пролина, аланина,  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, гистидина, аргинина и пула ЗАК ( $F_{5;54} > 107,30$ ;  $p < 0,001$ ), наименьшая – для метионина, фенилаланина и метаболической группы АРАК ( $F_{5;54} < 7,56$ ;  $p < 0,001$ ).

Географическая изменчивость аминокислотного спектра тканей ложноконской пиявки наглядно представлена с помощью компонентного анализа (РСА) (рис. 3.2.5, табл. 3.2.6).

По первой главной компоненте (РС1), на которую приходится 36,71% общей дисперсии, все экспериментальные данные обособлены в пять групп. Показана максимальная пространственная удаленность для тамбовских и луганских популяций *H. sanguisuga* и минимальная – для особей из оз. Горелое (Харьковская обл.1) и р. Челбас (Краснодарский край) (рис. 3.2.5).

Подобная картина была отмечена и при исследовании микроэлементного состава тканей больших ложноконских пиявок, а также содержания ТМ в донных отложениях из мест их обитания. Таким образом, можно говорить о существенном влиянии экологических факторов на формирование аминокислотного спектра тканей *H. sanguisuga* (Черная и др., 2019а).

Наибольший вклад в географические различия аминокислотного спектра тканей большой ложноконской пиявки по РС1, более 10,30%, вносят цистеиновая кислота, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, аланин, гистидин и аргинин, по второй компоненте (РС2), более 13,41% – треонин, лейцин, ГАВА, лизин, по третьей (РС3), более 9,20% – метионин, изолейцин, тирозин, ГАВА, орнитин (табл. 3.2.6).

Таблица 3.2.6 – Результаты компонентного анализа свободных аминокислот (АК, Ig мкмоль/100г) в тканях *H. sanguisuga* различных климатогеографических зон

АК, Ig мкмоль/100г ( <i>i</i> = 20)	Нагрузки (loadings, $a_{ij}$ )			Вклад в главную компоненту (Contribution = $(a_{ij}^2 * 100) / \lambda_j$ , %)		
	Главные компоненты (Principal Components – PC), <i>j</i> = 1, 2, 3					
	1	2	3	1	2	3
Cysteic Acid	-0,87***	0,14	-0,32*	10,31	0,54	3,13
Aspartic Acid	-0,90***	0,17	0,21	11,11	0,73	1,30
Threonine	-0,02	-0,83***	-0,32*	0,01	18,14	3,06
Serine	0,43**	-0,49***	-0,23	2,59	6,41	1,66
Glu+ Gln	-0,91***	-0,25	0,06	11,21	1,68	0,10
Proline	-0,52***	0,57***	-0,37**	3,63	8,48	4,10
Glycine	-0,51***	-0,41**	-0,50***	3,54	4,45	7,55
Alanine	-0,90***	-0,26*	0,01	10,92	1,74	0,00
Valine	-0,76***	-0,31*	0,26*	7,84	2,49	2,07
Cystine	-0,70***	0,25	-0,31*	6,59	1,68	3,01
Methionine	-0,09	0,03	0,57***	0,11	0,02	9,90
Isoleucine	-0,41**	-0,13	0,71***	2,33	0,44	15,57
Leucine	0,45***	-0,76***	-0,16	2,78	15,01	0,74
Tyrosine	0,15	-0,35**	0,63***	0,29	3,13	12,08
Phenylalanine	0,04	-0,37**	-0,33*	0,02	3,52	3,35
GABA	0,10	-0,72***	0,59***	0,13	13,42	10,69
Ornithine	-0,63***	-0,20	0,55***	5,40	1,02	9,21
Lysine	0,04	-0,73***	-0,54***	0,02	13,91	8,88
Histidine	-0,89***	-0,34**	0,06	10,74	3,06	0,09
Arginine	-0,88***	-0,07	-0,34**	10,43	0,14	3,51
	Собственные значения (eigenvalues, $\lambda_j$ ) PC			Дисперсия, объясненная PC (%)		
	7,34	3,82	3,25	36,71	19,07	16,25

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

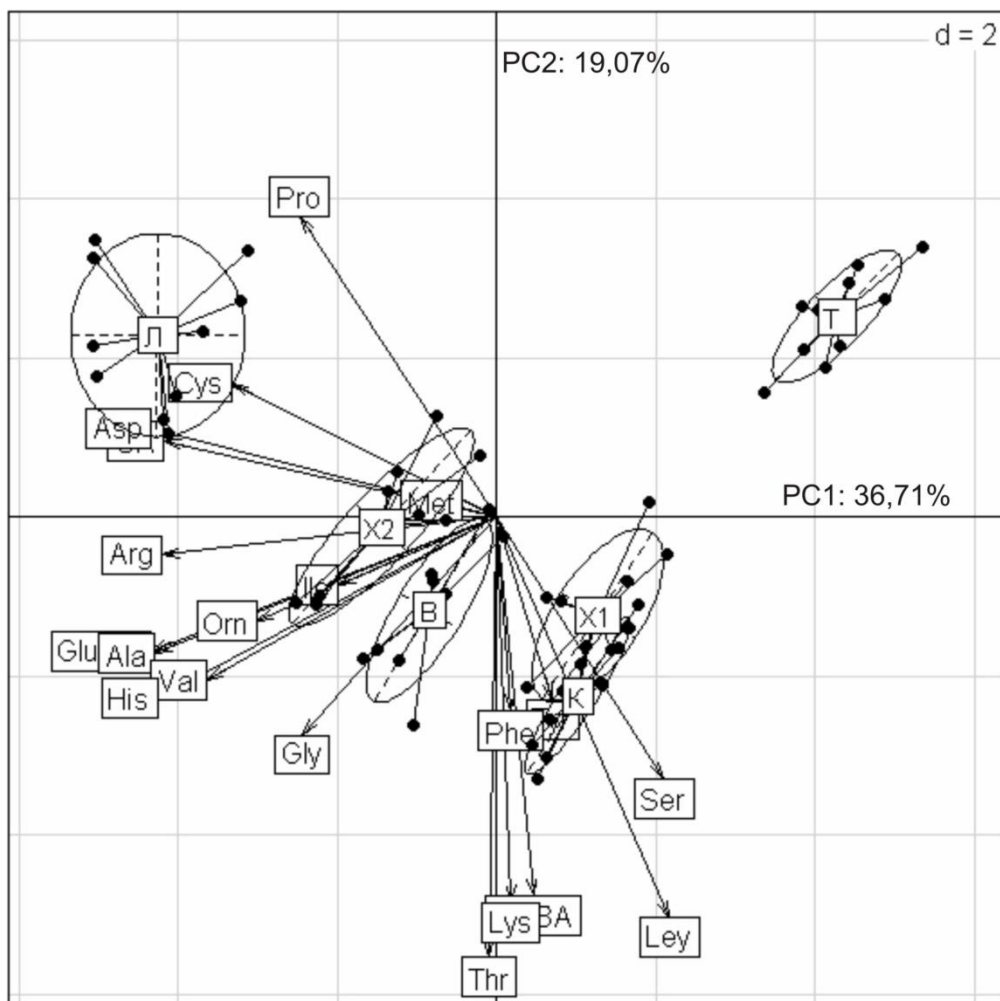


Рисунок 3.2.5 – Свободные аминокислоты (1г мкмоль/100г) тканей *H. sanguisuga* различных климатогеографических зон в пространстве главных компонент.

Условные обозначения: Т – Тамбовская область, Л – Луганская Народная Республика, X1, X2 – Харьковская область, В – Волгоградская область, К – Краснодарский край

Анализ процентного содержания свободных АК в тканях *H. sanguisuga* из водных экосистем различных регионов показал наиболее высокий уровень аспарагиновой кислоты, пролина, орнитина, гистидина у особей луганской популяции (рис. 3.2.6).

Пиявки *H. sanguisuga*, обитающие в Тамбовской области, отличаются от других географических групп повышенным процентным содержанием метионина, лейцина, тирозина, фенилаланина и фонда АРАК. В тканях харьковских пиявок отмечены максимальные количества треонина и лизина (оз. Горелое), цистеина и



аргинина (р. Уды). Волгоградские особи *H. sanguisuga* отличаются максимальным процентным содержанием аланина, а краснодарские – изолейцина (рис. 3.2.6).

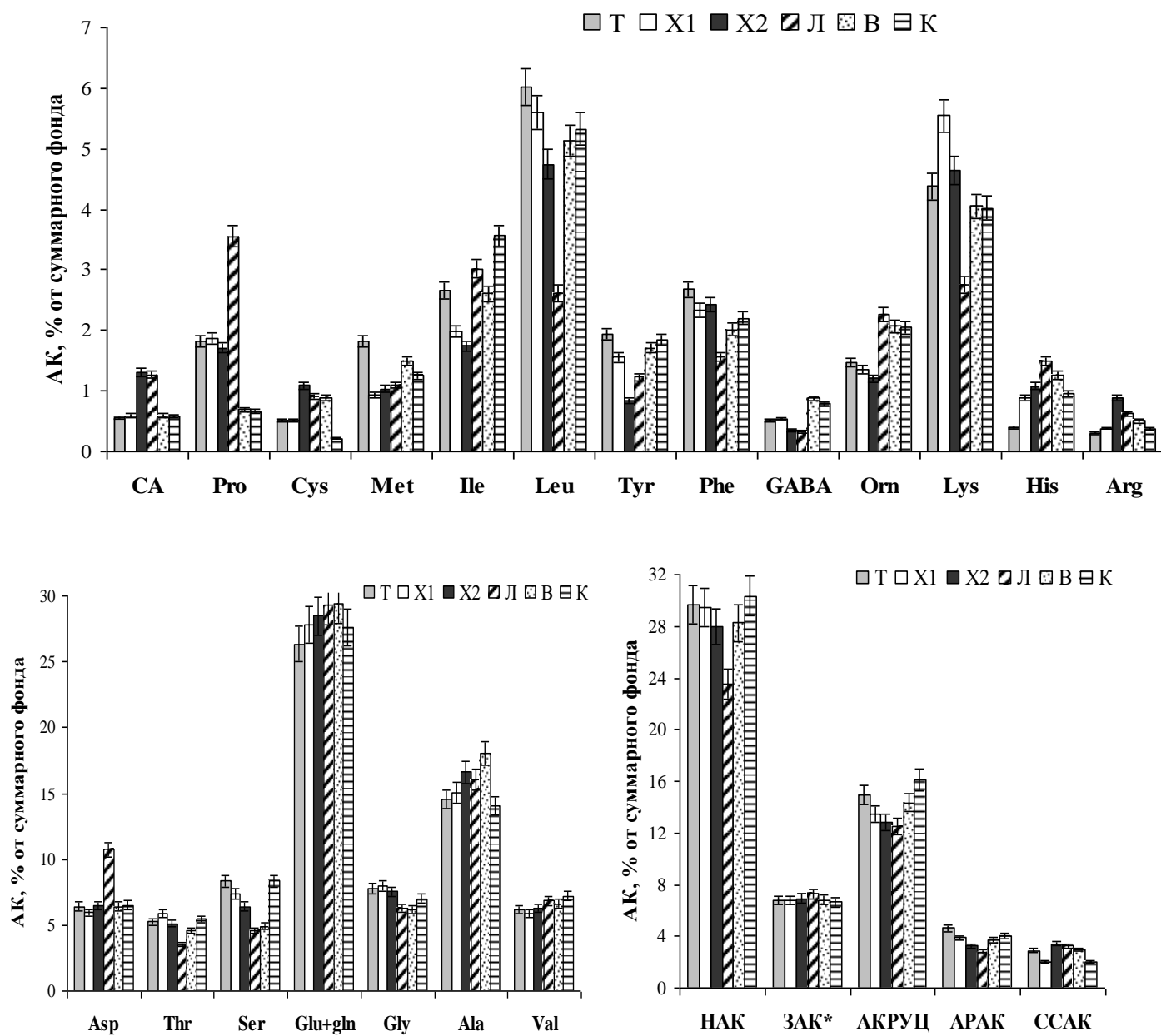


Рисунок 3.2.6 – Содержание свободных аминокислот (АК, % от суммарного фонда) в тканях ложноконской пиявки *H. sanguisuga*. Условные обозначения: Т – Тамбовская область, Х1, Х2 – Харьковская область, Л – Луганская Народная Республика, В – Волгоградская область, К – Краснодарский край;

\* – значения ЗАК уменьшены в 10 раз

Поскольку обсуждаемые выше экспериментальные данные показали высокую экологическую изменчивость аминокислотного спектра тканей у медицинских и ложноконской пиявок, перед нами стояла задача определить, сохраняется ли его видовая и трофическая специфика, выявленная в рамках одного водоема (оз. Горелое), в географическом аспекте.

Показано, что суммарные концентрации свободных АК в тканях челюстных пиявок изменяются в ряду: *H. medicinalis* (европейская) < *H. verbana* ≤ *H. sanguisuga* ≤ *H. medicinalis* (сибирская) ( $F_{3, 146} = 16,12$ ;  $p = 0,000$ ), при этом статистически значимые различия выявлены между лечебными МП, обитающими на европейской территории, и остальными группами гирудинид, а также между аптечными и лечебными сибирскими МП ( $p < 0,001$ ) (табл. 3.2.7).

Необходимо отметить, что различия аминокислотных пулов между исследуемыми видами и формами пиявок обусловлены в первую очередь высокой вариабельностью метаболических групп: НАК, АКРУЦ, АРАК ( $F_{3, 146} > 186,14$ ;  $p < 0,001$ ), повышенное содержание которых характерно для тканей сибирской формы *H. medicinalis* и хищной *H. sanguisuga* ( $p < 0,001$ ). Наиболее высокая эколого-физиологическая изменчивость отмечена для аспартата, пролина, валина, изолейцина, лизина, гистидина ( $F_{3, 146} > 133,00$ ;  $p < 0,001$ ), а наиболее низкая – для глутаминовой кислоты и глутамина ( $F_{3, 146} = 8,55$ ;  $p = 0,000$ ).

Переходя от общих оценок массива экспериментальных данных к детальному анализу, можно заключить, что наибольшее влияние на суммарный фонд свободных АК в тканях гирудинид оказывает климатический фактор. Так, суммарные концентрации свободных АК в тканях особей сибирской формы *H. medicinalis* превышает таковые у европейской формы в 1,21 раз ( $p < 0,001$ ) (табл. 3.2.7). Аминокислотный фонд тканей *H. medicinalis*, обитающих в экстремальных климатических условиях, на восточной границе ареала, повышен в основном за счет АК, концентрации которых более чем в два раза выше, чем у европейской формы – цистеиновой кислоты, изолейцина, тирозина, лизина, гистидина, аргинина ( $p < 0,001$ ).

Таблица 3.2.7 – Видовая, климатогеографическая и трофическая специфика аминокислотного спектра (АК, мкмоль/100г) тканей челюстных пиявок

АК, мкмоль/100г	1. <i>H. medicinalis</i> европейская n = 40	2. <i>H. medicinalis</i> сибирская n = 20	3. <i>H. verbanda</i> n = 30	4. <i>H. sanguisuga</i> n = 60
Cysteic Acid	19,00±1,46 <sup>3,4</sup>	43,28±4,04	21,06±1,11 <sup>1</sup>	16,82±1,18 <sup>1</sup>
Aspartic Acid	389,95±7,57 <sup>3</sup>	556,82±9,25	407,45±13,54 <sup>1</sup>	143,71±6,79
Threonine	45,24±2,77	65,98±1,50	55,66±4,49	97,93±2,23
Serine	66,60±3,53	109,06±2,37 <sup>4</sup>	78,13±3,73	129,60±3,21 <sup>2</sup>
Glu +Gln	624,43±18,36 <sup>2,3</sup>	643,49±4,60 <sup>1,3</sup>	657,50±19,12 <sup>1,2</sup>	562,11±11,39
Proline	29,06±2,46 <sup>3,4</sup>	1,34±0,06	21,81±1,35 <sup>1</sup>	34,95±3,18 <sup>1</sup>
Glycine	108,56±2,07	91,62±1,89	123,13±2,19	140,61±2,28
Alanine	239,58±6,72 <sup>2,3</sup>	252,31±3,38 <sup>1,3</sup>	237,45±4,75 <sup>1,2</sup>	314,70±7,40
Valine	43,89±2,91	73,37±1,10	52,47±2,10	129,97±3,07
Cystine	5,98±0,65 <sup>2</sup>	4,30±0,09 <sup>1</sup>	13,85±1,81 <sup>4</sup>	14,08±1,03 <sup>3</sup>
Methionine	13,48±0,55 <sup>2,3</sup>	15,05±0,67 <sup>1,3</sup>	13,41±0,72 <sup>1,2</sup>	24,87±0,86
Isoleucine	16,67±0,69 <sup>3</sup>	36,86±0,87	19,72±1,32 <sup>1</sup>	51,90±2,19
Leucine	53,61±1,30	78,87±2,11 <sup>3</sup>	71,02±2,21 <sup>2</sup>	95,67±2,61
Tyrosine	10,62±0,54	16,91±0,32 <sup>3</sup>	18,64±1,51 <sup>2</sup>	29,81±1,19
Phenylalanine	21,64±0,96 <sup>3</sup>	37,99±1,27 <sup>4</sup>	20,29±1,50 <sup>1</sup>	43,14±1,05 <sup>2</sup>
GABA	5,07±0,32	3,03±0,47 <sup>3</sup>	3,05±0,12 <sup>2</sup>	11,23±0,58
Ornithine	17,75±0,42 <sup>2</sup>	16,19±0,17 <sup>1</sup>	22,11±0,61	35,28±1,78
Lysine	24,69±1,32	50,01±1,86	32,35±1,16	83,29±2,38
Histidine	2,03±0,11	7,90±0,22	5,64±0,91	20,97±1,22
Arginine	1,49±0,24	5,26±0,41 <sup>3</sup>	4,31±0,53 <sup>2</sup>	10,52±0,62
Фонд АК	1739,37±37,98	2109,01±26,05 <sup>4</sup>	1879,03±15,04 <sup>4</sup>	1991,14±33,53 <sup>2,3</sup>
НАК	222,75±8,47	371,31±4,44	274,86±5,66	558,25±8,41
ЗАК	1474,79±34,02 <sup>3</sup>	1675,84±9,23 <sup>3</sup>	1557,96±14,37 <sup>1,2</sup>	1369,57±26,17
АКРУЦ	114,18±3,77	189,10±2,98	143,20±2,56	277,54±4,70
АРАК	32,27±1,23	54,90±1,12	38,93±1,13	72,95±1,61
ССАК	38,46±2,43	62,63±4,75 <sup>3,4</sup>	48,31±1,80 <sup>2,4</sup>	55,77±2,25 <sup>2,3</sup>

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

Вместе с тем для тканей сибирских особей *H. medicinalis* отмечено значимо низкое содержание пролина (в 21,69 раз), глицина (в 1,18 раз),  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (в 1,76 раз) ( $p < 0,001$ ). Для концентраций глутаминовой кислоты и глутамина, аланина, цистеина, метионина, орнитина статистически значимых различий не обнаружено ( $p > 0,05$ ).

Относительно специфики аминокислотного спектра тканей медицинских пиявок *H. medicinalis* и *H. verbana* необходимо отметить существенный вклад в межвидовые различия восьми АК: треонина, серина, глицина, валина, цистеина, орнитина, лизина, гистидина ( $p < 0,001$ ) (табл. 3.2.7).

Вместе с тем следует признать, что в климатогеографическом аспекте аминокислотный спектр тканей лечебных и аптечных пиявок теряет видовую специфику, выявленную в равных экологических условиях одного водоема (оз. Горелое) – для большинства свободных аминокислот статистически значимых различий выявить не удалось ( $p > 0,05$ ).

На рисунке 3.2.7 представлены результаты компонентного анализа свободных аминокислот тканей двух видов медицинских пиявок, обитающих в водных экосистемах различных климатогеографических зон.

Показана пространственная удаленность региональных групп медицинских пиявок, обитающих в экстремальных условиях – на границах ареала (особи *H. medicinalis* из Алтайского края и Тамбовской области) и на промышленно развитых территориях (пиявки *H. medicinalis* из Луганской Народной Республики и *H. verbana* из Волгоградской области). Особи лечебных и аптечных пиявок, обитающие в благоприятных экологических условиях (Харьковская область и Краснодарский край), на рисунке оформились в общее «ядро» (рис. 3.2.7).

Наибольший вклад, более 6,50%, в экологическую изменчивость свободных АК в тканях МП по первой главной компоненте (PC1), на которую приходится 40,75% общей дисперсии данных, вносят цистеиновая кислота, треонин, серин, валин, лейцин, лизин, гистидин, аргинин, характеризующиеся высокой корреляцией с PC1 и повышенное содержание которых отмечено у лечебных пиявок алтайских популяций (рис. 3.2.7, табл. 3.2.8).

Со второй компонентой (PC2), на которую приходится 16,71% общей дисперсии данных, сильно коррелируют глутаминовая кислота и глутамин, глицин, аланин, цистеин, метионин; вклад этих АК в PC2 превышает 9,13%. Наиболее весомый вклад в третью компоненту (PC3), на которую приходится 15,14% общей дисперсии данных, отмечен для треонина, изолейцина, орнитина и гистидина (табл. 3.2.8).

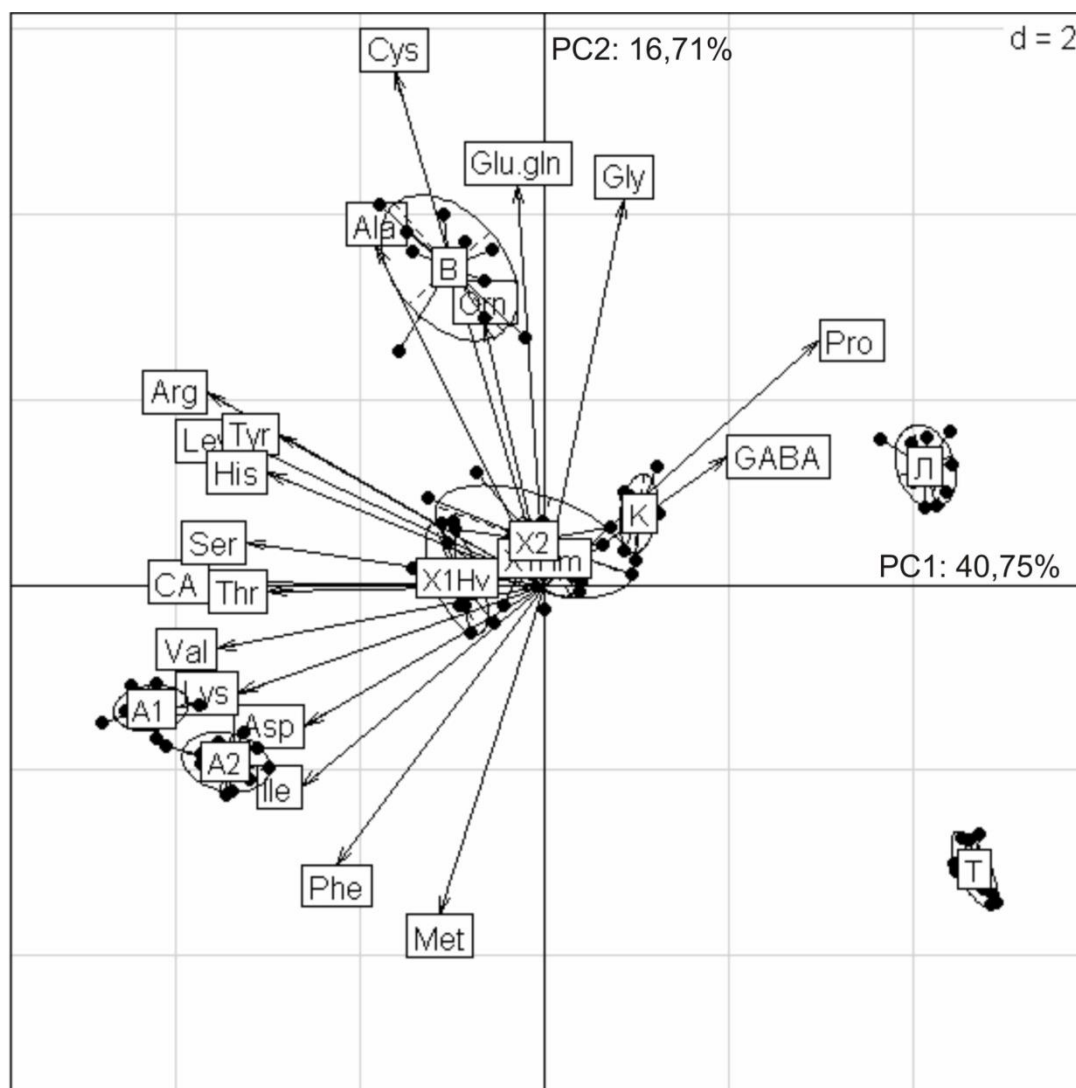


Рисунок 3.2.7 – Свободные аминокислоты (1г мкмоль/100г) тканей медицинских пиявок *H. medicinalis* (Hm) и *H. verbana* (Hv) в пространстве главных компонент. Условные обозначения: A1, A2 – Алтайский край, B – Волгоградская область, K – Краснодарский край, Л – Луганская Народная Республика, Т – Тамбовская область, X1, X2 – Харьковская область

Таблица 3.2.8 – Результаты компонентного анализа свободных аминокислот (АК, Ig мкмоль/100г) в тканях *H. medicinalis* и *H. verbana* различных климатогеографических зон

АК, Ig мкмоль/100г ( $i = 20$ )	Нагрузки (loadings, $a_{ij}$ )			Вклад в главную компоненту (Contribution = $(a_{ij}^2 \cdot 100) / \lambda_j$ , %)		
	Главные компоненты (Principal Components – PC), $j = 1, 2, 3$					
	1	2	3	1	2	3
Cysteic Acid	-0,89***	0,00	-0,05	9,63	0,00	0,08
Aspartic Acid	-0,63***	-0,24*	-0,11	4,91	1,67	0,42
Threonine	-0,73***	-0,01	-0,59***	6,54	0,00	11,46
Serine	-0,79***	0,07	-0,45***	7,57	0,15	6,67
Glu+ Gln	-0,07	0,67***	0,30**	0,06	13,42	2,97
Proline	0,72***	0,41***	-0,31**	6,43	5,03	3,11
Glycine	0,21*	0,65***	-0,52***	0,55	12,51	9,07
Alanine	-0,44***	0,57***	-0,01	2,40	9,65	0,01
Valine	-0,86***	-0,11	-0,37***	9,15	0,35	4,47
Cystine	-0,39***	0,86***	-0,04	1,91	22,16	0,05
Methionine	-0,28**	-0,55***	-0,43***	0,94	9,14	6,06
Isoleucine	-0,64***	-0,34**	0,60***	5,03	3,45	11,94
Leucine	-0,80***	0,24*	0,21*	7,89	1,73	1,53
Tyrosine	-0,70***	0,25*	0,31**	6,01	1,90	3,26
Phenylalanine	-0,55***	-0,47***	-0,54***	3,68	6,57	9,47
GABA	0,48***	0,22*	0,11	2,85	1,39	0,36
Ornithine	-0,16	0,44***	-0,68***	0,31	5,74	15,23
Lysine	-0,81***	-0,18	0,16	7,96	0,98	0,82
Histidine	-0,73***	0,19	0,62***	6,51	1,07	12,64
Arginine	-0,89***	0,32**	0,11	9,69	3,10	0,40
	Собственные значения (eigenvalues, $\lambda_j$ ) PC			Дисперсия, объясненная PC (%)		
	8,15	3,34	3,03	40,75	16,71	15,14

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

Сравнительная оценка показала, что трофическая специфика аминокислотного спектра тканей челюстных пиявок, выявленная в рамках одного водоема (оз. Горелое), сохраняется и в климатогеографическом аспекте (табл. 3.2.7). Показано, что медицинские пиявки содержат в тканях значительно больше, чем *H. sanguisuga*, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты и глутамина ( $p < 0,001$ ). Большая ложноконская пиявка отличается от особей *H. medicinalis* и *H. verbana* повышенными концентрациями треонина, серина, пролина, глицина, аланина, валина, метионина, изолейцина, лейцина, тирозина,  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, орнитина, лизина, гистидина и аргинина ( $p < 0,001$ ).

Суммарные фонды основных метаболических групп аминокислот (НАК, АКРУЦ и АРАК) хищных гирудинидкратно выше, чем у гематофагов ( $p < 0,001$ ), а пул серосодержащих АК не отличается от такового особей аптечных и сибирских лечебных пиявок ( $p > 0,05$ ). Сопоставимые концентрации цистеиновой кислоты, пролина, цистеина, фенилаланина характерны для особей *H. sanguisuga* и медицинских пиявок тех или иных экологических групп (табл. 3.2.7) ( $p > 0,05$ ).

Трофическая специфика аминокислотного спектра тканей челюстных пиявок визуализирована с помощью компонентного анализа (РСА) (рис. 3.2.8, табл. 3.2.9). По первой главной компоненте (PC1), на которую приходится 52,60% общей дисперсии данных, показана существенная пространственная удаленность хищных пиявок от кровососущих.

Наибольший вклад, более 5,86%, в компоненту PC1, отражающую трофические различия, вносят треонин, серин, валин, изолейцин, лейцин, тирозин, лизин, гистидин, аргинин. Для данных аминокислот характерна очень высокая корреляция с PC1 (табл. 3.2.9).

Со второй компонентой (PC2), на которую приходится 12,62% общей дисперсии, наиболее значимо коррелируют цистеиновая и аспарагиновая кислоты, пониженное содержание которых отмечено у ложноконских пиявок, а также глутаминовая кислота и глутамин, высокое и стабильное содержание которых характерно для медицинских пиявок различных экологических групп (рис. 3.2.8, табл. 3.2.9).

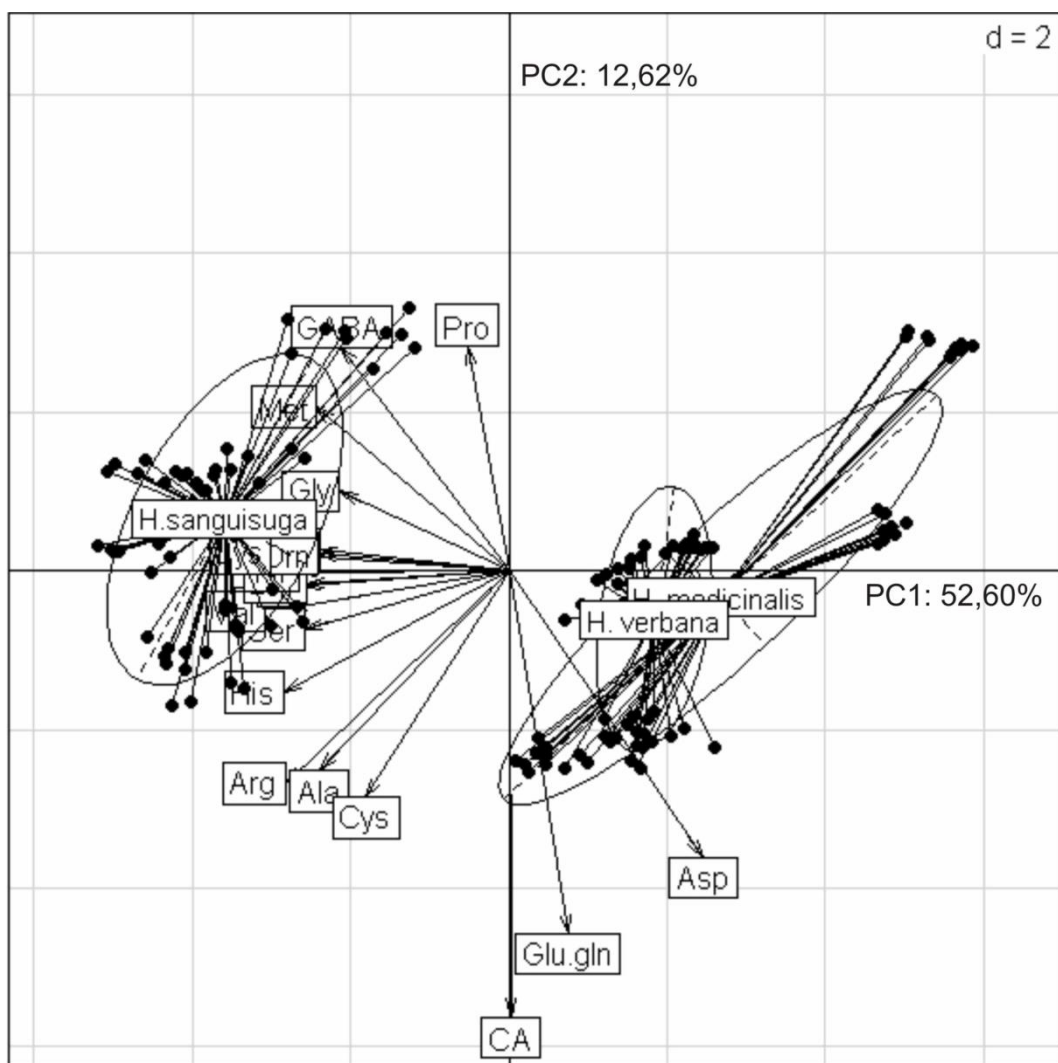


Рисунок 3.2.8 – Свободные аминокислоты (lg мкмоль/100г) тканей кровососущих (*H. medicinalis* и *H. verbana*) и хищных (*H. sanguisuga*) челюстных пиявок различных климатогеографических зон в пространстве главных компонент

Значимый вклад в третью главную компоненту (PC3), на которую приходится 10,94% общей дисперсии данных, вносят аминокислоты, для которых была выявлена невысокая трофическая изменчивость – пролин, глицин и цистеин (табл. 3.2.9).



Таблица 3.2.9 – Результаты компонентного анализа свободных аминокислот (АК, 1g мкмоль/100г) в тканях кровососущих и хищных пиявок

АК, 1g мкмоль/100г ( $i = 20$ )	Нагрузки (loadings, $a_{ij}$ )			Вклад в главную компоненту (Contribution = ( $a_{ij}^2 * 100$ )/ $\lambda_j$ , %)		
	Главные компоненты (Principal Components – PC), $j = 1, 2, 3$					
	1	2	3	1	2	3
Cysteic Acid	0,01	-0,84***	0,16	0,00	28,23	1,17
Aspartic Acid	0,75***	-0,52***	0,09	5,36	11,65	0,34
Threonine	-0,86***	-0,07	0,21**	6,96	0,21	2,10
Serine	-0,79***	-0,11	0,30***	5,97	0,48	4,01
Glu+ Gln	0,23**	-0,69***	-0,48***	0,50	18,65	10,59
Proline	0,16	0,42***	-0,77***	0,25	7,16	27,28
Glycine	-0,66***	0,15	-0,52***	4,08	0,89	12,16
Alanine	-0,73***	-0,38***	-0,39***	5,11	5,63	6,83
Valine	-0,95***	-0,08	0,12	8,50	0,24	0,69
Cystine	-0,55***	-0,43***	-0,52***	2,93	7,27	12,23
Methionine	-0,75***	0,31***	0,17*	5,31	3,78	1,26
Isoleucine	-0,80***	0,03	0,19*	6,11	0,03	1,70
Leucine	-0,79***	-0,02	0,23**	5,87	0,02	2,33
Tyrosine	-0,81***	-0,00	0,08	6,28	0,00	0,32
Phenylalanine	-0,73***	0,04	0,38***	5,10	0,06	6,75
GABA	-0,65***	0,42***	-0,30***	4,02	7,10	4,03
Ornithine	-0,74***	0,03	-0,32***	5,19	0,04	4,62
Lysine	-0,92***	0,03	0,17*	8,04	0,04	1,27
Histidine	-0,88***	-0,23**	-0,08	7,28	2,09	0,29
Arginine	-0,87***	-0,40***	-0,01	7,13	6,43	0,00
	Собственные значения (eigenvalues, $\lambda_j$ ) PC			Дисперсия, объясненная PC (%)		
	10,52	2,53	2,19	52,60	12,62	10,94

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

Проведенные исследования показали, что экологические особенности водных экосистем, в которых обитают изучаемые нами кровососущие и хищные пиявки, оказывают существенное влияние на состояние аминокислотного фонда тканей *H. medicinalis*, *H. verbana* и *H. sanguisuga*.

Выявлена видовая специфика аминокислотного состава тканей совместно обитающих медицинских пиявок, обусловленная особенностями их метаболизма. Установлено, что аптечная пиявка *H. verbana*, тяготеющая к обитанию в южных широтах, отличается от лечебной *H. medicinalis* повышенным содержанием в тканях аспарагиновой кислоты, серина, пролина, тирозина, орнитина, пула незаменимых АК, и пониженным – глутаминовой кислоты и глутамина, аланина, цистеина, изолейцина. Концентрации всех исследуемых свободных АК, исключая орнитин, в тканях двух видов медицинских пиявок существенно отличаются от таковых ложноконской пиявки *H. sanguisuga*, что свидетельствует о приоритетном влиянии трофического фактора на аминокислотный статус совместно обитающих кровососущих и хищных гирудинид. Важно, что трофическая специфика аминокислотного спектра тканей челюстных пиявок, выявленная в рамках одного водоема (оз. Горелое), сохраняется и в климатогеографическом аспекте.

Вместе с тем аминокислотный состав тканей природных особей *H. medicinalis* и *H. verbana* в географическом аспекте теряет видовую специфику, выявленную на биотопическом уровне, что в значительной степени обусловлено физиологическим состоянием особей, обитающих в оптимальных и периферийных частях ареала. В тканях лечебных и аптечных пиявок, обитающих в неблагоприятных климатических условиях и в водных экосистемах промышленных регионов, повышен уровень аминокислотного фонда за счет существенного роста концентраций аминокислот, обладающих энергообеспечивающими, иммуномодулирующими и детоксикационными свойствами.

## **ГЛАВА 4. СЕЗОННАЯ И ВОЗРАСТНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В ТКАНЯХ МЕДИЦИНСКИХ ПИЯВОК ИЗ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ**

В настоящее время связь между формированием аминокислотного состава тканей медицинских пиявок и их эколого-физиологическими особенностями – размножением, развитием и ростом, подготовкой к зимнему анабиозу, является важным, но слабо изученным вопросом. 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 сезонных и возрастных особенностей аминокислотного спектра тканей медицинских пиявок представляет несомненный интерес.

### **4.1. Сезонная динамика содержания свободных аминокислот 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 свободных аминокислот в тканях медицинских пиявок, обусловленные, как влиянием абиотических факторов среды, так и приуроченными к смене времен года физио-

логическими 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).

Одним из важнейших абиотических факторов, влияющих на географическое распространение пиявок и приуроченность к определенному типу водоема, является температурный режим воды, в частности на них неблагоприятно действуют как колебания, так и значительное повышение температуры воды (Синева, 1949; Лукин, 1976). Тем не менее, они приспособились к сезонным изменениям температуры и неоднократно впадают в зимний анабиоз, что может в определенной мере обуславливать им высокую продолжительность жизни (5 лет и более). Зимняя спячка – важный биологический феномен, обеспечивающий выживание в неблагоприятных условиях. В это время все системы жизнедеятельности работают в замедленном «энергосберегающем» режиме.

В литературе имеются сведения (Каранова, 2006; Джабаров, 2006; Karanova, 2011) о роли свободных аминокислот в формировании низкотемпературной адаптации пресноводных гидробионтов. Учитывая участие свободных аминокислот в регуляции основных метаболических процессов, оценка сезонного состояния аминокислотного фонда в тканях медицинских пиявок позволит оценить его роль в адаптационных возможностях этих гидробионтов к изменчивости температурного режима среды обитания.

Результаты ионообменной хроматографии показали, что физиологические процессы, связанные с сезонными особенностями биологического цикла медицинских пиявок, обуславливают качественные и количественные изменения аминокислотного спектра в их тканях (Черная и др., 2015) (табл. 4.1.1). По данным дисперсионного анализа (ANOVA) сезонный фактор оказывает существенное влияние на уровень аминокислотного фонда в целом и концентраций отдельных АК в тканях медицинских пиявок ( $p < 0,001$ ) (табл. 4.1.1).

Таблица 4.1.1 – Сезонные изменения содержания свободных аминокислот в тканях  
аптечной пиявки *H. verbana*

Аминокислота, мкмоль/100г	1. Весна <i>n</i> = 10	2. Лето <i>n</i> = 10	3. Осень <i>n</i> = 10	ANOVA F(2, 27); <i>p</i>
Cysteic Acid	15,10 ± 0,41	6,32 ± 0,20	41,61 ± 1,14	1092,9; 0,000
Aspartic Acid	349,70 ± 2,20	235,29 ± 2,34	425,51 ± 12,18	280,43; 0,000
Threonine	39,24 ± 1,51	24,74 ± 0,71	57,41 ± 2,39	126,88; 0,000
Serine	66,93 ± 1,46	41,65 ± 1,15	102,88 ± 4,70	180,15; 0,000
Glu +Glu	690,81 ± 5,71	201,63 ± 3,74	1242,57 ± 24,05	3274,8; 0,000
Proline	30,82 ± 0,58	2,42 ± 0,06	7,86 ± 0,12	4727,2; 0,000
Glycine	128,36 ± 1,47	41,37 ± 1,13	59,50 ± 2,34	1326,9; 0,000
Alanine	230,04 ± 1,10 <sup>3</sup>	166,33 ± 3,53	233,45 ± 10,69 <sup>1</sup>	40,86; 0,000
Valine	49,97 ± 0,54	7,16 ± 0,32	39,34 ± 1,23	1129,2; 0,000
Cysteine	8,53 ± 0,46	1,20 ± 0,03	33,4 ± 1,8	1484,2; 0,000
Methionine	16,02 ± 0,44 <sup>3</sup>	2,58 ± 0,04	17,55 ± 0,68 <sup>1</sup>	1180,9; 0,000
Isoleucine	18,50 ± 0,35	5,29 ± 0,27	32,25 ± 1,26	604,50; 0,000
Leucine	63,19 ± 0,36	32,63 ± 1,52	38,15 ± 1,16	117,03; 0,000
Tyrosine	12,49 ± 0,20	6,10 ± 0,24	7,81 ± 0,22	162,98; 0,000
Phenylalanine	22,31 ± 0,43	6,57 ± 0,31 <sup>3</sup>	6,95 ± 0,22 <sup>2</sup>	438,37; 0,000
Tryptophan	следы	следы	4,22 ± 0,09	8564,7; 0,000
GABA	3,43 ± 0,12	следы	следы	2646,0; 0,000
Ornithine	20,50 ± 0,31	10,81 ± 0,37	28,66 ± 1,16	231,97; 0,000
Lysine	38,24 ± 0,97 <sup>3</sup>	13,54 ± 0,53	40,48 ± 1,16 <sup>1</sup>	378,89; 0,000
Histidine	2,05 ± 0,05 <sup>3</sup>	0,49 ± 0,01	2,13 ± 0,05 <sup>1</sup>	809,43; 0,000
Arginine	1,75 ± 0,02	2,42 ± 0,03	15,26 ± 0,47	2949,8; 0,000
Фонд АК	1807,98 ± 7,71	808,58 ± 6,40	2436,94 ± 51,16	1865,3; 0,000

Примечание: надстрочными цифрами обозначены группы, между которыми отсутствуют значимые различия (Tukey HSD test, *p* > 0,05)

Так, в тканях особей *H. verbana*, отловленных в разные сезоны, суммарные концентрации аминокислотного пула статистически значимо убывают в ряду времен года: осень > весна > лето ( $F_{2; 27} = 1865,3; p = 0,000$ ) (табл. 4.1.1).

Наибольший вклад в сезонную изменчивость аминокислотного спектра тканевой аптечной пиявки вносят цистеиновая кислота, глутаминовая кислота и глутамин, пролин, глицин, валин, цистеин, метионин, триптофан,  $\gamma$ -аминомасляная кислота, аргинин ( $F_{2; 27} > 1092; p < 0,001$ ).

В тканях осенних особей *H. verbana* отмечены максимальные концентрации фонда АК ( $2436,94 \pm 51,16$  мкмоль/100г), втрое превышающие таковые летней группы пиявок ( $p < 0,001$ ), что связано с катаболизмом мышечных белков в условиях низких температур (+2°C).

Известно, что метаболизм живой клетки включает механизм в норме регулирующий протеолиз белков, однако во время гипотермического оцепенения организма дегградация белков преобладает над синтезом, а увеличение пулов аминокислот отражает этот процесс (Van Breukelen, 2004). Высокий уровень аминокислотного фонда в тканях осенних особей *H. verbana* обеспечивают максимальные концентрации 11-ти АК, кратно превышающие таковые летней группы пиявок: цистеиновой кислоты (в 6,6 раз), аспарагиновой кислоты (в 1,8), треонина (в 2,3), серина (в 2,5), глутаминовой кислоты и глутамина (в 6,2), цистеина (в 27,8), изолейцина (в 6,1), триптофана (в 4,2), орнитина (в 2,7), лизина (в 3,0), аргинина (в 6,3) ( $p < 0,01$ ) (табл. 4.1.1).

Для осенней группы пиявок необходимо особо отметить накопление в тканях незаменимой АК триптофана – биологического прекурсора серотонина (тормозящий нейромедиатор и тканевый гормон, вызывающий сокращение гладкой мускулатуры) и мелатонина (гормон эпифиза, регулирующий сезонную ритмику живых организмов). Мелатонин принимает активное участие в сезонных перестройках жизнедеятельности организмов животных. Поскольку продукция мелатонина зависит от длины светового дня, многие животные используют ее как «сезонные часы» – у животных продукция мелатонина летом ниже, чем зимой. Таким образом, мелатонин регулирует функции, зависящие от фотопериода – размноже-

ние, миграционное поведение, сезонная линька (Анисимов, 2007). К другим важнейшим функциям мелатонина относится его антиоксидантная, антистрессорная и иммуностимулирующая активность в организме животных, что актуально для теплолюбивых медицинских пиявок в условиях экстремального снижения температуры в осенний период.

В тканях весенних особей *H. verbana*, вышедших из продолжительного зимнего анабиоза, суммарный пул свободных АК снижается, относительно осенней группы, в 1,3 раз ( $p < 0,001$ ) (табл. 4.1.1). Обеднение аминокислотного фонда происходит в основном за счет существенного падения концентраций цистеиновой кислоты (в 2,8 раз), серина (в 1,5), глутаминовой кислоты и глутамина (в 1,8), цистеина (в 3,9), изолейцина (в 1,7), аргинина (в 8,7) и триптофана до следового содержания ( $p < 0,001$ ) (табл. 4.1.1). Вместе с тем, у весенней группы медицинских пиявок отмечено повышение тканевых концентраций пролина (в 3,9 раз), глицина (в 2,2), валина (в 1,3), лейцина (в 1,7), тирозина (в 1,6), фенилаланина (в 3,2), что указывает на их роль в активации метаболических процессов, способствующих сезонной адаптации ( $p < 0,001$ ). При этом в их тканях на одном уровне с осенними особями остаются концентрации аланина ( $p = 0,99$ ), метионина ( $p = 0,09$ ), лизина ( $p = 0,42$ ), гистидина ( $p = 0,46$ ) и пула незаменимых АК (НАК) ( $p = 0,93$ ) (табл. 4.1.1 и табл. 4.1.2).

Стабильные концентрации данных АК и фонда НАК может быть одним из условий поддержания гомеостаза в организме *H. verbana* при низких показателях температуры воды в весенний и осенний сезоны (колебания температурного режима воды от  $+10^{\circ}\text{C}$  до  $+2^{\circ}\text{C}$ ). Согласно литературным данным, возрастание концентраций тех или иных свободных АК в период сезонной адаптации к низким температурам свойственно многим видам криотолерантных животных (Лозина-Лозинский, 1972; Каранова, 2006). Так, положительная корреляционная связь между существенным увеличением содержания некоторых свободных АК (таурин, глутаминовая кислота, серин, аланин, пролин, глицин, орнитин лизин, гистидин) и сезонным падением температуры или искусственной акклимацией к холоду обна-

ружена у многих видов животных, в том числе пресноводных рыб и моллюсков (Storey, Storey, 1991; Каранова, 2006).

Таблица 4.1.2 – Сезонная динамика содержания метаболитических групп свободных аминокислот в тканях аптечной пиявки *H. verbana*

АК	1. Весна <i>n</i> = 10	2. Лето <i>n</i> = 10	3. Осень <i>n</i> = 10	ANOVA	
				F(2, 27); <i>p</i>	Tukey HSD test, <i>p</i>
мкмоль/100г					
НАК	251,29±2,26	95,42±2,33	253,74±4,01	996,54; 0,000	1-2 = 0,000; 1-3 = 0,933; 2-3 = 0,000
ЗАК	1517,68±6,98	695,99±6,69	2112,9±46,67	1620,2; 0,000	1-2 = 0,000; 1-3 = 0,000; 2-3 = 0,000
АКРУЦ	131,67±0,77	45,08±1,93	109,74±2,11	441,41; 0,000	1-2 = 0,000; 1-3 = 0,000; 2-3 = 0,000
АРАК	34,81±0,50	12,67±0,50	14,76±0,46	337,38; 0,000	1-2 = 0,000; 1-3 = 0,000; 2-3 = 0,000
ССАК	39,65±0,60	10,10±0,19	92,50±2,53	2781,0; 0,000	1-2 = 0,000; 1-3 = 0,000; 2-3 = 0,000
% от фонда АК					
НАК	13,90±0,11	11,81±0,29	10,43±0,16	74,91; 0,000	1-2 = 0,000; 1-3 = 0,000; 2-3 = 0,000
ЗАК	83,94±0,12	86,07±0,32	86,67±0,17	43,52; 0,000	1-2 = 0,000; 1-3 = 0,000; 2-3 = 0,131
АКРУЦ	7,28±0,05	5,58±0,24	4,50±0,04	96,38; 0,000	1-2 = 0,000; 1-3 = 0,000; 2-3 = 0,000
АРАК	1,93±0,03	1,57±0,06	0,60±0,01	208,79; 0,000	1-2 = 0,000; 1-3 = 0,000; 2-3 = 0,000
ССАК	2,19±0,04	1,25±0,03	3,80±0,06	945,94; 0,000	1-2 = 0,000; 1-3 = 0,000; 2-3 = 0,000
Соотношение метаболитических групп АК					
НАК/ ЗАК	0,17	0,14	0,12		
АКРУЦ/ АРАК	3,78	3,56	7,43		

По нашим данным, в тканях весенних особей *H. verbana* отмечены максимальные, относительно других сезонных групп пиявок, концентрации пролина, глицина, валина, лейцина, тирозина, фенилаланина и  $\gamma$ -аминомасляной кислоты ( $p < 0,001$ ), что указывает на их ключевую роль в активации физиологических процессов после продолжительного зимнего анабиоза (табл. 4.1.1). Высокое содержание в тканях пиявок глицина, наряду с аланином, может быть связано с возросши-



ми потребностями перезимовавших пиявок в фибриллярных белках – коллагене и эластине. Известно, что коллаген как основной структурный белок соединительной ткани содержит 33% глицина и 13% аланина (Биохимия..., 2004). Следует отметить ролевое участие протеиногенной АК пролина в составе коллагена, обеспечивающего коллагеновым волокнам в составе сухожилий, хрящей и кожи прочность и практически нерастяжимость. Заслуживает внимания в фонде АК спектр функционально значимых незаменимых аминокислот (валин, лейцин, изолейцин, метионин, фенилаланин, гистидин), которые модулируют ключевые метаболические пути, направленные на повышение жизнеспособности, процессов роста, развития и репродуктивных функций (созревание половых продуктов). Незаменимые аминокислоты участвуют как в интенсивном наращивании мышечной массы, так и обеспечивают гормональную и энергетическую поддержку в весенний период.

Необходимо заострить внимание на высоком суммарном содержании в тканях весенней группы *H. verbana* ароматических АК (тирозин и фенилаланин) – предшественников катехоламинов дофамина, адреналина и норадреналина (табл. 4.1.2). Эти важнейшие биологически активные соединения в целом отвечают за биохимические реакции адаптации к острому стрессу, эволюционно связанному с мышечной активностью («борьба или бегство»), что приводит к усилению продукции жирных кислот в жировой ткани и мобилизации глюкозы для поддержания энергетических потребностей организма (Биохимия..., 2004).

Летний период, наиболее благоприятный в биологическом цикле гирудинид, когда происходит интенсивное наращивание мышечной массы и основная репродуктивная деятельность (спаривание и откладка коконов), характеризуется пониженным уровнем аминокислотного обмена – суммарные концентрации в тканях медицинских пиявок снижаются в 2,2 раз относительно весенних особей и в 3,0 – осенних ( $p < 0,001$ ). Наибольший обвал концентраций свободных АК в этом случае характерен для цистеиновой кислоты (в 2,4 раз), пролина (в 12,7), глицина (в 3,1), цистеина (в 7,1) и ряда незаменимых АК: валина (в 7,0), метионина (в 6,2), изолейцина (в 3,5), фенилаланина (в 3,4), лизина (в 2,8) и гистидина (в 4,2) ( $p <$

0,001). У летних и осенних особей не имеют значимых различий концентрации ароматической АК фенилаланина ( $p = 0,45$ ) (табл. 4.1.1).

Процентное содержание свободных аминокислот (% от суммарного фонда АК), их производных и основных метаболических групп АК в разные сезоны года представлено на рисунке 4.1.1.

Показано, что, независимо от сезона года, основу аминокислотного спектра тканей аптечной пиявки *H. verbana* составляют аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота и глутамин, аланин, треонин, лизин (рис. 4.1.1). В тканях весенних особей *H. verbana* отмечено максимальное процентное содержание глицина, валина, метионина, фенилаланина, гамма-аминомасляной кислоты (ГАВА), лизина, гистидина, а также пула НАК и АКРУЦ ( $p < 0,05$ ) (рис. 4.1.1). Для тканей летней группы пиявок характерно максимальное процентное содержание треонина, аспарагиновой кислоты, аланина, серина, лейцина, тирозина, орнитина ( $p < 0,05$ ) (рис. 4.1.1). Осенние особи отличаются от остальных сезонных групп максимальным процентным содержанием в тканях цистеиновой кислоты, цистеина, изолейцина, триптофана, аргинина, глутаминовой кислоты и глутамина, пула серосодержащих аминокислот (ССАК) ( $p < 0,05$ ) (рис. 4.1.1).

Установлено, что суммарные концентрации пула незаменимых АК в тканях весенних и осенних особей *H. verbana* сохраняются на одном уровне ( $p = 0,93$ ), а летом снижены почти в три раза ( $p < 0,001$ ) (табл. 4.1.2). Вместе с тем, процентное содержание суммарного пула незаменимых АК в тканях *H. verbana* снижается в сезонном ряду: весна (13,90%) > лето (11,81%) > осень (10,43%) ( $p < 0,001$ ), как и показатели соотношения НАК/ЗАК: весна (0,17) > лето (0,14) > осень (0,12) (табл. 4.1.2, рис. 4.1.1). Согласно результатам однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), для пула НАК (% от фонда) характерна достаточно высокая вариабельность ( $F_{2; 27} = 74,91$ ;  $p = 0,000$ ) (табл. 4.1.2, рис. 4.1.2).

Напротив, для процентного содержания пула заменимых АК отмечена более низкая изменчивость ( $F_{2; 27} = 43,50$ ;  $p = 0,000$ ) и обратная динамика: осень (86,67%)  $\geq$  лето (86,07%) > весна (83,94%) (табл. 4.1.2, рис. 4.1.1-4.1.2).

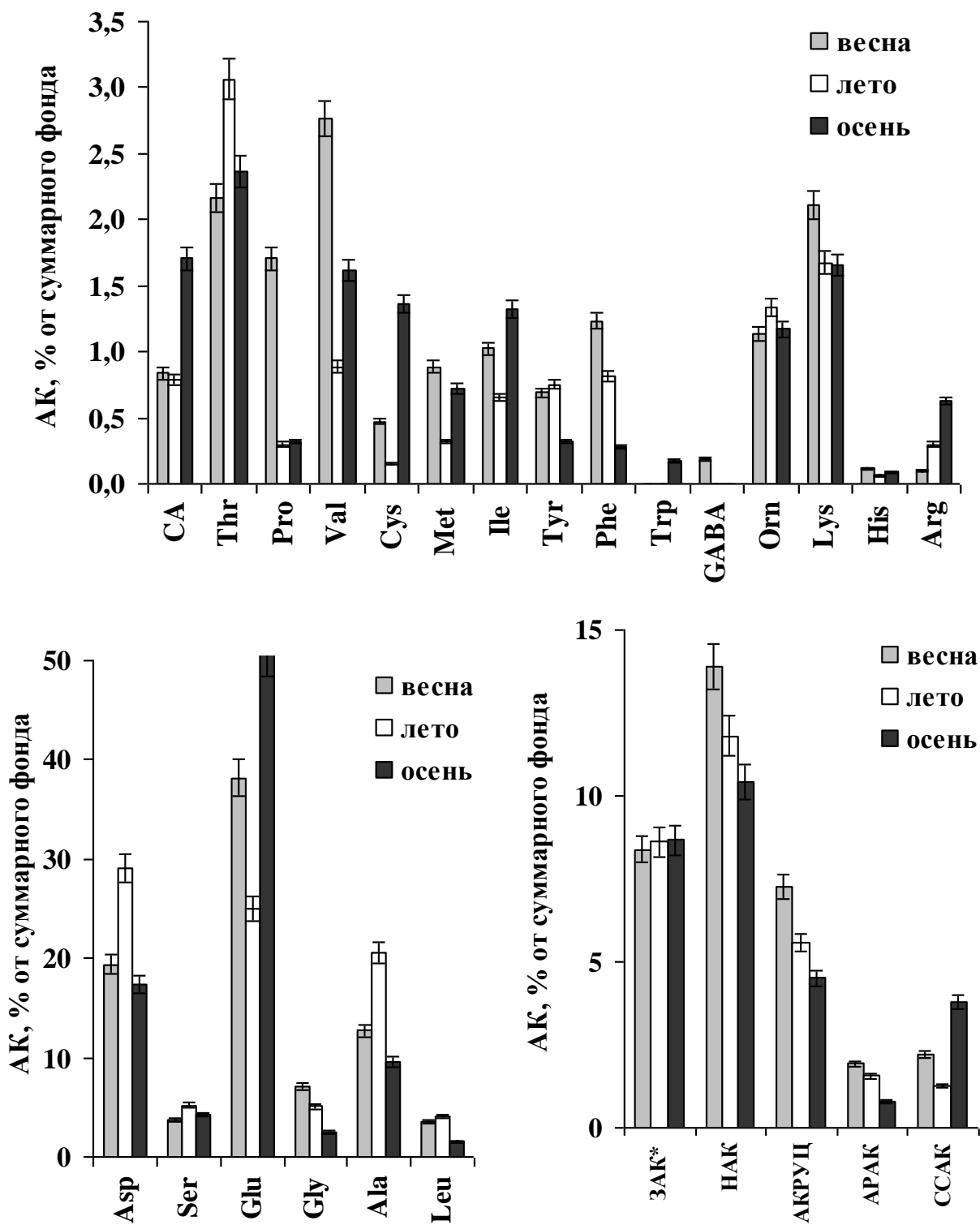


Рисунок 4.1.1 – Сезонная динамика процентного содержания свободных АК и основных метаболических групп в тканях аптечной пиявки *H. verband*. Условные обозначения: \* – содержание фонда заменимых АК уменьшено в 10 раз

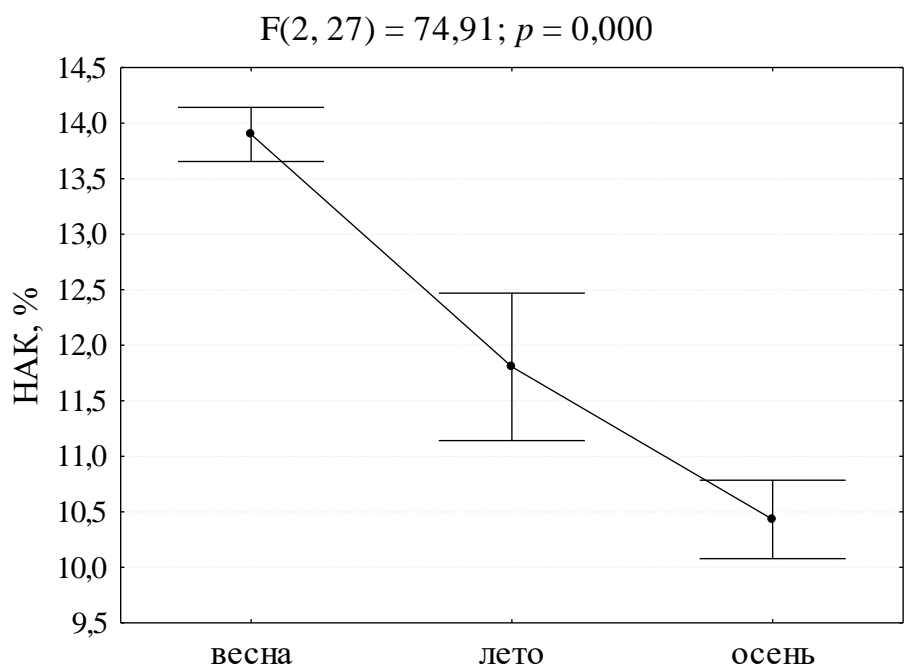
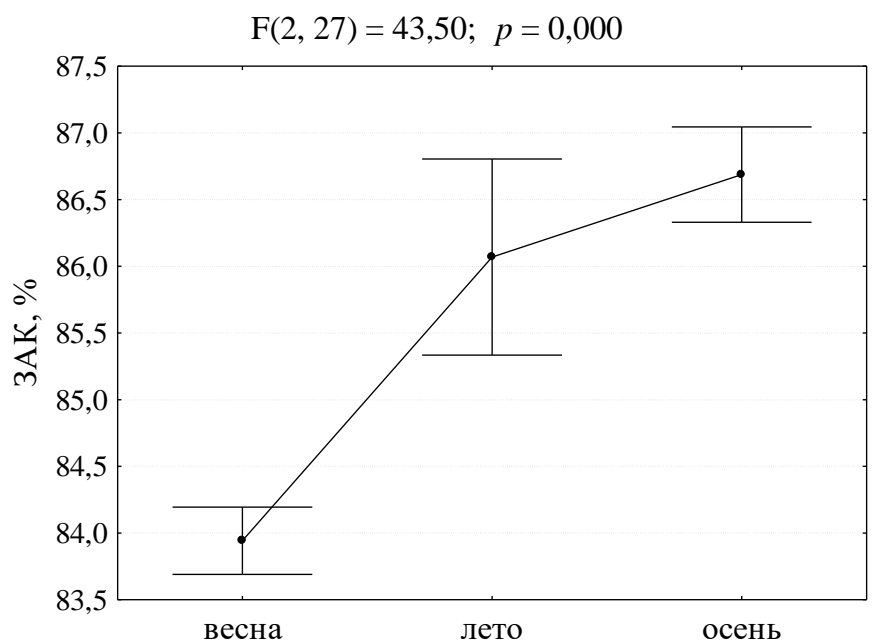


Рисунок 4.1.2 – Сезонная динамика процентного содержания заменимых и незаменимых аминокислот в тканях *H. verbana* (ANOVA)

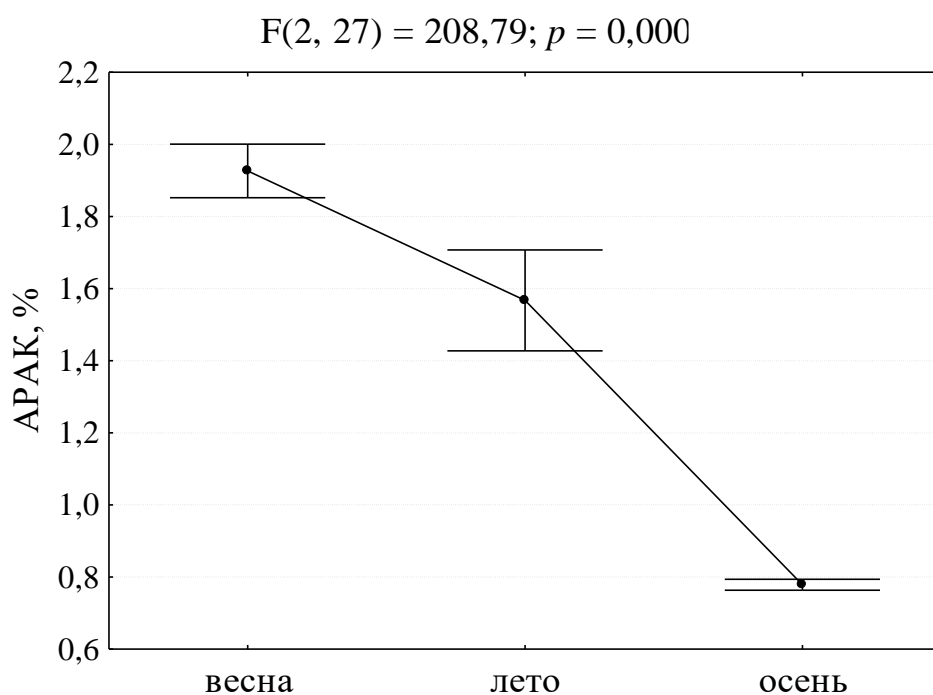
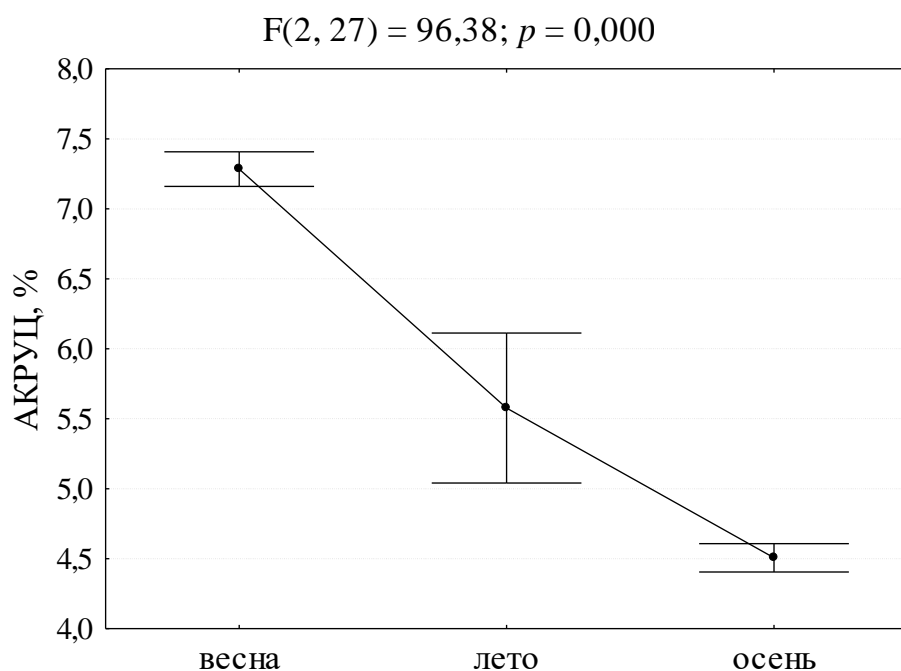


Рисунок 4.1.3 – Сезонная динамика процентного содержания АК с разветвленной углеродной цепью и ароматических АК в тканях *H. verbana* (ANOVA)

Показано, что за счет многократного снижения уровня содержания ароматических АК ( $F_{2; 27} = 208,79; p = 0,000$ ) в тканях *H. verbana* в условиях похолодания и переходе в зимний анабиоз налицо признаки эндогенного токсикоза, объективным критерием которого является высокие значения индекса Фишера ( $ИФ_{АКРУЦ/АРАК} =$

7,43 при норме  $3,0 \pm 0,5$ ) (табл. 4.1.2, рис. 4.1.1, 4.1.3). При этом в тканях осенних особей наблюдается существенное повышение, в 9,2 раз по сравнению с летней группой пиявок, суммарного фонда серосодержащих АК ( $p < 0,001$ ), обладающих дексоксицирующими и иммуномодулирующими свойствами (табл. 4.1.2).

Трехкратное повышение процентного содержания пула ССАК (цистеиновая кислота + цистеин + метионин) в тканях осенних особей *H. verbana* ( $F_{2; 27} = 945,94$ ;  $p = 0,000$ ) (рис. 4.1.4) можно рассматривать как важное звено в механизме формирования низкотемпературной адаптации.

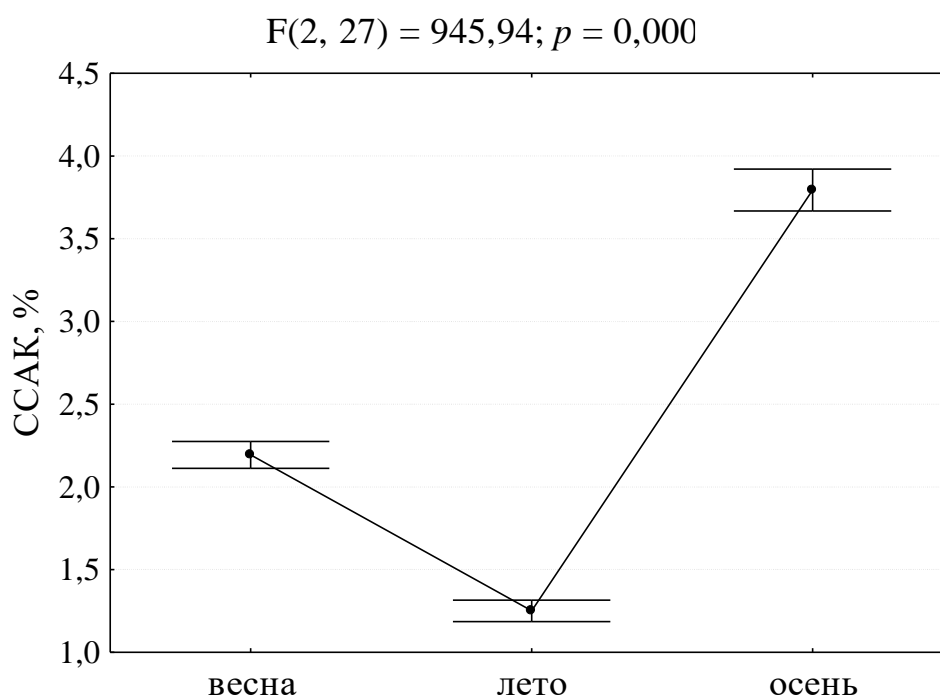


Рисунок 4.1.4 – Сезонная динамика процентного содержания серосодержащих аминокислот в тканях *H. verbana* (ANOVA)

Предполагаем, что высокий уровень пула ССАК компенсирует отсутствие в тканях пиявок сульфаминокислоты таурина, которая является производным цистеина, и, по некоторым данным, выполняет функцию протектора низкотемпературной адаптации в крови и органах позвоночных пойкилотермов (Storey, Storey, 1991; Karanova, 2011).

Вместе с тем, ключевое участие в связывании и нейтрализации токсичных продуктов межточного обмена, а также избыточного количества тяжелых метал-

лов в тканях *H. verbana*, наблюдаемые в осенний период (Черная и др., 2019а), принадлежит, по всей видимости, глутаминовой кислоте и глутамину, общее содержание которых повышается до 51% от суммарного фонда АК (рис. 4.1.1). Глутаминовая кислота поддерживает энергетический, медиаторный и пластический обмена в организме, служит предшественником при синтезе белков, ряда биологически активных соединений, обеспечивает синтез заменимых АК (Волков и др., 1975). При стрессовом напряжении организма (в нашем случае это – околонулевая температура воды в ноябре) глутамат служит естественным поставщиком кетоглутарата и янтарной кислоты, являясь наиболее эффективным субстратом в энергообеспечении (Кондрашова, 1972). Глутаминовая кислота связывает токсические продукты обмена и тяжелые металлы, образуя с ними комплексы и снижая тем самым их токсичность. Напомним, что в тканях осенних особей *H. verbana* авторами были отмечены максимальные концентрации Ni, Cd и Pb (Черная и др., 2019а). Глутаминовая кислота вместе с цистеином и глицином участвует в синтезе трипептида глутатиона – мощного антиоксиданта, который не только защищает клетку от токсичных свободных радикалов, но и в целом определяет окислительно-восстановительные характеристики внутриклеточной среды (Strużńska et al., 2005). Таким образом, выявленный нами высокий уровень глутамата в тканях осенних пиявок, является необходимым метаболическим условием для поддержания процессов жизнеобеспечения *H. verbana*, переходящих в зимний продолжительный анабиоз.

Кроме того, для осенней группы пиявок отмечено максимальное процентное содержание незаменимых АК: триптофана (физиологическая роль обсуждалась выше), изолейцина и аргинина, обладающими защитными и иммуностимулирующими свойствами. Данные АК тесно связаны с энергетическими процессами, и выполняют криопротекторную роль при поддержании адаптивных механизмов к низким положительным температурам и функцию защиты клеточных структур от гипотермической дестабилизации (Каранова, 2006; Karanova, 2011).

Весной ключевую роль в активации метаболических процессов, в том числе функцию детоксикантов избыточного количества экотоксикантов, накопленных в

тканях МП в период зимней спячки, выполняют как отдельные АК (пролин, глицин, валин, метионин, фенилаланин, лизин,  $\gamma$ -аминомасляная кислота, гистидин), так и метаболические группы (НАК, АКРУЦ, АРАК), на что указывает их повышенное содержание (% от фонда АК) (рис. 4.1.1).

На рисунках 4.1.5-4.1.15 представлены результаты однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) сезонной изменчивости процентного содержания свободных АК в тканях аптечной пиявки *H. verbana*.

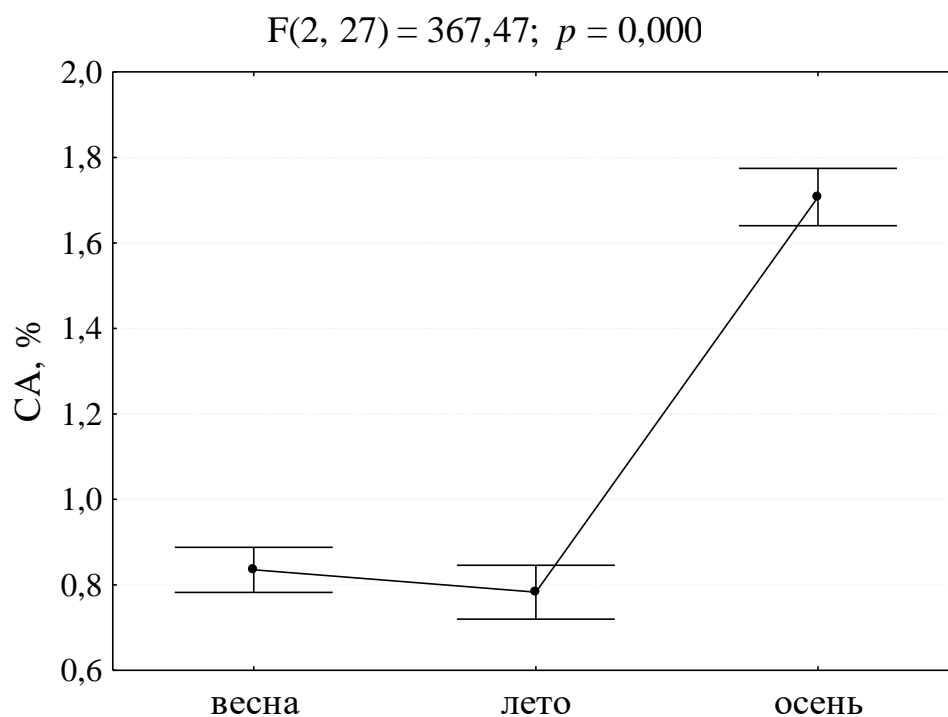


Рисунок 4.1.5 – Сезонная динамика процентного содержания цистеиновой кислоты в тканях *H. verbana* (ANOVA)



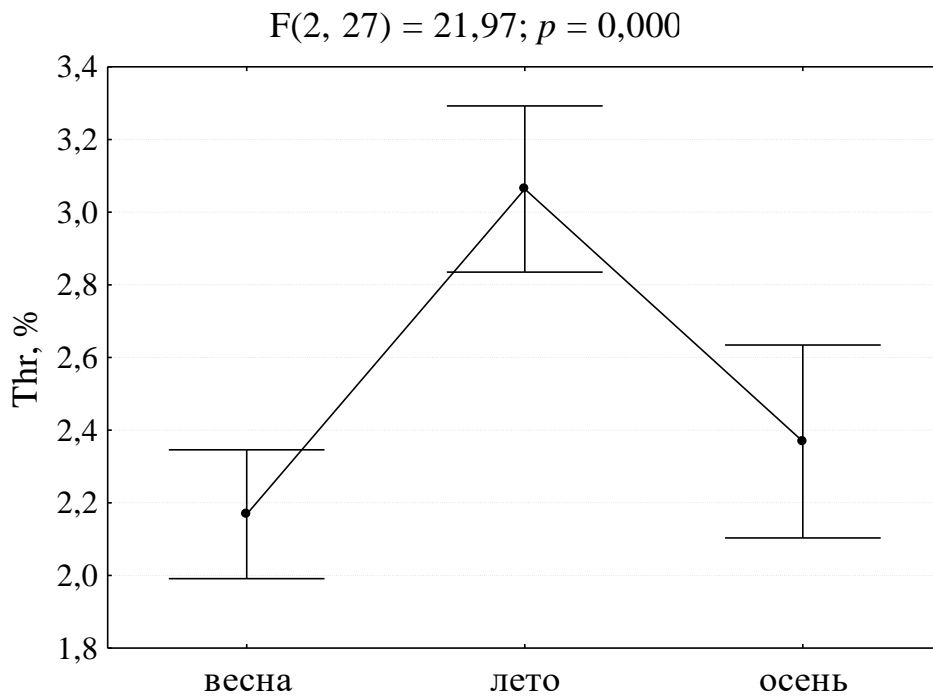
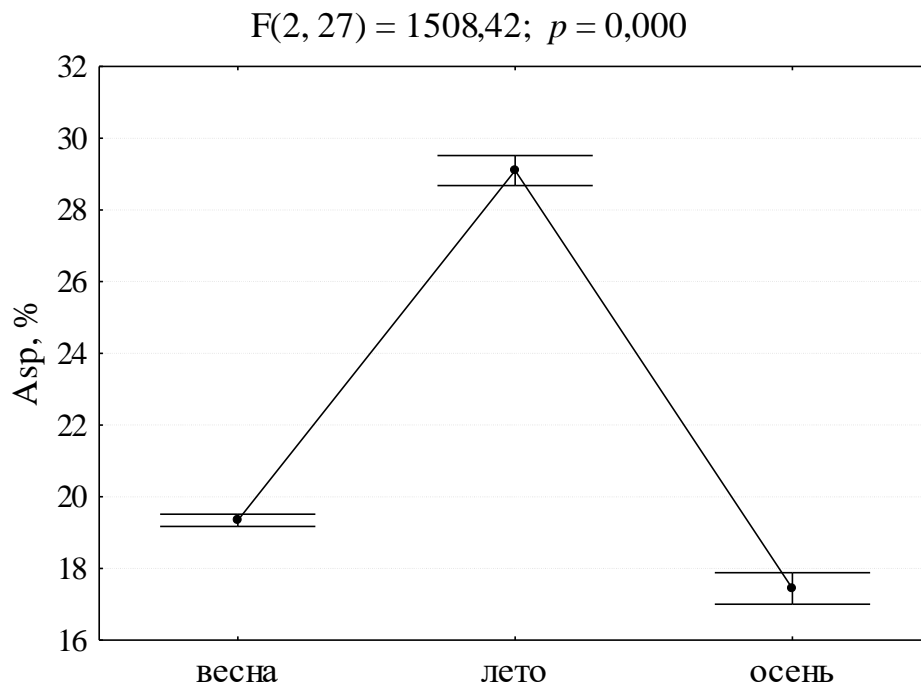


Рисунок 4.1.6 – Сезонная динамика процентного содержания аспарагиновой кислоты и треонина в тканях *H. verbana* (ANOVA)

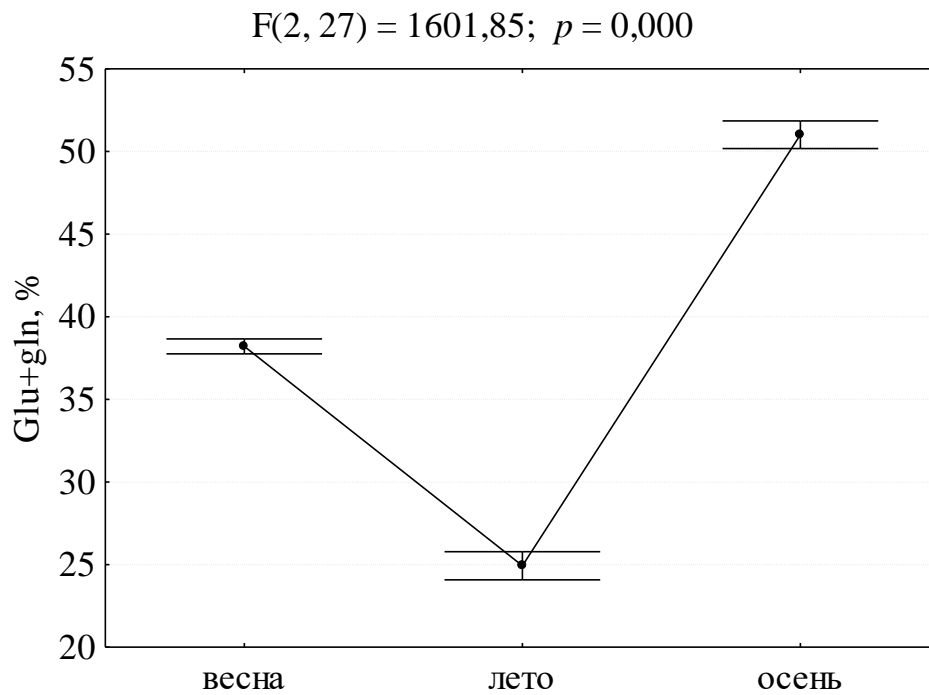
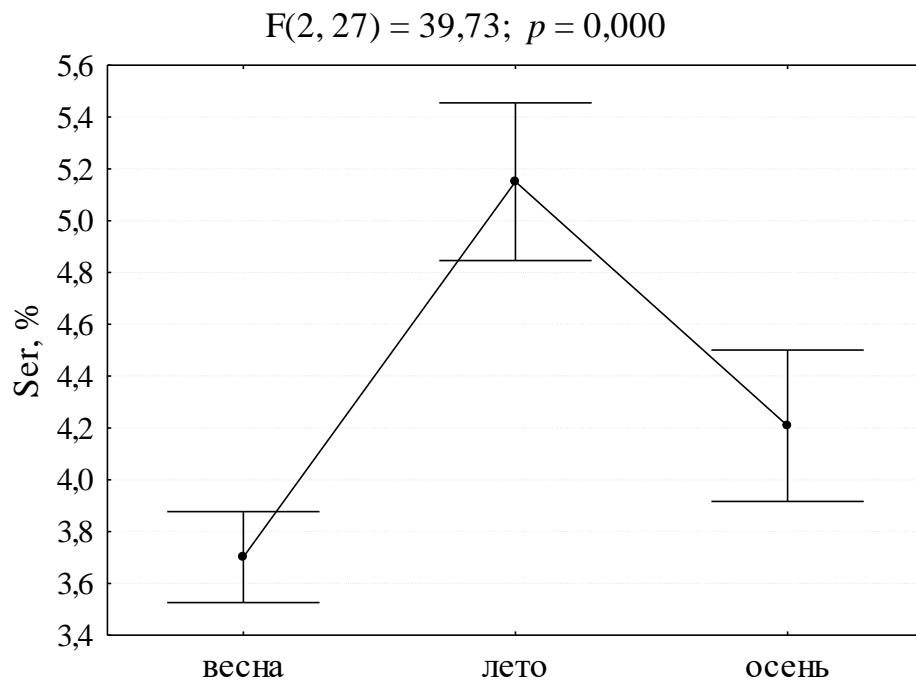


Рисунок 4.1.7 – Сезонная динамика процентного содержания серина, глутаминовой кислоты и глутамина в тканях *H. verbana* (ANOVA)

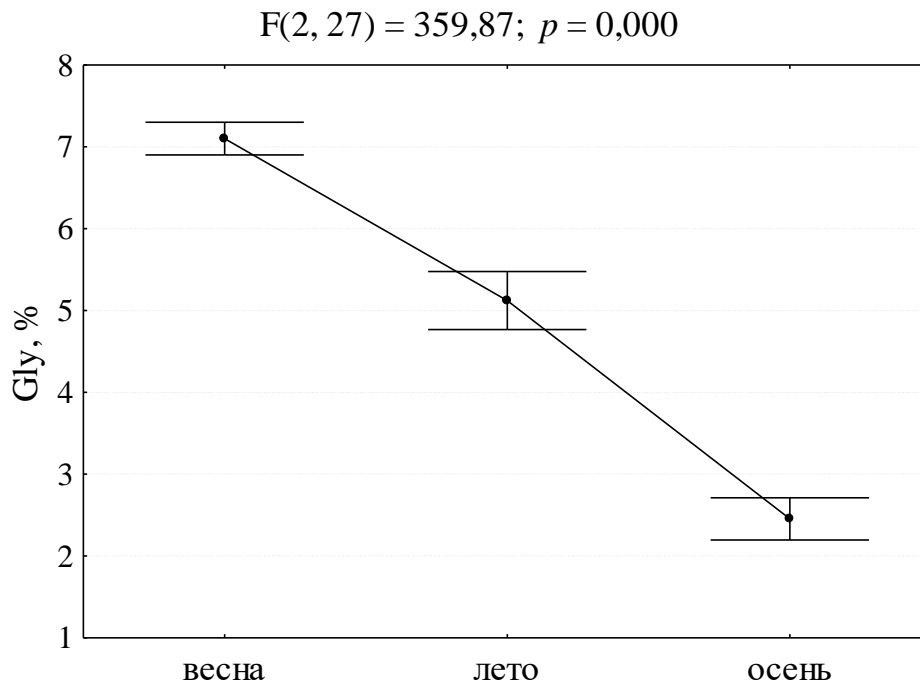
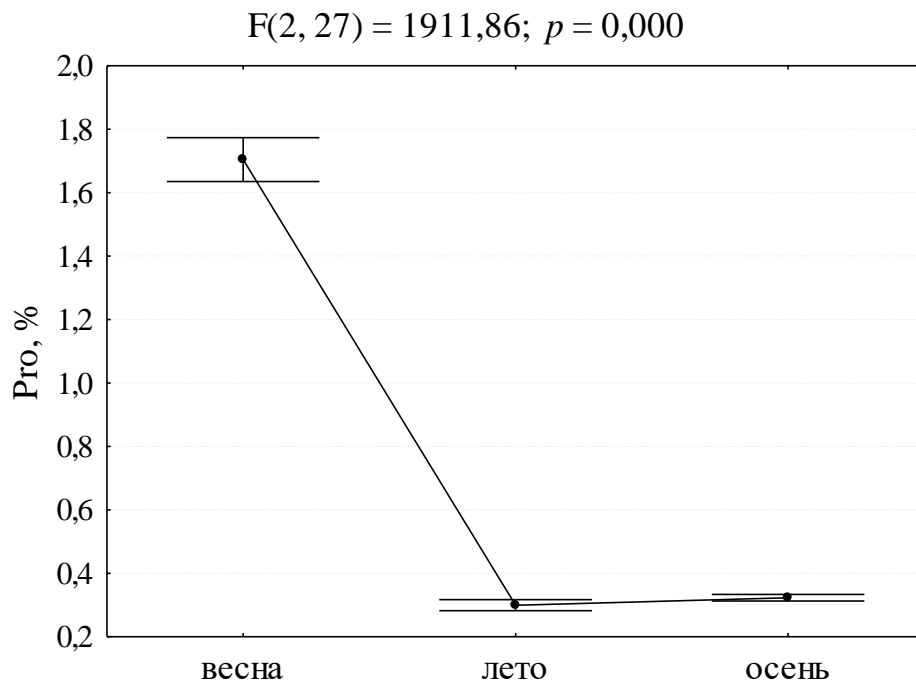


Рисунок 4.1.8 – Сезонная динамика процентного содержания пролина и глицина в тканях *H. verbana* (ANOVA)

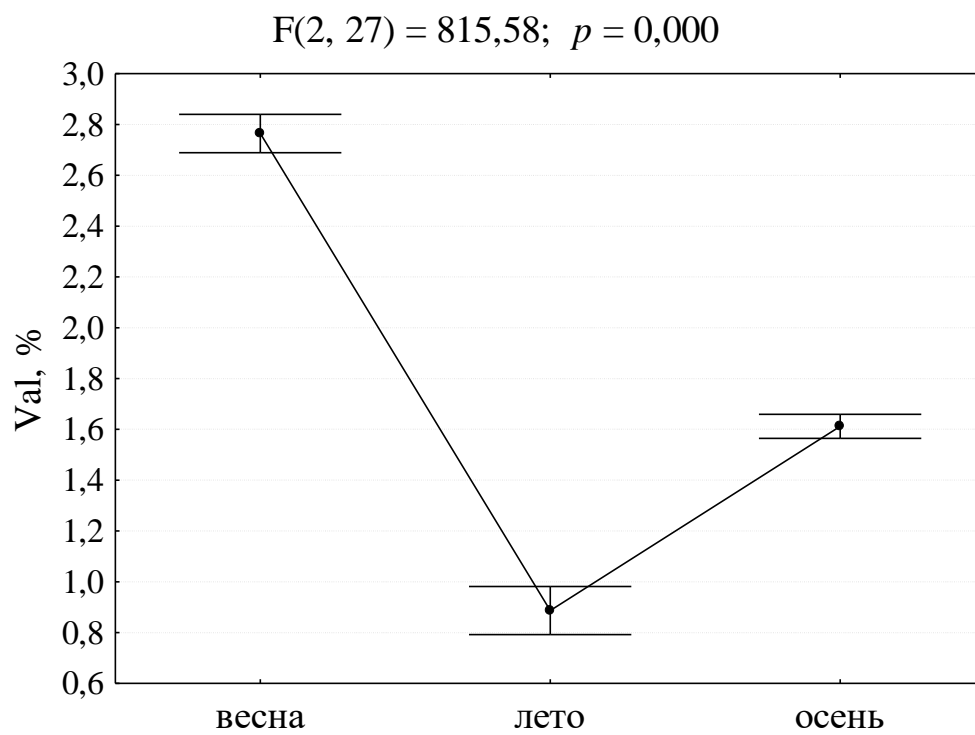
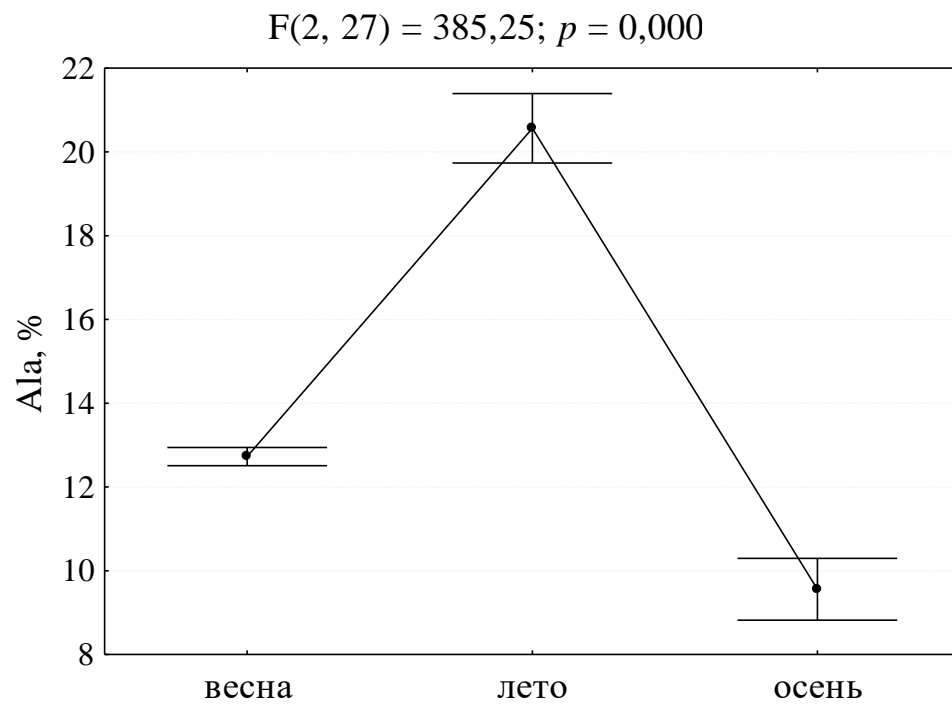


Рисунок 4.1.9 – Сезонная динамика процентного содержания аланина и валина в тканях *H. verbana* (ANOVA)

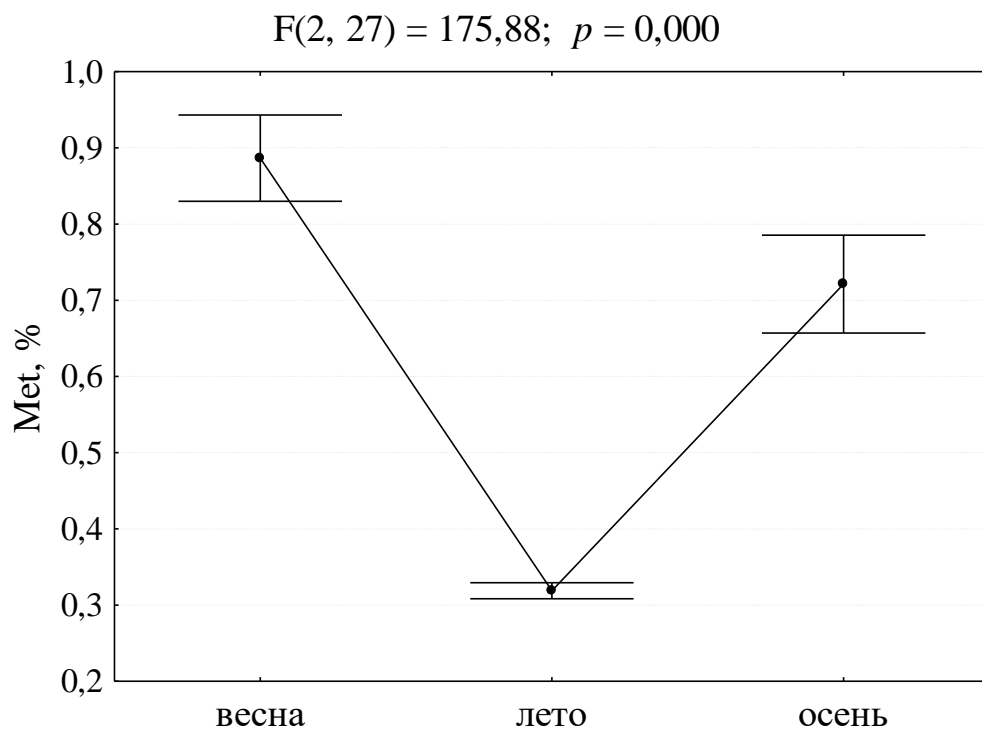
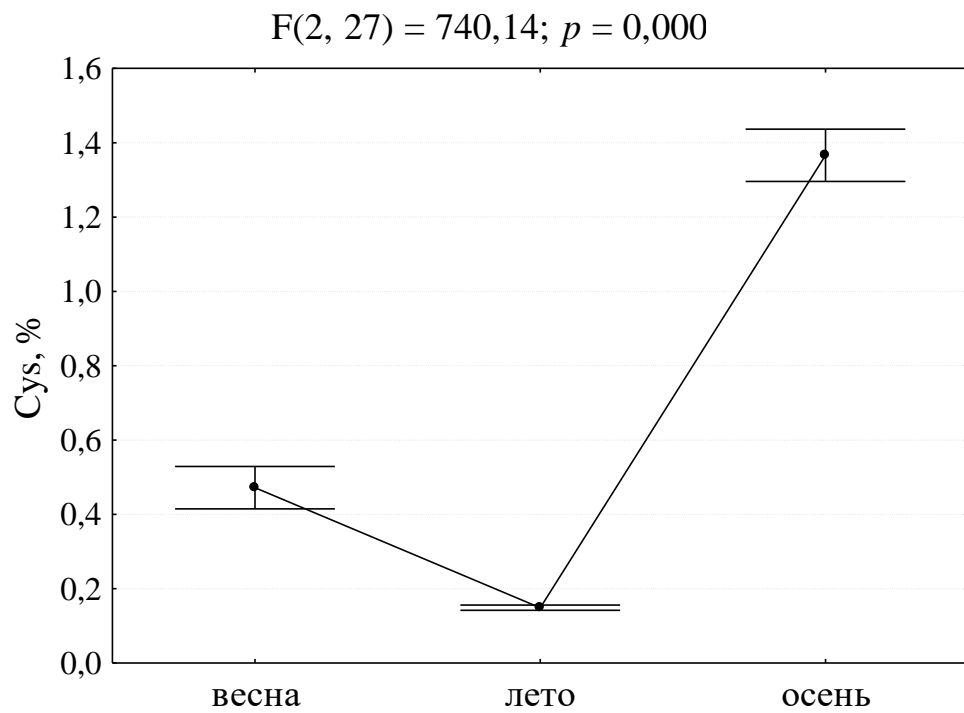


Рисунок 4.1.10 – Сезонная динамика процентного содержания цистеина и метионина в тканях *H. verbana* (ANOVA)

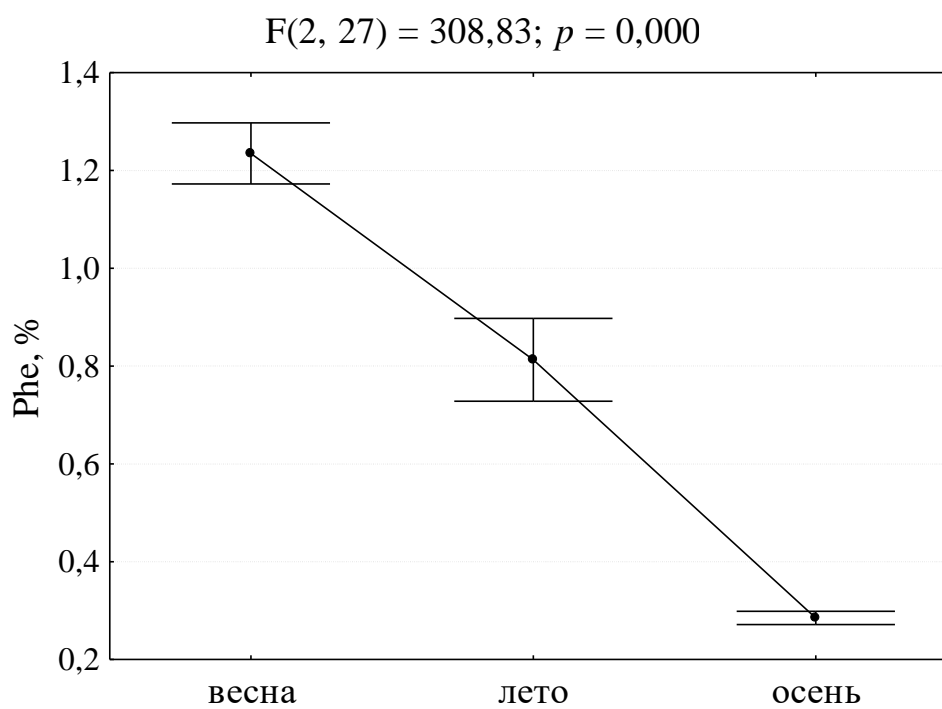
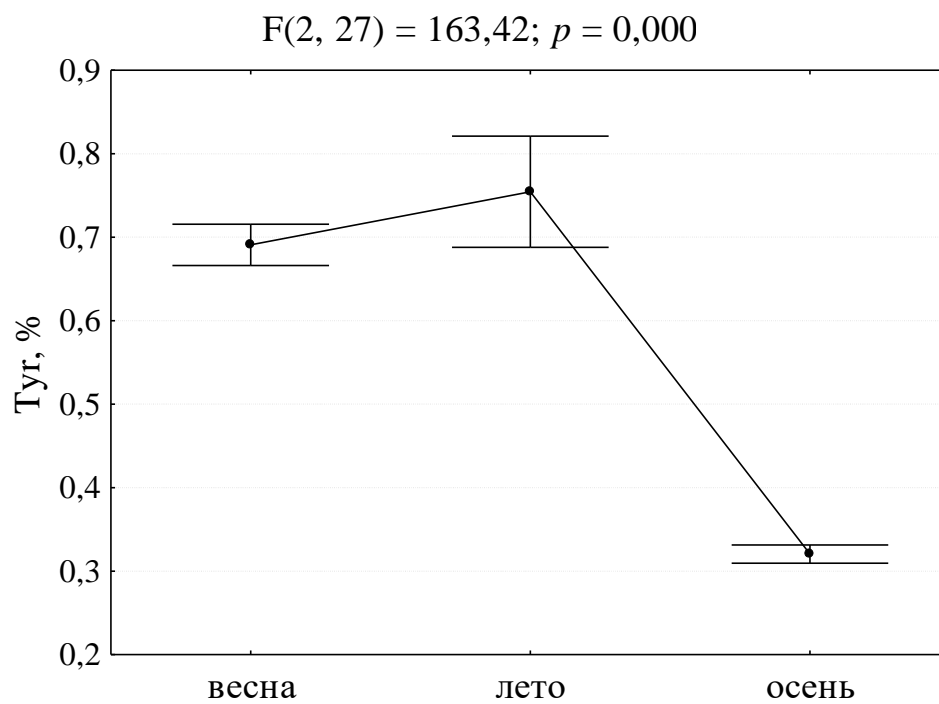


Рисунок 4.1.11 – Сезонная динамика процентного содержания тирозина и фенилаланина в тканях *H. verbana* (ANOVA)

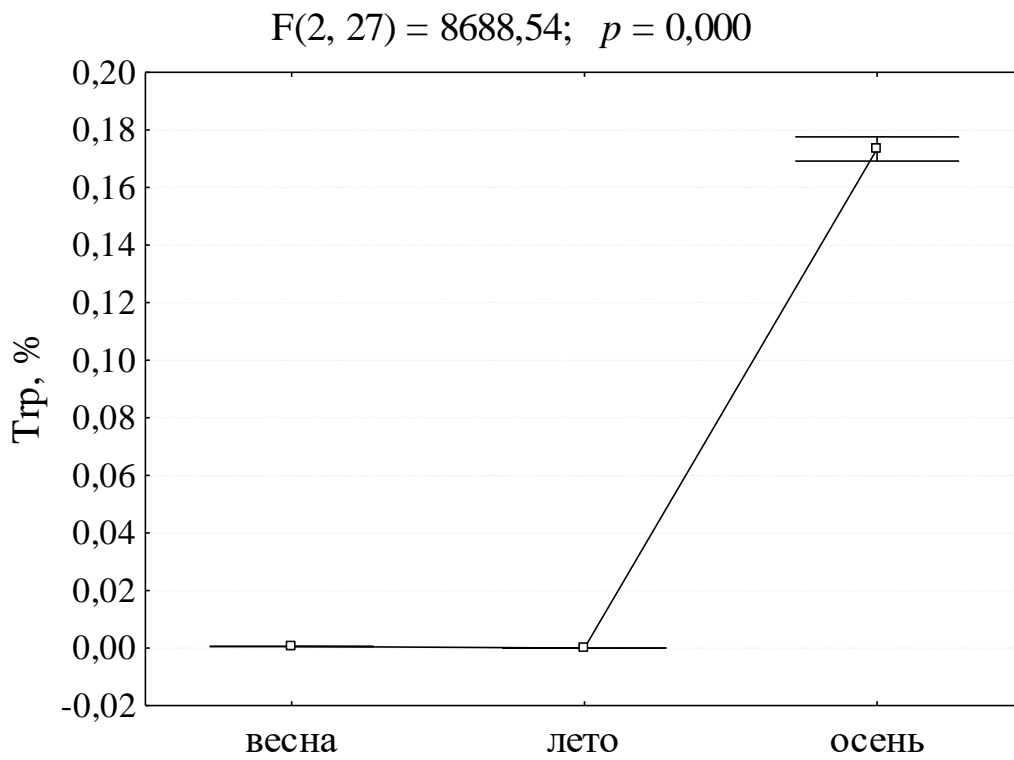
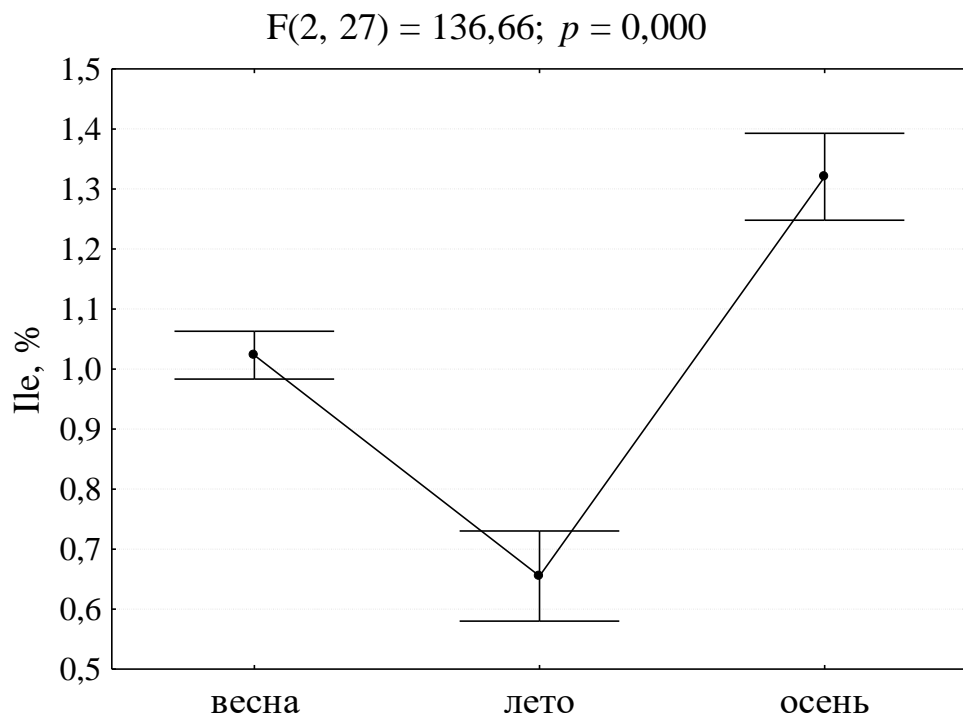


Рисунок 4.1.12 – Сезонная динамика процентного содержания изолейцина и триптофана в тканях *H. verbana* (ANOVA)

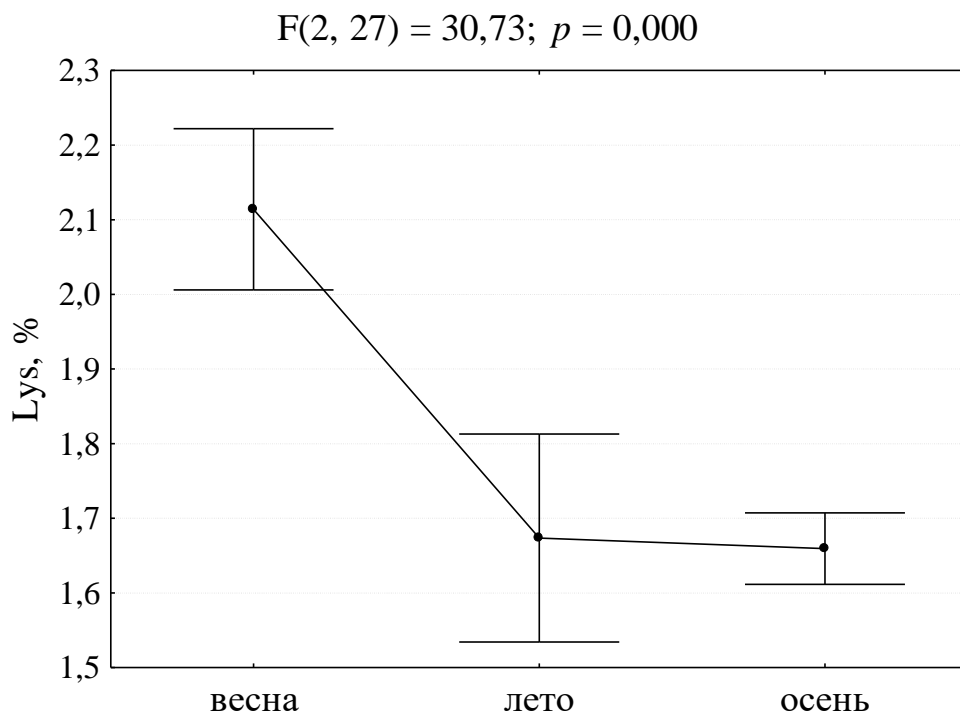
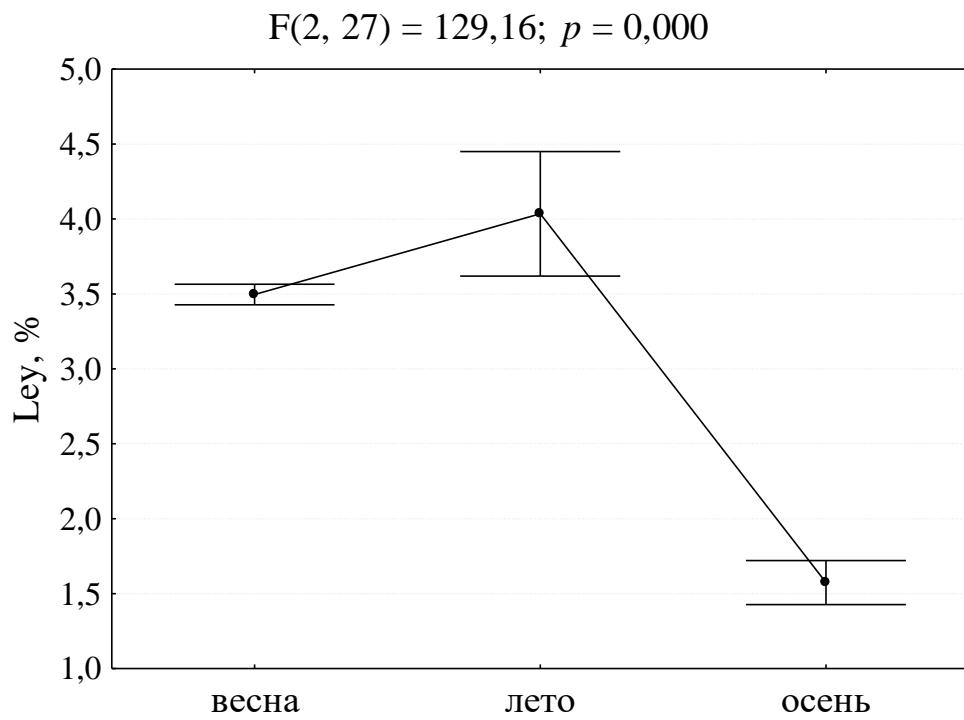


Рисунок 4.1.13 – Сезонная динамика процентного содержания лейцина и лизина в тканях *H. verbana* (ANOVA)



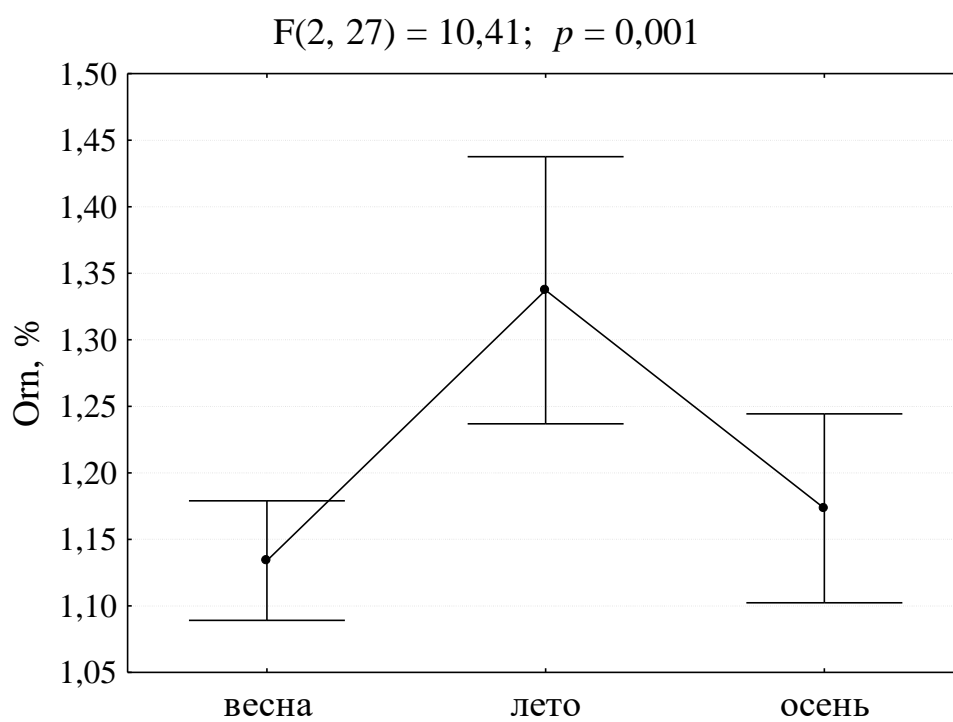
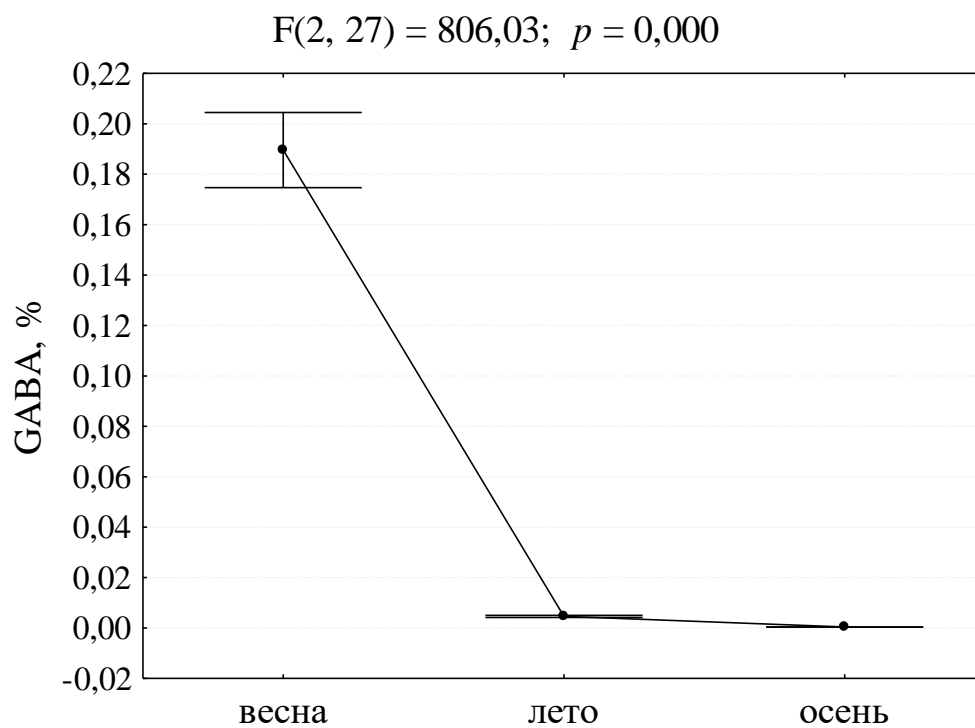


Рисунок 4.1.14 – Сезонная динамика процентного содержания гамма-аминомасляной кислоты и орнитина в тканях *H. verbana* (ANOVA)

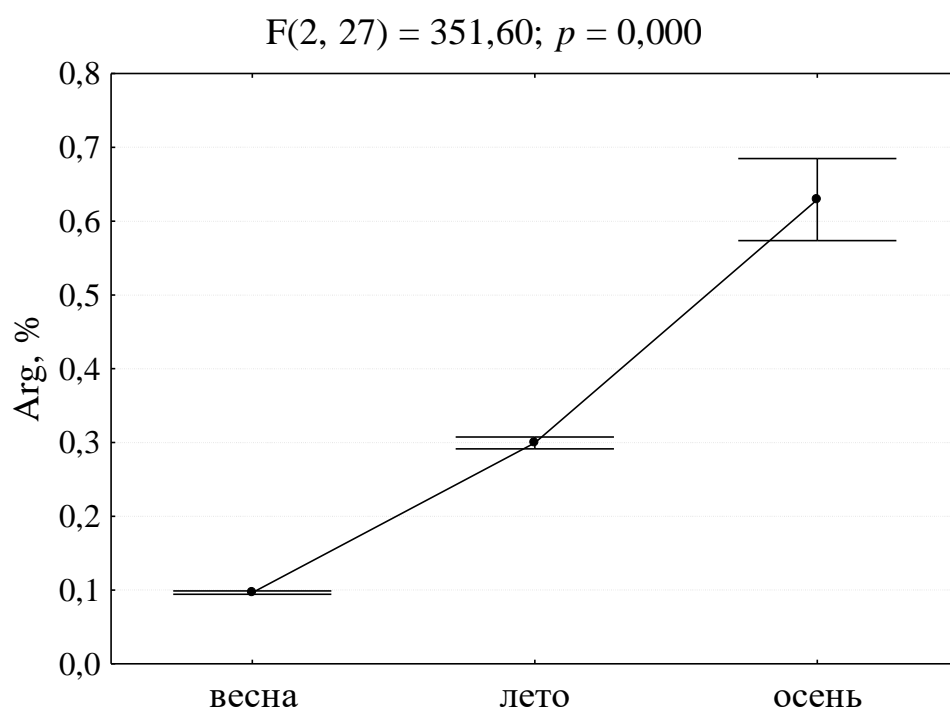
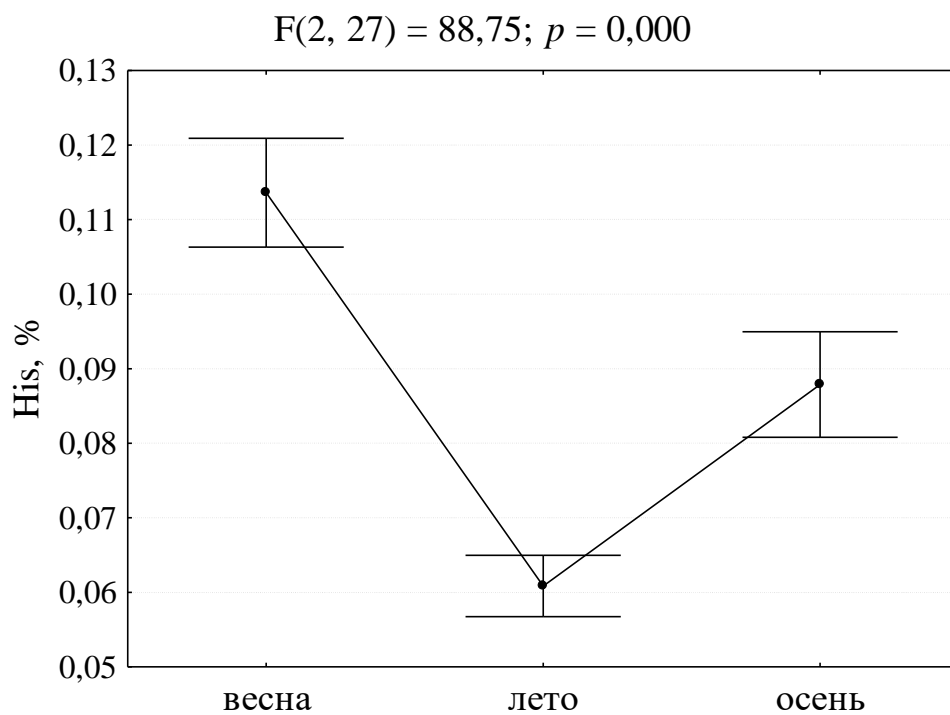


Рисунок 4.1.15 – Сезонная динамика процентного содержания гистидина и аргинина в тканях *H. verbana* (ANOVA)

Из рисунков 4.1.5-4.1.15 видно, что максимальная сезонная изменчивость характерна для триптофана, пролина, глутаминовой кислоты и глутамина, аспарагиновой кислоты ( $F_{2; 27} > 1508; p < 0,001$ ), минимальная – для орнитина, треонина, лизина ( $F_{2; 27} < 30,72; p < 0,001$ ).

Сезонная специфика аминокислотного спектра тканей аптечной пиявки визуализирована с помощью компонентного анализа (PCA) (рис. 4.1.16, табл. 4.1.3). Показано, что все экспериментальные данные образовали три самостоятельные сезонные группы. По первой главной компоненте (PC1), на которую приходится 68,33% общей дисперсии данных, показана существенная пространственная удаленность летней группы пиявок от весенней и осенней.

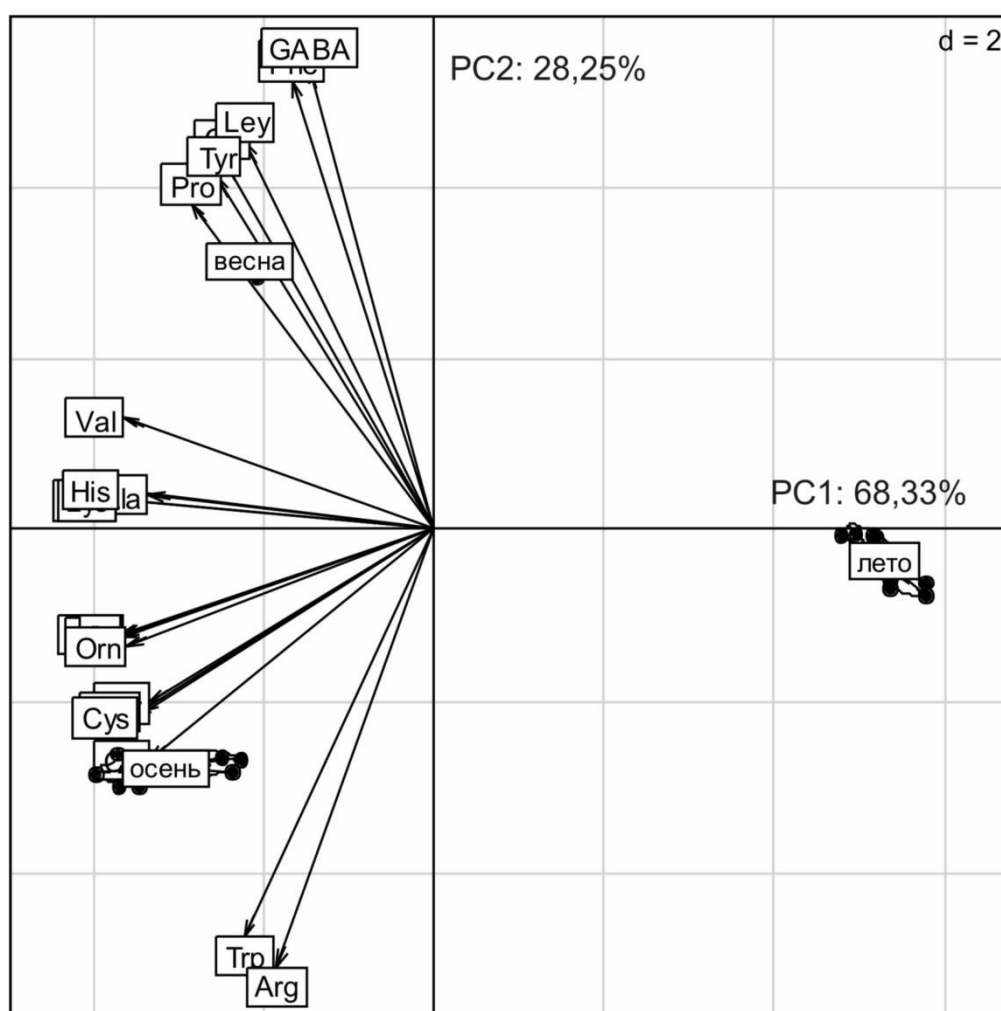


Рисунок 4.1.16 – Свободные аминокислоты (lg мкмоль/100г) тканей *H. verbana* различных сезонных групп в пространстве главных компонент

Таблица 4.1.3 – Результаты компонентного анализа свободных аминокислот (АК,  $\lg$  мкмоль/100г) в тканях особей *H. verbana* различных сезонных групп

АК, $\lg$ мкмоль/100г ( $i = 30$ )	Нагрузки (loadings, $a_{ij}$ )		Вклад в главную компоненту (Contribution = $(a_{ij}^2 \cdot 100) / \lambda_j$ , %)	
	Главные компоненты (Principal Components – PC), $j = 1, 2$			
	1	2	1	2
Cysteic Acid	-0,88***	-0,46*	5,44	3,54
Aspartic Acid	-0,96***	-0,21	6,48	0,74
Threonine	-0,88***	-0,34	5,44	1,98
Serine	-0,91***	-0,36	5,79	2,21
Glu+ Gln	-0,97***	-0,21	6,59	0,78
Proline	-0,75***	0,65***	3,95	7,08
Glycine	-0,65***	0,74***	2,98	9,13
Alanine	-0,89***	0,07	5,53	0,08
Valine	-0,97***	0,22	6,54	0,84
Cystine	-0,92***	-0,37*	5,94	2,34
Methionine	-0,99***	0,06	6,82	0,06
Isoleucine	-0,97***	-0,21	6,60	0,72
Leucine	-0,58***	0,77***	2,38	9,97
Tyrosine	-0,68***	0,70***	3,22	8,32
Phenylalanine	-0,44*	0,89***	1,35	13,37
Tryptophan	-0,59***	-0,81***	2,41	10,98
GABA	-0,38*	0,92***	1,02	14,17
Ornithine	-0,96***	-0,23	6,38	0,90
Lysine	-0,99***	0,06	6,77	0,06
Histidine	-0,98***	0,08	6,73	0,11
Arginine	-0,49**	-0,87***	1,65	12,66
	Собственные значения (eigenvalues, $\lambda_j$ ) PC		Дисперсия, объясненная PC (%)	
	14,35	5,93	68,33	28,25

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

По второй главной компоненте (PC2), на которую приходится 28,25% общей дисперсии, отражена значимая дистанция между осенними и весенними особями *H. verbana* (рис. 4.1.14, табл. 4.1.3).

Основной вклад в сезонную вариабельность аминокислотного спектра тканей медицинских пиявок вносят АК, наиболее сильно коррелирующие с осями компонент: по PC1 – цистеиновая кислота, аспарагиновая кислота, треонин, серин, глутамат и глутамин, аланин, валин, цистеин, метионин, изолейцин, орнитин, лизин, гистидин, по PC2 – пролин, глицин, лейцин, тирозин, фенилаланин, триптофан,  $\gamma$ -аминомасляная кислота, аргинин (рис. 4.1.15, табл. 4.1.3).

## **4.2. Сезонная динамика содержания свободных аминокислот в тканях большой ложноконской пиявки *H. sanguisuga***

В качестве дополнительной информации по сезонной изменчивости аминокислотного спектра тканей челюстных пиявок традиционно был использован вид *H. sanguisuga*. Взрослые особи большой ложноконской пиявки были отловлены в Белоярском водохранилище (Свердловская область).

Сравнительный анализ сезонных особенностей аминокислотного спектра тканей у фонового для медицинских пиявок вида – хищной большой ложноконской пиявки показал как общебиологические сходства, так и трофические различия. Так, суммарные концентрации свободных АК в тканях *H. sanguisuga*, также как и у аптечной пиявки, значимо изменяются по сезонам: осень > весна > лето ( $F_{2,27} = 1011,10$ ;  $p = 0,000$ ) (табл. 4.2.1).

Максимальные концентрации суммарного фонда АК ( $3058,58 \pm 38,71$  мкмоль/100г) выявлены в тканях осенних особей БЛП (табл. 4.2.1). Аминокислотный пул, уходящих в анабиоз хищных гирудинид, в отличие от медицинских пиявок, повышен за счет максимальных концентраций только пяти аминокислот: цистеиновой кислоты, глутаминовой кислоты и глутамина, цитруллина, триптофана.

Выявленные трофические различия обусловлены тем, что медицинские пиявки, в отличие от ложноконских, переходящих в зимний период исключительно

на эндогенное питание, при анабиозе используют резервные запасы насосанной им крови, сохраняющуюся в их желудке до пяти месяцев. Особенно примечательными отличиями этой сезонной группы пиявок *H. sanguisuga* являются отсутствие в тканях пролина, метионина,  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, и присутствие – цитруллина и триптофана, которые в летних и весенних биопробах определялись в следовом количестве (табл. 4.2.1).

У весенних пиявок *H. sanguisuga*, вышедших из зимнего анабиоза, суммарный фонд АК в тканях, по сравнению с осенними особями снижен в 1,2 раз ( $2569,91 \pm 51,67$  мкмоль/100г) ( $p < 0,001$ ) (табл. 4.2.1). Аминокислотный пул весенних пиявок за зимний период полностью утратил цитруллин и триптофан, а также потерял существенные количества цистеиновой кислоты, глутаминовой кислоты и глутамина, их содержание снизилось в 4,6 и 4,7 раз ( $p < 0,001$ ), соответственно, однако концентрации остальных АК значимо повысились, что обусловлено активацией обменных процессов *H. sanguisuga*.

Суммарные концентрации АК в тканях летних особей ( $927,61 \pm 23,22$  мкмоль/100г) ниже, чем у весенних и осенних пиявок в 2,8 и в 3,3 раз, соответственно ( $p < 0,001$ ). В тканях этой сезонной группы особей *H. sanguisuga* отмечены минимальные концентрации всех свободных АК ( $p < 0,001$ ), за исключением пролина, протеиногенной аминокислоты, участвующей в синтезе коллагена.

Наибольший обвал концентраций свободных аминокислот в тканях летних особей большой ложноконской пиявки, по сравнению с весенними, отмечен для цистеиновой кислоты (в 6,2 раз), аспарагиновой кислоты (в 4,0), цистеина (в 6,4) и для незаменимых аминокислот: треонина (в 5,0), валина (в 21,0), метионина (в 6,0) (табл. 4.2.1). Дисперсионный анализ (ANOVA) показал, что содержание всех изучаемых АК, обнаруженных в тканях *H. sanguisuga*, подвержено влиянию сезонного фактора ( $p < 0,001$ ).

Таблица 4.2.1 – Сезонные изменения содержания свободных аминокислот в тканях хищной пиявки *H. sanguisuga*

Аминокислота, мкмоль/100г	1. Весна <i>n</i> = 10	2. Лето <i>n</i> = 10	3. Осень <i>n</i> = 10	F(2, 27); <i>p</i>
Cysteic Acid	58,26 ± 2,48	9,41 ± 0,58	267,42 ± 3,45	1448,6; 0,000
Aspartic Acid	366,44 ± 4,89	88,42 ± 2,05	70,36 ± 2,02	1681,0; 0,000
Threonine	146,78 ± 4,90	29,40 ± 2,15	63,52 ± 2,62	249,66; 0,000
Serine	156,38 ± 4,85	46,29 ± 1,71	91,42 ± 3,33	304,79; 0,000
Glu +Glu	437,35 ± 7,14	218,84 ± 2,03	2051,22 ± 16,7	8516,7; 0,000
Proline	18,52 ± 0,95	44,60 ± 2,51	следы	1993,9; 0,000
Glycine	216,43 ± 3,53	80,26 ± 2,09	110,42 ± 1,72	674,91; 0,000
Alanine	374,48 ± 3,94	169,22 ± 3,64	179,5 ± 2,73	781,07; 0,000
Citrulline	следы	следы	3,78 ± 0,12	4081,2; 0,000
Valine	141,39 ± 5,34	6,74 ± 0,31	22,41 ± 1,89	663,54; 0,000
Cysteine	14,51 ± 0,73	2,28 ± 0,10	3,92 ± 0,06	563,96; 0,000
Methionine	98,42 ± 3,07	16,54 ± 0,96	следы	3991,5; 0,000
Isoleucine	69,39 ± 3,22	13,24 ± 0,40	17,54 ± 0,81	435,60; 0,000
Leucine	144,39 ± 3,30	60,46 ± 2,24	68,89 ± 1,75	272,82; 0,000
Tyrosine	37,21 ± 2,12	15,27 ± 0,43	5,78 ± 0,23	423,62; 0,000
Phenylalanine	53,47 ± 1,89	20,42 ± 0,88	7,27 ± 0,22	730,32; 0,000
Tryptophan	следы	следы	4,63 ± 0,12	6256,4; 0,000
Ornithine	38,39 ± 1,74	25,58 ± 1,05	12,50 ± 0,53	165,03; 0,000
Lysine	106,49 ± 1,52	59,30 ± 1,98	38,38 ± 2,28	141,59; 0,000
Histidine	55,35 ± 2,42	12,39 ± 0,55	22,27 ± 1,05	280,75; 0,000
Arginine	36,26 ± 2,31	8,95 ± 0,05	17,34 ± 0,76	204,83; 0,000
Фонд АК	2569,91±51,67	927,61±23,22	3058,58±38,71	1011,10; 0,000

Наибольшая вариабельность выявлена для тканевых концентраций цистеиновой кислоты, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты и глутамина, пролина, цитруллина, метионина, триптофана ( $F_{2; 27} > 1448,50; p < 0,001$ ) (табл. 4.2.1).

Отмечено, что суммарные концентрации пула незаменимых АК хищных гирудинид убывают в ряду весна > осень > лето, а содержание пула заменимых АК – иначе: осень > весна > лето ( $p < 0,001$ ) (табл. 4.2.2).

Для осенней группы БЛП, так же как и для медицинских пиявок, характерно значимо высокое содержание ССАК ( $p < 0,001$ ). Крайне низкий показатель соотношения НАК/ЗАК у осенних особей *H. sanguisuga* (0,10) указывает на аминокислотный дисбаланс в их тканях. О том, что у пиявок, уходящих в анабиоз, нарушен азотистый обмен, свидетельствует и высокое значение антитоксического индекса Фишера (ИФ = 8,26 при норме  $3,0 \pm 0,5$ ) (табл. 4.2.2).

Таблица 4.2.2 – Сезонная динамика содержания метаболитических групп свободных аминокислот в тканях *H. sanguisuga*

АК	1. Весна $n = 10$	2. Лето $n = 10$	3. Осень $n = 10$	ANOVA	
				F(2, 27); $p$	Tukey HSD test, $p$
Мкмоль/100г					
НАК	851,94 ± 24,40	227,43 ± 8,78	262,20 ± 9,85	425,99; 0,000	$I-2 = 0,000; I-3 = 0,000;$ $2-3 = 0,000$
ЗАК	1621,32 ± 24,73	665,19 ± 12,87	2512,65 ± 25,66	1867,10; 0,000	$I-2 = 0,000; I-3 = 0,000;$ $2-3 = 0,000$
АКРУЦ	355,16 ± 10,27	80,43 ± 2,88	108,84 ± 4,40	507,13; 0,000	$I-2 = 0,000; I-3 = 0,000;$ $2-3 = 0,000$
АРАК	91,59 ± 4,03	35,68 ± 1,19	13,06 ± 0,38	673,51; 0,000	$I-2 = 0,000; I-3 = 0,000;$ $2-3 = 0,000$
ССАК	171,19 ± 5,65	28,23 ± 1,60	271,34 ± 3,51	952,41; 0,000	$I-2 = 0,000; I-3 = 0,000;$ $2-3 = 0,000$
% от фонда АК					
НАК	33,10 ± 0,33	24,44 ± 0,34	8,55 ± 0,22	1659,60; 0,000	$I-2 = 0,000; I-3 = 0,000;$ $2-3 = 0,000$
ЗАК	63,15 ± 0,38	71,80 ± 0,42	82,17 ± 0,24	716,50; 0,000	$I-2 = 0,000; I-3 = 0,000;$ $2-3 = 0,000$
АКРУЦ	13,80 ± 0,16	8,65 ± 0,10	3,55 ± 0,10	1688,70; 0,000	$I-2 = 0,000; I-3 = 0,000;$ $2-3 = 0,000$
АРАК	3,55 ± 0,09	3,84 ± 0,05	0,43 ± 0,01	829,64; 0,000	$I-2 = 0,009; I-3 = 0,000;$ $2-3 = 0,000$
ССАК	6,65 ± 0,11	3,02 ± 0,10	8,87 ± 0,04	1003,50; 0,000	$I-2 = 0,000; I-3 = 0,000;$ $2-3 = 0,000$
Соотношение метаболитических групп АК					
НАК/ЗАК	0,52	0,34	0,10		
ИФ	3,88	2,25	8,26		

Пул заменимых АК в тканях осенних особей *H. sanguisuga* составляет 82,17% от суммарного фонда, при этом на долю глутаминовой кислоты и глутамината приходится 67,0 %, а на долю цистеиновой кислоты – 8,7 % (рис. 4.2.1).



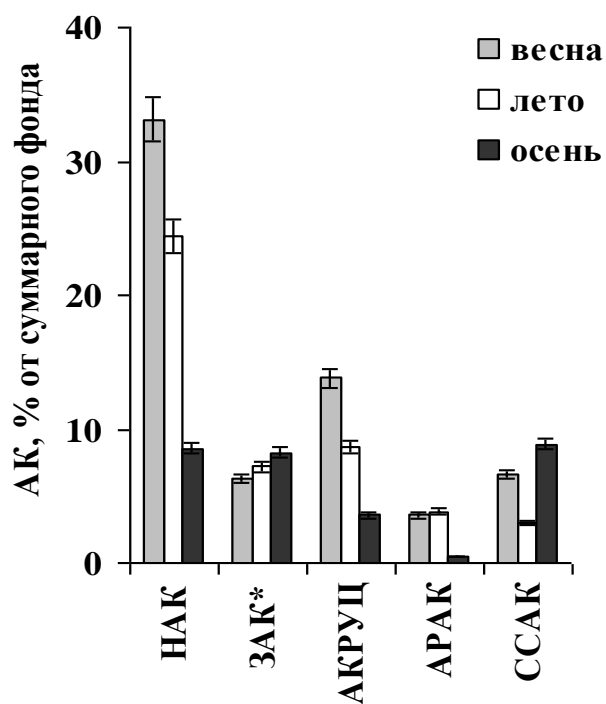
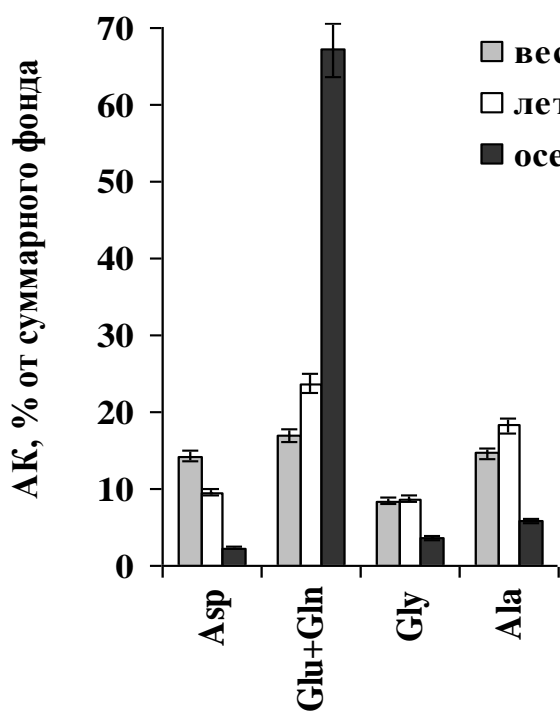
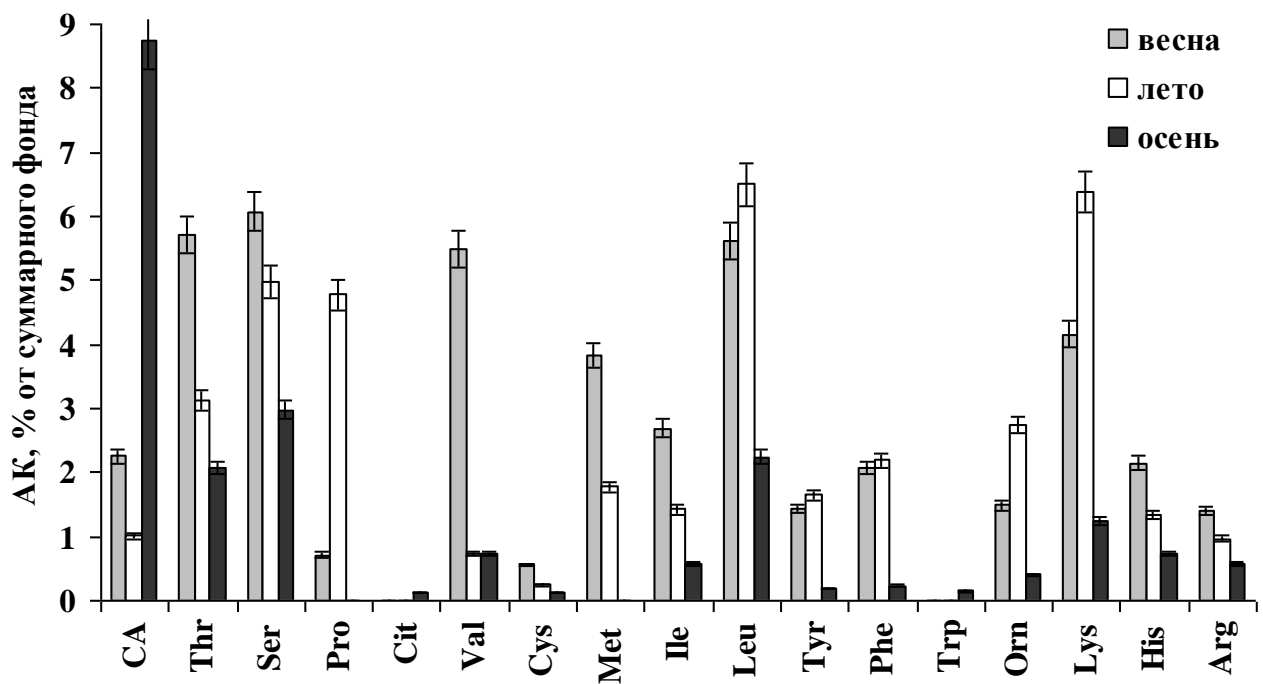


Рисунок 4.2.1 – Сезонная динамика процентного содержания свободных АК и метаболических групп АК в тканях большой ложноконской пиявки *H. sanguisuga*.

Условные обозначения: \* – содержание фонда заменимых АК уменьшено в 10 раз

У особей ложноконских пиявок других сезонных групп глутаминовая кислота и глутамин содержатся в значительно меньшем количестве: у летних особей – 23,6%, у весенних – 17,0% от суммарного фонда АК. В тканях весенних пиявок *H. sanguisuga* отмечено самое высокое процентное содержание аспарагиновой кисло-

ты, серина и незаменимых АК – треонина, валина, метионина, изолейцина, гистидина и аргинина (рис.). У летних особей *H. sanguisuga* значительно больше, чем у других групп пиявок, содержится пролина, аланина, лейцина, тирозина, фенилаланина орнитина, лизина. Сопоставимое процентное содержание глицина отмечено в тканях весенних и летних пиявок (рис. 4.2.1).

На рисунках 4.2.2-4.2.15 представлены результаты однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) сезонной изменчивости процентного содержания свободных АК и метаболитических АК групп в тканях *H. sanguisuga*.

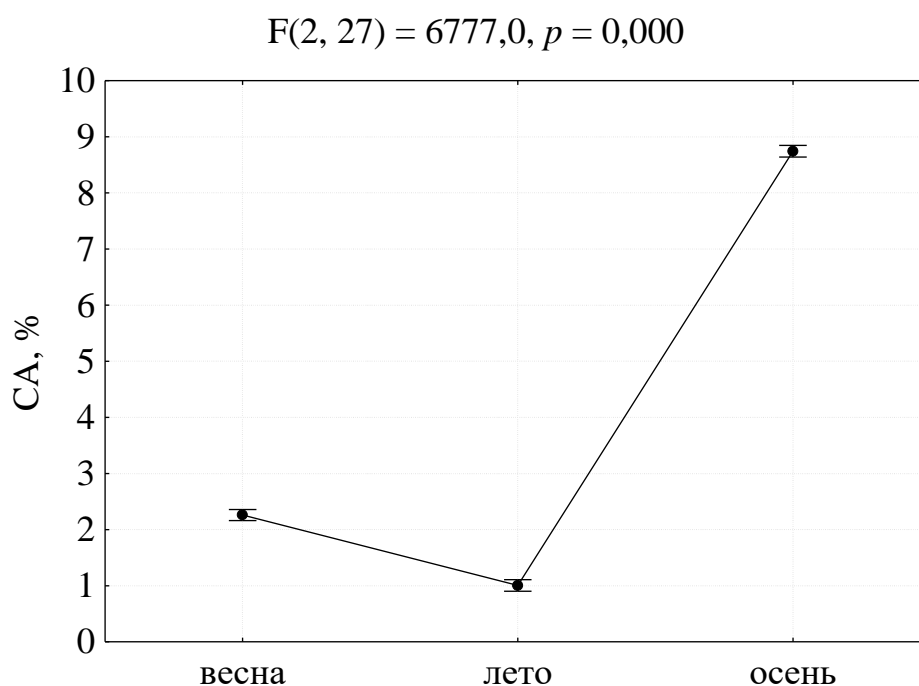


Рисунок 4.2.2 – Сезонная динамика процентного содержания цистеиновой кислоты в тканях *H. sanguisuga* (ANOVA)

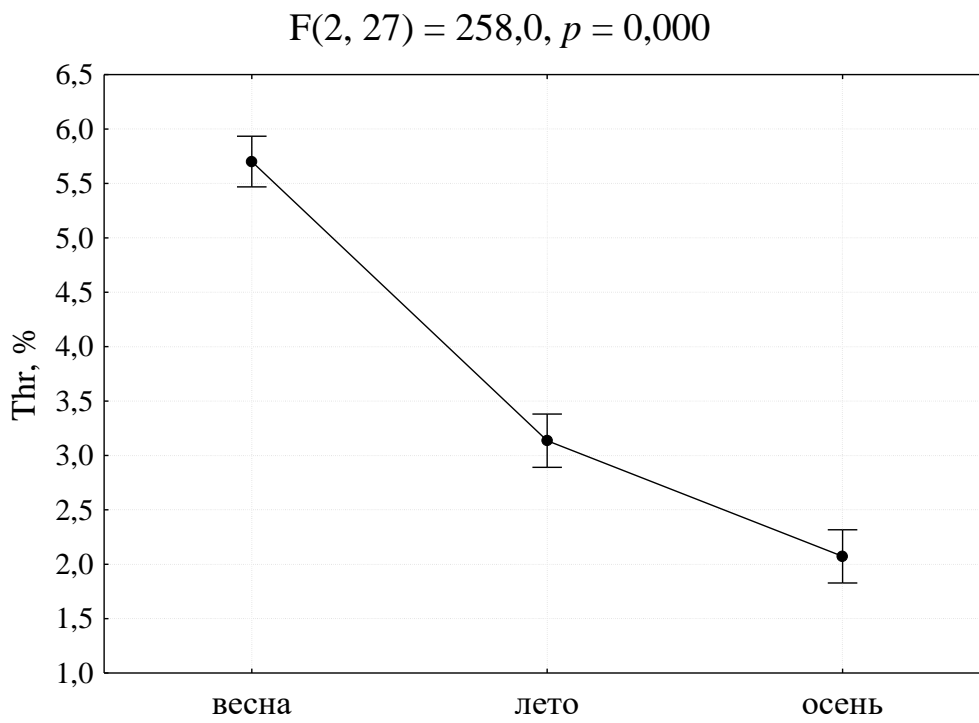
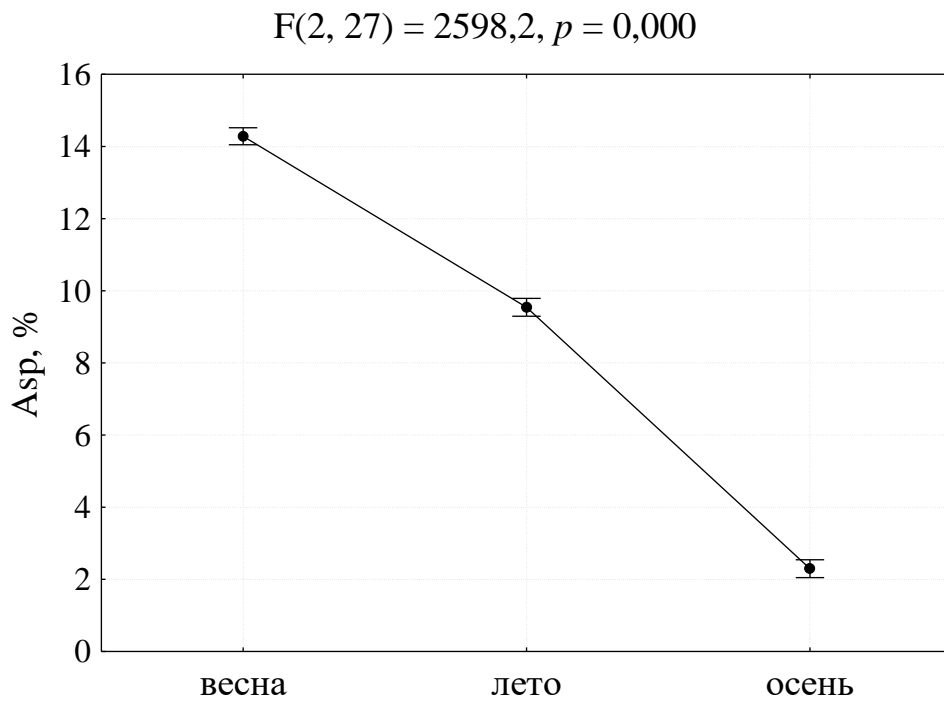


Рисунок 4.2.3 – Сезонная динамика процентного содержания аспарагиновой кислоты и треонина в тканях *H. sanguisuga* (ANOVA)

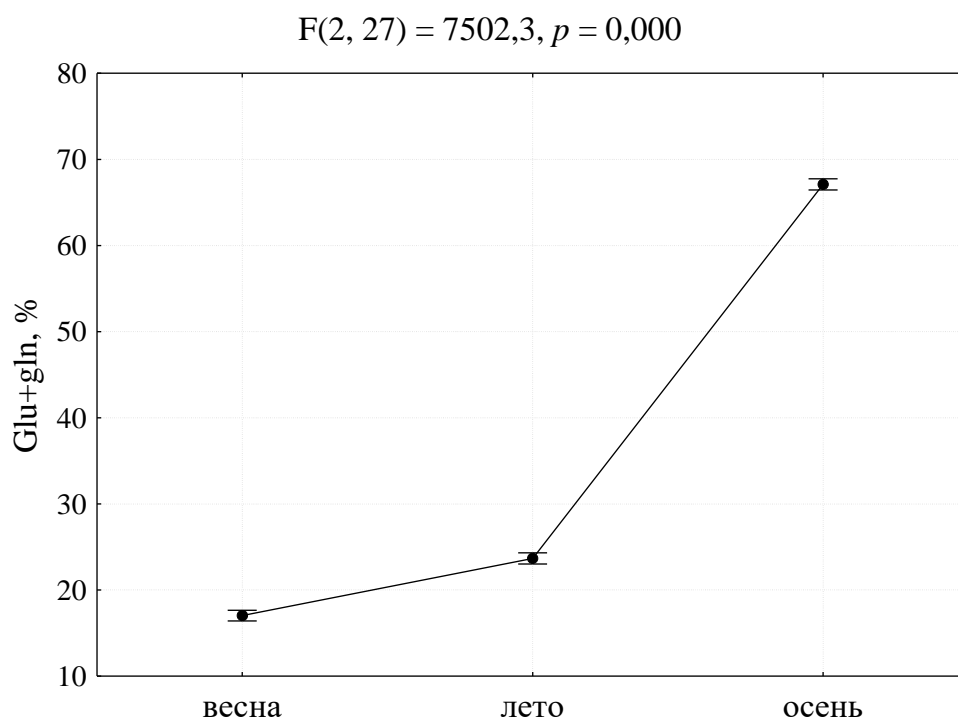
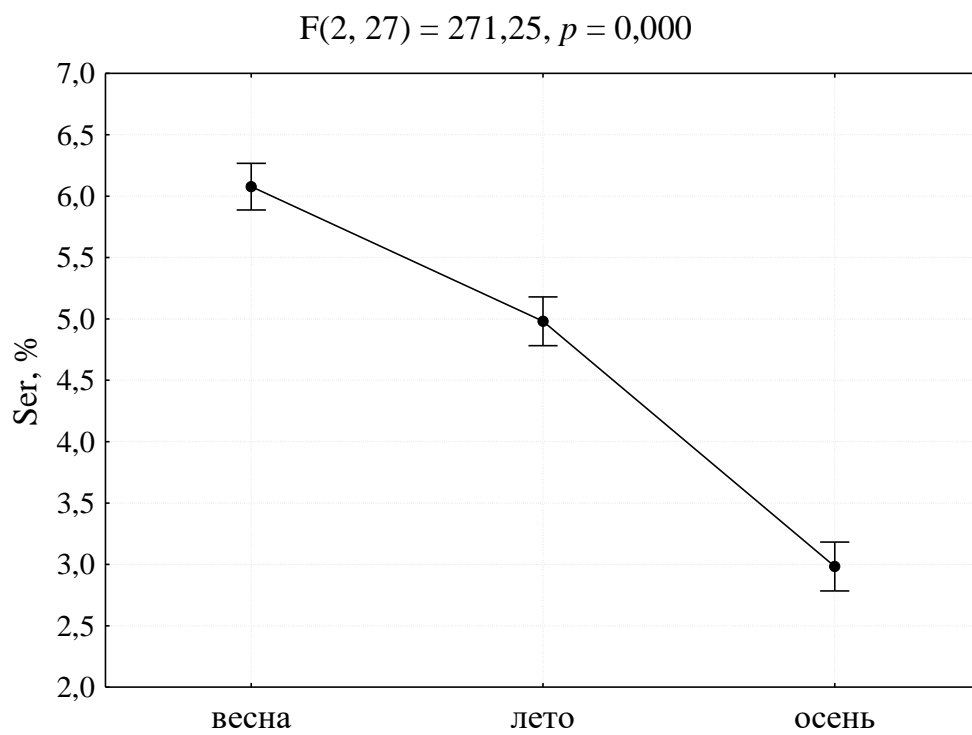


Рисунок 4.2.4 – Сезонная динамика процентного содержания серина, глутаминовой кислоты и глутамина в тканях *H. sanguisuga* (ANOVA)

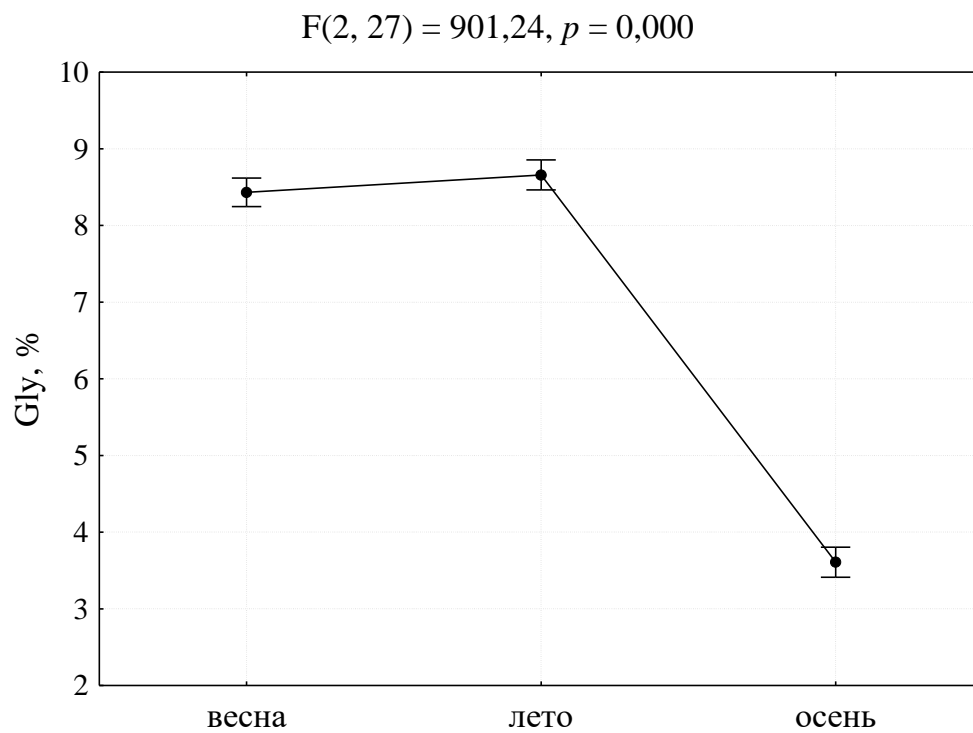
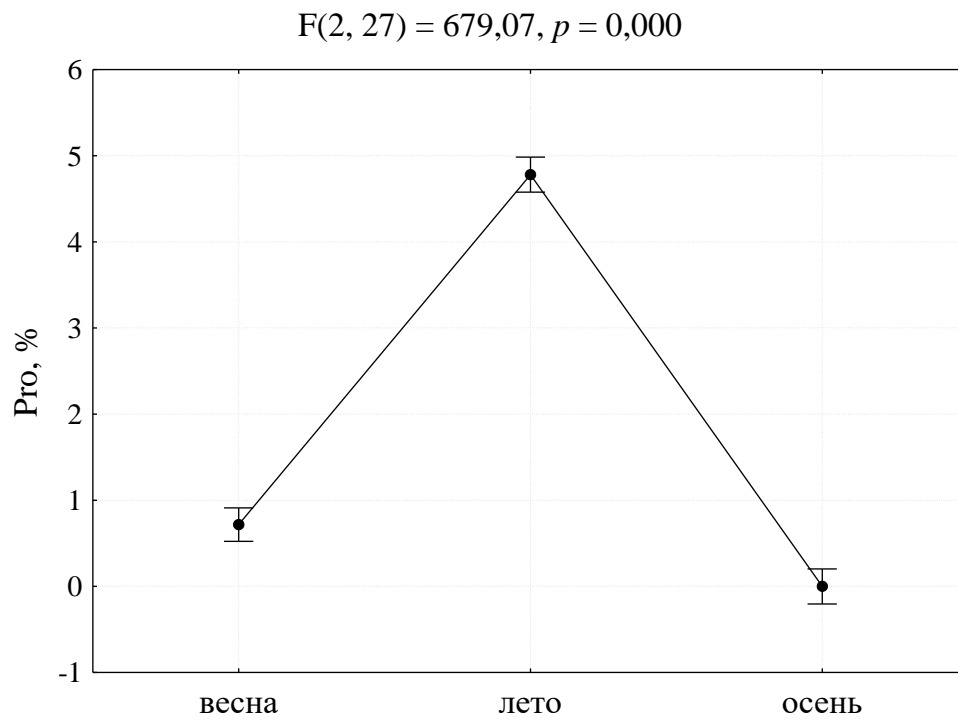


Рисунок 4.2.5 – Сезонная динамика процентного содержания пролина и глицина в тканях *H. sanguisuga* (ANOVA)

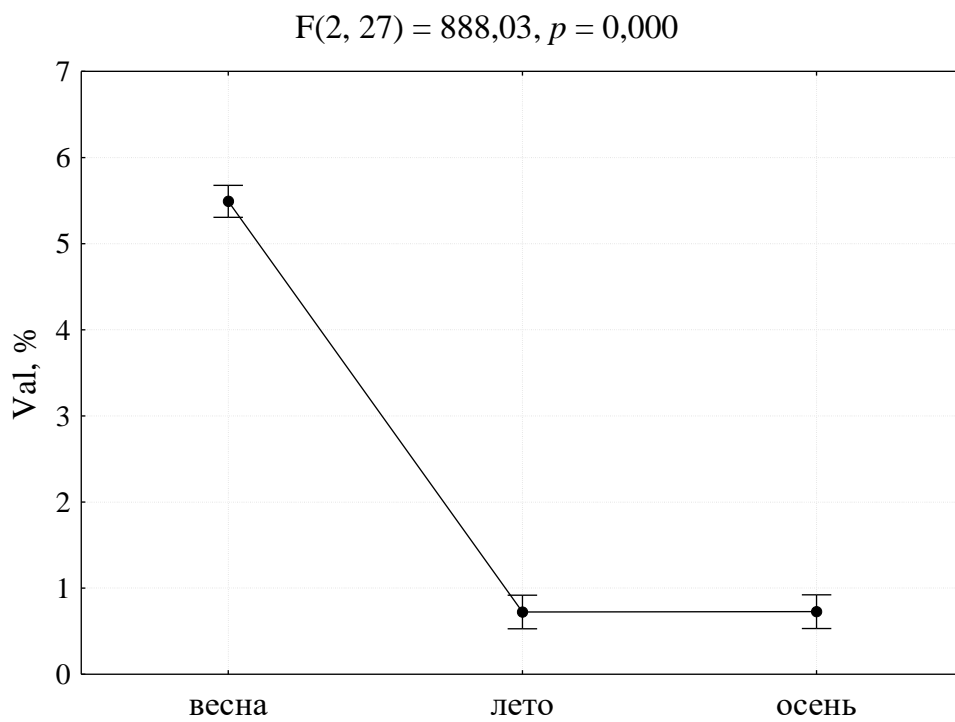
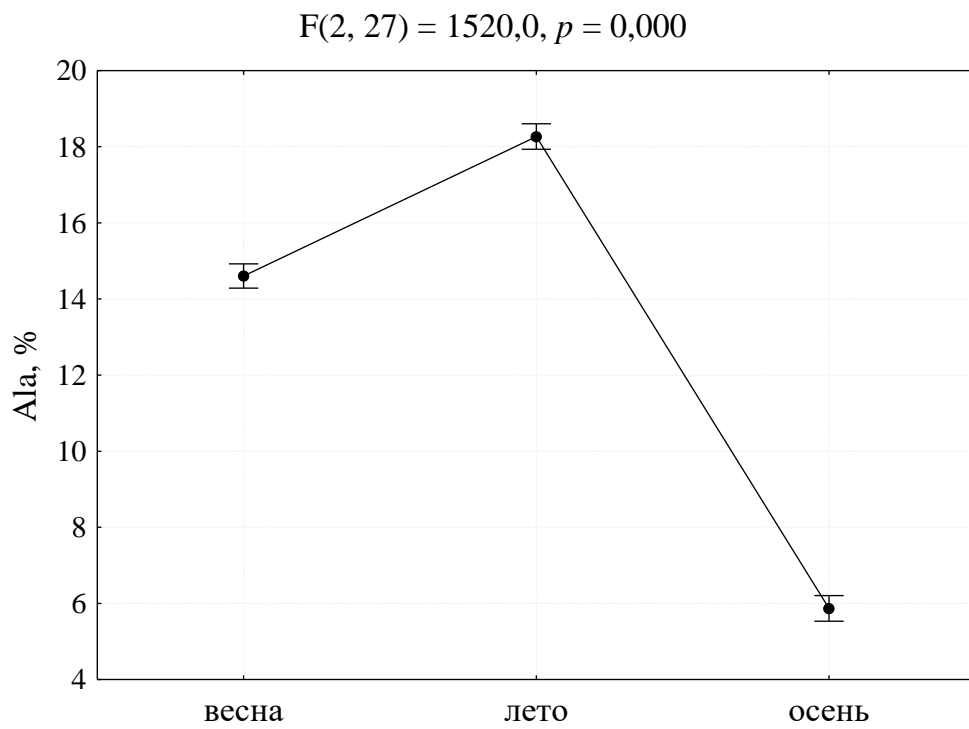


Рисунок 4.2.6 – Сезонная динамика процентного содержания аланина и валина в тканях *H. sanguisuga* (ANOVA)

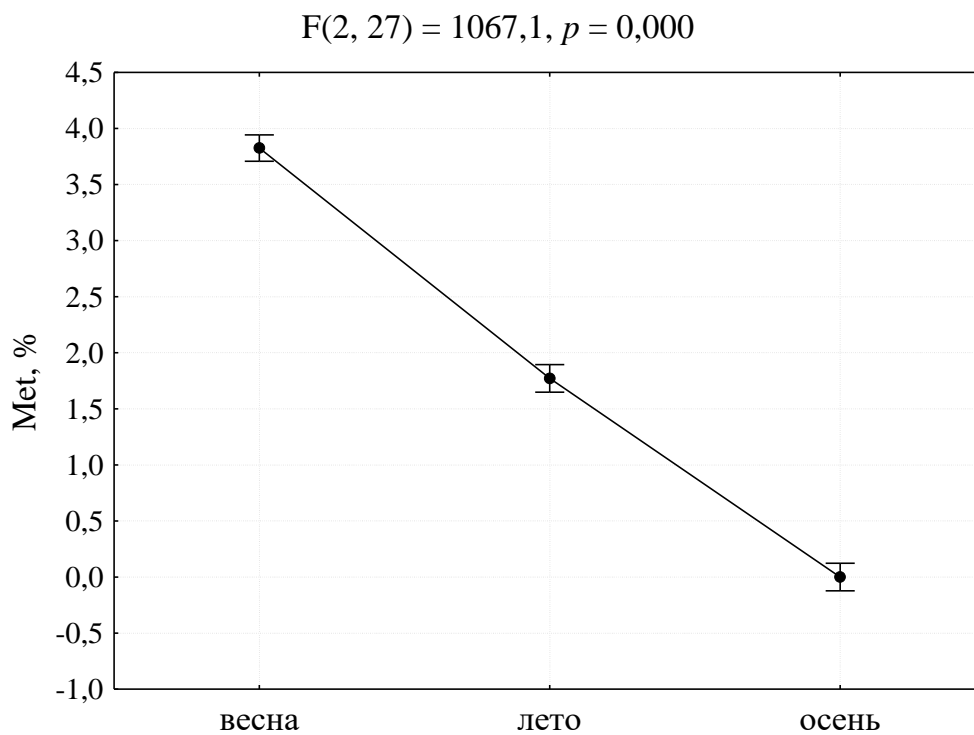
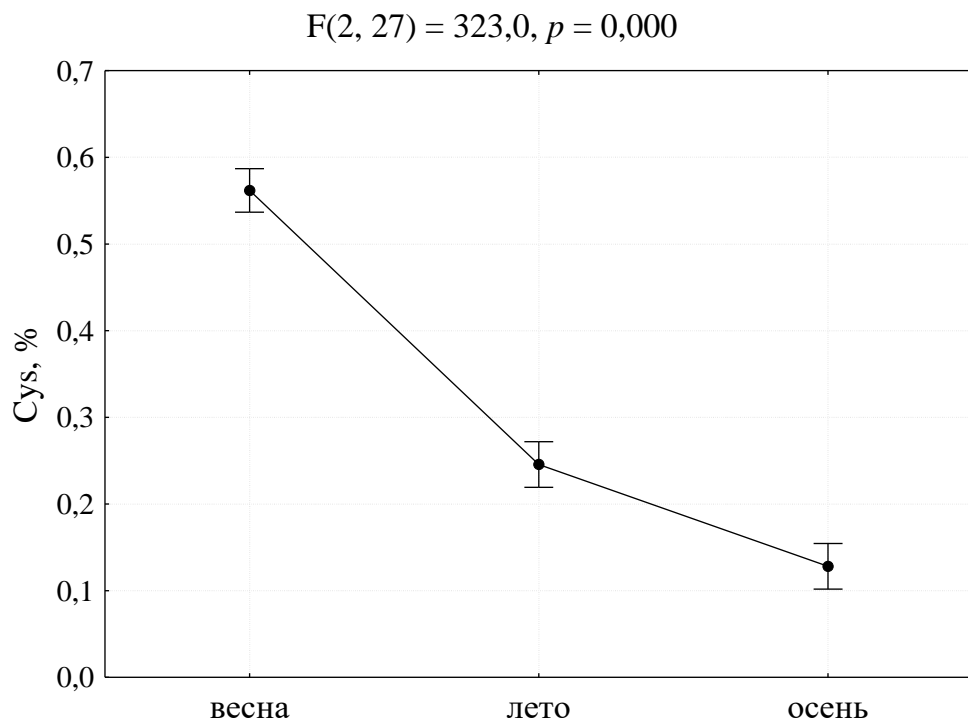


Рисунок 4.2.7 – Сезонная динамика процентного содержания цистеина и метионина в тканях *H. sanguisuga* (ANOVA)

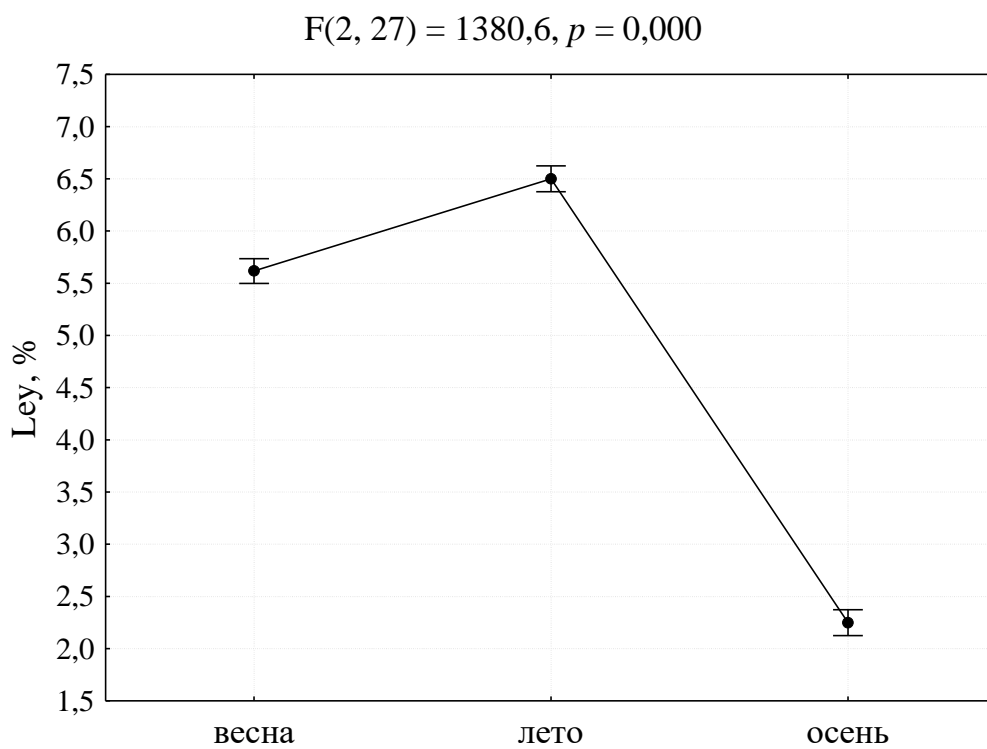
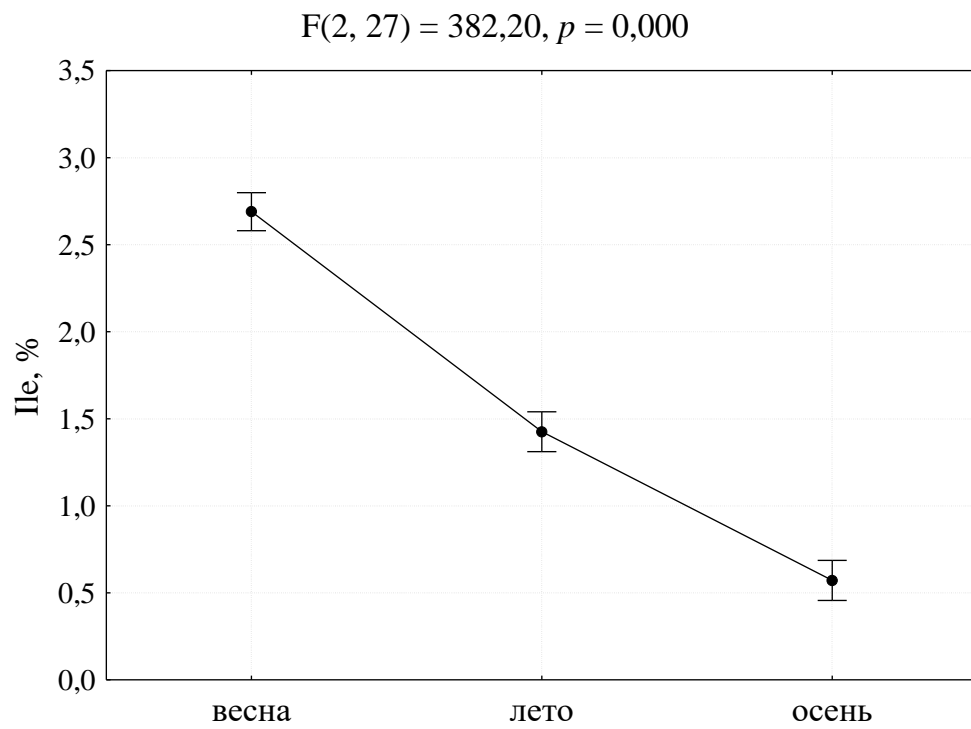


Рисунок 4.2.8 – Сезонная динамика процентного содержания изолейцина и лейцина в тканях *H. sanguisuga* (ANOVA)



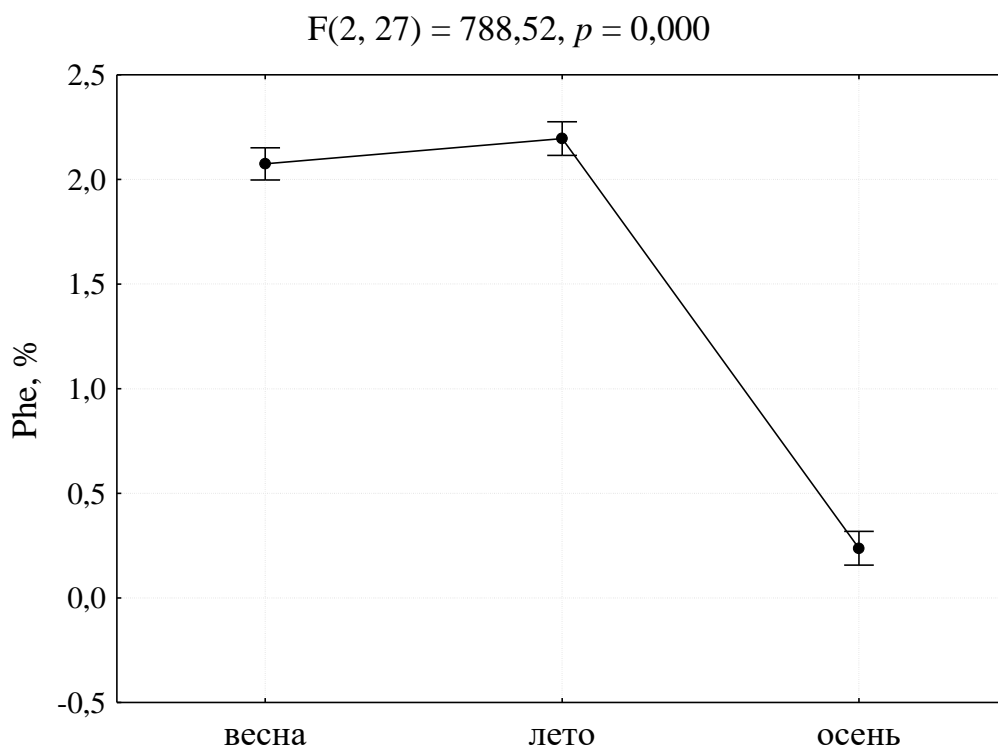
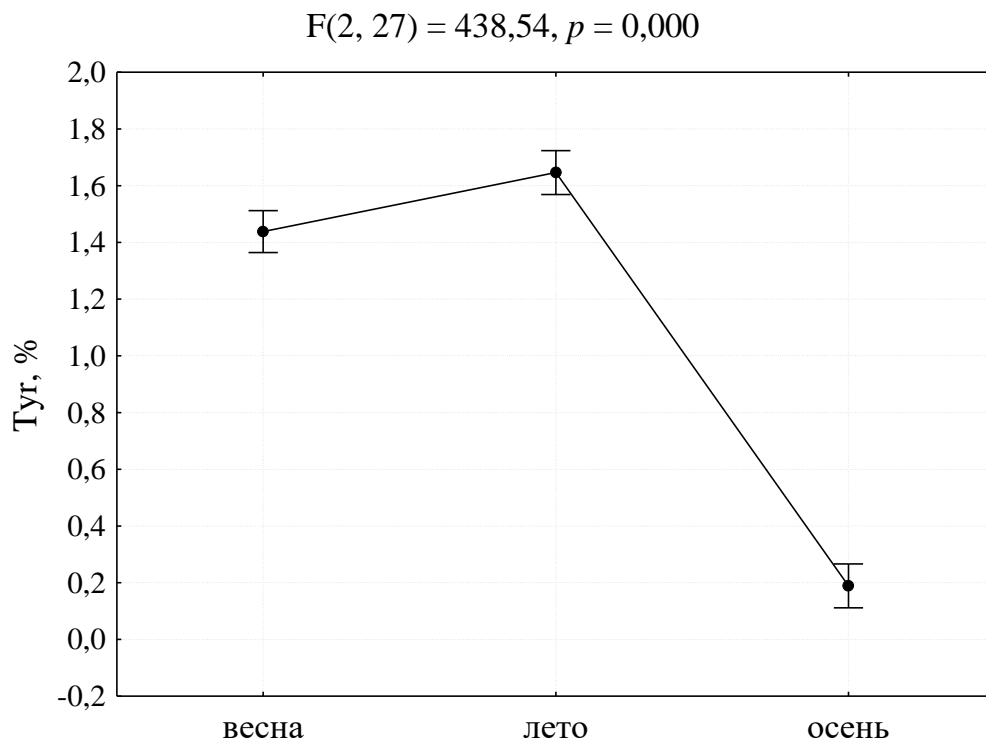


Рисунок 4.2.9 – Сезонная динамика процентного содержания тирозина и фенилаланина в тканях *H. sanguisuga* (ANOVA)

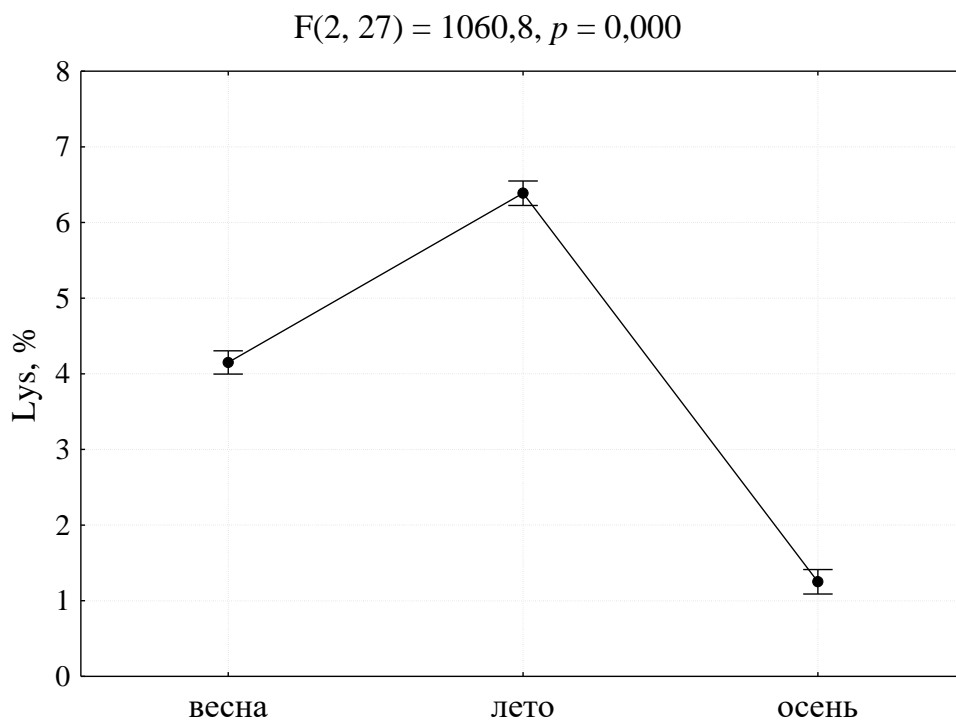
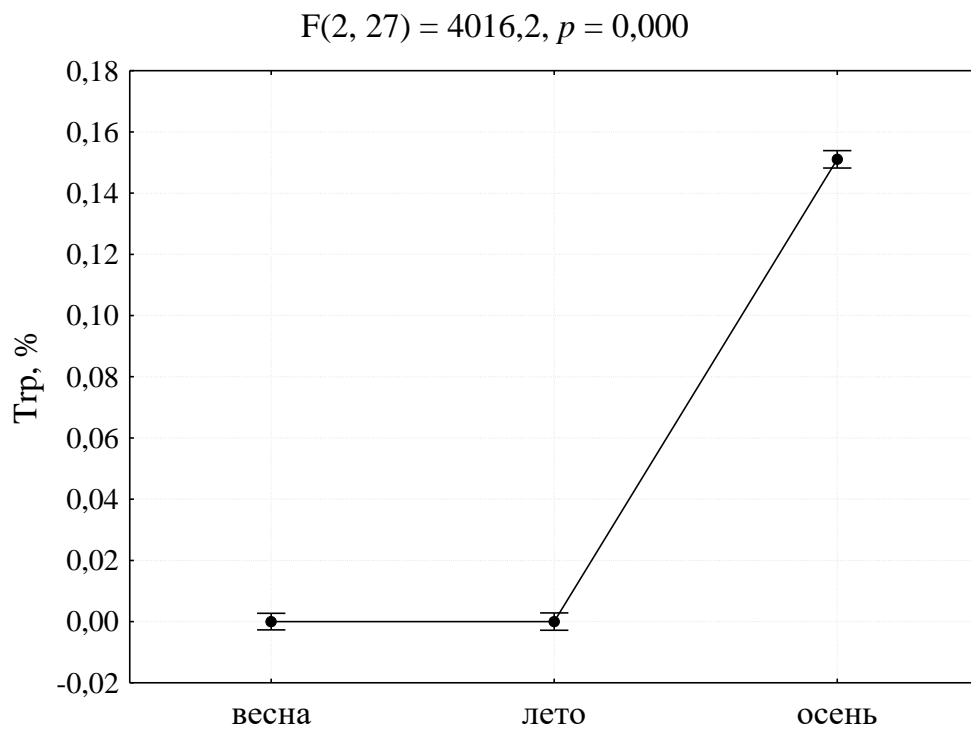


Рисунок 4.2.10 – Сезонная динамика процентного содержания триптофана и лизина в тканях *H. sanguisuga* (ANOVA)

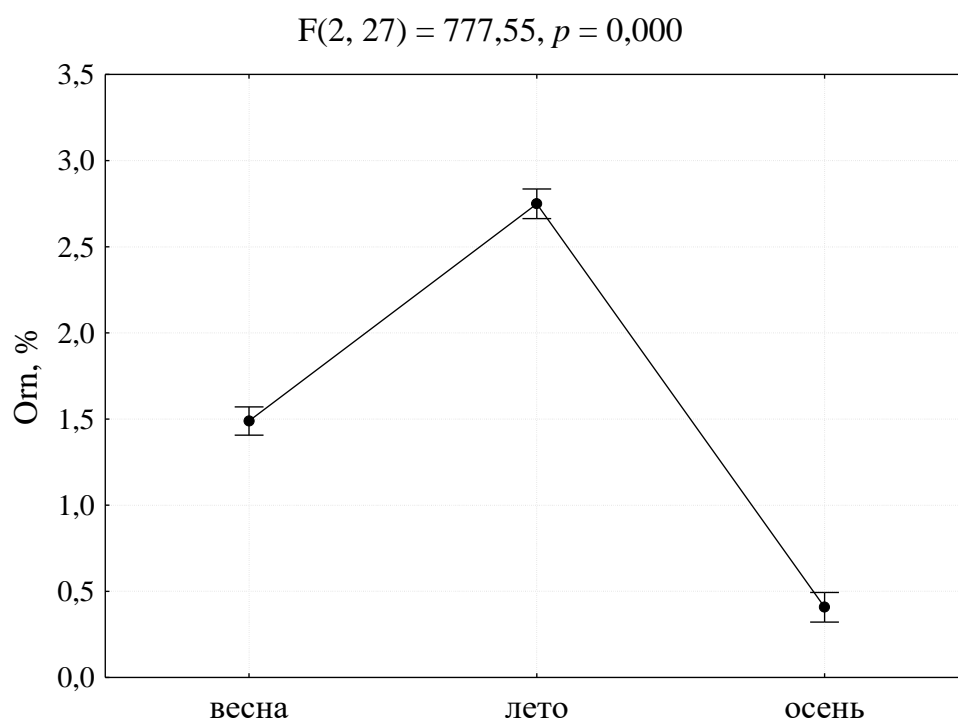
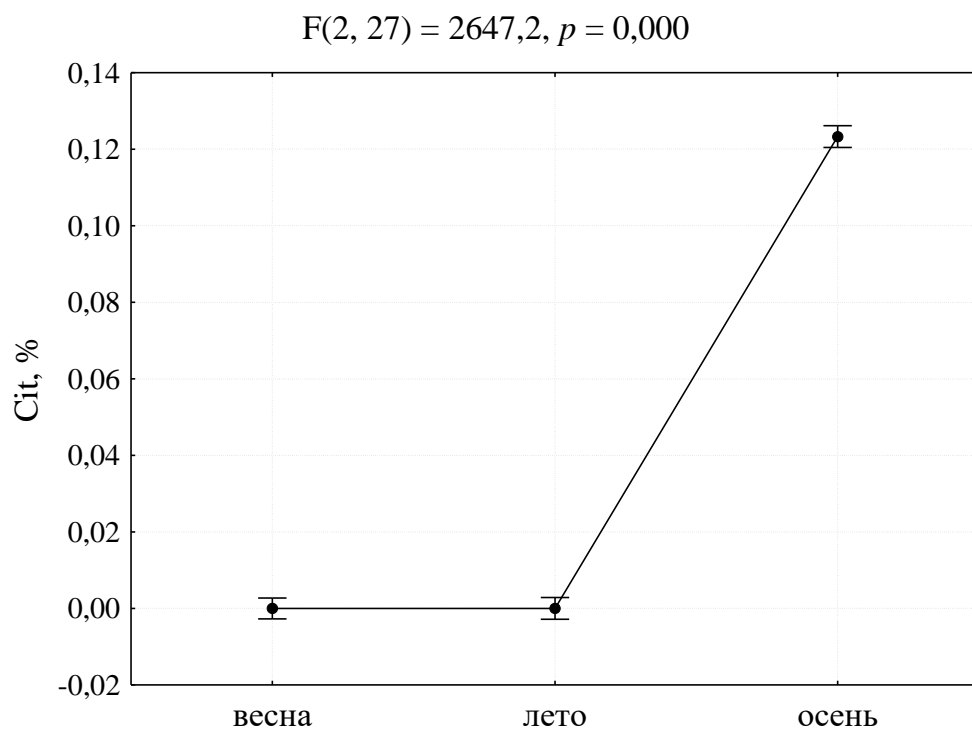


Рисунок 4.2.11 – Сезонная динамика процентного содержания цитруллина и орнитина в тканях *H. sanguisuga* (ANOVA)

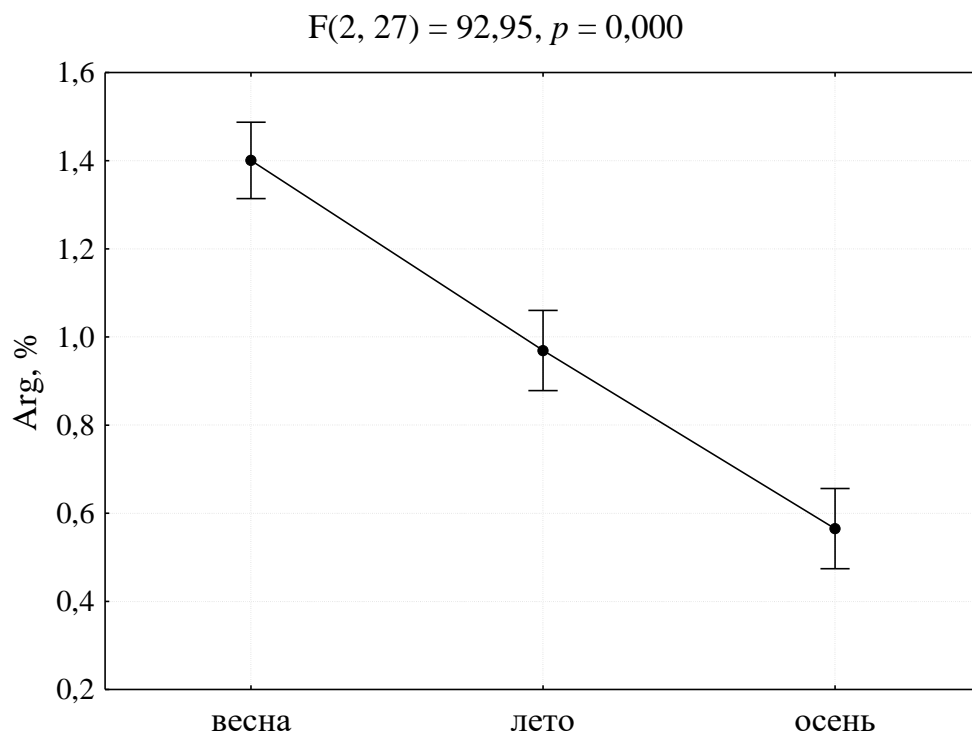
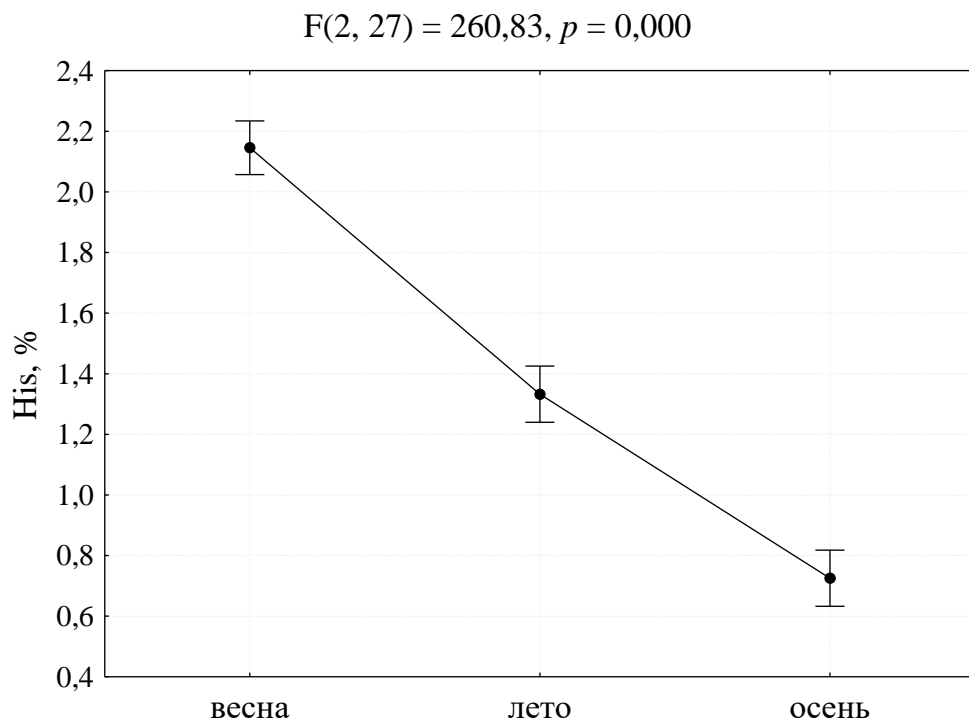


Рисунок 4.2.12 – Сезонная динамика процентного содержания гистидина и аргинина в тканях *H. sanguisuga* (ANOVA)

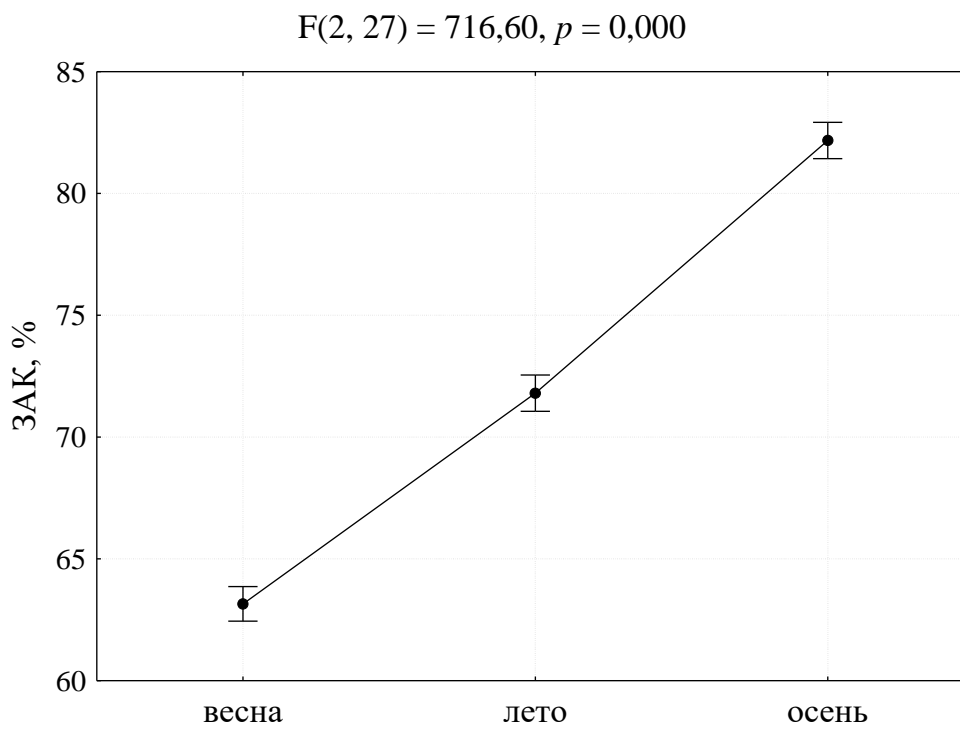
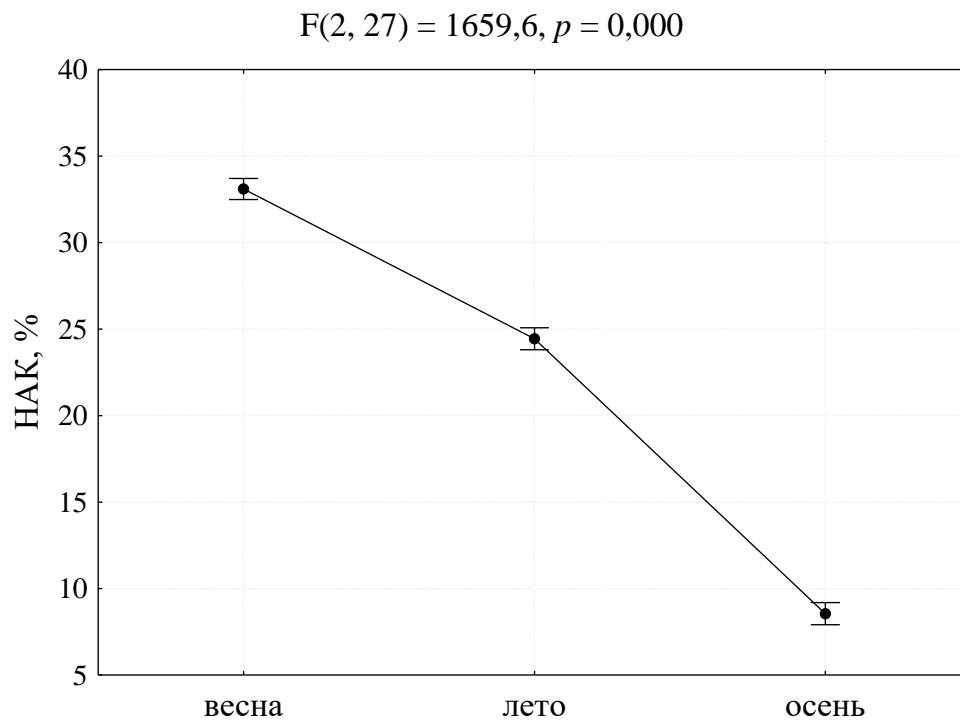


Рисунок 4.2.13 – Сезонная динамика процентного содержания незаменимых и заменимых аминокислот в тканях *H. sanguisuga* (ANOVA)

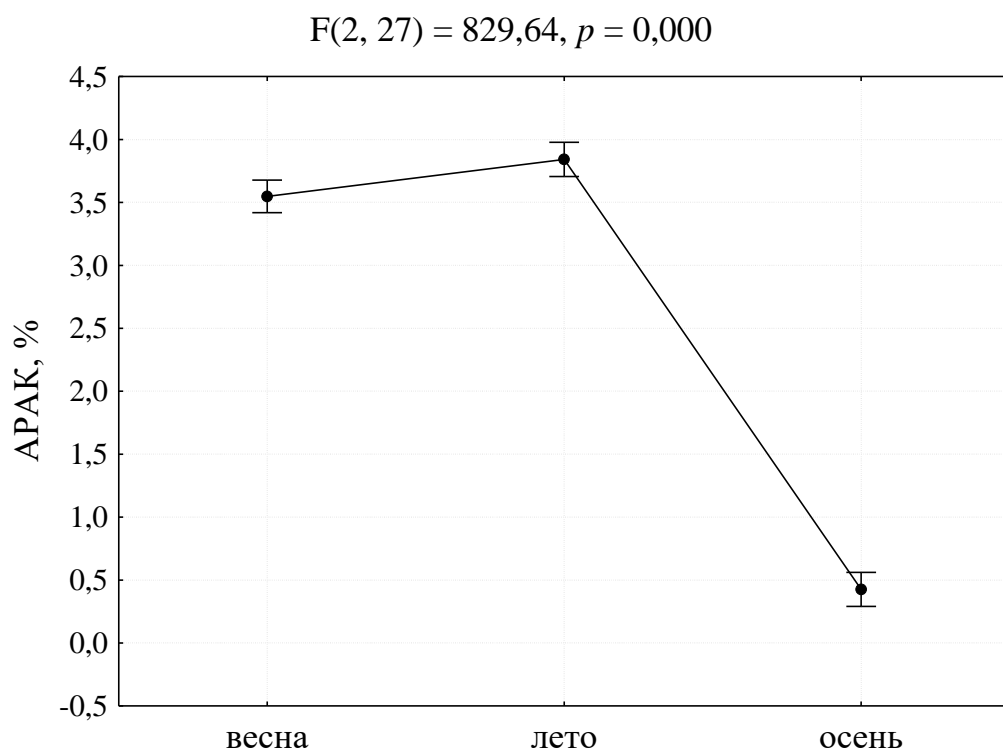
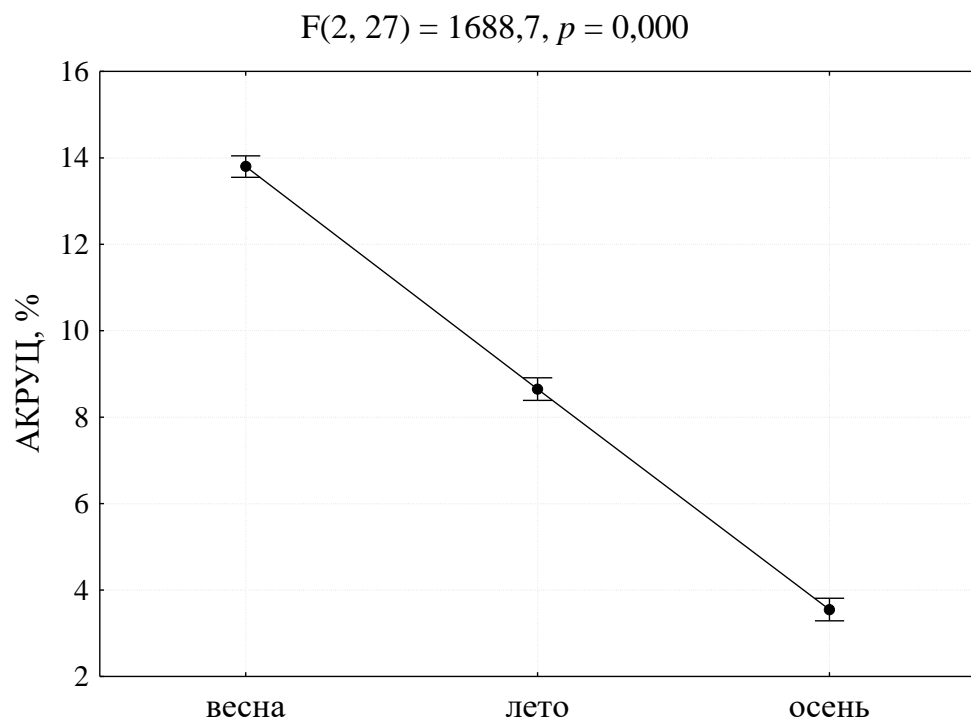


Рисунок 4.2.14 – Сезонная динамика процентного содержания АК с разветвленной углеродной цепью и ароматических АК в тканях *H. sanguisuga* (ANOVA)

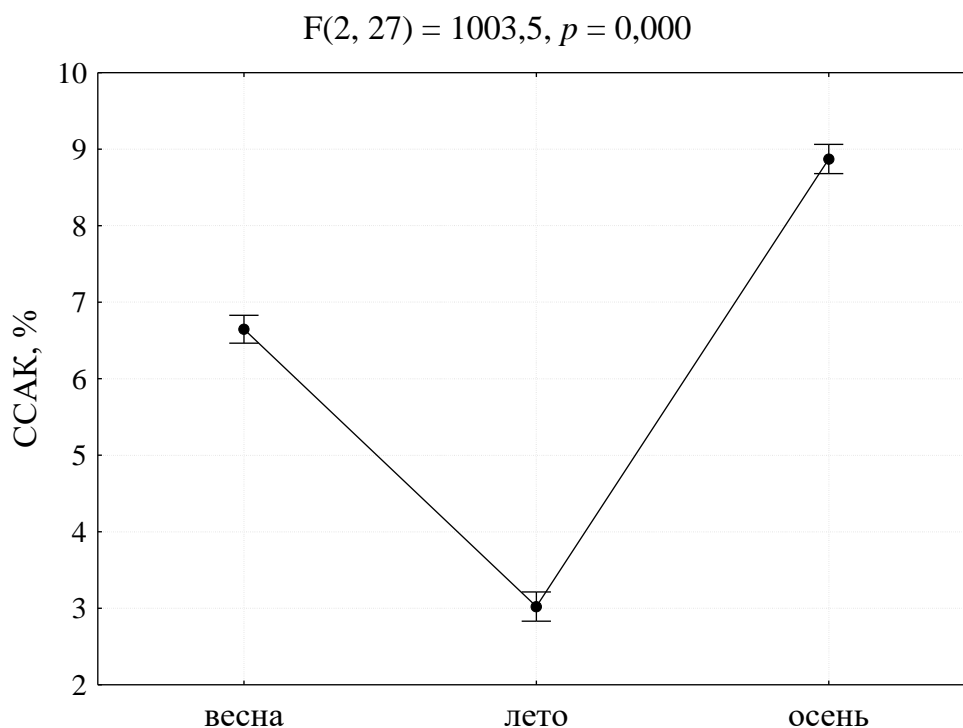


Рисунок 4.2.15 – Сезонная динамика процентного содержания серосодержащих АК в тканях *H. sanguisuga* (ANOVA)

Из рисунков 4.2.2-4.2.15 видно, что смена времен года оказывает наибольшее влияние на процентное содержание в тканях ложноконских пиявок цистеиновой кислоты, глутаминовой кислоты и глутамина, триптофана ( $F_{2; 27} > 4016; p < 0,001$ ). Наименьшая изменчивость характерна для аргинина, треонина, гистидина, серина ( $F_{2; 27} < 271,0; p < 0,001$ ).

Методом главных компонент показана четкая дифференциация трех сезонных групп большой ложноконской пиявки *H. sanguisuga* согласно обсуждаемым выше различиям аминокислотных спектров ее тканей (рис. 4.2.16, табл. 4.2.3).

Первая главная компонента (PC1), на которую приходится 66,72% общей дисперсии данных, пространственно отделяет весенних особей *H. sanguisuga* от летних и осенних.

Наибольший вклад в сезонные различия вносят аминокислоты, наиболее сильно коррелирующие с PC1: аспарагиновая кислота, аланин, изолейцин, лейцин, лизин ( $p < 0,001$ ) (рис. 4.2.16, табл. 4.2.3).

Со второй главной компонентой (PC2), на которую приходится 32,04% общей дисперсии данных, наиболее значимо коррелируют цистеиновая кислота, глутаминовая кислота, триптофан ( $p < 0,001$ ), максимальное содержание которых характерно для осенней группы *H. sanguisuga*, а также пролин, доминирующий у летних особей (рис. 4.2.16, табл. 4.2.3).

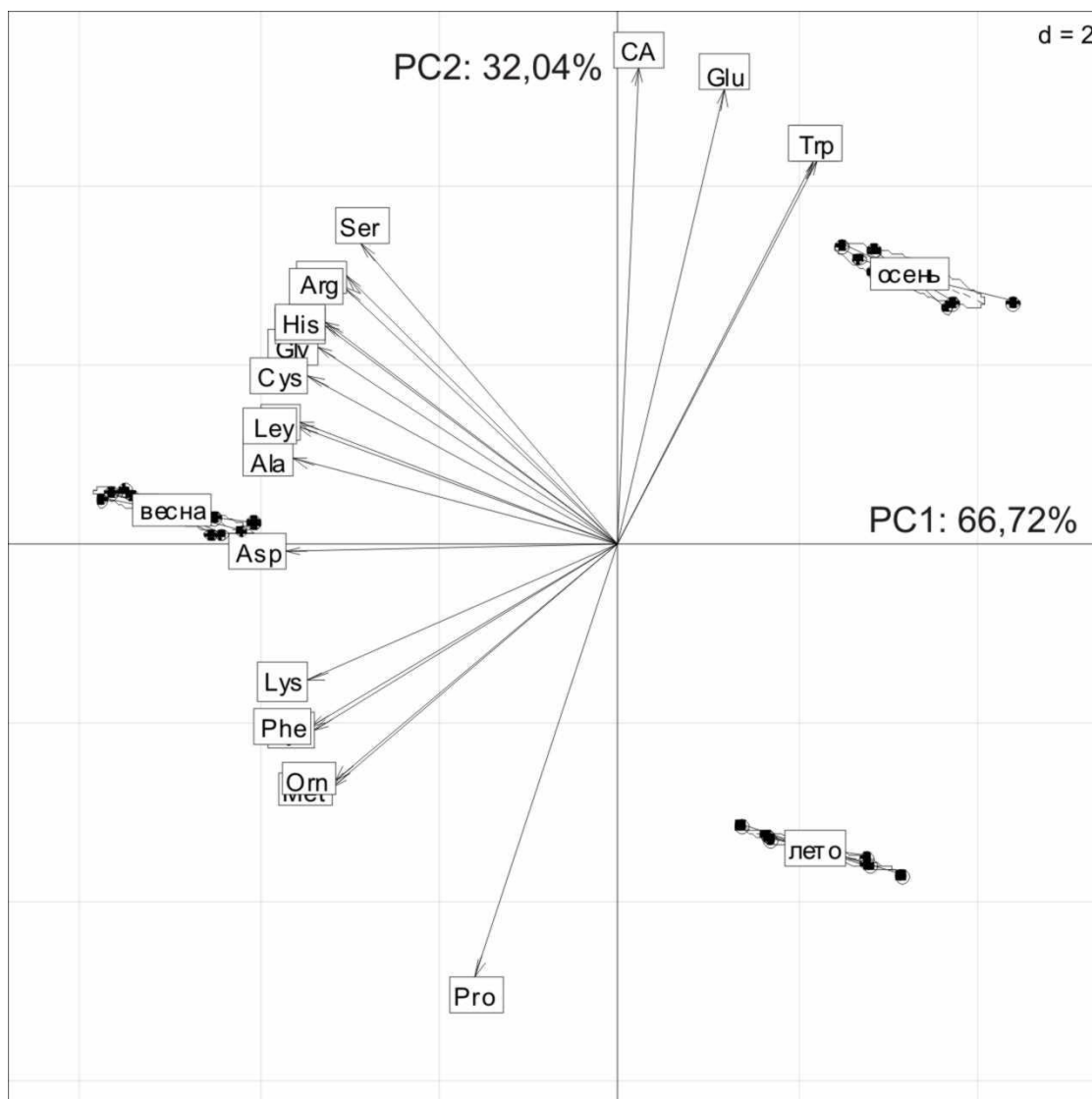


Рисунок 4.2.16 – Свободные аминокислоты (lg мкмоль/100г) тканей *H. sanguisuga* различных сезонных групп в пространстве главных компонент



Таблица 4.2.3 – Результаты компонентного анализа свободных аминокислот (АК,  $1\mu\text{г мкмоль}/100\text{г}$ ) в тканях особей *H. sanguisuga* различных сезонных групп

АК, $1\mu\text{г мкмоль}/100\text{г}$ ( $i = 30$ )	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
Cysteic Acid	0,06	0,99***	0,03	14,73
Aspartic Acid	-0,99***	-0,02	7,08	0,00
Threonine	-0,82***	0,56**	4,81	4,59
Serine	-0,77***	0,63***	4,25	5,84
Glu+ Gln	0,32	0,95***	0,75	13,28
Proline	-0,43*	-0,90***	1,29	12,08
Glycine	-0,90***	0,41*	5,87	2,52
Alanine	-0,98***	0,18	6,86	0,46
Citrulline	0,59***	0,80***	2,52	9,51
Valine	-0,88***	0,46*	5,58	3,10
Cystine	-0,93***	0,35	6,19	1,81
Methionine	-0,86***	-0,51**	5,24	3,88
Isoleucine	-0,96***	0,25	6,63	0,95
Leucine	-0,97***	0,25	6,65	0,91
Tyrosine	-0,91***	-0,39*	5,97	2,27
Phenylalanine	-0,92***	-0,38*	6,06	2,18
Tryptophan	0,60***	0,80***	2,53	9,51
Ornithine	-0,85***	-0,49**	5,15	3,58
Lysine	-0,93***	-0,29	6,18	1,23
Histidine	-0,88***	0,47*	5,52	3,22
Arginine	-0,82***	0,54**	4,84	4,32
	Собственные значения (eigenvalues, $\lambda_j$ ) PC		Дисперсия, объясненная PC (%)	
	14,01	6,73	66,72	32,04

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

### 4.3. Возрастные особенности аминокислотного спектра тканей кровососущих и хищных пиявок

Челюстные пиявки, или гирудиниды, отличаются от других представителей фауны пиявок Палеарктики более высокой продолжительностью жизни – пять и более лет (Лукин, 1976). Предыдущие исследования авторов были проведены с использованием взрослых особей челюстных пиявок. Между тем возрастные различия в содержании свободных аминокислот в тканях особей *H. verbana* и *H. sanguisuga* могут стать дополнительными информативными показателями при изучении роли биологически активных соединений в онтогенезе хищных и кровососущих пиявок. Биология развития гирудиниид изучена довольно хорошо. Известно, что они размножаются летом, откладывают коконы во влажный грунт прибрежной полосы водоемов. Через месяц из коконов выходит молодежь, 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».

#### *Свободные аминокислоты в тканях молоди и взрослых особей*

##### *H. verbana из природных популяций*

В исследованиях использованы особи аптечной пиявки *H. verbana* различных возрастных групп, отловленных в реке Челбас (Краснодарский край, Каневской район) в первую декаду августа. Масса тела молоди медицинских пиявок, используемых в эксперименте, составила  $0,14 \pm 0,08$  г, взрослых особей –  $1,83 \pm 0,24$  г.

При сравнительной оценке состояния аминокислотного пула в тканях молодых и взрослых особей *H. verbana*, были выявлены существенные различия. Так, у растущих пиявок отмечен высокий исходный уровень азотистого обмена – суммарные концентрации свободных аминокислот в их тканях вдвое превышают эти показатели у взрослых особей ( $p < 0,001$ ) (табл. 4.3.1).

Таблица 4.3.1 – Возрастные особенности аминокислотного состава тканей медицинской пиявки *H. verbana* из природных популяций

АК, мкмоль/100г	Взрослые n = 10	Молодь n = 25	<i>p</i>
Cysteic Acid	6,32±0,20	8,52±0,27	0,000
Taurine	следы	4,42±0,06	0,000
Aspartic Acid	235,29±2,34	398,58±3,97	0,000
Threonine	24,74±0,71	15,22±0,44	0,000
Serine	41,65±1,15	36,86±1,02	0,002
Glutamic acid +Glu	201,63±3,74	448,63±8,32	0,000
Proline	2,42±0,06	4,95±0,12	0,000
Glycine	41,37±1,13	222,31±6,09	0,000
Alanine	166,33±3,53	332,66±7,05	0,000
Valine	7,16±0,32	4,02±0,18	0,000
Cysteine	1,20±0,03	3,70±0,08	0,000
Methionine	2,58±0,04	5,99±0,08	0,000
Isoleucine	5,29±0,27	14,21±0,71	0,000
Leucine	32,63±1,52	93,28±4,34	0,000
Tyrosine	6,10±0,24	10,90±0,43	0,000
Phenylalanine	6,57±0,31	16,60±0,77	0,000
Tryptophan	следы	3,17±0,04	0,000
Ornithine	10,81±0,37	33,24±1,15	0,000
Lysine	13,54±0,53	79,23±3,12	0,000
Histidine	0,49±0,01	24,60±0,75	0,000
Arginine	2,42±0,03	20,60±0,23	0,000
Фонд АК	808,58±6,40	1781,70±13,89	0,000
ЗАК	695,99±6,69	1458,59±11,88	0,000
НАК	95,42±2,33	276,92±7,43	0,000
НАК/ЗАК	0,14	0,19	
АКРУЦ	45,08±1,93	111,51±4,99	0,000
АРАК	12,67±0,50	27,50±1,12	0,000
ИФ	3,56	4,05	
ССАК	10,10±0,19	22,63±0,25	0,000
ИЗ (Gly/Ala)	0,25	0,67	

Обнаружены значимые различия концентраций всех свободных аминокислот между тканями молодежи и взрослых *H. verbana* ( $p < 0,01$ ) (табл. 4.3.1). Причем в тканях взрослых пиявок, по сравнению с молодежью, значимо повышены концентрации трех аминокислот – треонина в 1,6 раз, серина в 1,1 раз и валина в 1,8 раз ( $p < 0,01$ ).

Наибольший вклад в высокий уровень аминокислотного фонда тканей растущих медицинских пиявок вносят глицин, цистеин, орнитин, лизин и аргинин, концентрации которых превышают таковые у взрослых особей в 5,4, 3,1, 3,1, 5,9, 8,5 раз, соответственно ( $p < 0,001$ ).

Более чем в два раза больше в тканях молодежи *H. verbana* глутаминовой кислоты и глутамина, пролина, аланина, метионина, изолейцина, лейцина и фенилаланина ( $p < 0,001$ ). Обращает на себя внимание невероятно высокий рост (в 50,2 раз) у молодых пиявок гистидина ( $p < 0,001$ ) (табл. 4.3.1).

Гистидин – незаменимая аминокислота, способствующая росту и восстановлению тканей, защищает организм от повреждающего действия радиации, выводит тяжелые металлы из организма и участвует в синтезе гистамина, важного компонента многих иммунологических реакций.

Отмечено, что в тканях растущих пиявок содержится значительное содержание таурина и незаменимой аминокислоты триптофана, которые у взрослых особей присутствуют только в следовых количествах. Очевидно, вышеупомянутые аминокислоты играют ключевую роль при росте и развитии пиявок.

В тканях медицинских пиявок обеих возрастных групп соизмеримо процентное содержание (% от фонда АК) глутаминовой кислоты и глутамина, пролина, метионина, лейцина, изолейцина, тирозина, фенилаланина и основных метаболических групп АКРУЦ, АРАК, ССАК ( $p > 0,05$ ) (табл. 4.3.2). Вместе с тем, в тканях молодежи наблюдается отклонение от нормы показателей антитоксического индекса Фишера (ИФ), вероятно, вследствие процесса формирования аминокислотного спектра растущего организма.

Таблица 4.3.2 – Возрастные особенности аминокислотного спектра (% от фонда) тканей медицинской пиявки *H. vervana* из природных популяций

АК, %	Взрослые n = 10	Молодь n = 25	<i>p</i>
Cysteic Acid	0,78±0,03	0,48±0,02	0,018
Taurine	следы	0,25±0,01	0,000
Aspartic Acid	29,10±0,19	22,37±0,17	0,000
Threonine	3,06±0,10	0,86±0,03	0,000
Serine	5,15±0,13	2,07±0,05	0,000
Glu +Glu	24,93±0,38	25,18±0,40*	0,965
Proline	0,30±0,01	0,28±0,01*	0,958
Glycine	5,12±0,16	12,49±0,36	0,000
Alanine	20,56±0,37	18,67±0,37	0,004
Valine	0,89±0,04	0,23±0,01	0,000
Cysteine	0,15±0,01	0,21±0,01	0,019
Methionine	0,32±0,02	0,34±0,01*	0,926
Isoleucine	0,66±0,03	0,80±0,04*	0,836
Leucine	4,03±0,18	5,23±0,23*	0,069
Tyrosine	0,75±0,03	0,61±0,02*	0,680
Phenylalanine	0,81±0,04	0,93±0,04*	0,907
Tryptophan	следы	0,18±0,01	0,000
Ornithine	1,34±0,04	1,86±0,06	0,036
Lysine	1,67±0,06	4,44±0,16	0,000
Histidine	0,06±0,01	1,38±0,04	0,000
Arginine	0,30±0,02	1,16±0,01	0,000
ЗАК	86,07±0,32	81,87±0,40	0,000
НАК	11,81±0,29	15,54±0,37	0,000
АКРУЦ	5,58±0,24	6,26±0,27*	0,561
АРАК	1,57±0,06	1,54±0,06*	0,999
ССАК	1,25±0,03	1,27±0,02*	0,992

Примечание: \* – статистически значимые различия между группами отсутствуют (Tukey HSD test,  $p > 0,05$ )

Особый интерес представляют показатели индикатора зрелости (ИЗ). Известно, что у промысловых видов рыб возрастание содержания аланина и снижение глицина в тканях с возрастом является устойчивым признаком, что полагает возможность использования отношения глицина/аланина в качестве индикатора зрелости: значения ИЗ равные 1,2-1,4 соответствовали неполовозрелым особям, а 0,3-0,6 – зрелым рыбам (Love, 1970). Согласно нашим данным, показатель ИЗ, используемый для диагностики половой зрелости рыб, «работает» и у пиявок в природе – у молоди медицинских пиявок значения индикатора выше, чем у взрослых особей (табл. 4.3.1).

Содержание заменимых аминокислот в тканях молодых пиявок составляет 81,9% от суммарного фонда, при этом 78,7% приходится на долю аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты и глутамина, глицина и аланина (табл. 4.3.2, рис. 4.3.1).

Процентное содержание заменимых (ЗАК) аминокислот у взрослых особей *H. verbana* выше, чем у молоди – 86,1% от суммарных концентраций АК ( $p < 0,001$ ). Основу пула ЗАК формируют аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота и глутамин, аланин, общее содержание которых достигает 74,6%. Наибольшие возрастные различия характерны для процентного содержания ЗАК: аспарагиновой кислоты, серина и глицина ( $p < 0,001$ ) (табл. 4.3.2, рис. 4.3.1).

Содержание незаменимых аминокислот (НАК) в тканях молодых пиявок составляет 15,5% от суммарного фонда, что существенно больше, чем у взрослых особей (11,8%) ( $p < 0,001$ ) (табл. 4.3.2), в связи чем, соотношение НАК/ЗАК у молоди и взрослых особей *H. verbana* различно – 0,19 и 0,14, соответственно (табл. 4.3.1). Ткани взрослых особей *H. verbana* содержат существенно больше треонина и валина – в 3,6 и 3,8 раз, соответственно ( $p < 0,001$ ). Наибольший вклад в повышенный уровень НАК у растущих пиявок вносят лейцин, лизин, гистидин и аргинин, суммарное содержание которых составляет 12,2% от суммарного фонда (рис. 4.3.1).

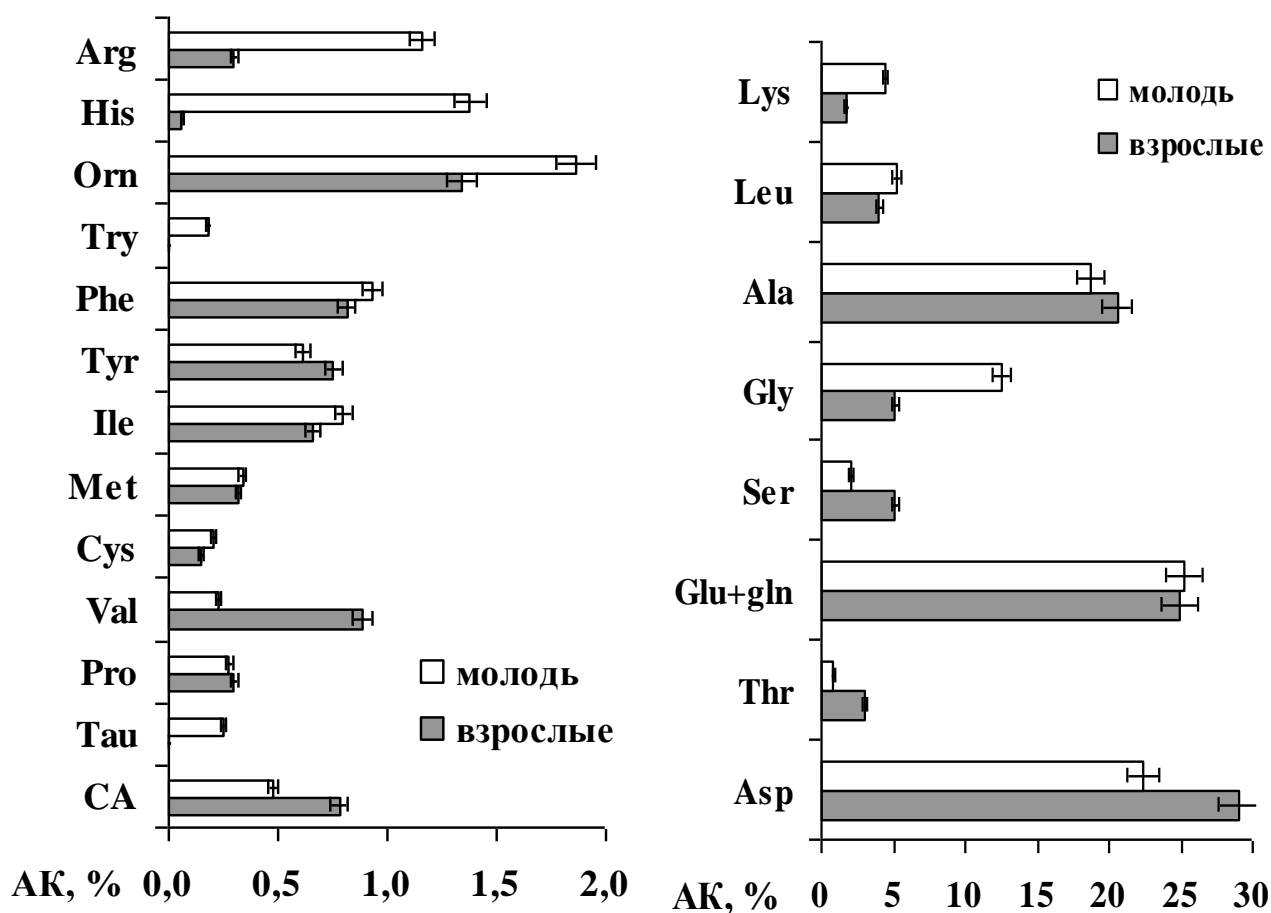


Рисунок 4.3.1 – Содержание свободных АК (% от фонда) в тканях молодых и взрослых особей аптечной пиявки *H. verbana*

*Свободные аминокислоты в тканях молоди и взрослых особей большой ложноконской пиявки *H. sanguisuga**

Для изучения возрастной изменчивости аминокислотного спектра тканей хищных пиявок были использованы особи *H. sanguisuga* различных возрастных групп, отловленные в первую декаду августа в вдхр. Белоярское (Свердловская обл.). Масса тела молоди большой ложноконской пиявки, используемых в эксперименте, составила  $0,13 \pm 0,06$  г, взрослых особей –  $2,30 \pm 0,41$  г.

При изучении аминокислотного пула *H. sanguisuga* обнаружено, что в тканях обеих возрастных групп пиявок содержится 23 свободных АК (табл. 4.3.3) (Chernaya, Kovalchuk, 2011; Черная, Ковальчук, 2014а).

Таблица 4.3.3 – Возрастные особенности аминокислотного состава (мкмоль/100г)

тканей ложноконской пиявки *H. sanguisuga* из природных популяций

АК мкмоль/100г	Взрослые n = 10	Молодь n = 25	<i>p</i>
Cysteic Acid	9,41 ± 1,86	8,48 ± 1,10*	0,240
Taurine	следы	19,52 ± 2,67	0,000
Aspartic Acid	88,42 ± 6,47	204,68 ± 8,11	0,000
Treonine	29,40 ± 6,79	52,61 ± 5,52	0,000
Serine	46,29 ± 5,39	72,57 ± 5,64	0,000
Glutamic Acid + Gln	218,84 ± 5,79	645,20±14,21	0,000
Proline	44,60 ± 7,95	164,71 ± 5,76	0,000
Glycine	80,26 ± 6,62	181,69 ± 6,26	0,000
Alanine	169,22±11,52	228,59 ± 7,99	0,000
Valine	6,74 ± 0,98	133,59 ± 6,16	0,000
Cystine	2,28 ± 0,30	3,77 ± 0,27	0,000
Methionine	16,54 ± 3,04	30,72 ± 4,53	0,000
Isoleucine	13,24 ± 1,25	19,49 ± 2,82	0,000
Leucine	60,46 ± 7,09	75,33 ± 4,85	0,000
Tyrosine	15,27 ± 1,36	25,39 ± 4,35	0,000
Phenylalanine	20,42 ± 2,79	35,59 ± 2,81	0,000
Tryptophan	следы	4,64 ± 0,34	0,000
Ornithine	25,58 ± 3,33	26,33 ± 2,98*	0,590
Lysine	59,29 ± 6,25	75,42 ± 4,34	0,000
Histidine	12,39 ± 1,75	22,14 ± 2,69	0,000
Arginine	8,95 ± 0,15	30,49 ± 3,53	0,000
Фонд АК	927,60±73,42	2060,9 ± 87,5	0,000
ЗАК	665,18±14,46	1526,06±16,84	0,000
НАК	227,43 ± 8,78	480,02 ± 11,09	0,000
НАК/ЗАК	0,34	0,31	
АКРУЦ	80,43 ± 2,88	228,42 ± 4,18	0,000
АРАК	35,68 ± 1,19	60,98 ± 2,25	0,000
ИФ	2,25	3,75	
ССАК	19,83 ± 1,07	34,89 ± 1,49	0,000
ИЗ (Gly/Ala)	0,47	0,79	

Примечание: \* – статистически значимые различия между группами отсутствуют (Tukey HSD test,  $p > 0,05$ )



При этом у молодежи, как и у медицинских пиявок, отмечен повышенный уровень азотистого обмена – суммарные концентрации свободных аминокислот в их тканях в 2,2 раза выше, чем у взрослых особей ( $p < 0,001$ ). Аминокислотный фонд у молодых пиявок повышен за счет 20-ти аминокислот. Только концентрации цистеиновой кислоты и орнитина в тканях пиявок обеих групп не показали значимых различий ( $p > 0,05$ ) (табл. 4.3.3).

У молодежи особенно высоко содержание аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты и глутамина, пролина, глицина, и аргинина, концентрации которых превышают содержание их у взрослых особей в 2,3, 2,9, 3,7, 2,3 и 3,4 раз, соответственно ( $p < 0,001$ ) (табл. 4.3.3). А содержание незаменимой аминокислоты валина у молодежи почти в 20 больше, чем у взрослых ( $p < 0,001$ ). Так же, как и у медицинских пиявок *H. verbana*, в тканях молодежи *H. sanguisuga* обнаружены аминокислоты, содержащиеся у взрослых пиявок в следовых количествах – таурин и триптофан. Показатели индикатора зрелости (ИЗ) в тканях БЛП, как и в случае с медицинскими пиявками, имеют существенные различия у молодежи и взрослых особей (табл. 4.3.3).

Содержание заменимых аминокислот в тканях молодых пиявок составляет 74,1% от суммарного фонда, при этом более 31% приходится на долю глутаминовой кислоты и глутамина (табл. 4.3.4, рис. 4.3.2).

Глутаминовая кислота занимает центральное место в процессах переаминирования в организме, участвует в углеводном обмене и является одним из источников гликогена. Важна роль глутаминовой кислоты и глутамина в обезвреживании аммиака, образующегося в процессе жизнедеятельности животных (Готовский и др., 2002). У взрослых особей содержание заменимых аминокислот несколько ниже, чем у молодежи – 71,8%, однако доля серина, аланина и тирозина превышает уровень этих аминокислот в тканях растущих пиявок (табл. 4.3.4, рис. 4.3.2).

Содержание незаменимых аминокислот в тканях молодых ложноконских пиявок составляет 23,3% от суммарного фонда, при этом более 6% приходится на долю валина.

Таблица 4.3.4 – Возрастные особенности аминокислотного состава (%) тканей ложноконской пиявки *H. sanguisuga* из природных популяций

АК % от фонда	Взрослые n = 10	Молодь n = 25	<i>p</i>
Cysteic Acid	1,01 ± 0,04	0,41 ± 0,01	0,000
Taurine	следы	0,94 ± 0,03	0,000
Aspartic Acid	9,54 ± 0,12	9,93 ± 0,06*	0,099
Treonine	3,14 ± 0,16	2,55 ± 0,05	0,002
Serine	4,98 ± 0,09	3,52 ± 0,04	0,000
Glutamic Acid + Gln	23,68 ± 0,41	31,33 ± 0,28	0,000
Proline	4,78 ± 0,17	7,99 ± 0,03	0,000
Glycine	8,66 ± 0,13	8,82 ± 0,03*	0,253
Alanine	18,27 ± 0,22	11,10 ± 0,08	0,000
Valine	0,72 ± 0,02	6,48 ± 0,02	0,000
Cystine	0,25 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,000
Methionine	1,77 ± 0,07	1,49 ± 0,05	0,004
Isoleucine	1,43 ± 0,01	0,94 ± 0,03	0,000
Leucine	6,50 ± 0,09	3,65 ± 0,04	0,000
Tyrosine	1,65 ± 0,02	1,23 ± 0,05	0,000
Phenylalanine	2,20 ± 0,06	1,73 ± 0,03	0,000
Tryptophan	следы	0,23 ± 0,01	0,000
Ornithine	2,75 ± 0,05	1,27 ± 0,03	0,000
Lysine	6,39 ± 0,11	3,66 ± 0,03	0,000
Histidine	1,33 ± 0,04	1,07 ± 0,03	0,000
Arginine	0,97 ± 0,02	1,48 ± 0,04	0,000
ЗАК	71,80 ± 0,42	74,11 ± 0,30	0,000
НАК	24,44 ± 0,34	23,26 ± 0,24	0,011
АКРУЦ	8,65 ± 0,10	11,08 ± 0,07	0,000
АРАК	3,84 ± 0,05	2,95 ± 0,07	0,000
ССАК	3,02 ± 0,10	3,02 ± 0,09*	0,999

Примечание: \* – статистически значимые различия между группами отсутствуют (Tukey HSD test,  $p > 0,05$ )

У взрослых особей содержание незаменимых аминокислот значимо выше, чем у молодежи – 24,4% ( $p < 0,05$ ). При этом более 12% приходится на долю лейцина и лизина (рис. 4.3.2, табл. 4.3.4).

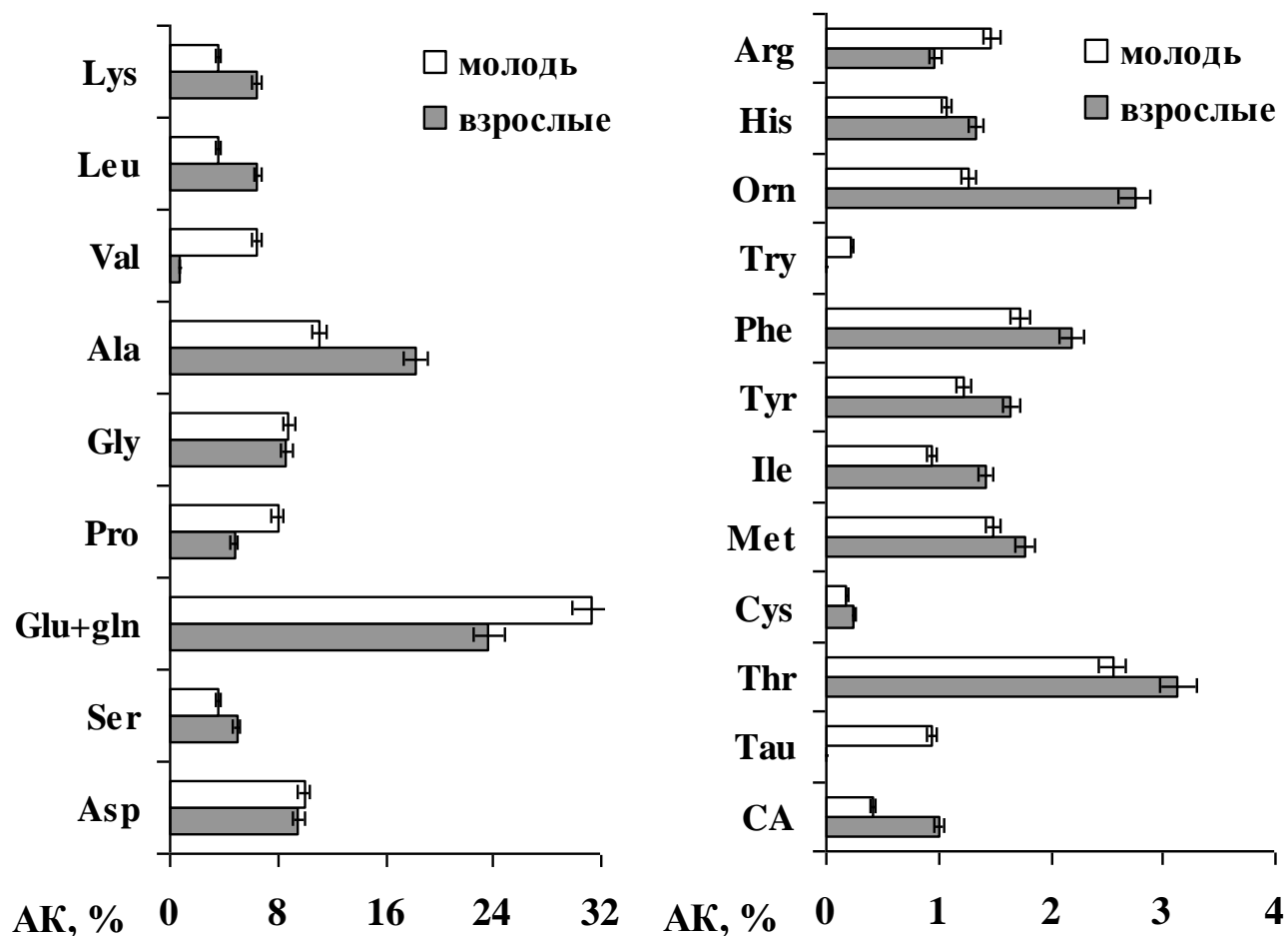


Рисунок 4.3.2 – Возрастные особенности процентного содержания (% от фонда АК) свободных аминокислот в тканях *H. sanguisuga*

Лейцин, вероятно, компенсирует пониженный уровень валина в тканях взрослых пиявок. Известно участие лизина в синтезе антител, гормонов и ферментов (Ленинджер, 1985; Готовский и др., 2002). Валин, наряду с лейцином и изолейцином, служит источником энергии в мышечных клетках, а также препятствует снижению уровня серотонина. Валин необходим для поддержания нормального обмена азота в организме (Ленинджер, 1985). Следует отметить достаточно высокий уровень содержания аргинина, который повышает выработку гор-

мона роста. При всех обнаруженных существенных различиях в содержании свободных аминокислот соотношение незаменимых аминокислот к заменимым (НАК/ЗАК) у обеих групп пиявок сопоставимо – 0.31 у молодежи и 0.34 у взрослых особей (табл. 4.3.4).

Проведенные исследования выявили существенные сезонные и возрастные различия аминокислотного спектра тканей аптечной пиявки *H. verbana* и большой ложноконской пиявки *H. sanguisuga*.

Показано, что качественные количественные изменения аминокислотного спектра тканей *H. verbana* и *H. sanguisuga* обусловлены физиологическими процессами, связанными с сезонными особенностями их биологического цикла. Многократное повышение концентраций серосодержащих аминокислот в тканях осенних особей и стабильно высокий уровень содержания аланина, метионина, лизина, гистидина, пула НАК в осенний и весенний периоды можно рассматривать как важное звено в механизме формирования низкотемпературной адаптации медицинских пиявок.

Установлено, что, независимо от видовой принадлежности, рост и развитие челюстных пиявок сопровождается высоким уровнем азотистого метаболизма. Отмечена высокая потребность молодежи медицинских и ложноконских пиявок в таурине и триптофане. Обнаружено, что индикатор зрелости (глицин/аланин), используемый для промысловых видов рыб, можно применять и при возрастной оценке особей *H. verbana* и *H. sanguisuga* в природных водоемах.

## ГЛАВА 5. ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ФОРМИРОВАНИЯ АМИНОКИСЛОТНОГО ФОНДА ТКАНЕЙ И СЕКРЕТА СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ МЕДИЦИНСКИХ ПИЯВОК В ГИРУДОКУЛЬТУРЕ

Антропогенное загрязнение водных экосистем в пределах ареалов медицинских пиявок и неконтролируемый браконьерский отлов, связанный с повышенным спросом на фармацевтическом рынке, привели к существенному снижению их численности в природных водоемах, в связи с чем одной из важнейших мер по сохранению природных популяций медицинских пиявок является их воспроизводство в искусственных условиях.

Современная технология гирудокультуры базируется на методике, разработанной отечественными учеными еще в середине прошлого века, основными этапами которой являются спаривание «маточного» поголовья медицинских пиявок, создание необходимых условий для откладки коконов, выборка молоди из созревших коконов и ускоренное ее раскармливание говяжьей кровью до размеров готовой продукции (Синева, 1944; Щеголев, Федорова, 1955). Полный цикл выращивания медицинских пиявок занимает 8-10 месяцев, в то время как в природе они достигают нужных размеров только на третий год жизни.

Процессы ускоренного роста и развития пиявок в гирудокультуре связаны исключительно с лабораторными условиями биофабрик, что сопряжено с рядом негативных факторов (частая смена воды, высокая плотность популяции, пространственное ограничение и мн. др.), оказывающих существенное влияние на физиологический статус выращенных особей, а зачастую являющихся причиной высокой смертности молоди (Кустов, 2003). При этом проблема оценки благополучия медицинских пиявок с учетом их физиологических потребностей в условиях искусственного воспроизводства остается не до конца решенной, и для контроля качества готовой продукции, реализуемой на фармацевтический рынок, наряду со строгим соблюдением ветеринарно-санитарных требований, необходимы надежные критерии состояния здоровья выращенных особей.

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).

В мировой литературе представлен обширный фактический материал по фармакологическим аспектам применения биологически активных соединений, продуцируемых медицинскими пиявками, тем не менее, комплексные сведения, касающиеся физиологического состояния особей, выращенных в искусственных условиях, практически отсутствуют. Нет полного представления об оптимальном содержании свободных аминокислот в гомогенатах тканей и секрете слюнных желез пиявок из гирудокультуры, используемых в гирудофармакологии и косметологии. Исследования в сравнительном аспекте медицинских пиявок 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 аминокислотного баланса в организме способна пролить свет и на резервные адаптивные возможности МП в изменяющихся условиях среды.

В данной главе будут рассмотрены видовые и региональные особенности аминокислотного состава тканей двух видов медицинских пиявок из гирудокультуры четырех биофабрик России. Приводятся данные сравнительного анализа аминокислотного статуса пиявок из гирудокультуры и их «предков» – особей из природных популяций. На примере модельного вида аптечной пиявки *H. verbana*, будут изучены возрастные закономерности формирования аминокислотного спектра тканей медицинских пиявок и его изменчивость в системе «гомогенаты тканей – секрет слюнных желез».

## 5.1. Эколого-физиологические особенности энергетического обмена челюстных пиявок

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

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

Таблица 5.1.1. Потребление кислорода (млО<sub>2</sub>/Г·час) у челюстных пиявок различных эколого-физиологических групп

Вид, эколого-физиологический статус	n	Масса тела, Г	Потребление кислорода млО <sub>2</sub> /Г·час
<i>Hirudo verbana</i> гирудокультура, сытая	38	4,33 ± 0,87	0,09 ± 0,009
<i>Hirudo verbana</i> гирудокультура, голодная	30	0,79 ± 0,23	0,86 ± 0,069
<i>Hirudo medicinalis</i> гирудокультура, голодная	30	0,75 ± 0,16	0,64 ± 0,035
<i>Hirudo verbana</i> природные популяции, голодная	35	0,78 ± 0,14	0,41 ± 0,027
<i>Haemopsis sanguisuga</i> природные популяции, голодная	20	1,03 ± 0,21	0,99 ± 0,016

Так, у аптечной пиявки *H. verbana*, выращенной на биофабрике («Гирудо-Мед.Юг», Краснодарский край) уровень основного обмена достигает 0,86 ± 0,069 млО<sub>2</sub>/Г·час, что значимо, в 1,34 раз выше этих показателей, обнаруженных у лечеб-

ной пиявки *H. medicinalis*, выращенной в подобных условиях (биофабрика «Гиру-ДИ.Н.», Саратовская обл.), у которой он составляет  $- 0,64 \pm 0,035$  млО<sub>2</sub>/г·час ( $p < 0,001$ ). Обсуждаемый уровень основного обмена обоих видов медицинских пиявок из гирудокультуры относится к особям, голодающим три месяца.

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

При изучении популяционных различий потребления кислорода мы использовали особей аптечной пиявки *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 и их масса ( $0,78 \pm 0,14$  г) позволили оценить их физиологическое состояние, как «голодные», и репрезентативно сопоставить их уровень основного обмена (млО<sub>2</sub>/г·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) (табл. 5.1.1).

Показано, что при одинаковом физиологическом состоянии особей двух опытных групп уровень основного обмена МП, выращенных на биофабрике ( $0,86 \pm 0,069$  млО<sub>2</sub>/г·час) вдвое превышает аналогичные показатели этого же вида пиявок ( $0,41 \pm 0,027$  млО<sub>2</sub>/г·час) из природных популяций (р. Челбас, Краснодарский край) ( $p < 0,001$ ) (табл. 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 (табл. 5.1.1).

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, ис-



кусственное 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 МП 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 ( $p < 0,05$ ) (табл. 5.1.1). В опыте (при расчете на особь) наблюдали повышение потребления кислорода у сытых пиявок, что совпадает с литературными данными (Проссер, 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  $0,86 \pm 0,069$  млО<sub>2</sub>/г·час, что превышает интенсивность потребления кислорода сытых пиявок ( $0,09 \pm 0,009$  млО<sub>2</sub>/г·час) в 9,6 раз ( $p = 0,001$ ) (Ковальчук и др., 2007) (табл. 5.1.1).

Аналогичные статистически значимые различия по основному обмену между голодными и сытыми особями МП 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 особен-

ности 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 (первая декада мая). Показано, что потребление кислорода у большой ложноконской пиявки *H. sanguisuga* ( $0,99 \pm 0,016$  млО<sub>2</sub>/г·час) более чем в два раза выше, чем у медицинской *H. verbana* из природных популяций ( $0,41 \pm 0,027$  млО<sub>2</sub>/г·час) ( $p < 0,001$ ) (табл. 5.1.1), что согласуется с нашими данными о высоком уровне аминокислотного 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 челюстных пиявок позволят адекватно оценить и интерпретировать эколого-физиологические закономерности формирования аминокислотного спектра их тканей.

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

При изучении аминокислотного спектра тканей искусственно выращенных особей *H. medicinalis* и *H. verbana* были выявлены существенные различия, как на межвидовом, так и на внутривидовом уровне (табл. 5.2.1, 5.2.2).

Таблица 5.2.1 – Содержание свободных аминокислот (АК, мкмоль/100г) в тканях медицинских пиявок *H. medicinalis* и *H. verbana*, выращенных на биофабрике «СибМедПиявка» (Алтайский край)

АК, мкмоль/100г	<i>H. medicinalis</i> n = 15	<i>H. verbana</i> n = 15	<i>p</i> Tukey test
Cysteic Acid	11,85±0,21	7,16±0,18	0,000
Aspartic Acid	251,75±3,83	329,61±4,54	0,000
Threonine	53,21±0,88	57,17±0,98*	0,206
Serine	61,56±1,01	71,51±0,95	0,001
Glutamic Acid + Glu	367,50±3,52	340,78±1,96	0,008
Proline	13,48±0,18	7,23±0,18	0,000
Glycine	62,51±0,95	69,34±0,97	0,000
Alanine	202,49±1,92	162,32±1,95	0,000
Valine	22,51±0,56	30,79±0,55	0,000
Cysteine	1,42±0,04	4,41±0,07	0,000
Methionine	9,15±0,04	8,96±0,03*	0,963
Isoleucine	10,34±0,17	19,57±0,51	0,000
Leucine	34,37±0,87	52,65±0,96	0,000
Tyrosine	12,14±0,11	13,16±0,05*	0,108
Phenylalanine	16,13±0,19	15,96±0,18*	0,998
GABA	4,12±0,02	2,11±0,02	0,000
Ornithine	14,03±0,19	14,52±0,18*	0,503
Lysine	31,57±0,87	31,53±0,64*	0,999
Histidine	6,15±0,17	1,62±0,04	0,000
Arginine	3,05±0,06	4,53±0,10	0,000
Фонд АК	1189,33±15,49	1244,92±14,58*	0,119
НАК	186,48±1,86	222,78±2,33	0,000
ЗАК	972,85±5,56	998,36±6,58*	0,302
АКРУЦ	67,22±1,29	103,01±1,51	0,000
АРАК	28,27±0,26	29,12±0,20*	0,760
ССАК	22,42±0,23	20,53±0,19*	0,173
НАК/ЗАК	0,19	0,22	
ИФ	2,38	3,54	

Примечание: \* – статистически значимые различия между группами отсутствуют (Tukey HSD test,  $p > 0,05$ )

Показано, что при равных условиях содержания и кормления, аминокислотный спектр тканей *H. medicinalis* и *H. verbana*, выращенных на биофабрике «СибМедПиявка» (Алтайский край), имеет, как сходства, так и существенные количественные различия (табл. 5.2.1).

Из таблицы видно, что в тканях медицинских пиявок обоих видов не имеют значимых различий, как суммарный фонд АК, так и концентрации треонина, метионина, тирозина, фенилаланина, орнитина и лизина ( $p > 0,05$ ). Вместе с тем у особей *H. verbana* наблюдается тенденция к повышенному уровню аминокислотного обмена, в основном за счет значимо высоких тканевых концентраций аспарагиновой кислоты, серина, глицина, валина, цистеина, изолейцина, лейцина, тирозина и аргинина ( $p < 0,001$ ) (табл. 5.2.1). Лечебная пиявка *H. medicinalis* отличается от особей аптечной *H. verbana* более высоким содержанием в тканях цистеиновой кислоты, глутамата, пролина, аланина,  $\gamma$ -аминомасляной кислоты и гистидина ( $p < 0,001$ ).

Значимые различия между аминокислотными спектрами двух видов медицинских пиявок, выращенных в условиях одной биофабрики, выявлены для пула незаменимых АК (НАК) и аминокислот с разветвленной углеродной цепью (АКРУЦ): в тканях *H. verbana* содержание этих метаболических групп значимо выше, чем у *H. medicinalis* ( $p < 0,001$ ) (табл. 5.2.1). Вместе с тем, суммарные фонды заменимых (ЗАК), ароматических (АРАК) и серосодержащих (ССАК) аминокислот в тканях МП не показали межвидовых различий ( $p > 0,05$ ).

Методом главных компонент визуализирована ярко выраженная видовая специфика аминокислотного спектра тканей лечебных и аптечных пиявок из гирудокультуры одной биофабрики (рис. 5.2.1, табл. 5.2.2).

На рисунке показана существенная пространственная удаленность особей медицинских пиявок *H. medicinalis* и *H. verbana* по первой главной компоненте (PC1), на которую приходится 67,44% общей дисперсии данных. Наиболее весомый вклад (более 6,31%) в межвидовые различия вносят АК, корреляция которых с PC1 достигает очень высокой степени связи ( $\pm 0,90$ ;  $p < 0,001$ ): цистеиновая кислота, аспарагиновая кислота, пролин, аланин, валин, цистеин, изолейцин, лейцин,

$\gamma$ -аминомасляная кислота, гистидин и аргинин. Со второй компонентой (PC2), на которую приходится 9,02% общей дисперсии, наиболее сильно коррелируют АК, для которых не было выявлено межвидовых различий: треонин, фенилаланин, орнитин, лизин. Суммарный вклад данных АК в PC2 составил 89,35% (табл. 5.2.2).

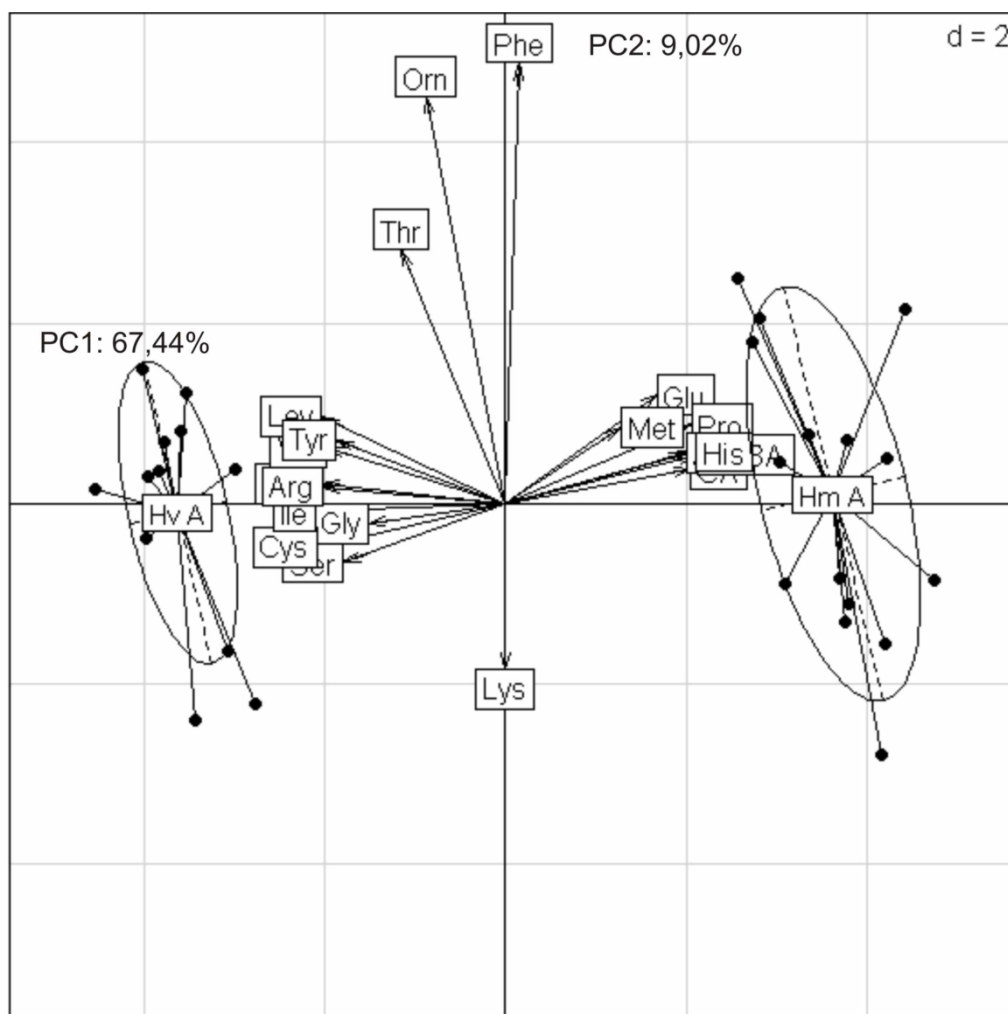


Рисунок 5.2.1 – Свободные аминокислоты (lg мкмоль/100г) тканей медицинских пиявок *H. verbana* (Hv) и *H. medicinalis* (Hm) из гирудокультуры биофабрики «СибМедПиявка» (Алтайский край) в пространстве главных компонент

Таблица 5.2.2 – Результаты компонентного анализа содержания свободных аминокислот (АК, Iг мкмоль/100г) в тканях двух видов медицинских пиявок

АК, Iг мкмоль/100г (i = 20)	Нагрузки (loadings, a <sub>ij</sub> )		Вклад в главную компоненту (Contribution = (a <sup>2</sup> <sub>ij</sub> *100)/λ <sub>j</sub> , %)	
	Главные компоненты (Principal Components – PC), j = 1, 2			
	1	2	1	2
Cysteic Acid	0,96***	0,06	6,77	0,23
Aspartic Acid	-0,95***	0,04	6,66	0,08
Threonine	-0,54**	0,48**	2,17	12,77
Serine	-0,83***	-0,11	5,17	0,70
Glu+ Gln	0,78***	0,20	4,51	2,32
Proline	0,96***	0,15	6,84	1,23
Glycine	-0,71***	-0,04	3,74	0,08
Alanine	0,93***	0,10	6,47	0,51
Valine	-0,92***	0,11	6,32	0,63
Cystine	-0,97***	-0,08	7,04	0,38
Methionine	0,60**	0,14	2,63	1,14
Isoleucine	-0,98***	-0,02	7,08	0,01
Leucine	-0,95***	0,16	6,68	1,49
Tyrosine	-0,88***	0,12	5,69	0,80
Phenylalanine	0,07	0,83***	0,03	38,36
GABA	0,99***	0,09	7,21	0,47
Ornithine	-0,41*	0,77***	1,23	32,73
Lysine	-0,00	-0,37*	0,00	5,49
Histidine	0,98***	0,10	7,14	0,52
Arginine	-0,95***	0,03	6,63	0,05
	Собственные значения (eigenvalues, λ <sub>j</sub> ) PC		Дисперсия, объясненная PC (%)	
	13,49	1,80	67,44	9,02

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

Необходимо особо подчеркнуть, что особи *H. medicinalis* и *H. verban*, выращенные в едином режиме питания и содержания (биофабрика «СибМедПиявка», Алтайский край) сохраняют видовую специфику аминокислотного состава тканей,

выявленную нами у лечебных и аптечных пиявок из природных популяций при совместном обитании (оз. Горелое) (Глава 3).

При изучении аминокислотного состава тканей особей лечебной пиявки *H. medicinalis*, выращенных на биофабриках различных регионов России, было установлено, что суммарные концентрации свободных АК саратовских пиявок, несколько выше таковых алтайских особей этого же вида, но не значимо ( $p = 0,214$ ) (табл. 5.2.3). Ткани обеих групп лечебных пиявок не показали значимых различий по содержанию шести аминокислот – аспарагиновой кислоты, треонина, пролина, глицина, валина и  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, а также метаболических групп АК – АКРУЦ, АРАК, ССАК ( $p > 0,05$ ).

Между концентрациями остальных свободных АК выявлены значимые региональные различия: у особей *H. medicinalis*, выращенных на биофабрике «ГируДИ.Н.» (Саратовская обл.), в сравнении с пиявками, приобретенными на производстве «СибМедПиявка» (Алтайский край), повышены тканевые концентрации цистеиновой кислоты, глутаминовой кислоты и глутамина, аланина, цистеина, лейцина, тирозина, орнитина, гистидина, аргинина фонда ЗАК и понижены – серина, метионина, изолейцина, фенилаланина, лизина, пула НАК ( $p < 0,05$ ) (табл. 5.2.3). Поскольку в тканях саратовских особей *H. medicinalis* ранее авторами были выявлены значимо высокие концентрации Zn, Mn, Ni, Cd и Pb (Черная и др., 2019а), высокое содержание свободных аминокислот, обладающих детоксицирующими свойствами (цистеиновая кислота, цистеин, гистидин и аргинин), ожидаемо и закономерно.

В тканях особей аптечной пиявки *H. verbana*, имеющих общее происхождение (Краснодарский край), но выращенных на разных биофабриках, суммарные концентрации свободных АК в тканях располагаются в региональном ряду: Краснодарский край < Алтайский край  $\leq$  Московская область (табл. 5.2.4).

У пиявок *H. verbana* не выявлено значимых региональных различий по уровню содержания в их тканях серина, лейцина, фенилаланина, лизина, гистидина, аргинина и суммарного фонда АКРУЦ ( $p > 0,05$ ).

Таблица 5.2.3 – Региональные особенности аминокислотного спектра тканей лечебной пиявки *H. medicinalis* в гирудокультуре

АК, мкмоль/100г	1. Саратовская область n = 15	2. Алтайский край n = 15
Cysteic Acid	16,57±1,12	11,85±0,21
Aspartic Acid	261,48±2,01 <sup>2,5</sup>	251,75±3,83 <sup>1</sup>
Threonine	57,53±0,55 <sup>2,3,4</sup>	53,21±0,88 <sup>1,3,4</sup>
Serine	54,64±1,54	61,56±1,01
Glutamic Acid + Gln	390,71±2,21	367,50±3,52
Proline	14,29±0,36 <sup>2</sup>	13,48±0,18 <sup>1</sup>
Glycine	65,95±0,78 <sup>2,3</sup>	62,51±0,95 <sup>1</sup>
Alanine	218,35±3,55	202,49±1,92
Valine	20,56±0,58 <sup>2</sup>	22,51±0,56 <sup>1</sup>
Cysteine	2,14±0,08	1,42±0,04
Methionine	4,35±0,11	9,15±0,04 <sup>3</sup>
Isoleucine	5,73±0,15	10,34±0,17
Leucine	36,96±0,53	34,37±0,87
Tyrosine	14,13±0,35 <sup>3,5</sup>	12,14±0,11 <sup>3</sup>
Phenylalanine	13,80±0,25	16,13±0,19 <sup>3,4,5</sup>
GABA	4,21±0,11 <sup>2</sup>	4,12±0,02 <sup>1</sup>
Ornithine	15,85±0,17	14,03±0,19 <sup>3</sup>
Lysine	26,68±0,50	31,57±0,87 <sup>3,4,5</sup>
Histidine	8,87±0,48	6,15±0,17
Arginine	4,58±0,15 <sup>3,5</sup>	3,05±0,06
Фонд АК	1237,38±8,56 <sup>2,3,4</sup>	1189,33±15,49 <sup>1,3,5</sup>
НАК	179,05±1,69	186,48±1,86
ЗАК	1021,69±4,22 <sup>3,4</sup>	972,85±5,56 <sup>3,4</sup>
АКРУЦ	63,26±1,04 <sup>2</sup>	67,22±1,29 <sup>1</sup>
АРАК	27,93±0,38 <sup>2,3</sup>	28,27±0,26 <sup>1,3,5</sup>
ССАК	23,06±1,15 <sup>2,3</sup>	22,42±0,23 <sup>1,3</sup>
НАК/ЗАК	0,18	0,19
ИФ	2,26	2,38

Примечание: надстрочными цифрами обозначены группы, между которыми отсутствуют значимые различия (Tukey HSD test,  $p > 0,05$ ) (см. табл. 5.2.4)



Таблица 5.2.4 – Региональные особенности аминокислотного спектра тканей ап-течной пиявки *H. verbana* в гирудокультуре

АК, мкмоль/100г	3. Алтайский край n = 15	4. Московская область n = 15	5. Краснодарский край n = 15
Cysteic Acid	7,16±0,18	5,59±0,18 <sup>5</sup>	5,49±0,22 <sup>4</sup>
Aspartic Acid	329,61±4,54 <sup>4</sup>	333,66±9,89 <sup>3</sup>	278,36±3,48 <sup>1</sup>
Threonine	57,17±0,98 <sup>1,2,4</sup>	54,68±2,48 <sup>1,2,3</sup>	46,77±0,42
Serine	71,51±0,95 <sup>4,5</sup>	77,57±3,26 <sup>3</sup>	69,29±0,88 <sup>3</sup>
Glu+ Gln	340,78±1,96 <sup>4</sup>	333,75±9,93 <sup>3</sup>	310,54±3,63
Proline	7,23±0,18	10,50±0,68	19,68±1,47
Glycine	69,34±0,97 <sup>1</sup>	81,03±1,36	86,31±0,94
Alanine	162,32±1,95 <sup>4</sup>	154,49±3,83 <sup>3,5</sup>	148,48±1,95 <sup>4</sup>
Valine	30,79±0,55 <sup>5</sup>	35,20±1,57 <sup>5</sup>	31,73±0,25 <sup>3,4</sup>
Cysteine	4,41±0,07 <sup>4</sup>	4,34±0,13 <sup>3</sup>	3,73±0,12
Methionine	8,96±0,03 <sup>2</sup>	6,33±0,12	7,39±0,30
Isoleucine	19,57±0,51	15,40±0,20	14,17±0,25
Leucine	52,65±0,96 <sup>4,5</sup>	52,48±1,05 <sup>3,5</sup>	50,45±0,50 <sup>3,4</sup>
Tyrosine	13,16±0,05 <sup>1,2,5</sup>	16,19±0,66	13,34±0,24 <sup>1,3</sup>
Phenylalanine	15,96±0,18 <sup>2,4,5</sup>	15,32±0,56 <sup>2,3</sup>	16,84±0,42 <sup>2,3</sup>
GABA	2,11±0,02 <sup>5</sup>	1,84±0,08	2,21±0,05 <sup>3</sup>
Ornithine	14,52±0,18 <sup>2</sup>	20,84±0,30	18,99±0,40
Lysine	31,53±0,64 <sup>2,4,5</sup>	32,29±0,75 <sup>2,3,5</sup>	30,78±0,18 <sup>2,3,4</sup>
Histidine	1,62±0,04 <sup>4,5</sup>	1,64±0,17 <sup>3,5</sup>	1,32±0,03 <sup>3,4</sup>
Arginine	4,53±0,10 <sup>1,4,5</sup>	4,00±0,22 <sup>3</sup>	4,64±0,18 <sup>1,3</sup>
Фонд АК	1244,92±14,58 <sup>1,2,4</sup>	1257,11±29,08 <sup>1,3</sup>	1160,48±4,01 <sup>2</sup>
НАК	222,78±2,33 <sup>4</sup>	217,33±4,07 <sup>3</sup>	204,08±1,28
ЗАК	998,36±6,58 <sup>1,2,4</sup>	1011,53±18,05 <sup>1,2,3</sup>	929,72±4,82
АКРУЦ	103,01±1,51 <sup>4,5</sup>	103,07±2,35 <sup>3,5</sup>	96,34±0,67 <sup>3,4</sup>
АРАК	29,12±0,20 <sup>1,2,5</sup>	31,52±0,98 <sup>5</sup>	30,18±0,53 <sup>2,3,4</sup>
ССАК	20,53±0,19 <sup>1,2</sup>	16,26±0,34 <sup>5</sup>	16,61±0,40 <sup>4</sup>
НАК/ЗАК	0,22	0,21	0,22
ИФ	3,54	3,27	3,19

Примечание: надстрочными цифрами обозначены группы, между которыми отсутствуют значимые различия (Tukey HSD test,  $p > 0,05$ ) (см. табл. 5.2.3)

Для концентраций остальных АК выявлена региональная изменчивость. Наибольшие различия характерны для тканевых концентраций пролина, глицина, метионина, изолейцина, орнитина ( $p < 0,001$ ).

Максимальные концентрации пролина, глицина, отмечены в гомогенатах тканей *H. verbana*, выращенных в Краснодарском крае. Медицинские пиявки московской биофабрики отличаются повышенным содержанием тирозина и орнитина, а алтайской биофабрики – цистеиновой кислоты, метионина и изолейцина ( $p < 0,001$ ) (табл. 5.2.4).

Обобщая экспериментальные данные, представленные в таблицах 5.2.3 и 5.2.4, можно заключить, что, несмотря на региональную вариабельность концентраций свободных АК в тканях лечебных и аптечных пиявок, видовая специфика их аминокислотных спектров очевидна. Так особи *H. verbana* отличаются от *H. medicinalis* более высокими тканевыми концентрациями серина, валина, цистеина, изолейцина, лейцина, но пониженными – цистеиновой кислоты, глутаминовой кислоты и глутамина, аланина,  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, гистидина ( $p < 0,001$ ).

В тканях медицинских пиявок, независимо от региона гирудокультуры, выявлены видовые особенности содержания основных метаболических групп АК. Так, аптечная пиявка *H. verbana* содержит, в сравнении с лечебной *H. medicinalis*, более высокие концентрации пулов АК: незаменимых (НАК), с разветвленной углеродной цепью (АКРУЦ – валин, лейцин, изолейцин), но пониженные – серосодержащих (ССАК – цистеиновая кислота, цистеин, метионин). Для ароматических аминокислот (АРАК – тирозин, фенилаланин) характерна региональная специфика (табл. 5.2.3 и 5.2.4).

Обсуждаемые выше результаты визуализированы с помощью многофакторного анализа главных компонент (рис. 5.2.2 и 5.2.3; табл. 5.2.5 и 5.2.6). На рисунке 5.2.2 показана четкая дифференциация исследуемых региональных и таксономических групп медицинских пиявок. По первой главной компоненте (PC1), на которую приходится 51,13% общей дисперсии данных, отражена видовая специфика аминокислотного спектра тканей особей *H. medicinalis* и *H. verbana*. Наибольший вклад в межвидовые различия по PC1 вносят цистеиновая кислота, аланин, валин,

цистеин, изолейцин, лейцин,  $\gamma$ -аминомасляная кислота, гистидин (рис. 5.2.2, табл. 5.2.5).

Вторая главная компонента (PC2), на которую приходится 13,54% общей дисперсии данных, пространственно разделяет оба вида МП из гирудокультуры биофабрики Алтайского края от остальных региональных групп пиявок, согласно особенностям аминокислотного состава их тканей (рис. 5.2.2, табл. 5.2.5).

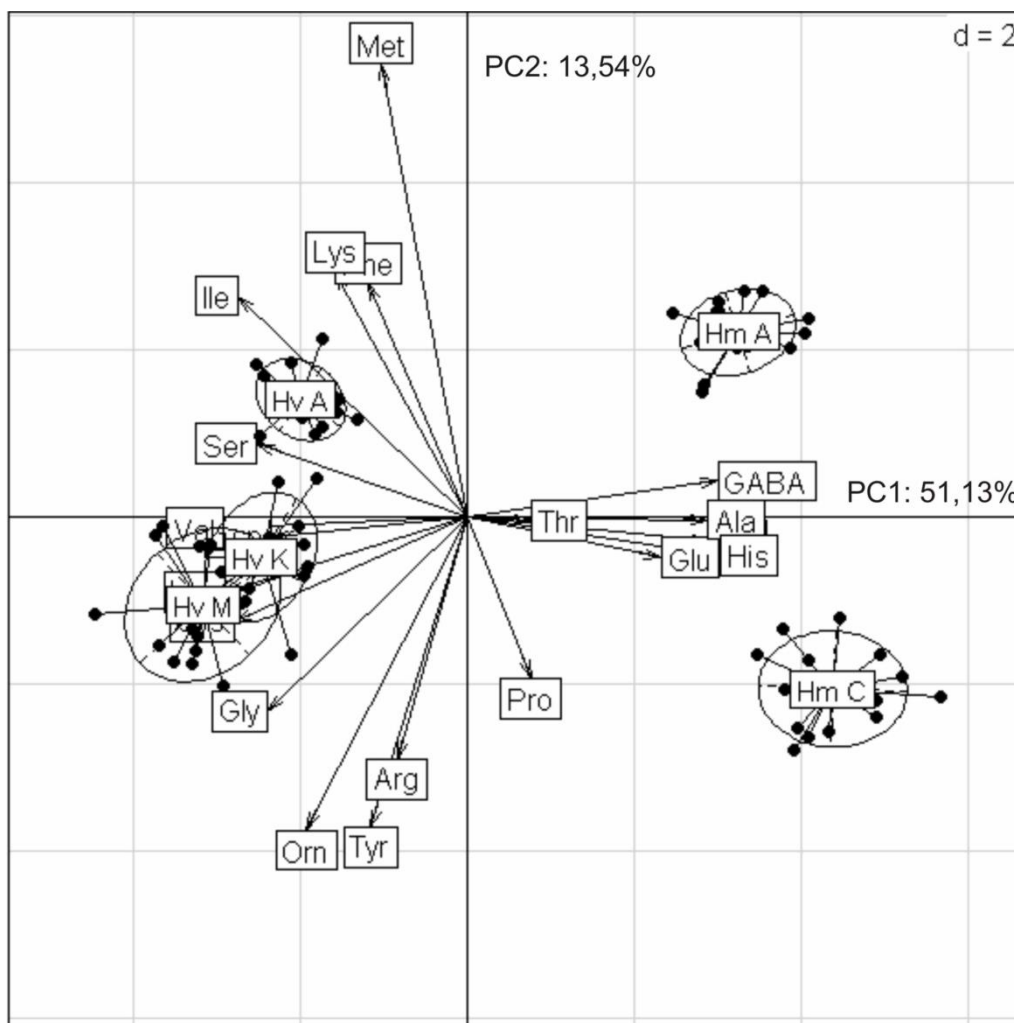


Рисунок 5.2.2 – Свободные аминокислоты (lg мкмоль/100г) тканей медицинских пиявок *H. verbana* (Hv) и *H. medicinalis* (Hm) из гирудокультуры биофабрик различных регионов России в пространстве главных компонент. Условные обозначения: А – Алтайский край, К – Краснодарский край, М – Московская область, С – Саратовская область

Таблица 5.2.5 – Результаты компонентного анализа свободных аминокислот (АК,  $1\mu\text{г мкмоль}/100\text{г}$ ) в тканях двух видов медицинских пиявок из гирудокультуры различных регионов России

АК, $1\mu\text{г мкмоль}/100\text{г}$ ( $i = 20$ )	Нагрузки (loadings, $a_{ij}$ )			Вклад в главную компоненту (Contribution = $(a_{ij}^2 \cdot 100)/\lambda_j$ , %)		
	Главные компоненты (Principal Components – PC), $j = 1, 2, 3$					
	1	2	3	1	2	3
Cysteic Acid	0,92***	-0,05	-0,17	8,25	0,08	1,32
Aspartic Acid	-0,74***	-0,04	-0,48***	5,39	0,06	10,38
Threonine	0,25*	-0,01	-0,77***	0,60	0,00	26,38
Serine	-0,76***	0,14	-0,20	6,20	0,74	1,75
Glu+ Gln	0,74***	-0,08	-0,45***	5,32	0,23	9,01
Proline	0,24*	-0,32**	0,82***	0,58	3,67	29,88
Glycine	-0,76***	-0,38***	0,31**	5,62	5,33	4,22
Alanine	0,91***	-0,01	-0,21	8,12	0,00	1,99
Valine	-0,92***	-0,02	-0,09	8,32	0,02	0,33
Cystine	-0,88***	-0,20	-0,19	7,62	1,55	1,65
Methionine	-0,32**	0,88***	0,08	1,03	28,80	0,31
Isoleucine	-0,87***	0,43***	-0,12	7,36	6,82	0,68
Leucine	-0,92***	-0,15	-0,16	8,26	0,79	1,11
Tyrosine	-0,36**	-0,61***	-0,38***	1,30	13,54	6,42
Phenylalanine	-0,37**	0,45***	0,22	1,37	7,63	2,12
GABA	0,95***	0,07	0,09	8,84	0,18	0,34
Ornithine	-0,61***	-0,61***	0,17	3,64	13,75	1,23
Lysine	-0,50***	0,47***	0,10	2,45	8,33	0,49
Histidine	0,96***	-0,07	-0,05	9,05	0,20	0,10
Arginine	-0,26*	-0,47***	0,08	0,68	8,28	0,30
	Собственные значения (eigenvalues, $\lambda_j$ ) PC			Дисперсия, объясненная PC (%)		
	10,23	2,71	2,23	51,13	13,54	11,13

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

Наибольший вклад в PC2 (более 8,27%) вносят метионин, максимальные концентрации которого характерны для алтайский пиявок, а также аминокислоты, для которых была отмечена невысокая видовая и региональная вариабельность ( $F_{4,70} < 23,82$ ;  $p < 0,001$ ) – тирозин, орнитин, лизин, аргинин (рис. 5.2.2, табл. 5.2.3-5.2.4).

На третью главную компоненту (PC3) приходится 11,13% общей дисперсии данных, основной вклад в которую вносят аспарагиновая кислота, треонин, глутаминовая кислота и глутамин, пролин, тирозин – аминокислоты, максимальное содержание которых отмечено в тканях пиявок отдельных региональных групп медицинских пиявок (табл. 5.2.3-5.2.4).

Видовые различия аптечных и лечебных пиявок по уровню содержания в тканях основных метаболических групп АК наглядно представлены на рисунке 5.2.3. Из рисунка видно, что все экспериментальные данные по уровню содержания свободных АК в тканях медицинских пиявок сгруппированы согласно их видовой принадлежности.

С первой главной компонентой (PC1), на которую приходится 48,47% общей дисперсии данных, наиболее сильно коррелируют метаболические группы НАК и АКРУЦ, повышенное содержание которых отмечено у особей аптечных пиявок всех региональных групп, а также ароматические АК, максимальные концентрации которых характерны для тканей особей *H. verbana* из гирудокультуры Московской области (рис. 5.2.3, табл. 5.2.3 и 5.2.4).

Весомый вклад во вторую главную компоненту (PC2), на которую приходится 31,18% общей дисперсии данных, вносят суммарный фонд АК и пул заменимых АК, для которых характерна невысокая видовая и региональная изменчивость, а также пул серосодержащих АК, повышенное содержание которого в тканях отличает лечебную пиявку *H. medicinalis* от аптечной *H. verbana* (рис. 5.2.3, табл. 5.2.6).

Проведенные исследования внутривидовой изменчивости уровня содержания свободных АК в тканях медицинских пиявок, выращенных на различных фабриках России, показали, что, специфика условий разведения и экологические осо-

бенности изучаемых регионов в значительной мере влияют на аминокислотный состав тканей *H. medicinalis* и *H. verbana*. Вместе с тем методом главных компонент было установлено, что независимо от региона разведения, в тканях лечебных и аптечных пиявок четко выражена видовая специфика аминокислотного спектров.

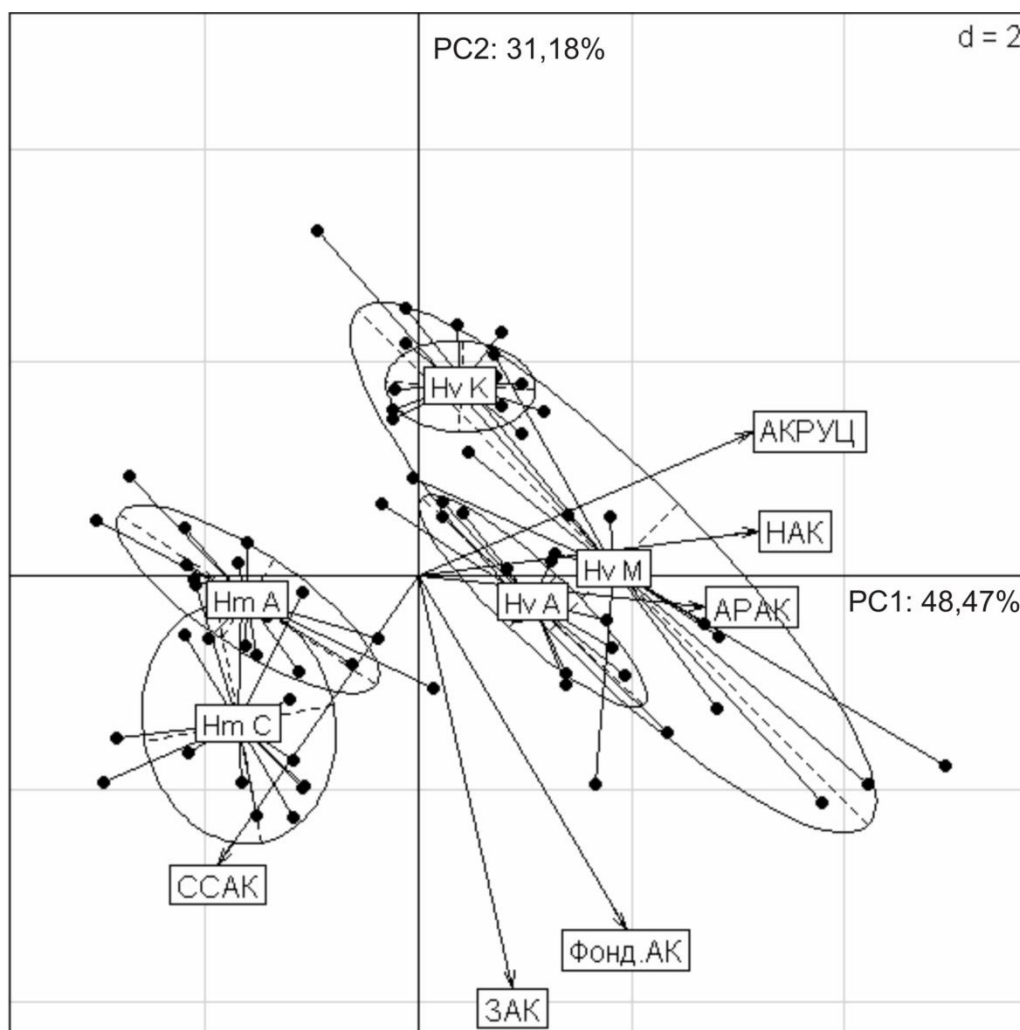


Рисунок 5.2.3 – Метаболические группы АК (1г мкмоль/100г) в тканях медицинских пиявок *H. verbana* (Hv) и *H. medicinalis* (Hm) из гирудокультуры биофабрик различных регионов России в пространстве главных компонент. Условные обозначения: А – Алтайский край, К – Краснодарский край, М – Московская область, С – Саратовская область

Таблица 5.2.6 – Результаты компонентного анализа суммарного фонда и метаболических групп аминокислот (АК, 1g мкмоль/100г) в тканях двух видов медицинских пиявок из гирудокультуры различных регионов России

АК, 1g мкмоль/100г ( $i = 6$ )	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
Фонд АК	0,56***	-0,76***	10,65	31,22
НАК	0,92***	0,10	28,85	0,49
ЗАК	0,25*	-0,89***	2,20	42,18
АКРУЦ	0,90***	0,31**	27,79	5,14
АРАК	0,77***	-0,07	20,47	0,25
ССАК	-0,54***	-0,62***	10,03	20,72
	Собственные значения (eigenvalues, $\lambda_j$ ) PC		Дисперсия, объясненная PC (%)	
	2,91	1,87	48,47	31,18

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

### 5.3. Исследование аминокислотного фонда секрета слюнных желез медицинских пиявок *H. verbana*, выращенных на биофабрике

В настоящее время все больший интерес вызывают природные средства оздоровления организма, характеризующиеся большой эффективностью и отсутствием побочных реакций при их использовании. В этом плане медицинские пиявки являются значимым биологическим ресурсом, используемым 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, иммуностимули-

рующего, бактериостатического, анальгезирующего эффектов гирудотерапии, и создали необходимые предпосылки к ее более широкому применению в медицинской практике.

Детальное изучение состава секрета слюнных желез (ССЖ) медицинских пиявок 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 аминокислотном статусе.

Учитывая первостепенное значение свободных аминокислот в процессах биосинтеза высокоактивных биологических соединений актуальность исследования их содержания в ССЖ медицинской пиявки несомненна.

В данной части главы будут изучены особенности формирования аминокислотного профиля секрета слюнных желез медицинской пиявки у взрослых особей аптечной пиявки *H. verbanda*, выращенных в искусственно созданных условиях на



предприятия ЗАО «Международный центр медицинской пиявки» (п. Удельная, Московская обл.). Период голодания пиявок составил пять месяцев.

Сравнительная оценка аминокислотного спектра тканей и слюнной жидкости медицинских пиявок *H. verbana* показала существенные различия в процентном содержании отдельных свободных АК и основных метаболических групп АК (рис. 5.3.1). Отмечено отсутствие в тканях пиявок таурина, цитруллина и триптофана, которые в ССЖ составили 1,42%, 0,07% и 0,45 %, соответственно (Ковальчук и др., 2011а).

Установлено, что основу пула заменимых АК в тканях *H. verbana*, который составляет 87,3 % от суммарного фонда, составляют глутаминовая кислота и глутамин, аспарагиновая кислота и аланин, а в ССЖ – глутаминовая кислота и глутамин, серин, глицин и аспарагиновая кислота (61,2%).

В гомогенатах тканей *H. verbana* содержится значимо больше аспарагиновой кислоты (в 5,7 раз), глутамата (в 1,1), аланина (в 1,8), но меньше серина (в 3,1), глицина (в 1,4), цистеина (в 1,2), тирозина (в 1,3) ( $p < 0,05$ ) (рис. 5.3.1).

Процентное содержание пула незаменимых АК в ССЖ (32,6%) медицинских пиявок в 3,3 выше, чем в их тканях (9,9%) ( $p < 0,001$ ). Наибольший вклад в формирование пула НАК тканей *H. verbana* вносят треонин, валин, метионин, лейцин, фенилаланин (рис. 5.3.1). Основу фонда НАК в секрете слюнных желез *H. verbana* составляют, треонин, валин, лейцин, лизин, при этом процентное содержание всех незаменимых АК слюны превышает их доли в тканях. Наибольшие различия отмечены для гистидина (в 30 раз), лизина (в 8), треонина (в 4,3), лейцина (в 3,9) и валина (в 3,7) ( $p < 0,001$ ) (рис. 5.3.1).

Показано, что формирование аминокислотного фонда секрета слюнных желез медицинских пиявок направлено на более высокое процентное содержание, в сравнении с гомогенатами тканей, основных метаболических групп аминокислот – незаменимых (НАК), с разветвленной углеродной цепью (АКРУЦ), ароматических (АРАК), серосодержащих (ССАК) (рис. 5.3.2).

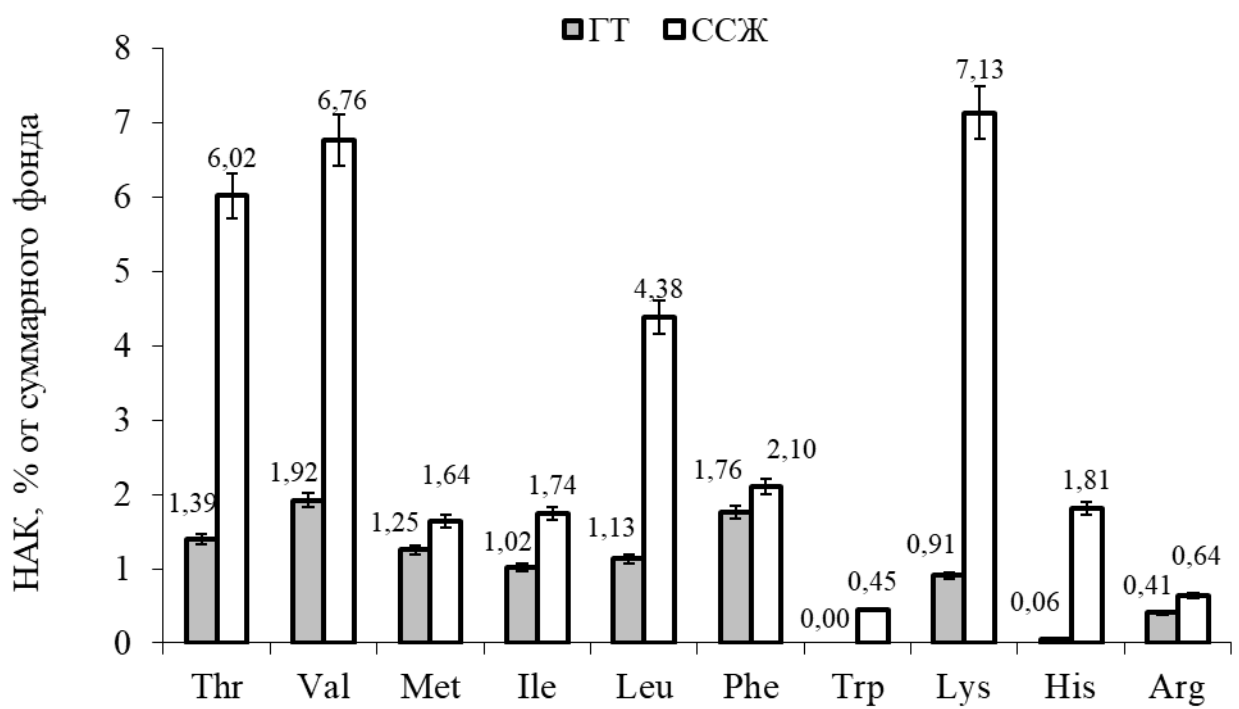
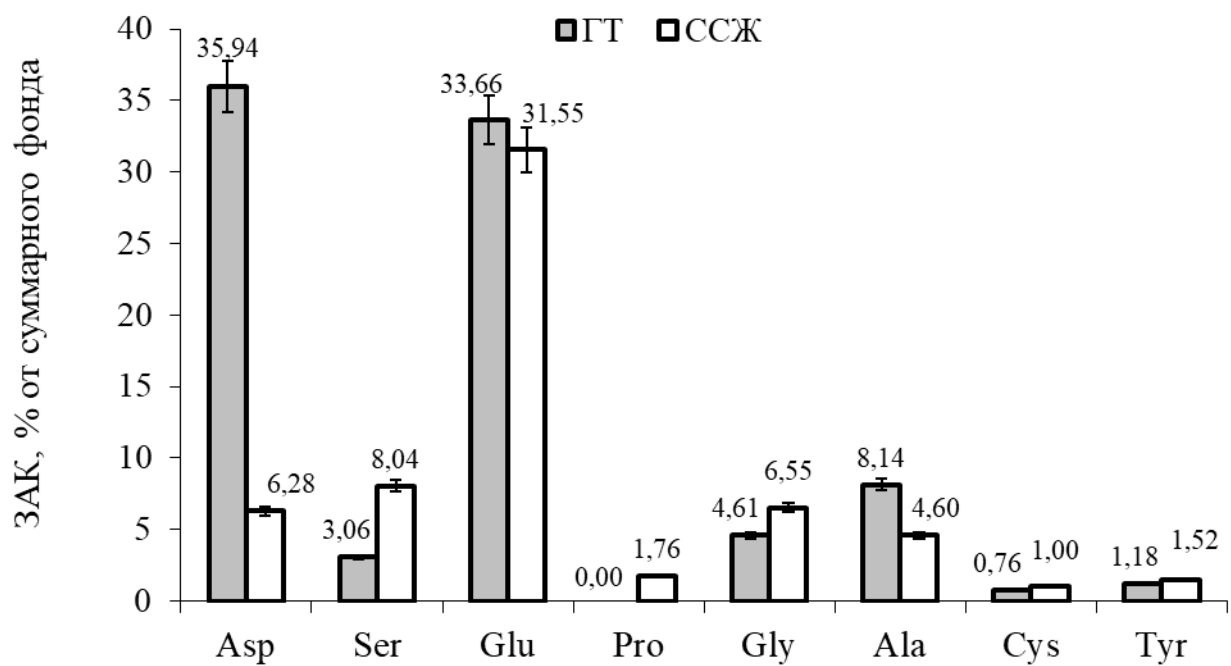


Рисунок 5.3.1 – Содержание заменимых (ЗАК), незаменимых (НАК) аминокислот (% от суммарного фонда) в гомогенатах тканей (ГТ) и в секрете слюнных желез (ССЖ) аптечной пиявки *H. verbana* из гирудокультуры

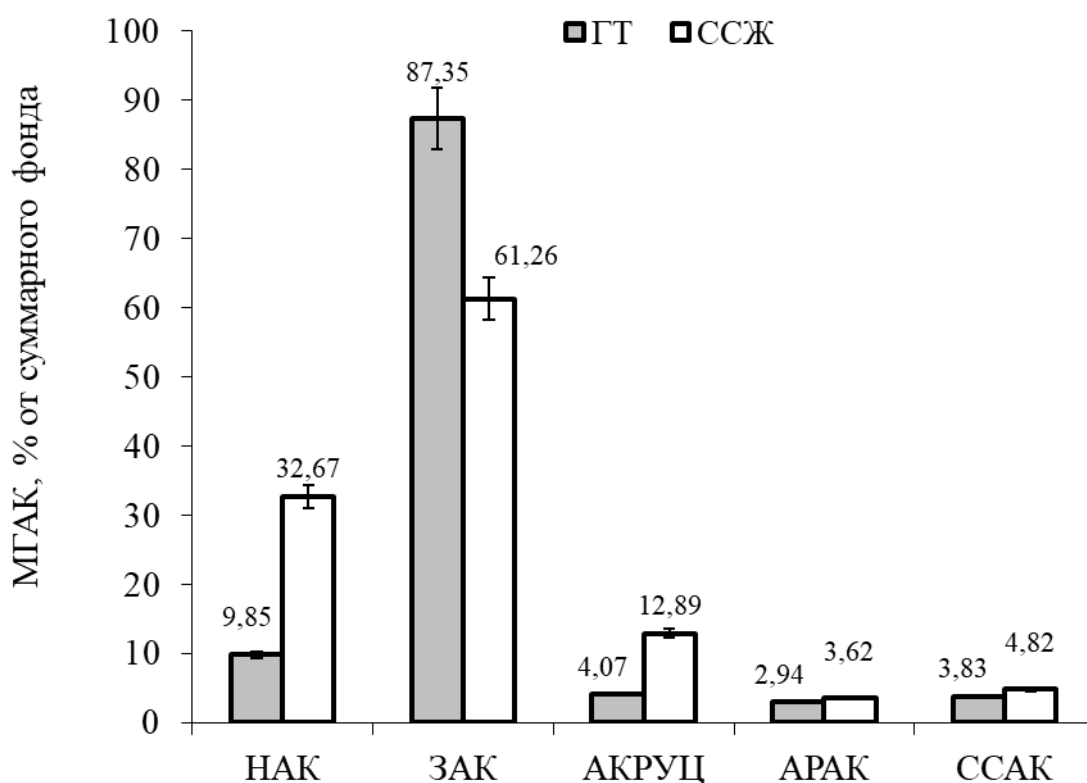


Рисунок 5.3.2 – Содержание метаболитических групп аминокислот (МГАК, % от суммарного фонда) в гомогенатах тканей (ГТ) и в секрете слюнных желез (ССЖ) аптечной пиявки *H. verbana* из гирудокультуры

#### 5.4. Сравнительный анализ содержания свободных аминокислот в тканях медицинских пиявок из природных популяций и гирудокультуры

Искусственно созданные условия для роста и развития медицинских пиявок на биофабриках, на наш взгляд, 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 ме-

дицинские 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 аминокислотного спектра тканей особей из природных популяций и гирудокультуры.

Проведенные исследования (Главы 3 и 4) показали, что уровень содержания свободных АК 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 аминокислотного спектра тканей медицинских пиявок различных эколого-физиологических групп использовали взрослых особей аптечной пиявки *H. verbana*, 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.

При оценке аминокислотного пула тканей аптечной пиявки *H. verbana* из природных популяций и гирудокультуры (Краснодарский край) обнаружены значимые различия ( $p < 0,05$ ) (табл. 5.4.1).

Таблица 5.4.1 – Аминокислотный состав (мкмоль/100г) тканей аптечной пиявки *H. verbana* из природных популяций и гирудокультуры

АК, мкмоль/100г	Природные популяции	Гирудокультура	<i>p</i>
Cysteic Acid	6,32±0,20	5,49±0,22	0,003
Aspartic Acid	235,29±2,34	278,36±3,48	0,000
Threonine	24,74±0,71	46,77±0,42	0,000
Serine	41,65±1,15	69,29±0,88	0,000
Glutamic Acid + Glu	201,63±3,74	310,54±3,63	0,000
Proline	2,42±0,06	19,68±1,47	0,000
Glycine	41,37±1,13	86,31±0,94	0,000
Alanine	166,33±3,53	148,48±1,95	0,000
Valine	7,16±0,32	31,73±0,25	0,000
Cysteine	1,20±0,03	3,73±0,12	0,000
Methionine	2,58±0,04	7,39±0,30	0,000
Isoleucine	5,29±0,27	14,17±0,25	0,000
Leucine	32,63±1,52	50,45±0,50	0,000
Tyrosine	6,10±0,24	13,34±0,24	0,000
Phenylalanine	6,57±0,31	16,84±0,42	0,000
GABA	следы	2,21±0,05	0,000
Ornithine	10,81±0,37	18,99±0,40	0,000
Lysine	13,54±0,53	30,78±0,18	0,000
Histidine	0,49±0,01	1,32±0,03	0,000
Arginine	2,42±0,03	4,64±0,18	0,000
Фонд АК	808,58±6,40	1160,48±4,01	0,000
ЗАК	695,99±6,69	929,72±4,82	0,000
НАК	95,42±2,33	204,08±1,28	0,000
НАК/ЗАК	0,14	0,22	
АКРУЦ	45,08±1,93	96,34±0,67	0,000
АРАК	12,67±0,50	30,18±0,53	0,000
ИФ	3,56	3,19	
ССАК	10,10±0,19	16,61±0,40	0,000

В тканях пиявок, выращенных на биофабрике, суммарное содержание свободных аминокислот значительно превышает величину фонда АК у особей из природных популяций ( $p < 0,001$ ) (Черная, Ковальчук, 2007б).

Вместе с тем, для тканей природных особей характерны более высокие концентрации цистеиновой кислоты и аланина ( $p < 0,01$ ).

При изучении процентного содержания свободных АК обнаружено, что ткани особей *H. verbana* обеих групп содержат в сопоставимых количествах лейцин, орнитин, аргинин и пул серосодержащих АК ( $p > 0,05$ ) (табл. 5.4.2).

Показано, что 63,6% от общего количества АК у медицинских пиявок, выращенных на биофабрике, приходится на аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту и глутамин, аланин. Суммарное процентное содержание этих важнейших АК в тканях пиявок из природных популяций составляет 74,6%.

Обнаружено, что ткани *H. verbana* из гирудокультуры, в сравнении с природными особями, содержат больше пролина, участвующего в синтезе коллагена, в 5,6 раз ( $p < 0,001$ ), а незаменимой аминокислоты валина, используемого мышечной тканью в качестве источника энергии и обладающего иммуностимулирующими и детоксицирующими свойствами, в 3,1 раз ( $p < 0,001$ ), что актуально при интенсивном развитии и росте на биофабрике (табл. 5.4.2).

В то же время у пиявок природных популяций, в сравнении с выращенными особями, выявлено более высокое (в 1,6 раз) процентное содержание аланина ( $p < 0,001$ ) (табл. 5.4.2). Известно, что интенсивный синтез аланина в мышцах и выход его в циркуляцию наблюдается при мышечной деятельности (Готовский и др., 2002).

Поскольку медицинские пиявки при росте и развитии на биофабрике не испытывают нехватки в пищевых ресурсах, они большую часть времени находятся в состоянии покоя, в то время как в природных водных экосистемах МП вынуждены активно двигаться в поисках жертвы, что является, по-нашему мнению, одним из факторов, стимулирующих рост аланина в их тканях.

Таблица 5.4.2 – Аминокислотный спектр (% от фонда) тканей аптечной пиявки *H. verbana* из природных популяций и гирудокультуры

АК, % от фонда	Природные популяции	Гирудокультура	<i>p</i>
Cysteic Acid	0,78±0,03	0,47±0,02	0,046
Aspartic Acid	29,10±0,19	23,99±0,28	0,000
Threonine	3,06±0,10	4,03±0,04	0,000
Serine	5,15±0,13	5,97±0,08	0,002
Glutamic Acid +Glu	24,93±0,38	26,76±0,33	0,001
Proline	0,30±0,01	1,69±0,13	0,000
Glycine	5,12±0,16	7,44±0,09	0,000
Alanine	20,56±0,37	12,80±0,19	0,000
Valine	0,89±0,04	2,73±0,03	0,000
Cysteine	0,15±0,01	0,32±0,01	0,006
Methionine	0,32±0,02	0,64±0,03	0,010
Isoleucine	0,66±0,03	1,22±0,02	0,000
Leucine	4,03±0,18	4,35±0,05*	0,601
Tyrosine	0,75±0,03	1,15±0,02	0,003
Phenylalanine	0,81±0,04	1,45±0,04	0,001
GABA	следы	0,19±0,01	0,000
Ornithine	1,34±0,04	1,64±0,03*	0,145
Lysine	1,67±0,06	2,65±0,02	0,000
Histidine	0,06±0,01	0,11±0,01	0,029
Arginine	0,30±0,02	0,40±0,02*	0,547
ЗАК	86,07±0,32	80,13±0,46	0,000
НАК	11,81±0,29	17,59±0,14	0,000
АКРУЦ	5,58±0,24	8,30±0,07	0,000
АРАК	1,57±0,06	2,60±0,05	0,000
ССАК	1,25±0,03	1,43±0,04*	0,404

Примечание: \* – статистически значимые различия между группами отсутствуют, (Tukey HSD test,  $p > 0,05$ )

Поскольку наши исследования показали, что пиявки из гирудокультуры отличаются от особей из природных популяций повышенным содержанием в тканях Cu, Fe, Cd, Ni (Черная и др., 2019а), вероятно, высокие тканевые концентрации

глутамата, цистеина, метионина, изолейцина, лизина, гистидина, аргинина (аминокислоты, способные связывать ТМ в нетоксичные хелатные комплексы), обеспечивают выращенным особям *H. verbana* высокую резистентность к избыточному присутствию экотоксикантов, поступающих извне (Черная и др., 2006; Нохрина и др., 2008; Нохрина, 2010).

Сравнительная оценка аминокислотных спектров тканей пиявок-производителей *H. verbana* из природных популяций Краснодарского края и их потомков, выращенных на трех биофабриках различных регионов России, показала существенные различия, визуализированные методом главных компонент (рис. 5.4.1, табл. 5.4.3).

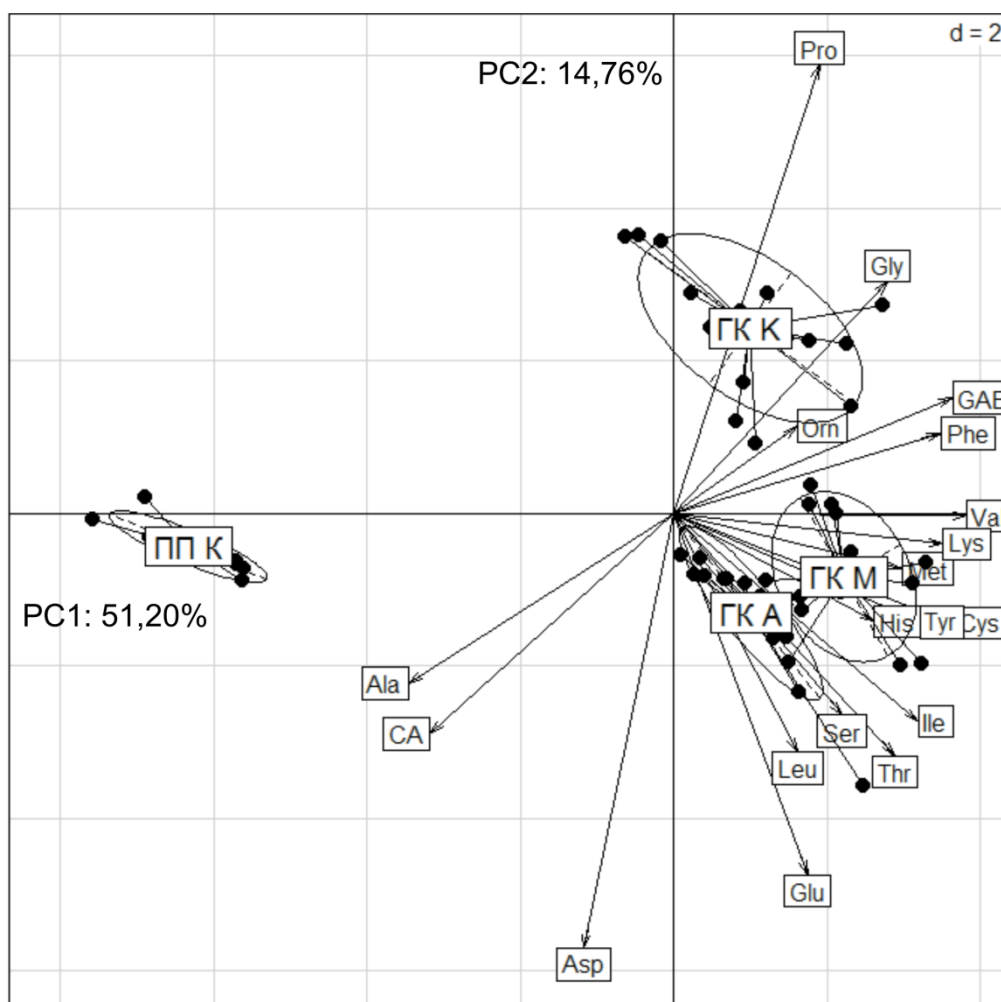


Рисунок 5.4.1 – Содержание свободных АК (lg мкмоль/100г) в тканях *H. verbana* из природных популяций (ПП) и гирудокультуры (ГК) различных регионов России в пространстве главных компонент. Условные обозначения: А – Алтайский край, К – Краснодарский край, М – Московская область



Таблица 5.4.3 – Результаты компонентного анализа содержания свободных аминокислот (АК, Iг мкмоль/100г) в тканях аптечной пиявки *H. verbana* из природных популяций и гирудокультуры различных регионов России

АК, Iг мкмоль/100г ( <i>i</i> = 20)	Нагрузки (loadings, $a_{ij}$ )		Вклад в главную компоненту (Contribution = $(a_{ij}^2 * 100) / \lambda_j$ , %)	
	Главные компоненты (Principal Components – PC), <i>j</i> = 1, 2			
	1	2	1	2
Cysteic Acid	0,79***	0,36**	6,30	4,63
Aspartic Acid	0,30*	0,76***	0,89	20,37
Threonine	-0,71***	0,43***	5,06	6,66
Serine	-0,53***	0,41**	2,80	5,90
Glu+ Gln	-0,43***	0,64***	1,84	14,33
Proline	-0,48***	-0,78***	2,35	21,33
Glycine	-0,69***	-0,36**	4,80	4,60
Alanine	0,86***	0,29*	7,47	2,91
Valine	-0,94***	0,03	8,96	0,03
Cystine	-0,90***	0,19	8,25	1,29
Methionine	-0,75***	0,06	5,61	0,14
Isoleucine	-0,79***	0,34**	6,34	4,11
Leucine	-0,40**	0,41**	1,64	6,04
Tyrosine	-0,79***	0,23	6,26	1,92
Phenylalanine	-0,87***	-0,14	7,58	0,65
GABA	-0,91***	-0,21	8,31	1,52
Ornithine	-0,39**	-0,10	1,56	0,32
Lysine	-0,88***	0,05	7,79	0,09
Histidine	-0,65***	0,19	4,23	1,28
Arginine	-0,44***	-0,23	1,95	1,88
	Собственные значения (eigenvalues, $\lambda_j$ ) PC		Дисперсия, объясненная PC (%)	
	9,73	2,80	51,20	14,76

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

На рисунке 5.4.1 показана четкая дифференциация по первой главной компоненте PC1, на которую приходится 51,20% общей дисперсии данных, особенностей производителей из природы *H. verbana* от трех, близко расположенных друг к другу, групп аптечных пиявок, выращенных в гирудокультуре региональных биофабрик России, согласно особенностям аминокислотного спектра тканей.

Стабильная трофическая обеспеченность медицинских пиявок на биофабрике обуславливает и высокое процентное содержание в их тканях, в сравнении с природными особями, пулов метаболитических групп АК: незаменимых, с разветвленной углеродной цепью, ароматических ( $p < 0,001$ ). Несмотря на экстремальный характер условий биофабрики, пиявки *H. verbana* сохраняют в тканях оптимальный аминокислотный баланс, о чем свидетельствуют высокие показатели критерия НАК/ЗАК и нормальные значения антитоксического индекса Фишера (ИФ) (табл. 5.4.1).

Достаточно значимым биотическим фактором, обеспечивающим высокий уровень обменных процессов в тканях пиявок, выращенных на биофабрике, может являться, по-нашему мнению, чрезмерно высокая плотность особей (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). Был изучен 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 достоверно различается по количественному соотношению аминокислот (Степанова, 1982).

Таким образом, специфика условий содержания обуславливает особенности метаболизма, при котором формируются животные разных физиологических осо-

бенностей, что подтверждают результаты нашего исследования. Медицинские пиявки, выращенные в искусственных условиях, являясь потомками первого поколения особей из природных популяций, отличаются по всем изучаемым эколого-физиологическим параметрам (Черная и др., 2006; Нохрина и др., 2008; Нохрина, 2010; Черная и др., 2019а).

Увеличение общего содержания свободных АК в тканях медицинских пиявок, выращенных на биофабрике, обусловлено активацией метаболических процессов, направленных на поддержание гомеостаза в условиях интенсивного питания, роста и развития, и, вкуче с повышенным уровнем основного и микроэлементного обменов, является, вероятно, одной из форм физиологической адаптации кровососущих гирудинид к экстремальным условиям искусственного разведения и содержания.

Особенный интерес представляет изучение аминокислотного пула слюнной жидкости медицинских пиявок в сравнительном аспекте – ССЖ особей из природных популяций и гирудокультуры.

Практическое значение этих исследований обусловлено, в первую очередь, проникновением на фармацевтический рынок значительного количества несертифицированных природных пиявок, использование которых в лечебных целях чревато серьезными осложнениями, поскольку в природных водоемах нет возможности определить, чьей кровью питалась пиявка – это может быть и крупный рогатый скот, зараженный лептоспирозом, и человек, страдающий гепатитом или СПИДом.

В то же время, поскольку факт применения пиявки из природных популяций в гирудопрактике имеет место, несомненно, существует необходимость изучения потенциального уровня содержания биологически активных соединений, в число которых входят свободные аминокислоты, в ССЖ медицинских пиявок обеих групп (выращенных на биофабрике и из естественных водоемов).

Учитывая то, что выращенные пиявки являются первым поколением маток-пиявок из природных популяций, теоретический интерес представляет оценка

влияния условий разведения и содержания на формирование аминокислотного фонда их слюнной жидкости.

Обнаружено, что аминокислотный спектр ССЖ медицинских пиявок обеих групп качественно постоянен и содержит 23 свободных аминокислоты (табл. 5.4.4). Однако в количественном отношении слюна пиявок, выращенных на биофабрике, оказалась более насыщенной аминокислотами – их суммарные концентрации свободных АК в секрете слюнных желез значительно превышают эти показатели слюны природных пиявок ( $p < 0,001$ ) (Ковальчук и др., 2011).

Обнаружено, что в слюне пиявок обеих групп сопоставимы только концентрации гистидина ( $p > 0,05$ ). У особей *H. verbana* из природных популяций в ССЖ отмечены значимо высокие концентрации треонина, пролина, аргинина, содержание остальных АК существенно выше в слюне пиявок из гирудокультуры ( $p < 0,01$ ) (табл. 5.4.4).

Авторами было показано, что для медицинских пиявок, выращенных в условиях биофабрики, в отличие от особей из природных популяций, характерны интенсивное потребление кислорода и более высокий уровень содержания макро- и микроэлементов и свободных аминокислот в тканях. Вполне закономерно, что специфические условия искусственного разведения обеспечивают пиявкам повышенный исходный уровень аминокислотного обмена в ССЖ на фоне высокого азотистого, энергетического и микроэлементного обмена в тканях.

При рассмотрении процентного содержания отдельных АК выявлено, что практически треть (36,2% и 31,4%) аминокислотного фонда ССЖ обеих групп пиявок приходится на глутаминовую кислоту (табл. 5.4.5). Это важнейшая заменимая аминокислота, играющая роль нейромедиатора с высокой метаболической активностью, стимулирующая окислительно-восстановительные процессы, обмен белков.

Таблица 5.4.4 – Аминокислотный состав секрета слюнных желез медицинской пиявки *H. verbana* из природных популяций и гирудокультуры

АК, мкмоль/100 мл	Природные популяции	Гирудокультура	<i>p</i>
Cysteic Acid	3,64±0,08	4,20±0,14	0,006
Taurine	5,66±0,15	7,90±0,08	0,000
Aspartic Acid	24,97±0,23	34,73±0,31	0,000
Threonine	35,15±0,46	33,28±0,31	0,006
Serine	30,96±0,20	44,48±0,45	0,000
Glutamic Acid	163,76±2,05	173,40±1,34	0,003
Glutamine	0,73±0,03	0,91±0,03	0,002
Proline	18,92±0,15	9,75±0,14	0,000
Glycine	30,13±0,32	36,22±0,60	0,000
Alanine	18,80±0,14	25,45±0,32	0,000
Citrulline	0,20±0,02	0,41±0,01	0,000
Valine	15,21±0,23	37,38±0,56	0,000
Cysteine	1,41±0,07	5,53±0,05	0,000
Methionine	4,45±0,10	9,06±0,09	0,000
Isoleucine	4,57±0,07	9,64±0,22	0,000
Leucine	15,74±0,09	24,24±0,31	0,000
Tyrosine	6,04±0,08	8,38±0,13	0,000
Phenylalanine	8,32±0,16	11,64±0,15	0,000
Tryptophan	1,66±0,08	2,48±0,03	0,000
Ornithine	18,29±0,24	21,06±0,12	0,000
Lysine	27,47±0,24	39,44±0,19	0,000
Histidine	10,01±0,09	10,00±0,08*	0,997
Arginine	6,01±0,17	3,52±0,16	0,000
Фонд АК	452,10±5,41	553,07±4,92	0,000
НАК	128,59±1,66	180,66±1,25	0,000
ЗАК	295,71±3,26	338,85±3,37	0,000
НАК/ЗАК	0,43	0,53	
АКРУЦ	35,52±0,39	71,26±0,46	0,000
АРАК	14,36±0,24	20,02±0,29	0,000
ИФ	2,47	3,56	
ССАК	15,16±0,39	26,69±0,37	0,000

Примечание: \* – статистически значимые различия между группами отсутствуют (Tukey HSD test,  $p > 0,05$ )

Таблица 5.4.5 – Содержание свободных аминокислот (% от фонда) в секрете слюнных желез медицинской пиявки *H. verbana* из природных популяций и гирудокультуры

АК, % от фонда	Природные популяции	Гирудокультура	<i>p</i>
Cysteic Acid	0,80±0,008	0,76±0,019*	0,951
Taurine	1,25±0,019	1,43±0,005*	0,266
Aspartic Acid	5,52±0,016	6,28±0,002	0,000
Threonine	7,77±0,010	6,02±0,007	0,000
Serine	6,85±0,038	8,04±0,012	0,000
Glutamic Acid	36,22±0,021	31,35±0,038	0,000
Glutamine	0,16±0,005	0,16±0,004*	0,999
Proline	4,19±0,017	1,76±0,010	0,000
Glycine	6,66±0,013	6,55±0,050*	0,859
Alanine	4,16±0,019	4,60±0,018	0,005
Citrulline	0,04±0,004	0,07±0,002	0,027
Valine	3,36±0,011	6,76±0,147	0,000
Cysteine	0,31±0,011	1,00±0,004	0,000
Methionine	0,98±0,012	1,64±0,001	0,000
Isoleucine	1,01±0,003	1,74±0,025	0,000
Leucine	3,48±0,023	4,38±0,018	0,000
Tyrosine	1,34±0,002	1,52±0,013*	0,109
Phenylalanine	1,84±0,012	2,10±0,011*	0,070
Tryptophan	0,37±0,013	0,45±0,001*	0,591
Ornithine	4,05±0,006	3,81±0,012*	0,078
Lysine	6,08±0,020	7,13±0,029	0,000
Histidine	2,22±0,011	1,81±0,003	0,000
Arginine	1,33±0,022	0,64±0,023	0,003
НАК	28,44±0,028	32,67±0,095	0,000
ЗАК	65,41±0,063	61,26±0,083	0,000
АКРУЦ	7,86±0,010	12,89±0,109	0,000
АРАК	3,18±0,015	3,62±0,024	0,022
ССАК	3,35±0,047	4,82±0,025	0,000

Примечание: \* – статистически значимые различия между группами отсутствуют (Tukey HSD test,  $p > 0,05$ )

Глутаминовая кислота нормализует обмен веществ, связывает и выводит аммиак, участвует в синтезе других АК, ацетилхолина, АТФ, мочевины, способствует переносу и поддержанию необходимой концентрации  $K^+$  в мозге, повышает устойчивость организма к гипоксии, служит связующим звеном между обменом углеводов и нуклеиновых кислот, нормализует содержание показателей гликолиза в крови и тканях, оказывает антитоксическое и гепатозащитное действие.

Далее важнейшими составляющими аминокислотного фонда секрета пиявок из гирудокультуры и природы являются: серин, лизин, глицин, аспарагиновая кислота, треонин, аланин, валин, орнитин, лейцин, фенилаланин. Содержание остальных АК большей частью не превышает 2% от общего суммарного пула (табл. 5.4.5).

Секрет слюнных желез пиявок обеих групп в равных пропорциях содержит цистеиновую кислоту, таурин, глутамин, глицин, тирозин, фенилаланин, триптофан, орнитин ( $p > 0,05$ ). В слюне искусственно выращенных пиявок существенно выше процентное содержание аспарагиновой кислоты, серина, аланина, цитруллина, валина, цистеина, метионина, изолейцина, лейцина, лизина ( $p < 0,05$ ) (табл. 5.4.5).

Для секрета медицинских пиявок из природных популяций характерно повышенное содержание треонина, глутаминовой кислоты, пролина, гистидина и аргинина ( $p < 0,01$ ) (табл. 5.4.5).

При анализе отдельных групп аминокислот обнаружено, что содержание незаменимых АК в ССЖ выращенных пиявок значительно выше, чем в слюне природных особей ( $p < 0,001$ ). В секрете слюнных желез пиявок, выращенных на биофабрике, содержится значительно больше свободных АК, играющих ключевую роль в межклеточном обмене: с разветвленной углеродной цепью (АКРУЦ – валин, изолейцин, лейцин), ароматических (АРАК – тирозин, фенилаланин) и серосодержащих (ССАК – цистеиновая кислота, цистеин, метионин, таурин) ( $p < 0,05$ ). В тоже время процентное содержание заменимых (ЗАК) в ССЖ пиявок из природных популяций значимо превышает эти параметры слюнной жидкости особей из гирудокультуры ( $p < 0,001$ ) (табл. 5.4.5).

Таким образом, в контролируемых условиях искусственного разведения на биофабрике у медицинских пиявок формируются секрет слюнных желез, обильнее насыщенный свободными аминокислотами, нежели слюна пиявок из природных популяций.

Результаты исследований аминокислотного спектра тканей и секрета слюнных желез медицинских пиявок, помимо научной новизны, имеют практическое значение для гирудотерапевтической практики.

### **5.5. Возрастная динамика свободных аминокислот в тканях медицинской пиявки *H. verbana* в условиях ускоренного роста и развития на биофабрике**

Исследования, направленные на изучение физиологической роли свободных аминокислот 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 АК в тканях медицинских пиявок на различных этапах роста и развития могут способствовать более эффективному и качественному воспроизводству 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 свободных АК 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 «нитчатки», 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.

Сравнительная оценка состояния аминокислотного спектра тканей особей *H. verbana* различных возрастных групп выявила существенные колебания концентраций, как суммарного фонда АК, так и всех изучаемых свободных аминокислот ( $p < 0,001$ ) (табл. 5.5.1).

Максимальные суммарные концентрации свободных АК отмечены в тканях «нитчаток» – пиявок, вышедших из коконов и еще не питавшихся кровью. В первые две недели жизни, до начала первого кормления, молодые пиявки используют для поддержания гомеостаза исключительно эндогенное питание, с преобладанием катаболической компоненты – отсюда и высокие значения суммарного фонда свободных АК в их тканях.

После первых двух кормлений, в возрасте одного месяца, медицинские пиявки утраивают свой вес, но уровень азотистого метаболизма не снижают ( $p > 0,05$ ) (табл. 5.5.1).

Дальнейшие рост и развитие сопровождаются равномерным снижением суммарных концентраций свободных аминокислот в тканях *H. verbana* – у взрослых девятимесячных особей они в три раза ниже, чем у «нитчаток» ( $p < 0,001$ ) (табл. 5.5.1).

На рисунках 5.5.1-5.5.14 представлена возрастная динамика концентраций свободных АК (1г мкмоль/100г), суммарного фонда и основных метаболических групп (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA).

Таблица 5.5.1 – Возрастная динамика свободных аминокислот (мкмоль/100г)

в тканях *H. verbana* в гирудокультуре

АК μмоль /100г	Нитчатки контроль <i>n</i> = 5(50)	1 мес. <i>n</i> = 5(25)	3 мес. <i>n</i> = 5(15)	5 мес. <i>n</i> = 5	7 мес. <i>n</i> = 5	9 мес. <i>n</i> = 5
СА	49,24±0,49	79,64±0,64	54,48±1,44*	46,25±1,68*	41,28±1,24	31,98±1,02
Tau	11,65±0,36	9,39±0,51	6,46±0,50	следы	следы	следы
Asp	9,95±0,41	126,62±1,92	85,01±4,27	16,07±1,07	4,65±0,44	4,86±0,47
Thr	81,88±1,20	96,20±1,68	58,17±0,85	77,60±3,38*	98,23±3,66	73,4±2,56*
Ser	91,20±2,86	48,47±1,09	87,78±1,57*	94,49±3,50*	104,0±1,22	76,03±2,93
Glu+gln	608,20±5,79	413,89±2,62	381,01±3,08	285,49±6,89	203,1±1,36	158,3±3,17
Pro	70,74±1,06	28,62±1,00	14,12±0,71	9,48±0,97	7,07±0,43	5,28±0,56
Gly	157,01±2,10	208,32±2,27	134,16±1,6*	77,47±3,24	27,11±0,58	18,47±1,32
Ala	209,13±1,74	236,69±1,52	206,0±1,54*	130,04±3,38	97,86±1,61	73,27±2,62
Cit	9,15±0,42	9,37±0,42*	4,72±0,35	следы	следы	следы
Val	93,31±0,85	110,19±1,50	73,09±1,54	96,47±3,30*	121,8±1,46	91,3±2,12*
Cys	6,37±0,42	4,12±0,17	23,55±0,85	15,32±0,71	8,52±0,50	6,35±0,46*
Met	23,56±0,84	14,80±0,43	53,29±1,48	36,58±3,40	23,0±0,62*	18,95±0,56
Ile	121,31±1,40	98,36±1,79*	34,51±0,68	23,90±2,99	13,14±0,72	9,98±0,67
Leu	180,72±2,49	154,04±1,39	130,88±2,61	86,36±3,67	46,1±0,95	34,67±0,62
Tyr	15,44±0,76	8,80±0,71	27,51±1,12	20,41±1,73*	16,1±0,60*	11,8±0,80*
Phe	30,87±1,40	34,9±0,54*	56,34±1,11	41,87±2,62	23,76±0,44	17,83±0,81
Trp	2,82±0,19	22,71±0,77	5,53±0,33	следы	следы	следы
Orn	27,43±0,89	27,12±1,01*	29,20±0,49*	18,48±1,00	9,15±0,51	6,82±0,49
Lys	70,39±1,49	79,41±1,63*	79,29±1,01*	45,46±2,09	13,96±0,54	10,35±0,82
His	1,19±0,02	4,68±0,42	11,77±0,43	3,86±0,07	0,89±0,06*	0,18±0,01
Arg	46,98±1,08	31,17±0,77	22,93±0,66	14,43±1,09	7,72±0,51	1,96±0,07
Фонд	1918,5±27,0	1847,6±23,7*	1579,7±26,4	1140,0±42,6	867,4±13,7	650,8±12,6
НАК	653,0±10,7	646,5±10,5*	525,8±10,7	426,5±19,9	348,6±9,0	258,6±8,2
ЗАК	1168,0±21,2	1075,5±10,8*	959,1±14,0	648,8±21,0	468,4±6,5	354,4±7,3
АКРУЦ	395,3±4,7	362,6±4,5	238,5±4,8	206,7±9,2	181,0±2,9	136,0±2,1
АРАК	49,1±2,3	66,5±1,9	89,4±2,5	62,3±3,8	39,8±1,0	29,6±0,5
ССАК	90,8±1,5	107,9±1,7	137,8±4,2	98,2±5,6*	72,8±2,4	56,3±0,3
Н/З	0,56	0,60	0,55	0,66	0,74	0,73
ИЗ <sub>Gly/Ala</sub>	0,75	0,88	0,65	0,60	0,28	0,25

Примечание: *n* – количество проб (особей), \* – статистические различия с контролем отсутствуют,  $p > 0,05$  (Dunnnett test, ANOVA)

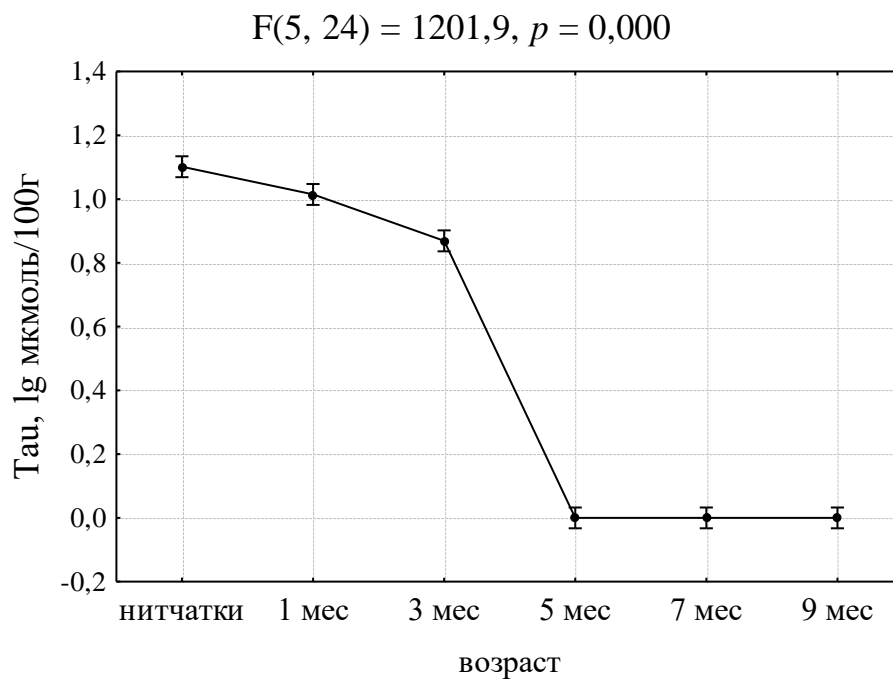
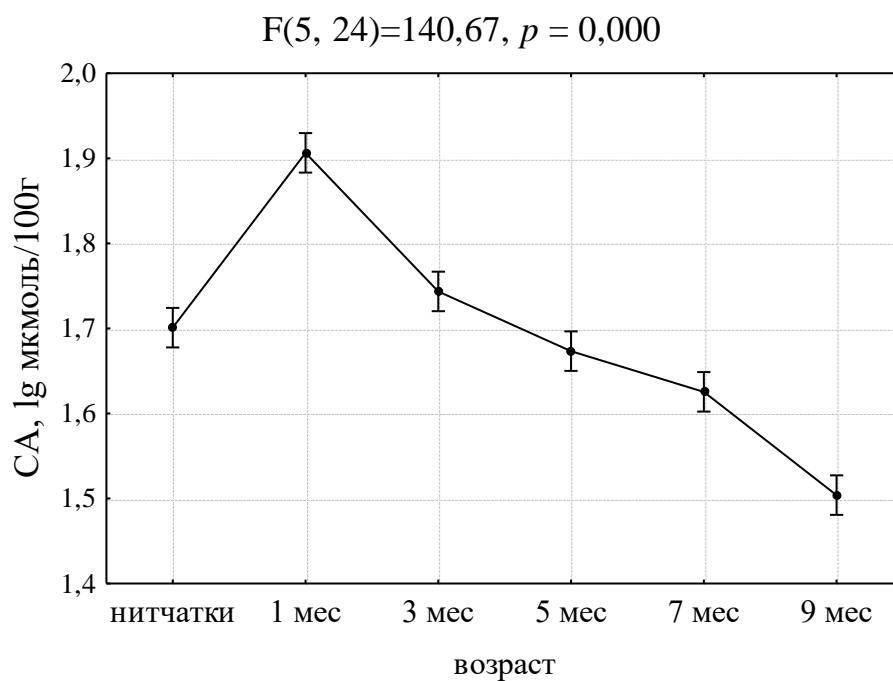


Рисунок 5.5.1 – Возрастная динамика концентраций ( $\mu\text{г } \mu\text{моль}/100\text{г}$ ) цистеиновой кислоты и таурина в тканях аптечной пиявки *H. verbanus* (ANOVA)

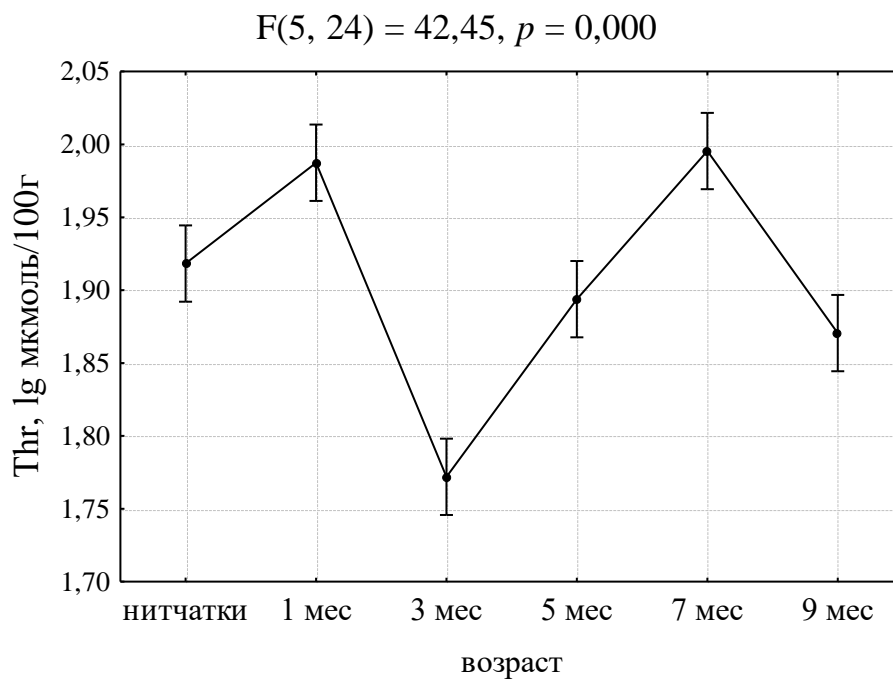
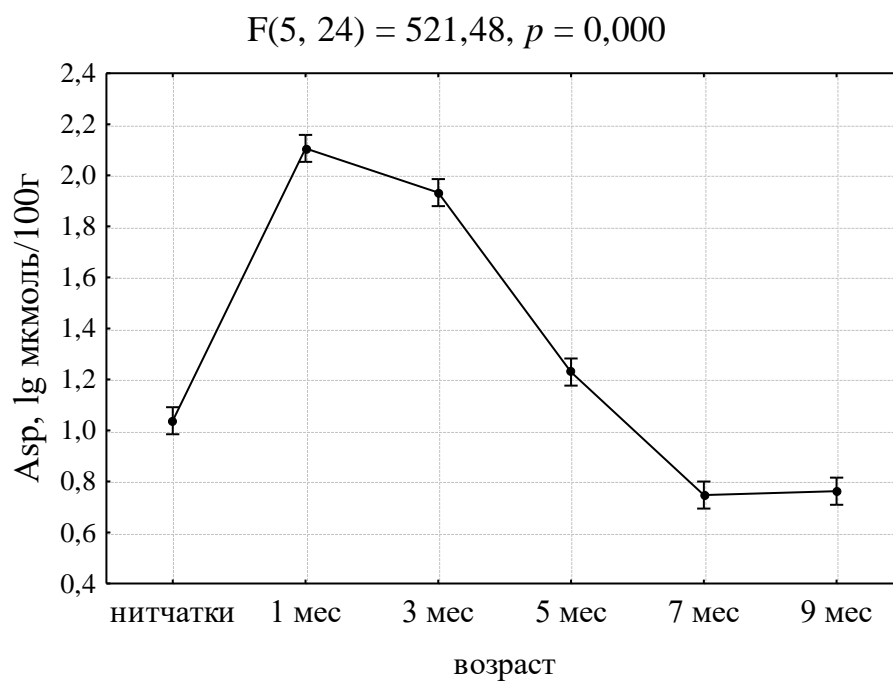


Рисунок 5.5.2 – Возрастная динамика концентраций (lg мкмоль/100г) аспарагиновой кислоты и треонина в тканях аптечной пиявки *H. verbana* (ANOVA)

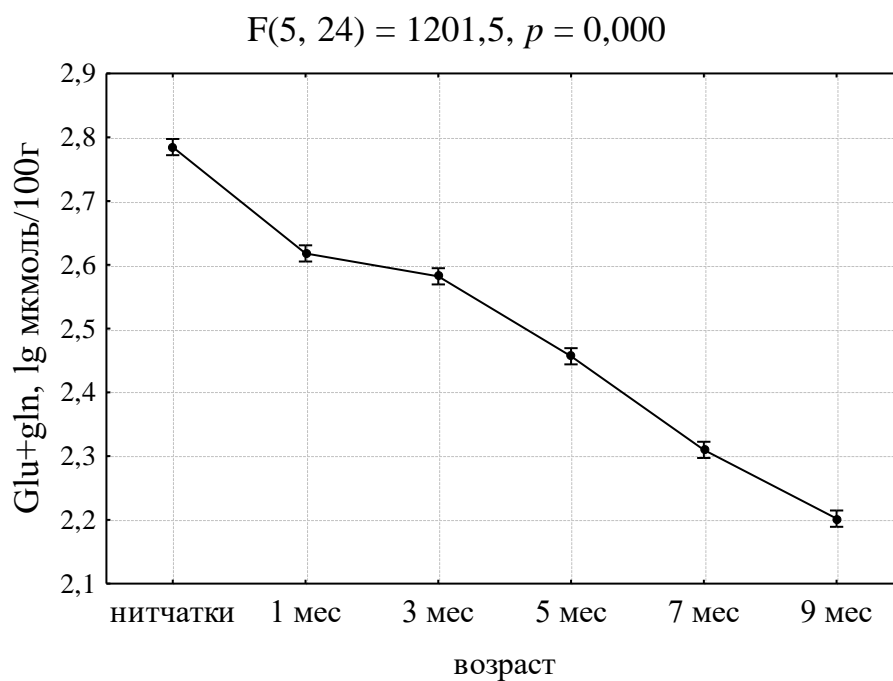
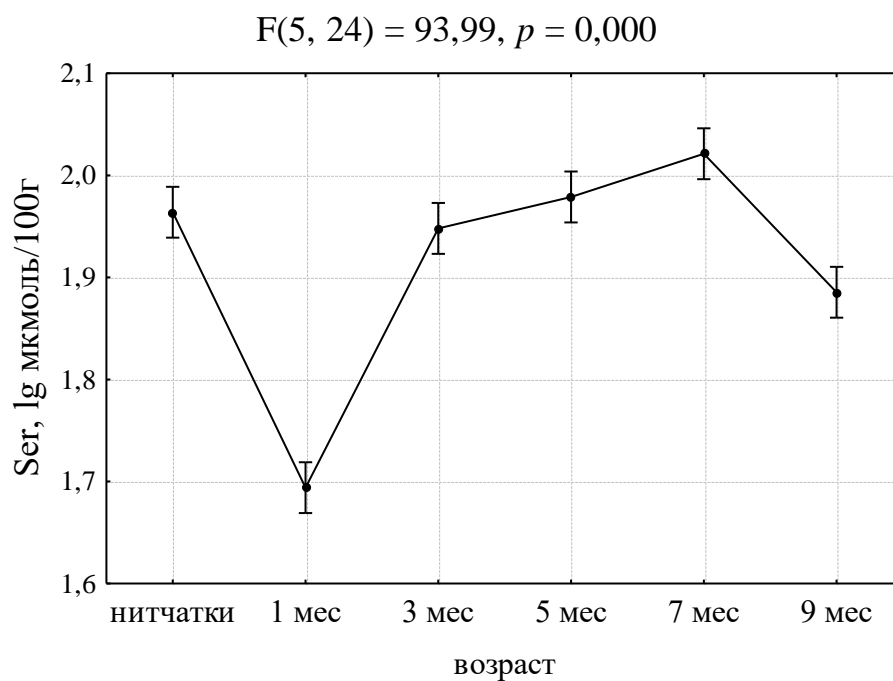


Рисунок 5.5.3 – Возрастная динамика концентраций ( $\mu\text{g}/100\text{г}$ ) серина, глутаминовой кислоты и глутамина в тканях аптечной пиявки *H. verbana* (ANOVA)

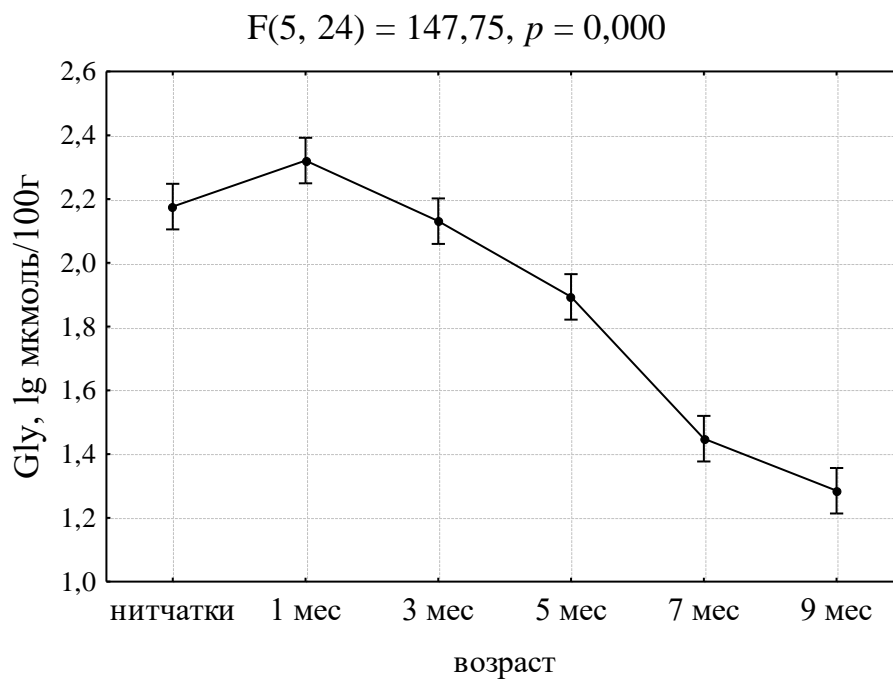
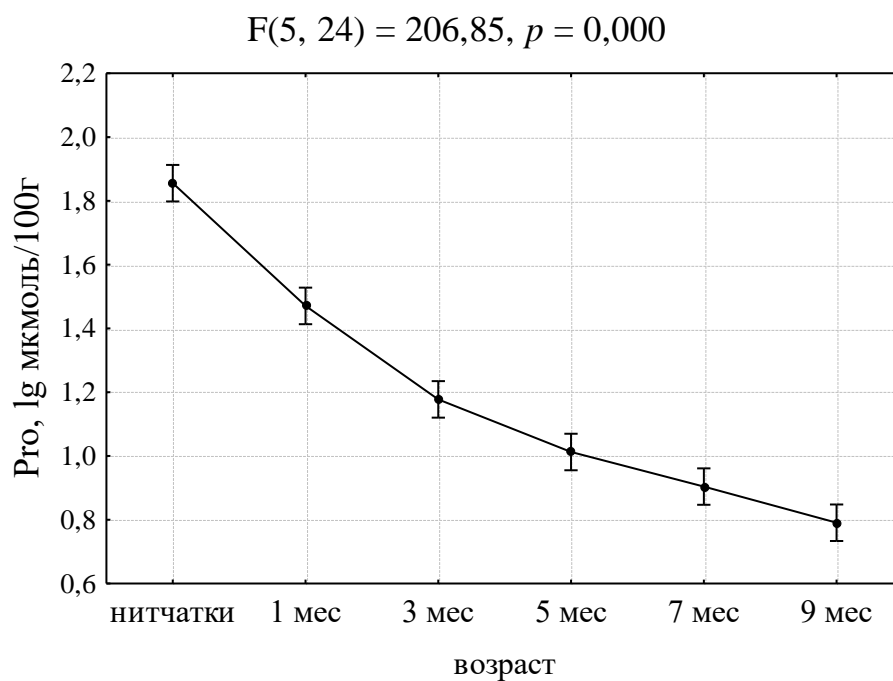


Рисунок 5.5.4 – Возрастная динамика концентраций ( $\mu\text{g}/100\text{г}$ ) пролина и глицина в тканях аптечной пиявки *H. verbana* (ANOVA)

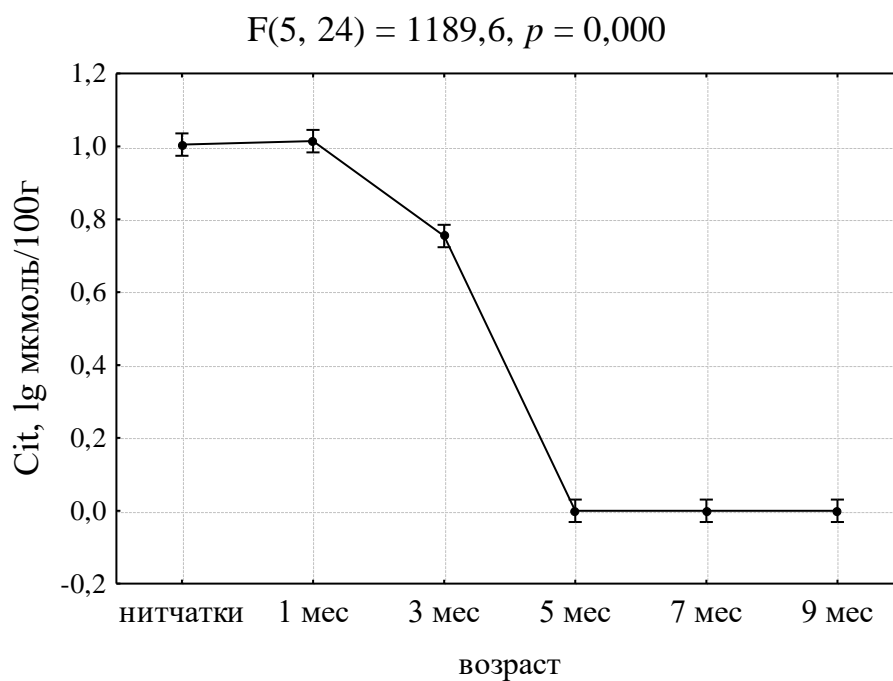
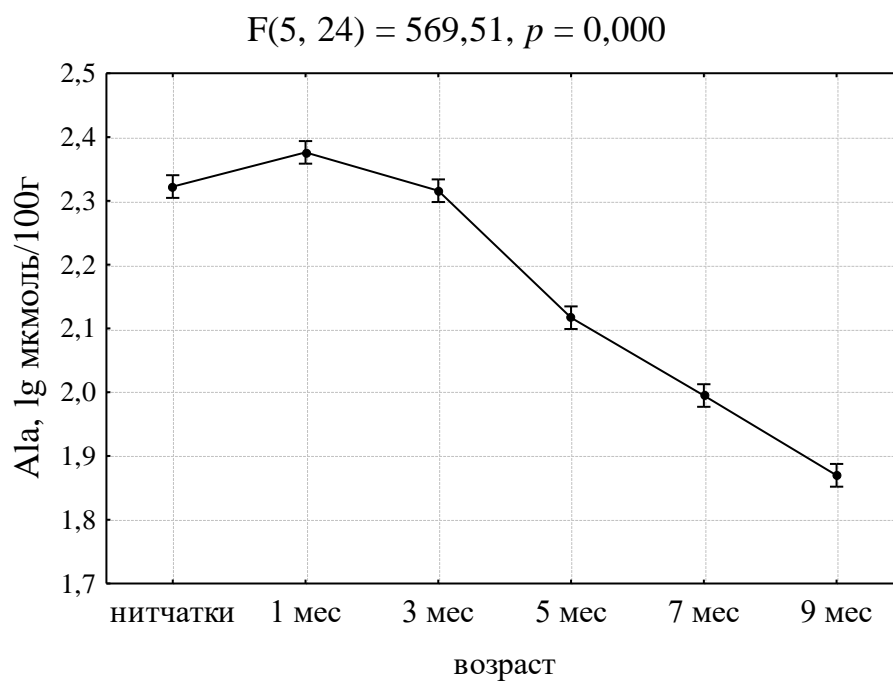


Рисунок 5.5.5 – Возрастная динамика концентраций (Ig мкмоль/100г) аланина и цитруллина в тканях аптечной пиявки *H. verbana* (ANOVA)

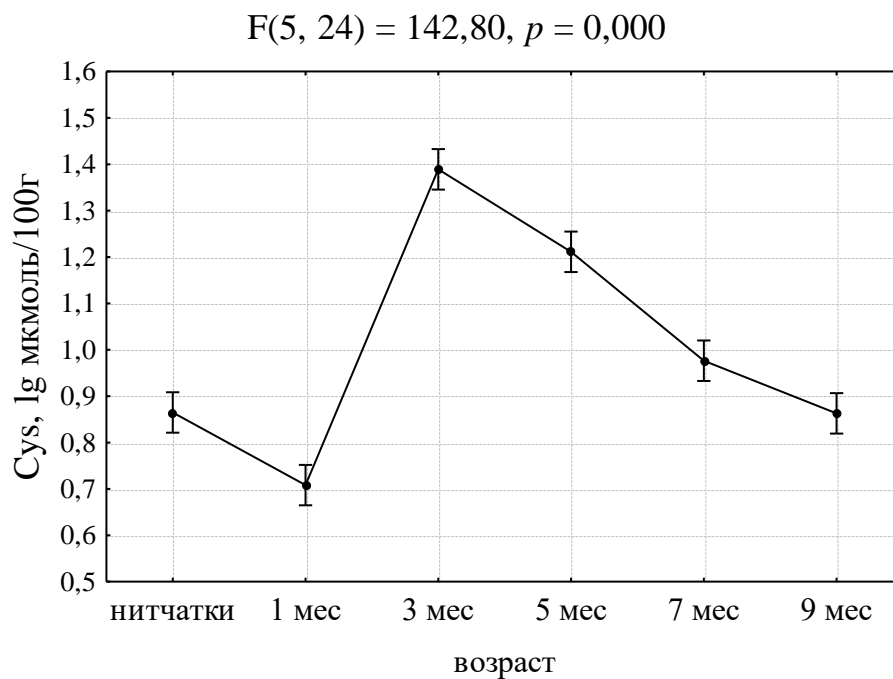
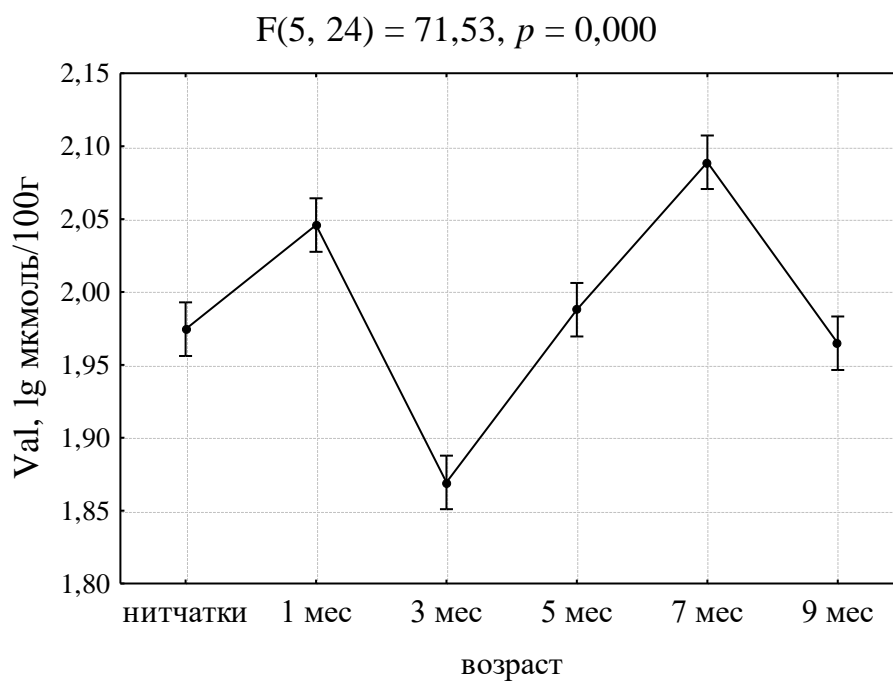


Рисунок 5.5.6 – Возрастная динамика концентраций (lg мкмоль/100г) валина и цистеина в тканях аптечной пиявки *H. verbana* (ANOVA)



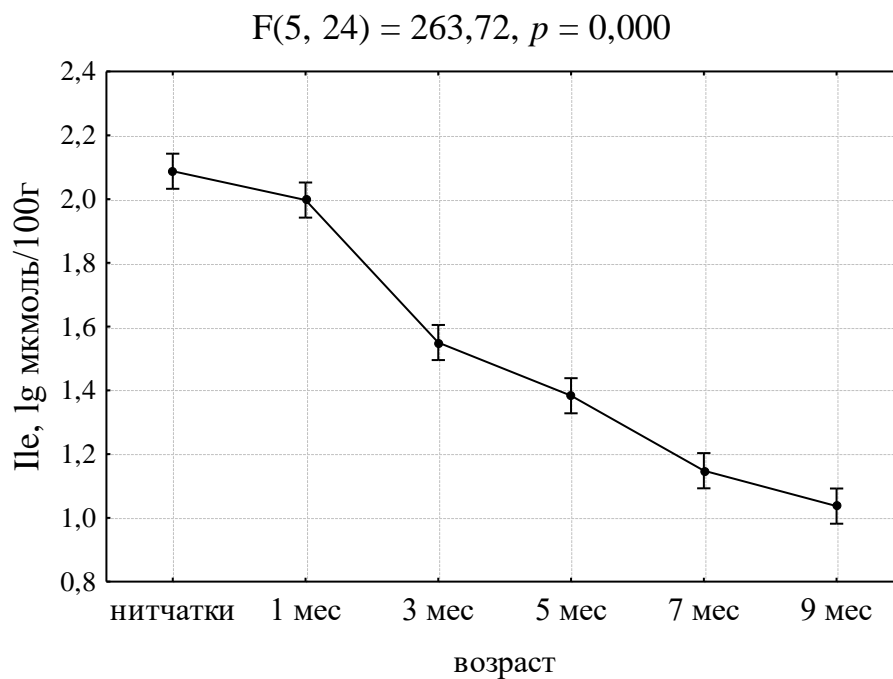
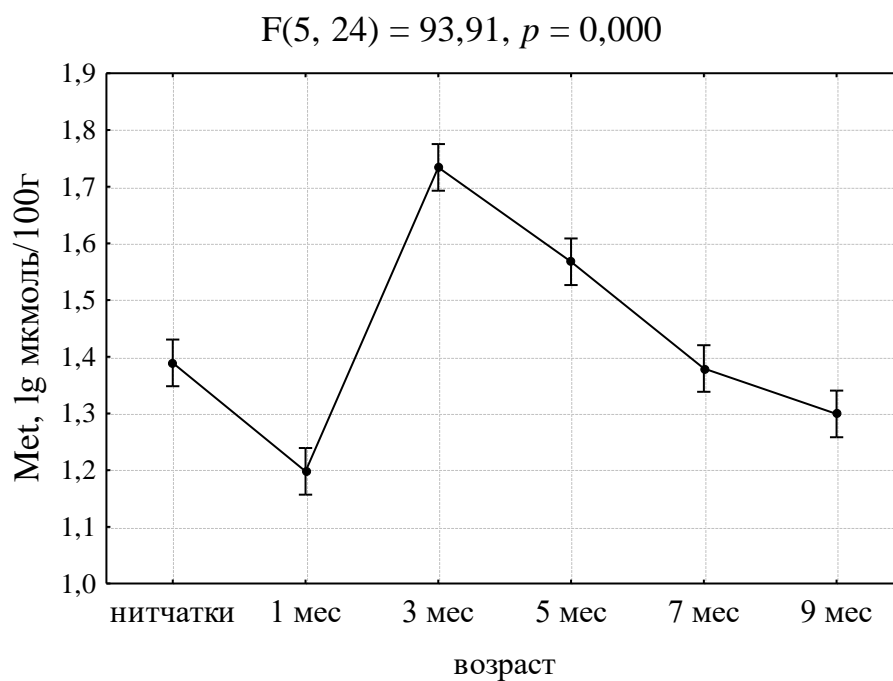


Рисунок 5.5.7 – Возрастная динамика концентраций (lg мкмоль/100г) метионина и изолейцина в тканях аптечной пиявки *H. verbana* (ANOVA)

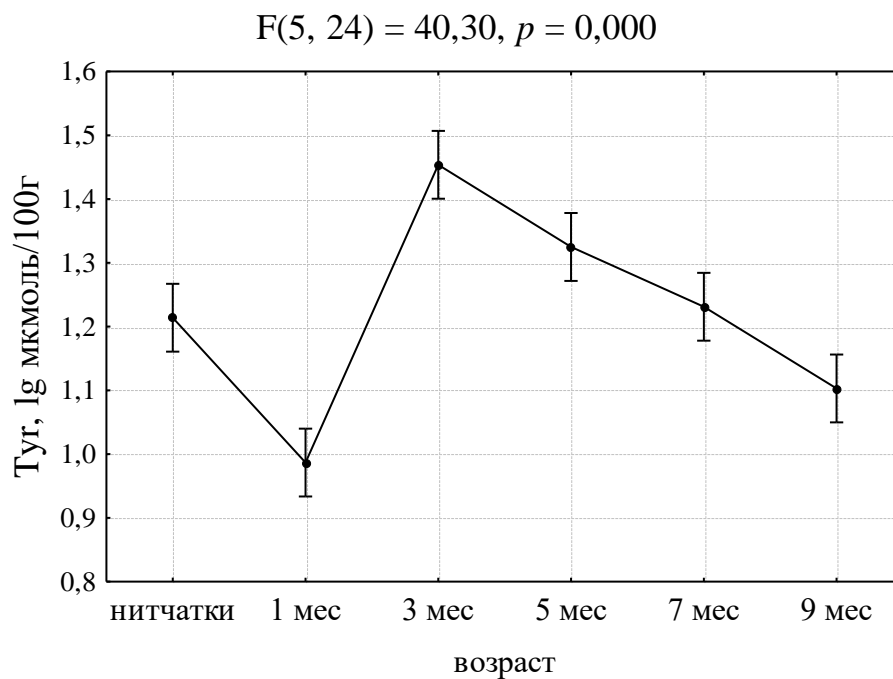
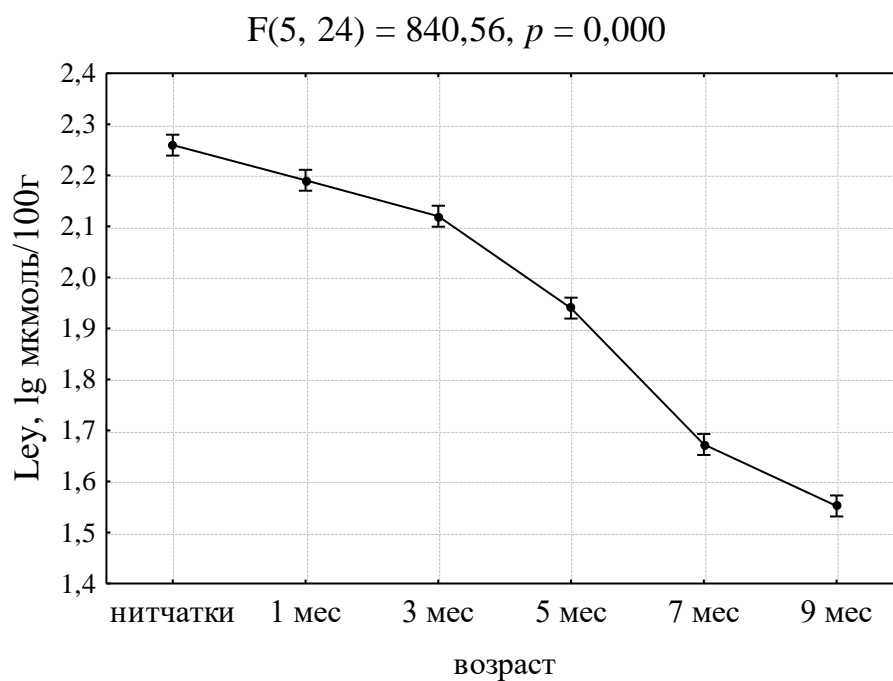


Рисунок 5.5.8 – Возрастная динамика концентраций (lg мкмоль/100г) лейцина и тирозина в тканях аптечной пиявки *H. verbana* (ANOVA)

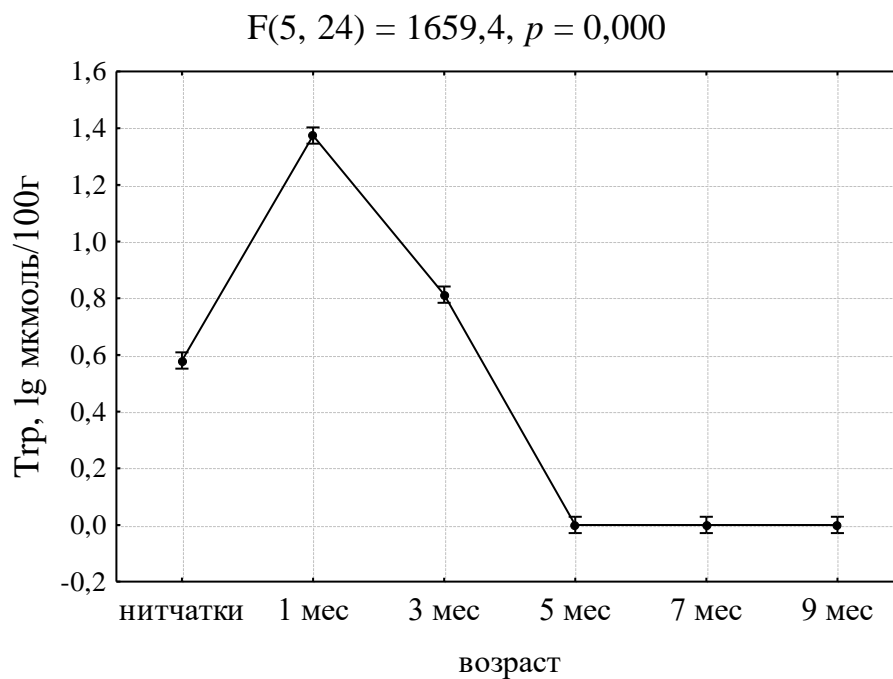
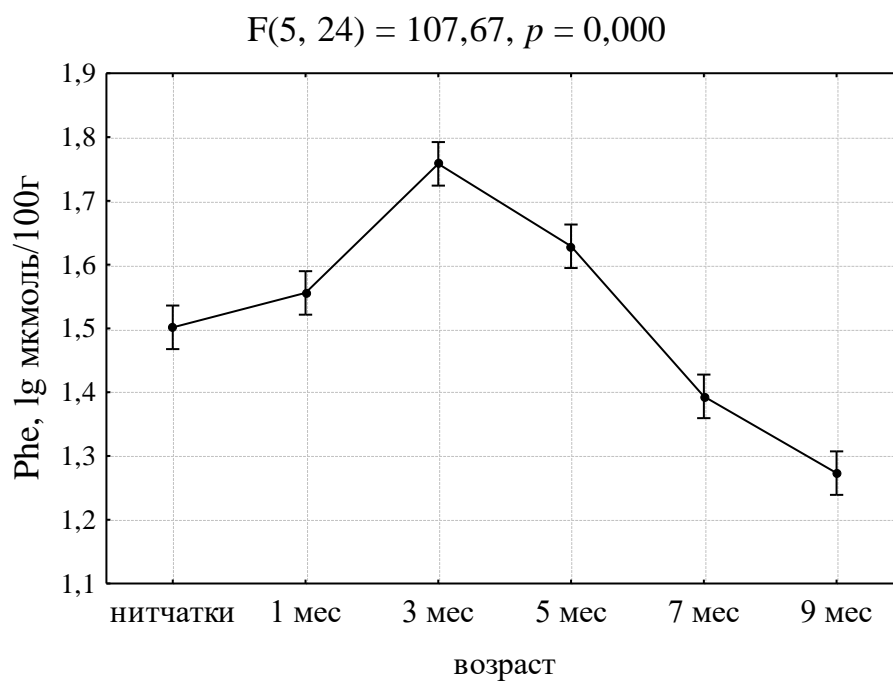


Рисунок 5.5.9 – Возрастная динамика концентраций ( $\mu\text{г мкмоль}/100\text{г}$ ) фенилаланина и триптофана в тканях аптечной пиявки *H. verbana* (ANOVA)

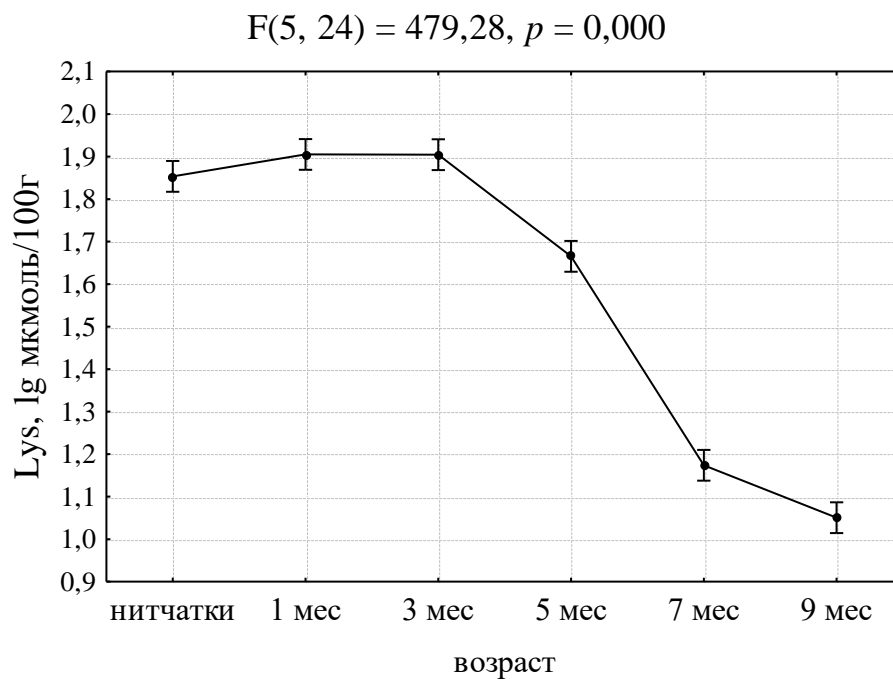
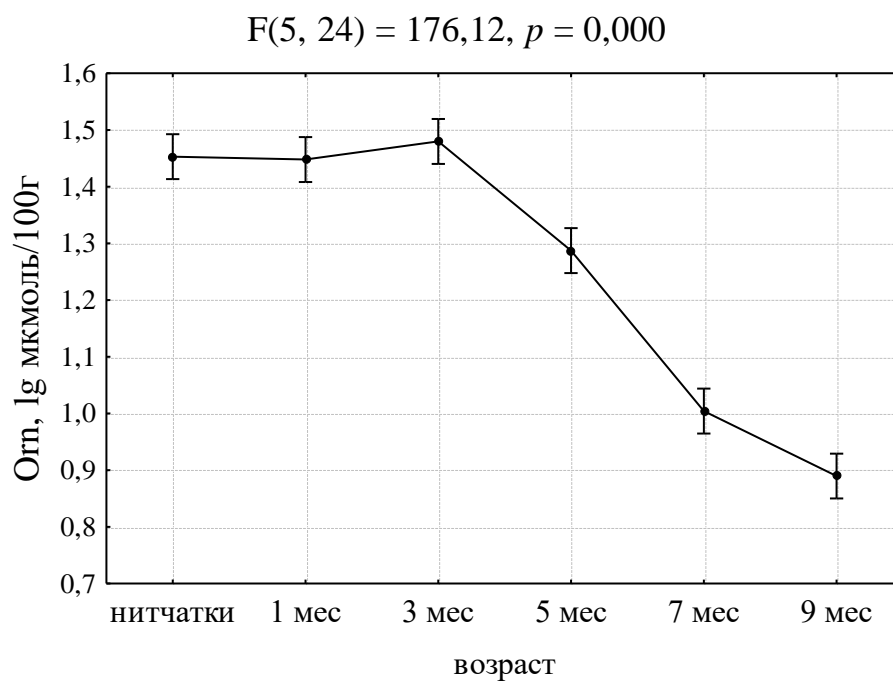


Рисунок 5.5.10 – Возрастная динамика концентраций ( $\mu\text{g}$  мкмоль/100г) орнитина и лизина в тканях аптечной пиявки *H. verbana* (ANOVA)

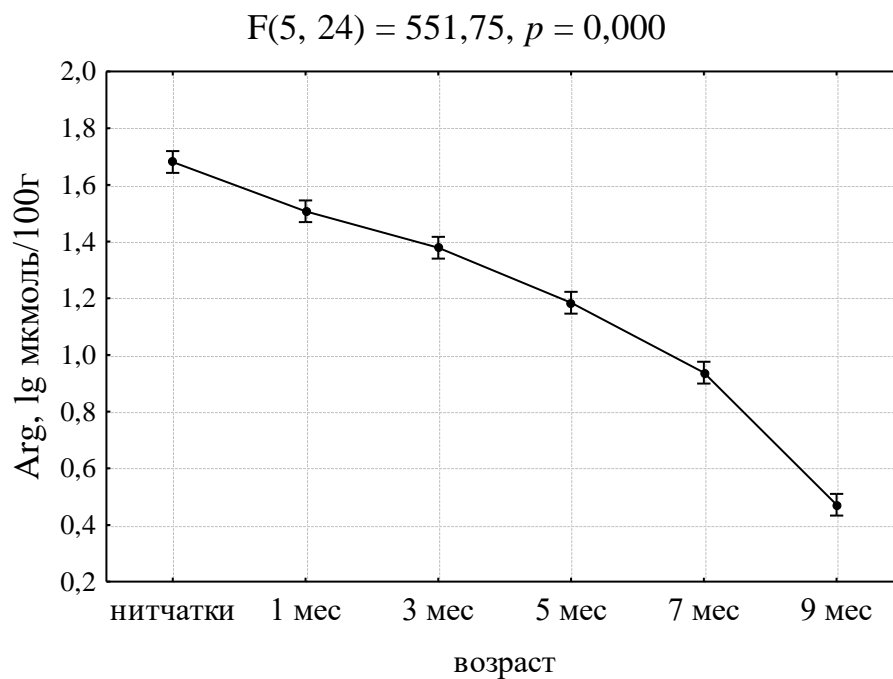
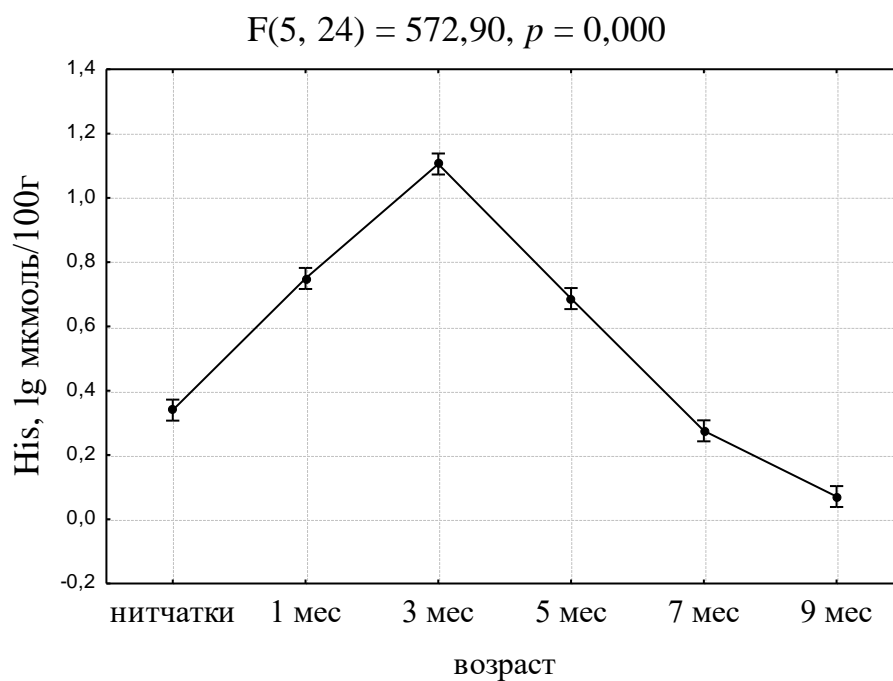


Рисунок 5.5.11 – Возрастная динамика концентраций (Ig мкмоль/100г) гистидина и аргинина в тканях аптечной пиявки *H. verbana* (ANOVA)

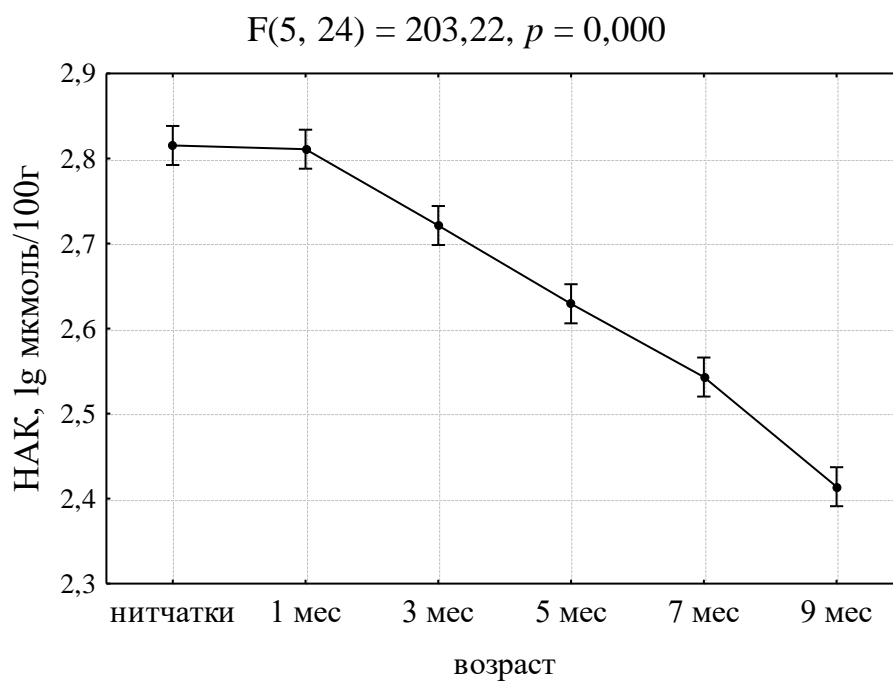
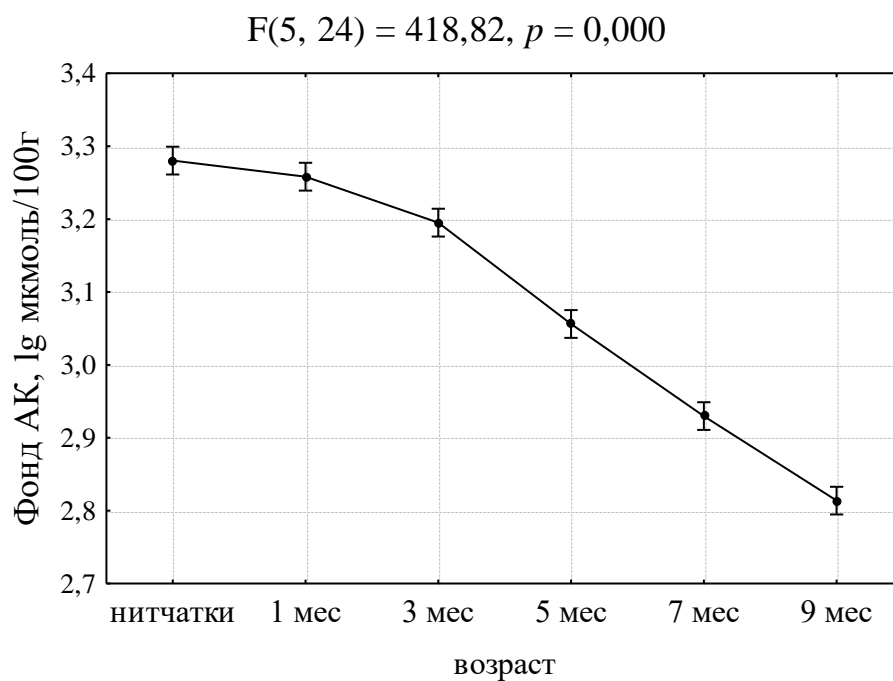


Рисунок 5.5.12 – Возрастная динамика суммарного фонда и незаменимых аминокислот (Ig мкмоль/100г) в тканях аптечной пиявки *H. verbana* (ANOVA)

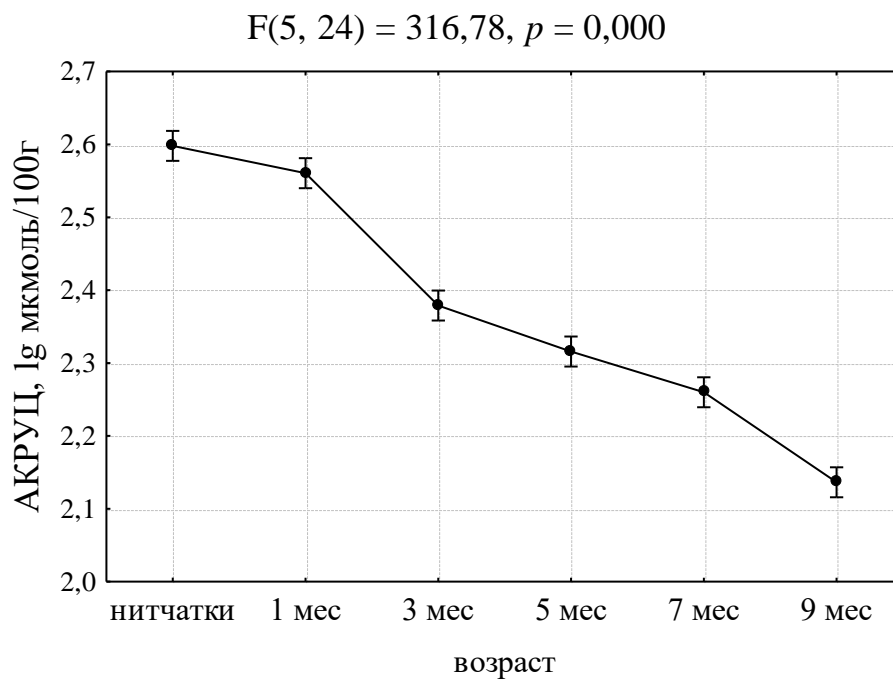
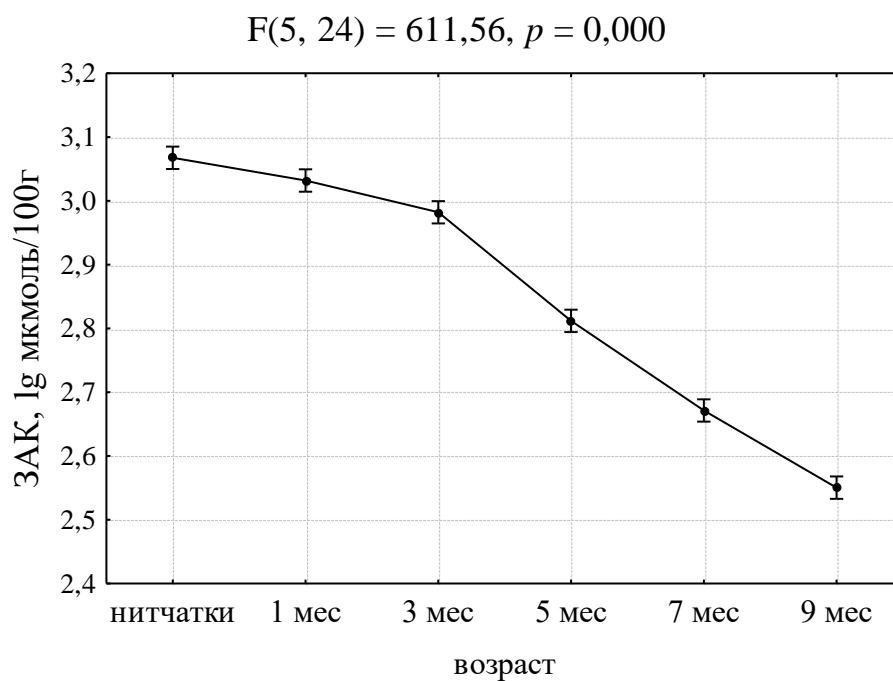


Рисунок 5.5.13 – Возрастная динамика концентраций (lg мкмоль/100г) заменимых аминокислот и АК с разветвленной углеродной цепью в тканях аптечной пиявки *H. verbana* (ANOVA)

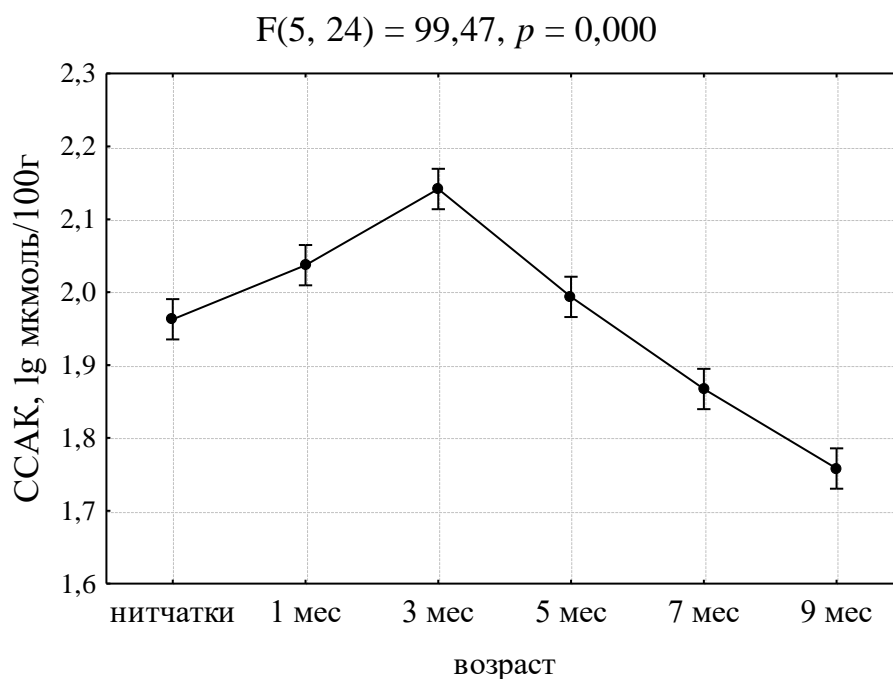
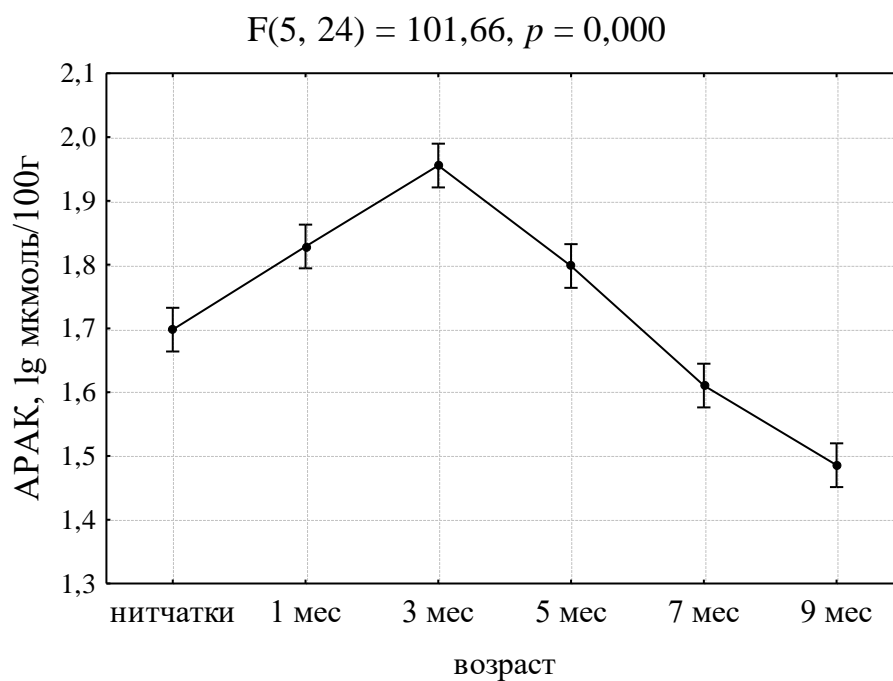


Рисунок 5.5.14 – Возрастная динамика концентраций (lg мкмоль/100г) ароматических и серосодержащих АК в тканях аптечной пиявки *H. verbana* (ANOVA)

Показано, что в тканях *H. verbana* наибольшая возрастная изменчивость характерна для концентраций таурина, аспарагиновой кислоты, глутамата, аланина, цитруллина, лейцина, триптофана, гистидина, аргинина и фонда ЗАК ( $F_{5; 24} >$



521,47;  $p < 0,001$ ), а наименьшая – для треонина и тирозина ( $F_{5; 24} < 42,46$ ;  $p < 0,001$ ) (рис. 5.5.1-5.5.14).

Выявлена очень высокая отрицательная корреляционная связь между суммарным фондом свободных аминокислот тканей аптечной пиявки и их возрастом ( $r_s = -0,98$ ,  $p = 0,000$ ). Наибольший вклад в снижение суммарных концентраций АК в тканях растущих пиявок вносят 11 аминокислот, концентрации которых при достижении девятимесячного возраста падают в разы: глутаминовая кислота и глутамин (в 3,8 раз), пролин (в 13,4), глицин (в 8,5), аланин (в 2,9), изолейцин (в 12,2), лейцин (в 5,2), орнитин (в 4,0), лизин (в 6,8), гистидин (в 6,6), аргинин (в 24,0) ( $p < 0,001$ ) (табл. 5.5.1).

В тканях молоди до трехмесячного возраста отмечено накопление таурина, цитруллина и триптофана, содержание которых у взрослых особей обнаружены в следовых количествах. Таурина больше всего содержится в тканях «нитчаток», цитруллина и триптофана – одномесячных особей (табл. 5.5.1).

Максимальные концентрации подавляющего большинства изучаемых свободных АК также отмечены в тканях молоди. Так, глутамата, пролина, изолейцина, лейцина и аргинина больше всего в тканях «нитчаток»; цистеиновой кислоты, аспарагиновой кислоты, треонина, глицина, аланина, триптофана и лизина – у одномесячных особей; цистеина, метионина, тирозина, фенилаланина, орнитина, лизина и гистидина – у трехмесячных; максимальные концентрации серина и валина содержат ткани взрослых семимесячных пиявок ( $p < 0,05$ ) (табл. 5.5.1).

Суммарные концентрации пулов заменимых АК и незаменимых АК в процессе роста пиявок значимо снижаются ( $p < 0,001$ ), однако их соотношение НАК/ЗАК, напротив, растет. Обратная картина отмечена для показателей индикатора зрелости (ИЗ) – соотношения глицина и аланина (табл. 5.5.1).

Было показано, что возрастание содержания аланина и снижение содержания глицина является устойчивым признаком и отношение этих АК можно использовать в качестве индикатора зрелости. Так, у четырех видов рыб отношение глицин/аланин, равное 1,2-1,4, соответствовало незрелым особям, а 0,3-0,6 – зрелым (Love, 1976). Согласно нашим данным, индикатор зрелости, предлагаемый

для рыб, «работает» и при оценке возрастных особенностей аминокислотного спектра тканей медицинских пиявок в гирудокультуре, что может иметь практическое применение.

Методом главных компонент показана четкая дифференциация возрастных групп пиявок согласно специфике их аминокислотных спектров (рис. 5.5.15, табл. 5.5.2).

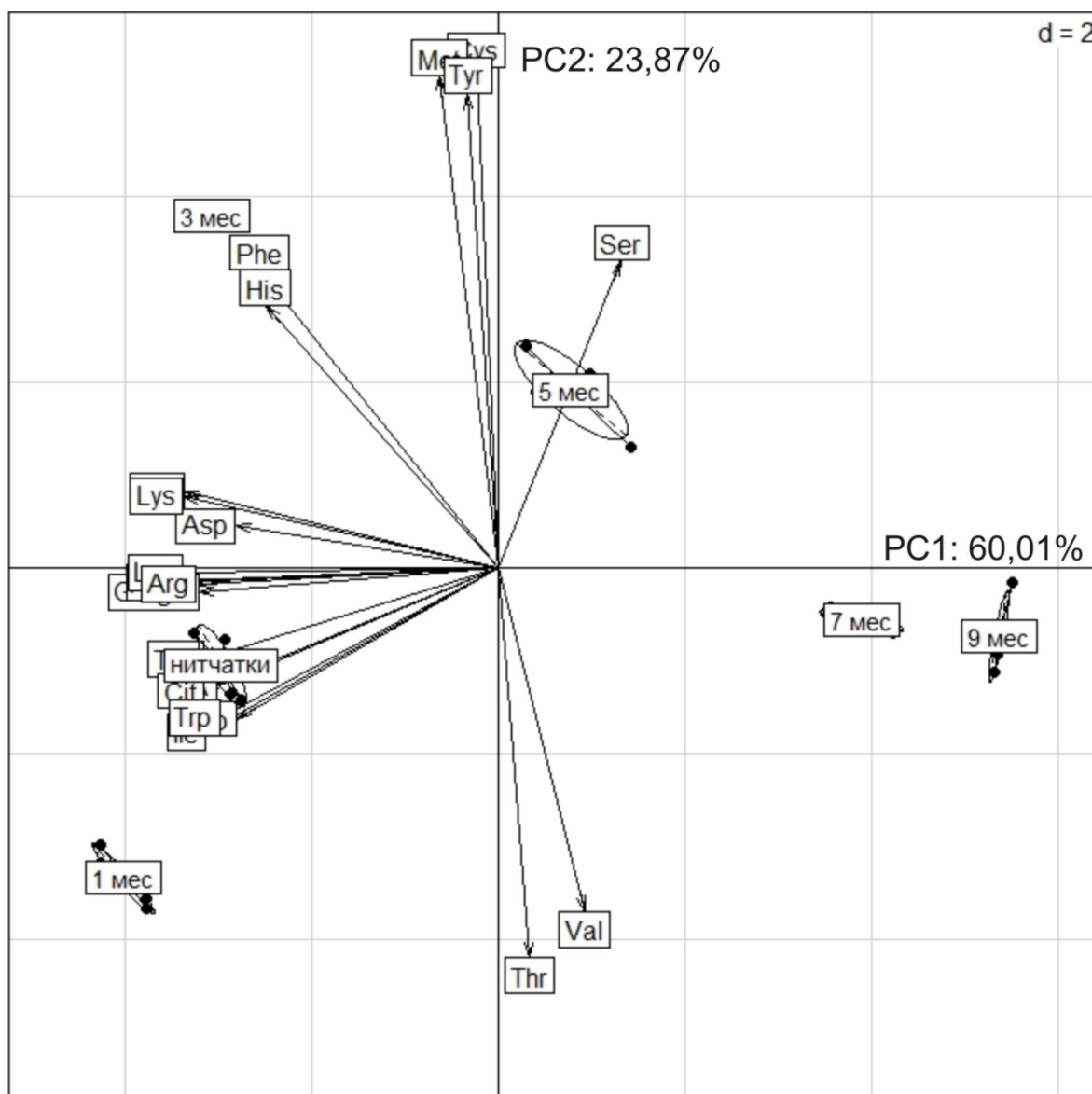


Рисунок 5.5.15 – Возрастная специфика аминокислотного спектра (АК, 1g мкмоль/100г) тканей аптечной пиявки *H. vervana* из гирудокультуры в пространстве главных компонент

Таблица 5.5.2 – Результаты компонентного анализа содержания свободных аминокислот (АК, 1g мкмоль/100г) в тканях аптечной пиявки *H. verbandi* различных возрастных групп

АК, 1g мкмоль/100г ( $i = 22$ )	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
Cysteic Acid	-0,87***	-0,23	5,76	0,99
Taurine	-0,91***	-0,18	6,33	0,61
Aspartic Acid	-0,81***	0,08	5,02	0,13
Threonine	0,10	-0,77***	0,07	11,17
Serine	0,38*	0,60***	1,12	6,94
Glu + Gln	-0,93***	-0,05	6,53	0,05
Proline	-0,81***	-0,30	4,98	1,67
Glycine	-0,98***	-0,02	7,21	0,01
Alanine	-0,99***	-0,03	7,49	0,02
Citrulline	-0,91***	-0,24	6,32	1,11
Valine	0,27	-0,68***	0,55	8,68
Cystine	-0,06	0,98***	0,03	18,31
Methionine	-0,18	0,97***	0,25	17,78
Isoleucine	-0,91***	-0,32	6,21	1,99
Leucine	-0,98***	-0,01	7,27	0,00
Tyrosine	-0,10	0,93***	0,07	16,49
Phenylalanine	-0,74***	0,58***	4,15	6,51
Tryptophane	-0,86***	-0,29	5,63	1,65
Ornithine	-0,98***	0,15	7,20	0,43
Lysine	-0,98***	0,14	7,21	0,38
Histidine	-0,72***	0,52**	3,93	5,06
Arginine	-0,94***	-0,03	6,65	0,02
	Собственные значения (eigenvalues, $\lambda_j$ ) PC		Дисперсия, объясненная PC (%)	
	13,20	5,25	60,01	23,87

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

По первой главной компоненте (PC1), на которую приходится 60,01% общей дисперсии данных, наиболее значимо пространственно удалены группы молодые и взрослых особей МП. С PC1 очень сильно коррелируют аминокислоты, чей вклад в возрастные различия превышает 6,20% – таурин, глутаминовая кислота и глутамин, глицин, аланин, цитруллин, изолейцин, лейцин, орнитин, лизин, аргинин ( $p < 0,001$ ) (рис. 5.5.15, табл. 5.5.2).

Вторая главная компонента (PC2), на которую приходится 23,87% общей дисперсии данных, пространственно разделяет трех- и пятимесячных особей *H. verbana* от остальных возрастных групп МП. Наибольший вклад в PC2, более 5,05%, вносят цистеин, метионин, фенилаланин, гистидин, максимальные концентрации которых отмечены у трехмесячных пиявок, а также треонин и тирозин, для которых характерна невысокая возрастная вариабельность (рис. 5.5.15, табл. 5.5.2).

Поскольку суммарные концентрации свободных АК в тканях медицинских пиявок различных возрастных групп показали существенные различия, целесообразно было рассмотреть динамику **процентного содержания** отдельных свободных АК и основных метаболических групп (рис. 5.5.16-5.5.17).

Установлено, что рост и развитие медицинских пиявок в гирудокультуре сопровождается значительным ростом в их тканях процентного содержания незаменимых АК: треонина, валина, метионина и обвальным падением – изолейцина, лейцина, триптофана, лизина и аргинина (рис. 5.5.16).

Из заменимых аминокислот наибольшее снижение характерно для процентного содержания глутаминовой кислоты и глутамина, пролина и глицина на фоне существенного роста аспарагиновой кислоты, аланина, цистеина, тирозина (рис. 5.5.16).

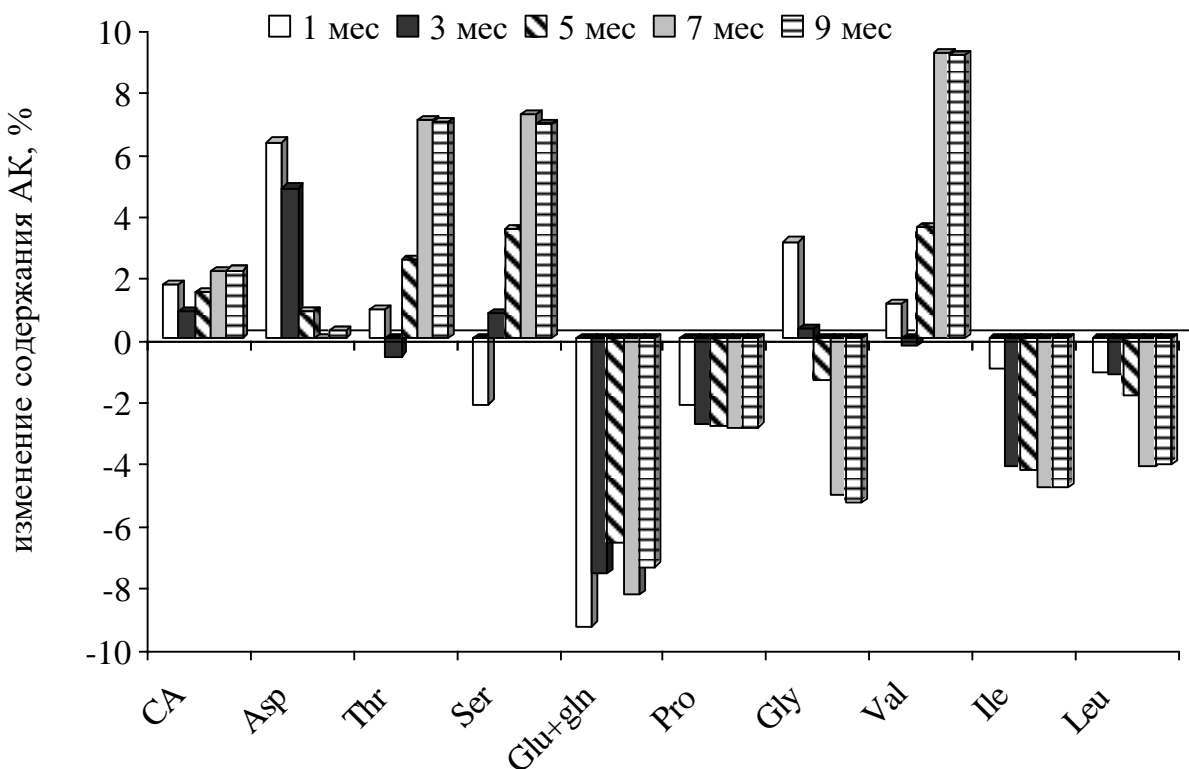
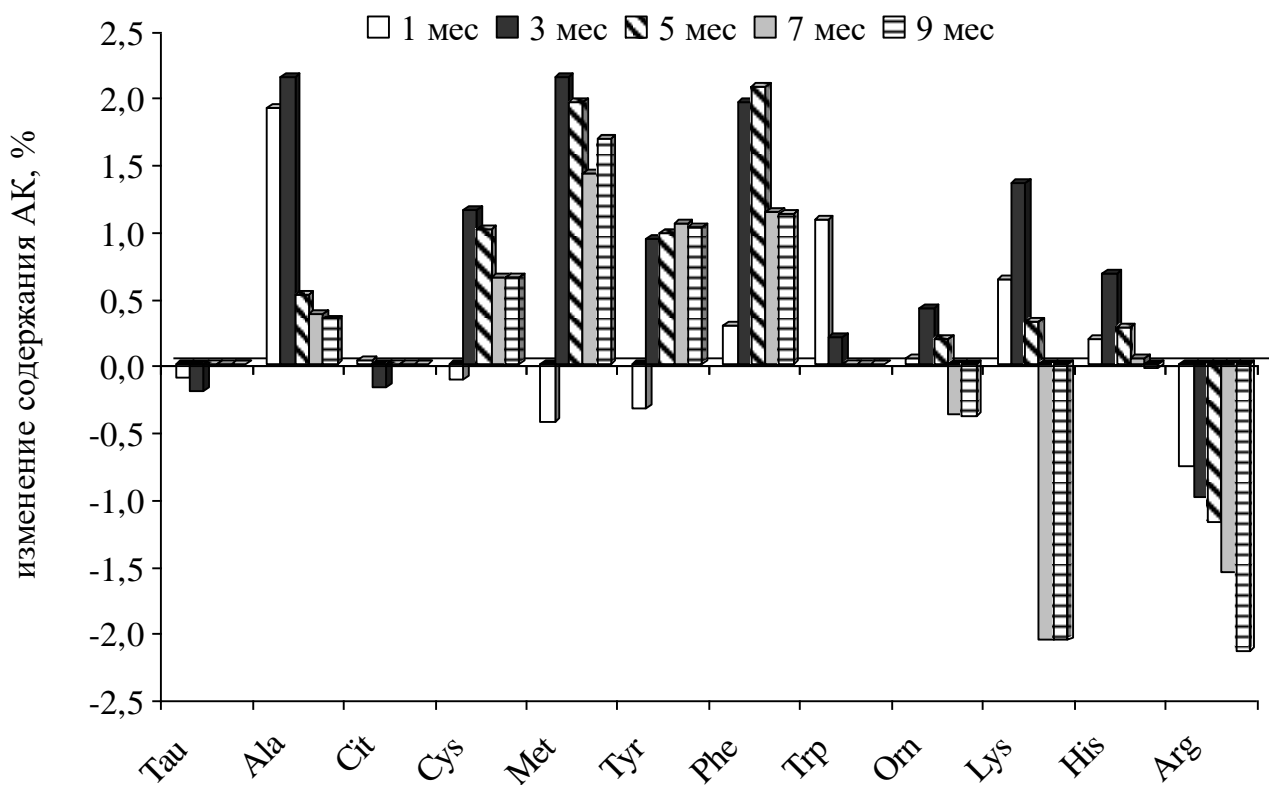


Рисунок 5.5.16 – Изменение процентного содержания (относительно контроля) свободных аминокислот (% от суммарного фонда АК) в тканях аптечной пиявки *H. verbana* при ускоренном росте в гирудокультуре

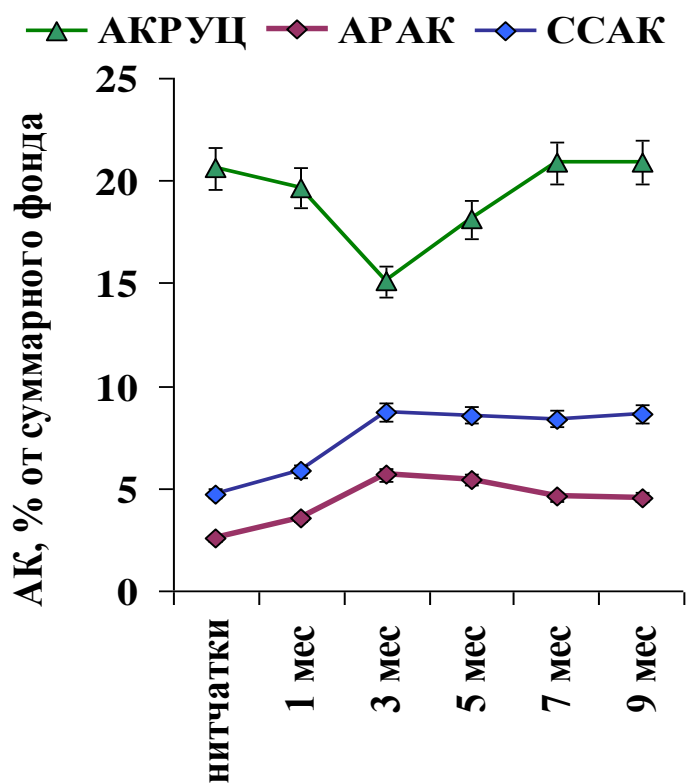
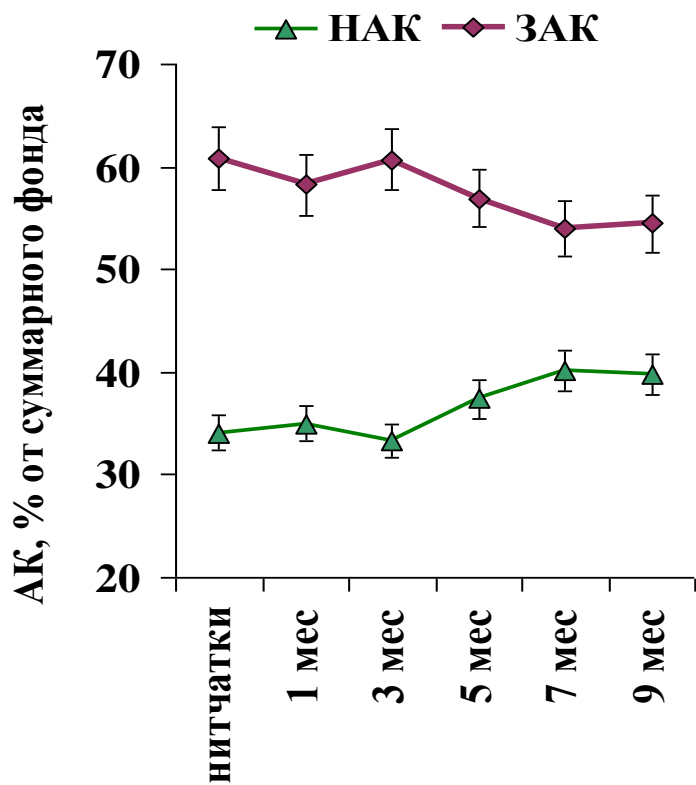


Рисунок 5.5.17 – Возрастная динамика процентного содержания метаболических групп аминокислот в тканях *H. verbana*

Относительно возрастной динамики процентного содержания основных метаболических групп необходимо отметить значимое падение фонда ЗАК и существенный рост НАК, АРАК и ССАК ( $p < 0,05$ ) (рис. 5.5.17). Показано, что соотношение НАК/ЗАК в онтогенезе аптечной пиявки *H. verbana* растет, а показатели индикатора зрелости (ИЗ) – падают (рис. 5.5.18). Необходимо отметить стабилизацию процентного содержания основных метаболических групп АК у взрослых особей, из чего можно заключить, что формирование аминокислотного спектра тканей медицинских пиявок в гирудокультуре происходит уже в семимесячном возрасте.

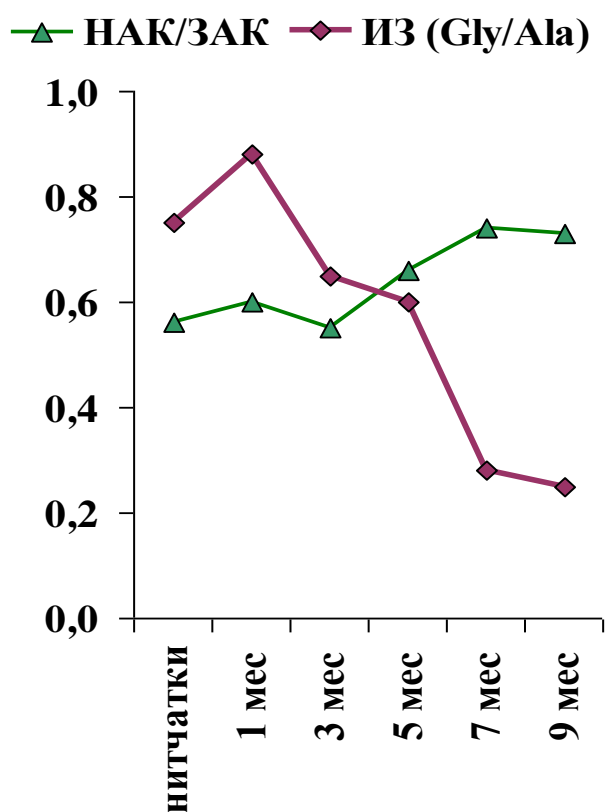


Рисунок 5.5.18 – Возрастная динамика индекса зрелости в тканях медицинской пиявки *H. verbana* в гирудокультуре

Выявлены статистически значимые корреляционные связи между процентным содержанием большинства аминокислот и их возрастом (табл. 5.5.3).

Таблица 5.5.3 – Корреляционные связи между процентным содержанием свободных аминокислот в тканях *H. verbana* и их возрастом

АК	$r_s$	$p$
Cysteic Acid	0,78	0,000
Taurine	-0,93	0,000
Aspartic Acid	-0,47	0,009
Threonine	0,79	0,000
Serine	0,89	0,000
Glutamic Acid + Gln	-0,87	0,000
Proline	-0,78	0,000
Glycine	-0,86	0,000
Citrulline	-0,89	0,000
Valine	0,79	0,000
Cystine	0,39	0,031
Methionine	0,48	0,007
Isoleucine	-0,92	0,000
Leucine	-0,94	0,000
Tyrosine	0,71	0,000
Phenylalanine	0,47	0,009
Tryptophan	-0,75	0,000
Ornithine	-0,49	0,006
Lysine	-0,56	0,001
Arginine	-0,98	0,000
НАК	0,87	0,000
ЗАК	-0,85	0,000
АРАК	0,55	0,002
ССАК	0,79	0,000

Из таблицы видно, что в тканях особей *H. verbana* при росте и развитии в гирудокультуре повышается процентное содержание цистеиновой кислоты, треонина, серина, валина, цистеина, метионина, тирозина, фенилаланина, пулов НАК, АРАК, ССАК и снижается – таурина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты и глутамина, пролина, глицина, цитруллина, изолейцина, лейцина, триптофана, орнитина, лизина, аргинина и фонда ЗАК ( $p < 0,05$ ).



Сравнительная оценка возрастных особенностей аминокислотного спектра тканей челюстных пиявок различных эколого-физиологических групп (кровососы и хищники, природные и искусственно выращенные особи медицинских пиявок) выявили общебиологические закономерности участия свободных АК в онтогенезе гирудиниид: в тканях взрослых особей, по сравнению с молодью, характерен более низкий уровень аминокислотного обмена, следовое содержание таурина и триптофана.

Проведенные исследования показали, что у медицинских пиявок *H. medicinalis* и *H. verbana*, выращенных в равных условиях одной биофабрики («СибМед-Пиявка», Алтайский край) аминокислотный состав тканей, как и у природных особей, зависит от видовой принадлежности особей. Важно, что при стандартизированном режиме технологии гирудокультуры различных биофабрик видоспецифичность аминокислотного состава тканей медицинских пиявок сохраняется и в региональном аспекте.

Аптечные пиявки из гирудокультуры отличаются от особей-производителей из природных популяций более высокими концентрациями в тканях практически всех свободных АК, за исключением цистеиновой кислоты и аланина. Несмотря на экстремальный характер условий искусственного воспроизводства, выращенные особи аптечной пиявки *H. verbana* сохраняют в тканях оптимальный баланс АК. В контролируемых условиях искусственного разведения у аптечных пиявок формируются секрет слюнных желез, обильнее насыщенный свободными аминокислотами, нежели слюна особей из природных популяций.

Возрастная изменчивость аминокислотного спектра тканей медицинской пиявки *H. verbana* объективно отражает ее потребности в приоритетных нутриентах на разных этапах онтогенеза в гирудокультуре. Рост и развитие аптечной пиявки *H. verbana* сопровождается снижением показателей индикатора зрелости (глицин/аланин) от 0,75 (нитчатки) до 0,25 (взрослые девятимесячные особи).

## **ГЛАВА 6. ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО ГОЛОДАНИЯ НА ФОРМИРОВАНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СПЕКТРА ТКАНЕЙ МЕДИЦИНСКИХ ПИЯВОК**

Для жизненных циклов гидробионтов характерны периоды длительного голодания, которые являются естественной фазой, генетически запрограммированным и отрегулированным поведенческим феноменом. Стратегия переживания этих периодов очень разнообразна у отдельных видов пойкилотермных, которые прибегают к трате периферических белков (Савина и др., 1990). Было установлено, что особенности содержания свободных аминокислот в мышечной ткани промысловых видов рыб связаны с их эволюционным статусом и эколого-физиологической спецификой, в том числе и с длительным голоданием (Джаббаров, 2006). Способность к длительному голоданию пиявок является одной из адаптаций к неблагоприятным факторам среды (недостаток кормовых ресурсов, пересыхание временных водоемов, сезонное снижение температуры и т.д.), приобретенных в ходе эволюционного развития (Лукин, 1976). В мировой литературе недостаточно данных об уровне содержания в тканях челюстных пиявок таких важных БАС, как свободные аминокислоты, особенно при различных физиологических состояниях. Формирование аминокислотного пула тканей тесно связано с метаболизмом белков, углеводов, липидов, реакциями цикла трикарбоновых кислот, 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 (Нефедов, 1993).

### **6.1. Содержание свободных аминокислот в тканях сытых и голодных особей *H. verbana* и *H. sanguisuga* из природных популяций**

В данном разделе главы приведены результаты лабораторного эксперимента по влиянию хронического голодания на состояние аминокислотного спектра тканей медицинских пиявок *H. verbana* из природных популяций (р. Челбас, Красно-

дарский край) и большой ложноконской пиявки *H. sanguisuga* (вдхр. Белоярское, Свердловская обл.).

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 суммарные концентрации свободных АК повышаются в 1,8 раз, по сравнению с контролем, ( $p < 0,001$ ) (табл. 6.1.1).

Аминокислотный фонд голодных особей медицинских пиявок повышен за счет семи АК: это – заменимые аспарагиновая кислота (в 5,3 раз), серин (в 2,9), глутаминовая кислоты и глутамин (в 2,0), аланин (в 1,2) и незаменимые АК изолейцин (в 1,6) и гистидин (в 1,4) ( $p < 0,001$ ).

Весомый вклад в высокий уровень аминокислотного обмена у голодающих в течение семи месяцев медицинских пиявок вносит  $\gamma$ -аминомасляная кислота, стимулирующая дыхательную активность тканей, концентрации которой повышаются в тканях опытных особей в 26,7 раз ( $p < 0,001$ ). Наибольший обвал концентраций в тканях голодных особей *H. verbana* характерен для: цистеиновой кислоты (в 2,3 раз), пролина (в 5,6), орнитина (в 2,7) и аргинина (в 4,4) ( $p < 0,001$ ).

Хроническое голодание вызывает существенное (в 1,4 раз) падение пула незаменимых АК в тканях *H. verbana* ( $p < 0,001$ ), в связи с чем показатель НАК/ЗАК снижается в три раза (табл. 6.1.1). Одновременно повышается показатель индекса Фишера (АКРУЦ/АРАК), который вкупе с очень высокими концентрациями накопленного аммиака ( $9,46 \pm 1,64$  мкмоль/100г) указывают на эндогенный токсикоз в организме медицинских пиявок, содержащихся семь месяцев без пищи.

При рассмотрении процентного содержания свободных АК в тканях опытных пиявок *H. verbana* показана ключевая роль аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты и глутамина, серина в поддержании жизнеспособности опытных животных в критические сроки голодания (табл. 6.1.2).

Таблица 6.1.1 – Динамика концентраций (мкмоль/100г) свободных аминокислот в тканях аптечной пиявки *H. verbana* из природных популяций при хроническом голодании

АК, мкмоль/100г	Контроль n = 10	Голодание n = 10	<i>p</i>
Cysteic Acid	11,90±0,38	5,18±0,16	0,000
Aspartic Acid	78,59±0,78	415,32±4,13	0,000
Threonine	27,19±0,79	21,51±0,62	0,000
Serine	37,39±1,04	108,29±3,00	0,000
Glu +Glu	183,64±3,40	376,37±6,98	0,000
Proline	37,91±0,89	6,76±0,16	0,000
Glycine	62,71±1,72	36,60±1,00	0,000
Alanine	81,61±1,73	100,59±2,13	0,000
Valine	30,80±1,39	21,90±0,99	0,000
Cysteine	2,63±0,06	1,24±0,03	0,000
Methionine	3,53±0,05	2,01±0,03	0,000
Isoleucine	5,73±0,29	8,97±0,45	0,000
Leucine	33,70±1,57	19,90±0,93	0,000
Tyrosine	8,21±0,32	3,67±0,14	0,000
Phenylalanine	11,30±0,53	4,87±0,23	0,000
GABA	2,16±0,11	57,71±0,65	0,000
Ornithine	20,12±0,70	7,55±0,26	0,000
Lysine	20,90±0,82	15,20±0,60	0,000
Histidine	2,55±0,08	3,62±0,11	0,000
Arginine	3,44±0,04	0,78±0,01	0,000
Фонд АК	666,00±4,51	1218,04±9,98	0,000
НАК	139,14±3,44	98,76±2,35	0,000
ЗАК	492,68±4,11	1048,84±9,99	0,000
НАК/ЗАК	0,28	0,09	–
АКРУЦ	70,23±2,84	50,77±2,06	0,000
АРАК	19,51±0,79	8,54±0,34	0,000
ИФ	3,59	5,94	–
ССАК	18,06±0,37	8,43±0,16	0,000

Таблица 6.1.2 – Динамика содержания (% от фонда) свободных аминокислот в тканях аптечной пиявки *H. verbana* из природных популяций при хроническом голодании

АК, % от фонда	Контроль n = 10	Голодание n = 10	<i>p</i>
Cysteic Acid	1,79±0,06	0,43±0,02	0,000
Aspartic Acid	11,80±0,10	34,10±0,19	0,000
Threonine	4,08±0,12	1,77±0,06	0,000
Serine	5,61±0,14	8,89±0,23	0,000
Glu +Glu	27,57±0,47	30,89±0,44	0,000
Proline	5,69±0,14	0,56±0,01	0,000
Glycine	9,42±0,26	3,01±0,09	0,000
Alanine	12,26±0,27	8,26±0,16	0,000
Valine	4,62±0,21	1,80±0,08	0,000
Cysteine	0,39±0,01	0,10±0,01	0,000
Methionine	0,53±0,01	0,16±0,01	0,000
Isoleucine	0,86±0,04	0,74±0,04*	0,894
Leucine	5,05±0,22	1,63±0,07	0,000
Tyrosine	1,23±0,04	0,30±0,01	0,000
Phenylalanine	1,70±0,07	0,40±0,02	0,000
GABA	0,33±0,02	4,74±0,05	0,000
Ornithine	3,02±0,10	0,62±0,02	0,000
Lysine	3,14±0,11	1,25±0,05	0,000
Histidine	0,38±0,01	0,30±0,01*	0,470
Arginine	0,52±0,01	0,06±0,00	0,000
НАК	20,89±0,46	8,11±0,20	0,000
ЗАК	73,98±0,50	86,10±0,25	0,000
НАК/ЗАК	0,28	0,09	–
АКРУЦ	10,54±0,40	4,17±0,17	0,000
АРАК	2,93±0,11	0,70±0,03	0,000
ИФ	3,59	5,96	–
ССАК	2,71±0,06	0,69±0,02	0,000

Примечание: \* – статистически значимые различия между группами отсутствуют (Tukey HSD test,  $p > 0,05$ )

Суммарное процентное содержание этих важнейших гликогенных аминокислот в контроле составляет 45,0%, а в процессе голодания достигает 73,9%. В тканях голодных особей *H. verbana* наибольший рост процентного содержания характерен для аспарагиновой кислоты – в 2,9 раз (табл. 6.1.2).

После семимесячного вынужденного воздержания от пищи в тканях пиявки *H. verbana* кратно снижается процентное содержание важнейших заменимых АК: пролина (в 10,2 раз), глицина (в 3,1), аланина (в 1,5), цистеина (в 3,9) и тирозина (в 4,1) ( $p < 0,001$ ). Пул незаменимых АК у сытых пиявок составляет 20,9%, у голодных – 8,1% от суммарного фонда. Такое обеднение фонда незаменимых АК обусловлено существенным падением процентного содержания всех девяти изучаемых незаменимых АК. Наибольший спад процентного содержания, более чем в три раза, характерен для метионина, лейцина, фенилаланина и аргинина ( $p < 0,001$ ) (табл. 6.1.2).

Для изучения трофической специфики аминокислотного статуса голодающих особей челюстных пиявок, авторами была проведена оценка аминокислотного спектра тканей больших ложноконских пиявок, содержащихся в лабораторных условиях без пищи пять месяцев (далее наступала массовая гибель опытных особей). Показано, что после длительного голодания особи *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, как и у медицинских пиявок, значимо повышались суммарные концентрации свободных АК ( $1382,62 \pm 71,81$  мкмоль/100г), в 1,5 раз, по сравнению с сытыми особями ( $927,60 \pm 53,4$  мкмоль/100г), что вызвано катаболизмом мышечных белков ( $p < 0,001$ ) (рис. 6.1.1).

Основной вклад в наблюдаемое повышение суммарных концентраций АК вносят цистеиновая и аспарагиновая кислоты, содержание которых возросло в период вынужденной голодовки *H. sanguisuga* в 8,2 и 7,0 раз, соответственно ( $p < 0,001$ ). Значимо, в 4,4 раз повысились концентрации незаменимой аминокислоты валина, которая может использоваться в качестве дополнительного источника энергии при эндогенном питании, и в данном случае, вероятно, замещает замени-

мую аминокислоту аланин, обвальное снижение которой (в 6,5 раз) наблюдалось в эксперименте ( $p < 0,001$ ) (рис. 6.1.1).

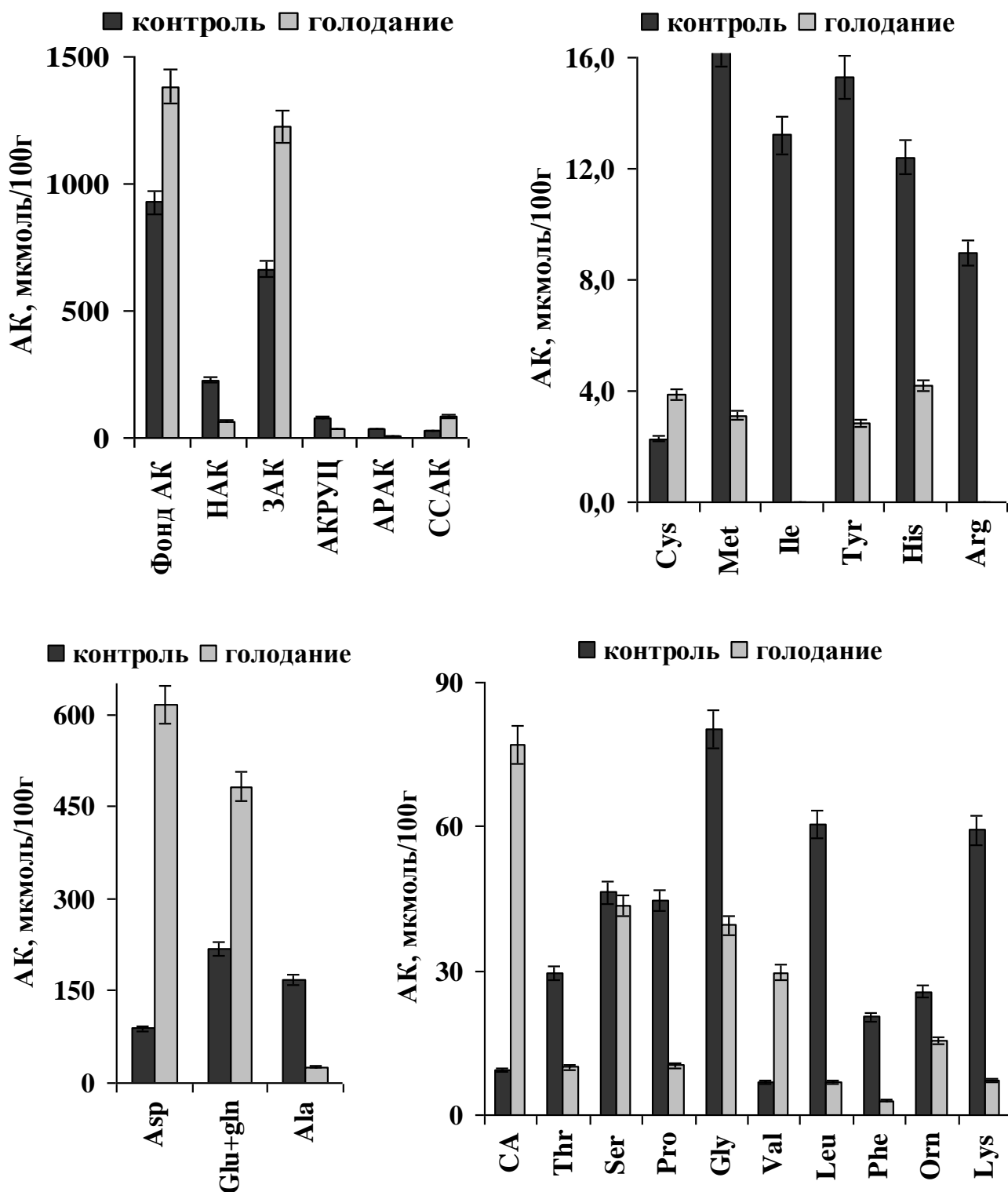


Рисунок 6.1.1 – Влияние хронического голодания на уровень содержания свободных АК (μмоль/100г) в тканях хищной пиявки *H. sanguisuga*

В период вынужденного голодания ложноконских пиявок, помимо указанных аминокислот, выявлено существенное повышение заменимых АК: глутаминовой кислоты и глутамина (в 2,2) и цистеина (в 1,7) ( $p < 0,001$ ). Для остальных изучаемых АК отмечено значимое, по сравнению с сытыми особями, снижение их содержания в тканях ( $p < 0,001$ ) (рис. 6.1.1). Так, максимальный расход, до полной утилизации, в период голодовки *H. sanguisuga* претерпевают незаменимые аминокислоты изолейцин и аргинин. Отмечено обвальное снижение незаменимых АК: метионина (в 5,3 раз), лейцина (в 9,0), фенилаланина (в 6,8), лизина (в 8,4), треонина (в 2,9) и гистидина (в 3,0) ( $p < 0,001$ ). В итоге, суммарный пул незаменимых АК тканей опытных гирудинид после пятимесячного голодания, на фоне повышения аминокислотного фонда, сократился в 3,6 раз (от  $227,40 \pm 17,01$  до  $63,72 \pm 3,36$  мкмоль/100г) ( $p < 0,001$ ).

Соответственно, соотношение показателя НАК/ЗАК критически уменьшилось от 0,34 до 0,05, что, возможно, является одной из основных причин начала массовой гибели животных. После пяти месяцев голодания, в организме ложноконских пиявок отмечен эндогенный токсикоз, о чем свидетельствует почти трехкратное повышение антитоксического индекса Фишера от 2,25 до 6,14 (ИФ = АКРУЦ/АРАК). Об отравлении экспериментальных животных накопившимися в их тканях токсичными продуктами метаболизма говорят и высокие концентрации аммиака, которые повысились при катаболических процессах, вследствие продолжительного голодания, в девять раз: от  $0,67 \pm 0,09$  до  $6,06 \pm 1,02$  мкмоль/100г ( $p < 0,001$ ).

Выявленный дисбаланс азотистого обмена у опытных животных, когда белковые резервы не удовлетворяют жизненные потребности организма, наглядно показывает сравнительная оценка процентного соотношения заменимых и незаменимых АК в тканях сытых и голодных особей большой ложноконской пиявки. Так, если в норме суммарное содержание таких важнейших гликогенных АК, как аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота и аланин составляет 51,5%, то после хронического голодания их содержание повышается до 80,0% – доля только аспа-



рагиновой кислоты достигает 44,7%, при одновременном падении ключевого источника глюкозы – аланина от 18,3% до 1,9% ( $p < 0,001$ ).

Нарушение азотистого равновесия в тканях голодных особей усугубляет, наблюдаемое в опыте, многократное снижение процентного содержания гликогенных АК – пролина от 4,8% до 0,8%, глицина от 8,7% до 2,9% и ароматической АК тирозина от 1,6% до 0,2% от суммарного фонда АК ( $p < 0,001$ ). При вынужденной голодовке особей *H. sanguisuga* неизменным остается только процентное содержание цистеина в тканях. Из девяти незаменимых АК в тканях голодных пиявок повышается только доля валина от 0,7% до 2,2%, которое едва ли компенсирует обвальное падение процентного содержания остальных незаменимых АК ( $p < 0,001$ ).

Таким образом, общими закономерностями для хищных и кровососущих гирудинид в критические сроки голодания являются: существенное повышение суммарных концентраций свободных аминокислот и обвальное падение пула незаменимых АК в их тканях.

## **6.2. Влияние хронического голодания на аминокислотный состав тканей медицинской пиявки *H. verba* из гирудокультуры**

Изучение уровня содержания биологически активных соединений, в частности свободных аминокислот, 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 приоритетных аминокислот, содержащихся в тканях пиявок, при производстве лекарственных препаратов, пищевых биологических добавок, косметологических средств.

Наши исследования показали, что хроническое голодание (семь месяцев) оказывает существенное влияние на аминокислотный обмен в тканях *H. verbana* из природных популяций. Пиявки, выращенные на биофабрике, по нашим наблюдениям, способны голодать намного дольше, чем особи из естественных водоемов, более 12 месяцев. Авторы располагали достаточно большим количеством особей *H. verbana* из гирудокультуры, что позволило детально изучить картину динамики свободных аминокислот в тканях медицинских пиявок, голодающих три, пять, семь, девять и двенадцать месяцев (Ковальчук и др., 2011).

Результаты однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) показали, что хроническое голодание оказывает существенное влияние, как на содержание отдельных аминокислот в тканях аптечных пиявок, так и на их суммарный фонд (табл. 6.2.1, рис. 6.2.1-6.2.2). Для суммарного фонда АК в тканях голодающих особей *H. verbana* выявлена фазовая динамика ( $p < 0,001$ ) (рис. 6.2.1).

Обнаружено, что на всех этапах голодания в тканях медицинских пиявок значимо возрастают, относительно сытых особей, суммарные концентрации свободных АК ( $F_{4;20} = 850,22$ ;  $p = 0,000$ ), достигая максимальных значений после пяти месяцев голодания (рис. 6.2.1, табл. 6.2.1).

Многokратное повышение суммарных концентраций в тканях медицинских пиявок обусловлено преобладанием катаболических процессов. При этом наблюдается значительная динамика концентраций ЗАК и стабильный уровень пулов НАК и АКРУЦ (3-7-й месяцы опыта), что представляется существенным фактором поддержания гомеостаза голодающих особей (рис. 6.2.1-6.2.4, табл. 6.2.1).

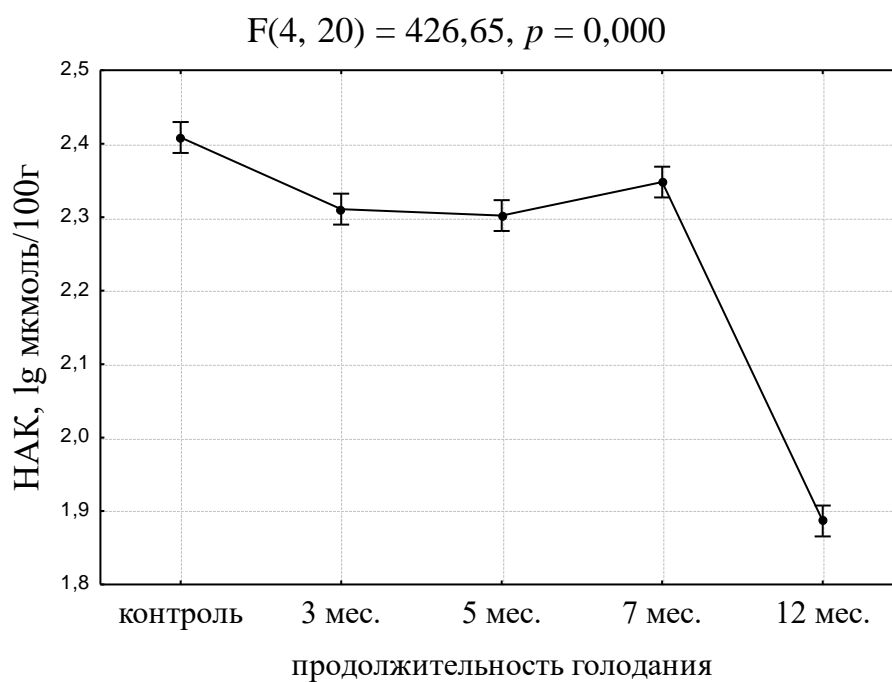
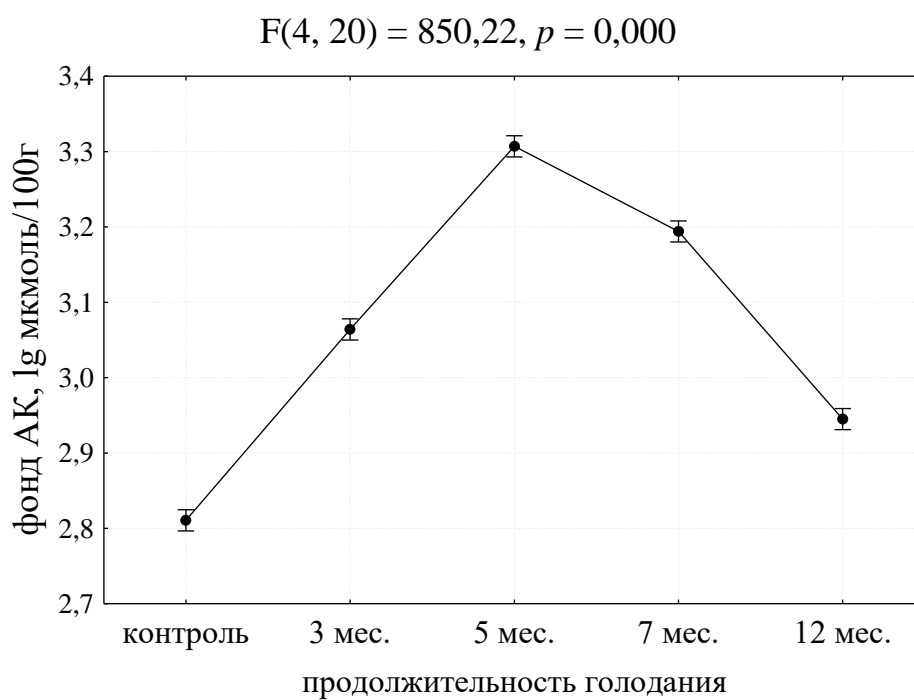


Рисунок 6.2.1 – Динамика концентраций суммарного фонда и пула незаменимых аминокислот ( $\mu\text{g}$  мкмоль/100г) в тканях аптечной пиявки *H. verbana* из гирудокультуры при хроническом голодании (ANOVA)

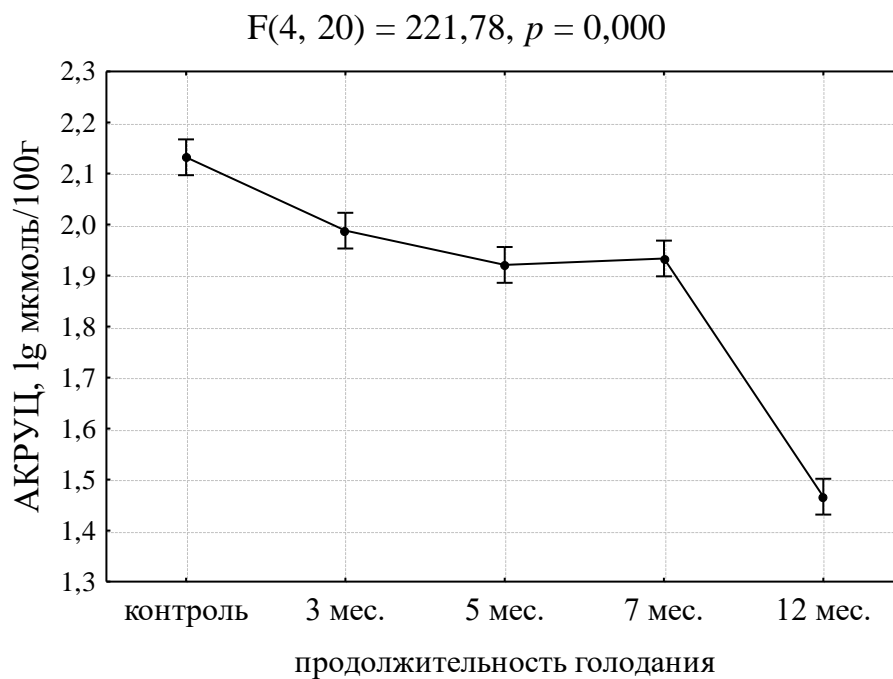
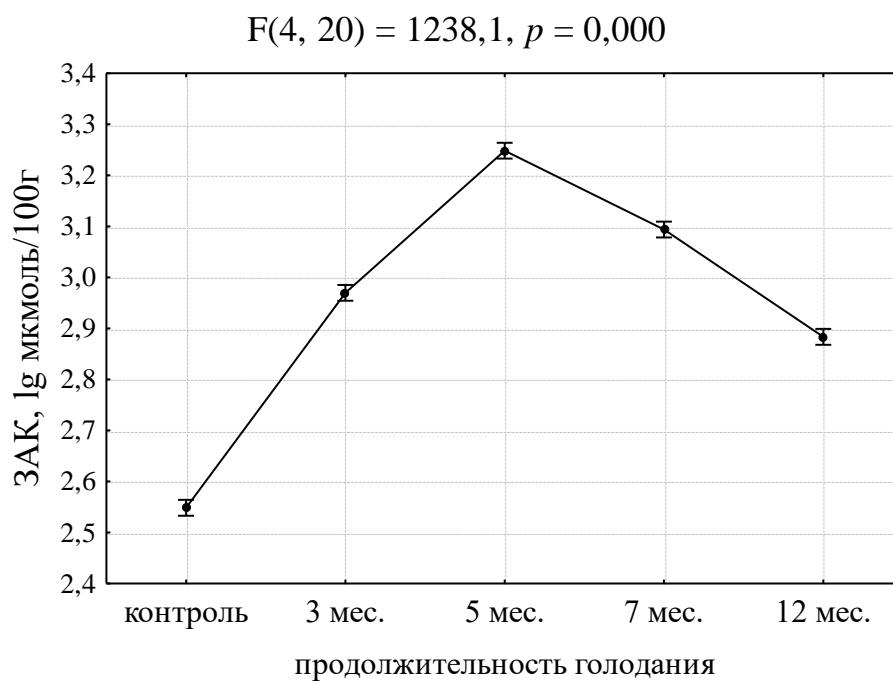


Рисунок 6.2.2 – Динамика концентраций суммарного пула заменимых АК и АК с разветвленной углеродной цепью (lg мкмоль/100г) в тканях аптечной пиявки *H. verbana* из гирудокультуры при хроническом голодании (ANOVA)

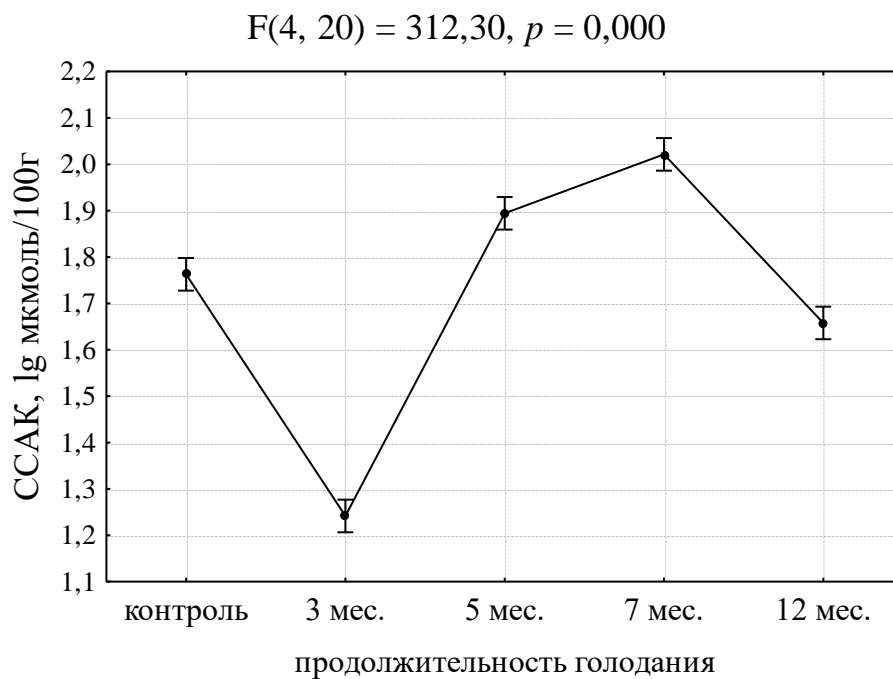
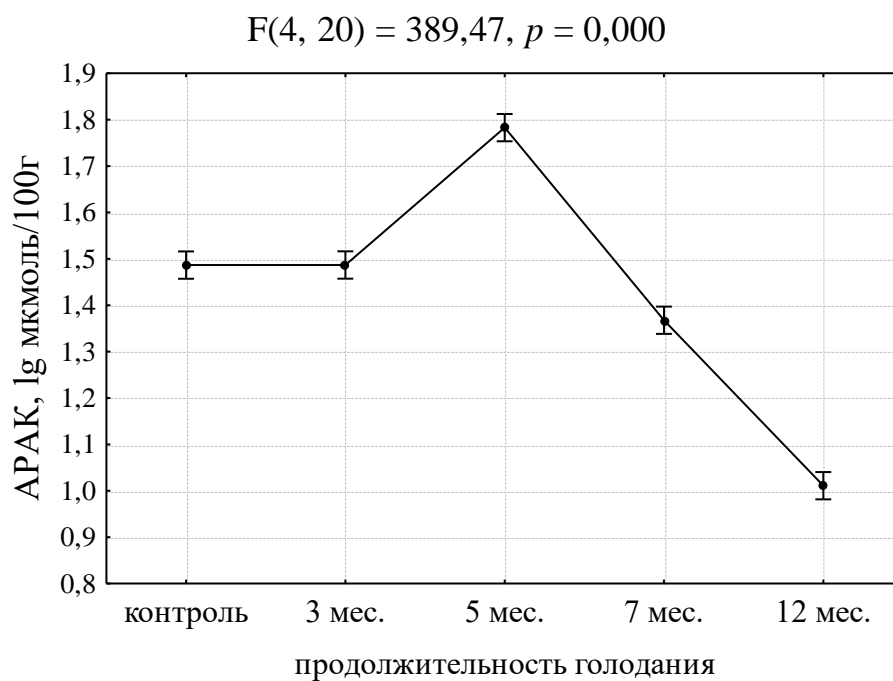


Рисунок 6.2.3 – Динамика концентраций ароматических и серосодержащих аминокислот ( $\mu\text{г}$  мкмоль/100г) в тканях аптечной пиявки *H. verbana* из гирудокультуры при хроническом голодании (ANOVA)

Таблица 6.2.1 – Динамика концентраций свободных аминокислот (мкмоль/100г) в тканях *H. verbana* при хроническом голодании

АК мкмоль/100г	контроль	Продолжительность голодания			
		3 месяца	5 месяцев	7 месяцев	12 месяцев
Cysteic Acid	31,39±1,30	5,49±0,40	36,93±0,93*	73,90±4,76	28,59±0,56*
Aspartic Acid	4,93±0,52	278,35±6,41	729,76±23,25	386,47±8,59	271,39±5,03
Threonine	71,54±3,16	46,76±0,77	28,21±0,98	66,54±3,62*	22,24±0,91
Serine	75,79±3,40	69,29±1,62*	62,03±0,92	90,94±5,88	60,16±1,53
Glu +Glu	156,36±3,95	310,53±6,68	682,52±12,12	467,43±7,53	335,53±5,23
Proline	5,41±0,59	21,68±2,10	следы	13,40±1,16	5,57±0,41*
Glycine	19,79±0,98	86,31±1,72	93,36±1,34	131,89±1,70	47,61±2,54
Alanine	71,84±3,26	148,47±3,59	165,09±3,27	131,90±1,77	31,58±0,98
Valine	90,18±2,81	31,72±0,45	39,17±3,85	44,38±3,38	12,31±0,97
Cysteine	6,65±0,43	3,73±0,23	15,32±1,25	7,85±0,59*	7,71±0,47*
Methionine	18,99±0,59	7,39±0,56	25,24±1,30	22,45±1,57*	8,23±0,60
Isoleucine	9,35±0,70	14,17±0,46	20,66±0,71	4,81±0,33	5,75±0,55
Leucine	35,04±1,09	50,44±0,91	22,99±1,26	35,69±1,60*	10,42±0,58
Tyrosine	12,33±0,80	13,34±0,45*	23,99±1,34	10,76±0,69*	4,20±0,28
Phenylalanine	17,35±1,10	16,47±1,07*	35,76±1,30	11,56±0,92	5,09±0,43
Ornithine	6,55±0,52	18,99±0,74	19,97±0,93	26,35±1,01	11,72±0,67
Lysine	10,88±0,85	30,77±0,32	18,55±1,21	30,40±0,90	7,59±0,65
Histidine	0,18±0,01	1,32±0,06	1,16±0,03	0,84±0,01	1,63±0,04
Arginine	1,91±0,07	4,65±0,34	8,21±0,50	5,12±0,45	2,87±0,30
Фонд АК	646,46±14,39	1157,86±5,96	2028,93±45,06	1562,67±17,16	880,20±6,44
НАК	255,42±5,76	203,69±2,90	199,95±6,58	221,79±1,99	76,13±2,20
ЗАК	353,10±9,59	931,69±7,33	1772,08±37,86	1240,63±16,09	763,76±4,25
НАК/ЗАК	0,72	0,22	0,11	0,18	0,10
АКРУЦ	134,56±2,39	96,34±1,47	82,82±4,39	84,88±1,75	28,48±1,67
АРАК	29,69±0,67	29,80±1,44*	59,75±1,64	22,32±0,26	9,29±0,42
ИФ	4,53	3,23	1,39	3,80	3,07
ССАК	57,03±1,84	16,60±1,18	77,49±1,94	104,19±2,99	44,53±1,10

Примечание: \* – статистически значимые различия с контролем отсутствуют,  $p > 0,05$  (Dunnett test, ANOVA)

Для ароматических (АРАК) и серосодержащих (ССАК) аминокислот характерна фазовая динамика с высоким ростом концентраций после пяти месяцев голодания ( $p < 0,001$ ) (рис. 6.2.3, табл. 6.2.1).

Установлено, что хроническое голодание оказывает существенное влияние на уровень содержания всех изучаемых свободных аминокислот в тканях опытных особей аптечной пиявки *H. verbana* ( $p < 0,001$ ) (рис. 6.2.4-6.2.13).

Наибольшая вариабельность характерна для тканевых концентраций цистеиновой кислоты, аспартата, глутамата, пролина, глицина, аланина, гистидина ( $F_{4; 20} > 367,20$ ;  $p < 0,001$ ), наименьшая – для серина, цистеина, метионина, аргинина ( $F_{4; 20} < 86,76$ ;  $p < 0,001$ ) (рис. 6.2.4-6.2.13).

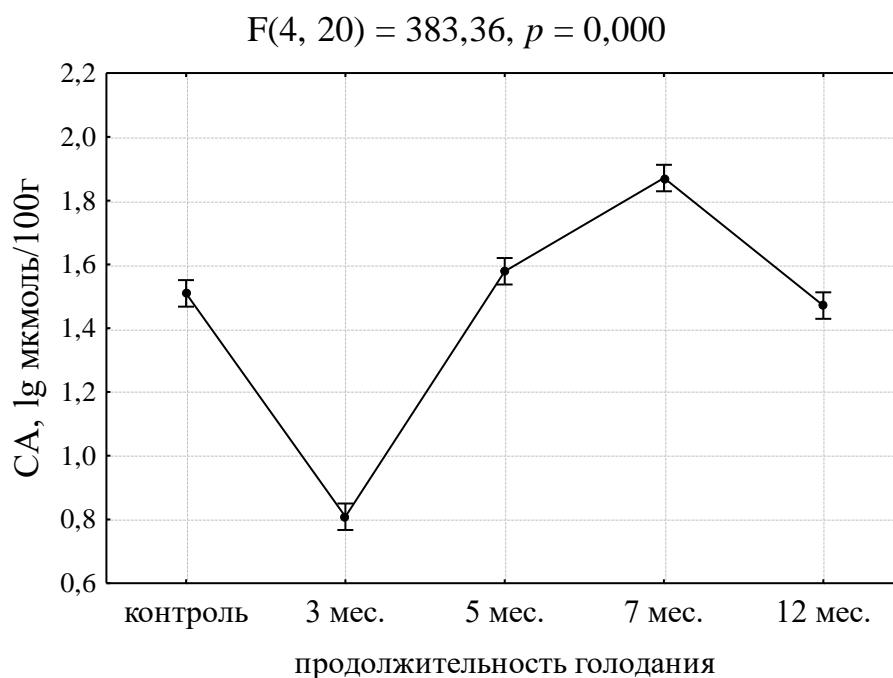


Рисунок 6.2.4 – Динамика концентраций цистеиновой кислоты (lg мкмоль/100г) в тканях аптечной пиявки *H. verbana* из гирудокультуры при хроническом голодании (ANOVA)

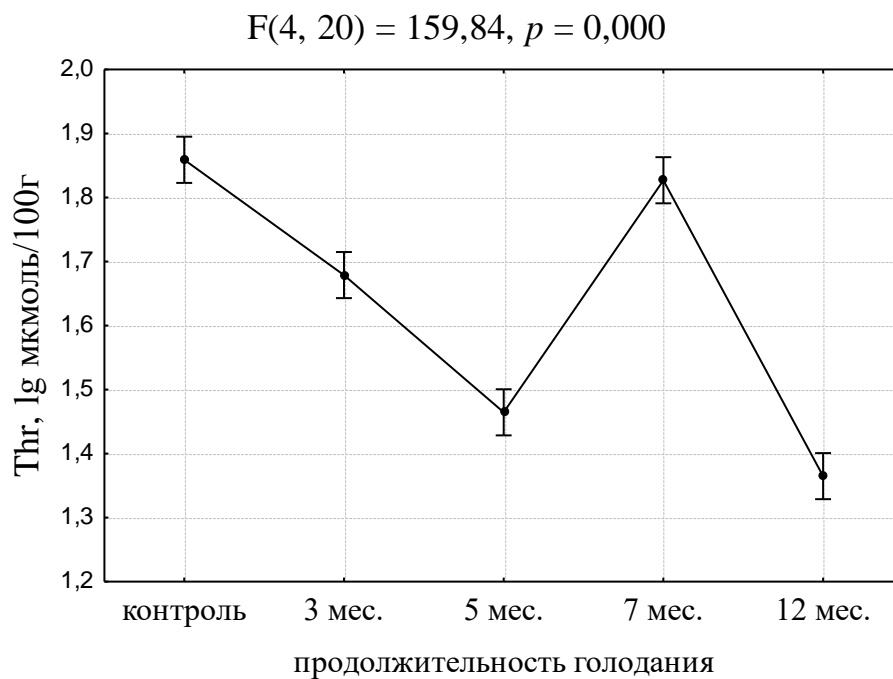
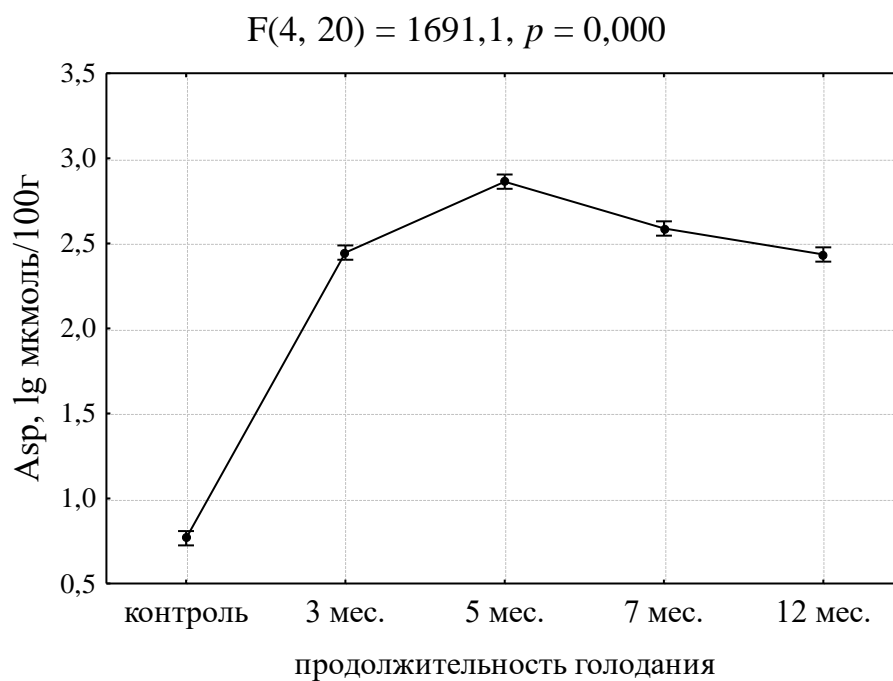


Рисунок 6.2.5 – Динамика концентраций аспарагиновой кислоты и треонина (Ig мкмоль/100г) в тканях аптечной пиявки *H. verbana* из гирудокультуры при хроническом голодании (ANOVA)



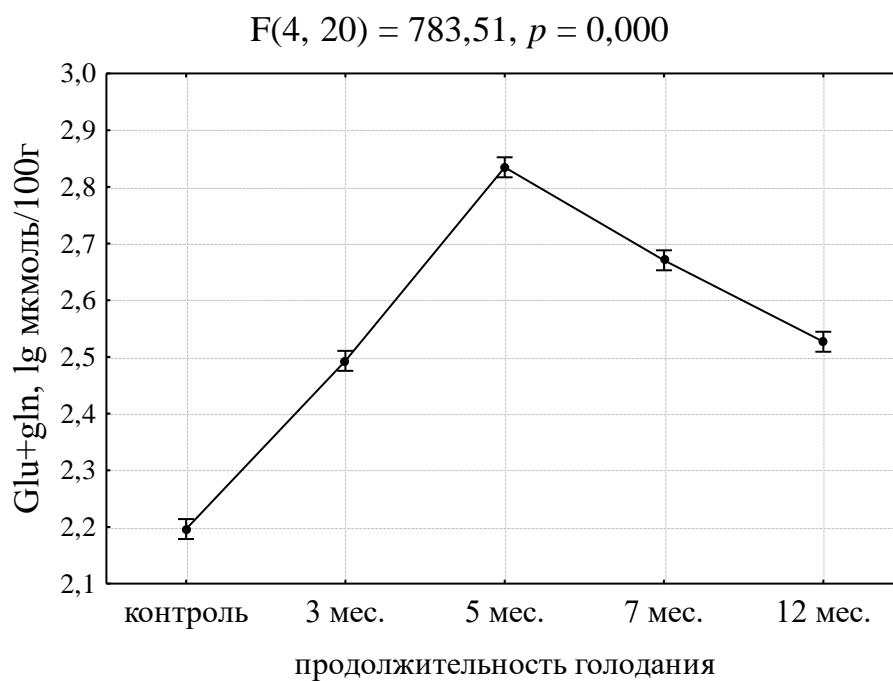
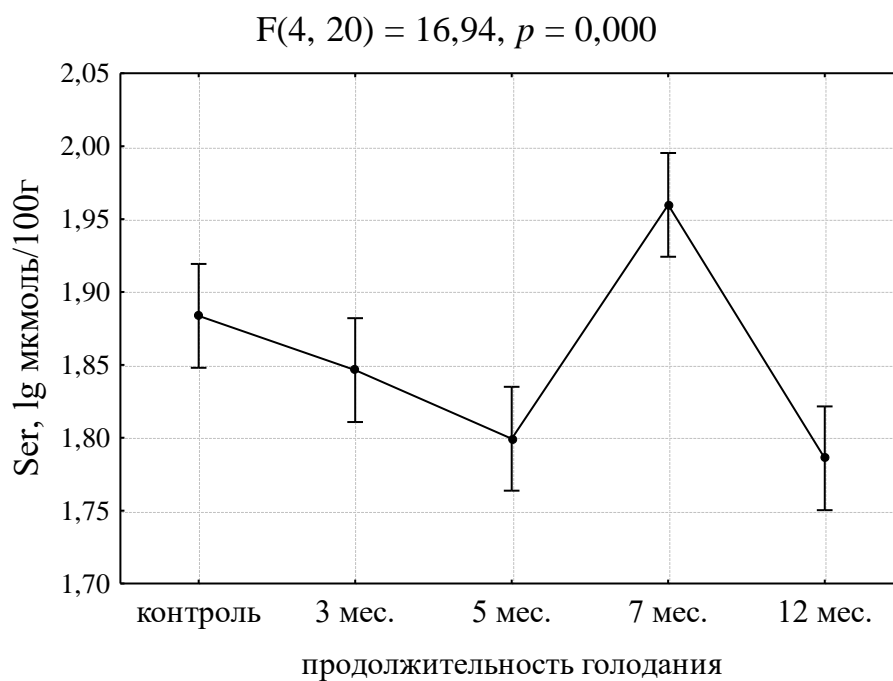


Рисунок 6.2.6 – Динамика концентраций серина, глутаминовой кислоты и глутамина (Ig мкмоль/100г) в тканях аптечной пиявки *H. verbana* из гирудокультуры при хроническом голодании (ANOVA)

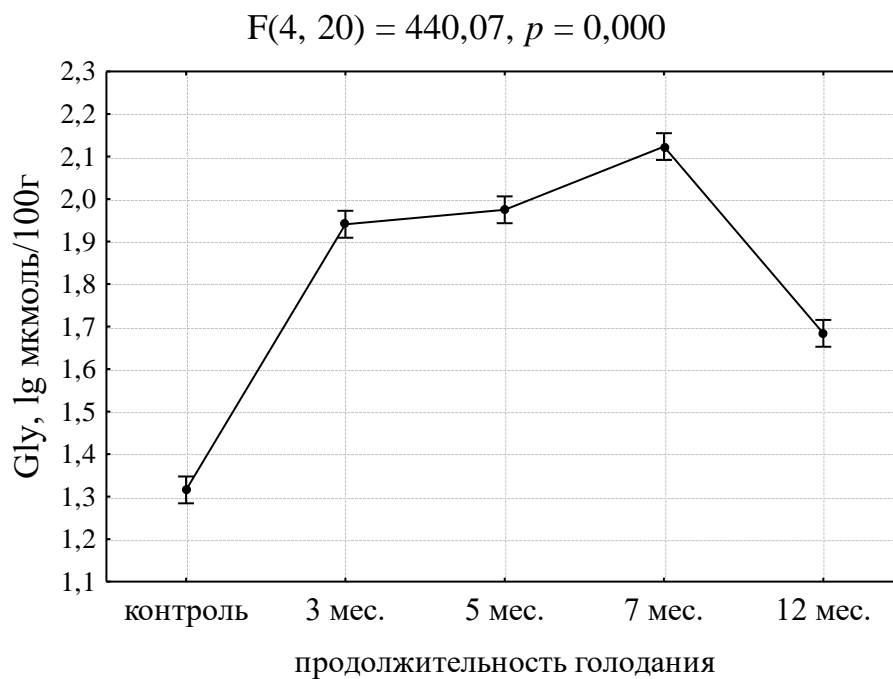
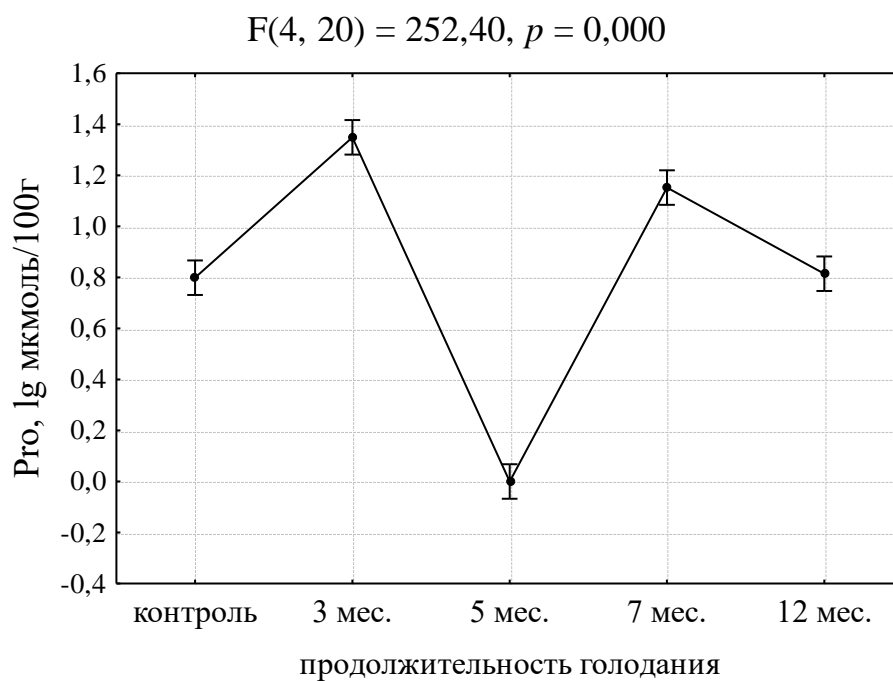


Рисунок 6.2.7 – Динамика концентраций пролина и глицина (lg мкмоль/100г) в тканях аптечной пиявки *H. verbana* из гирудокультуры при хроническом голодании (ANOVA)

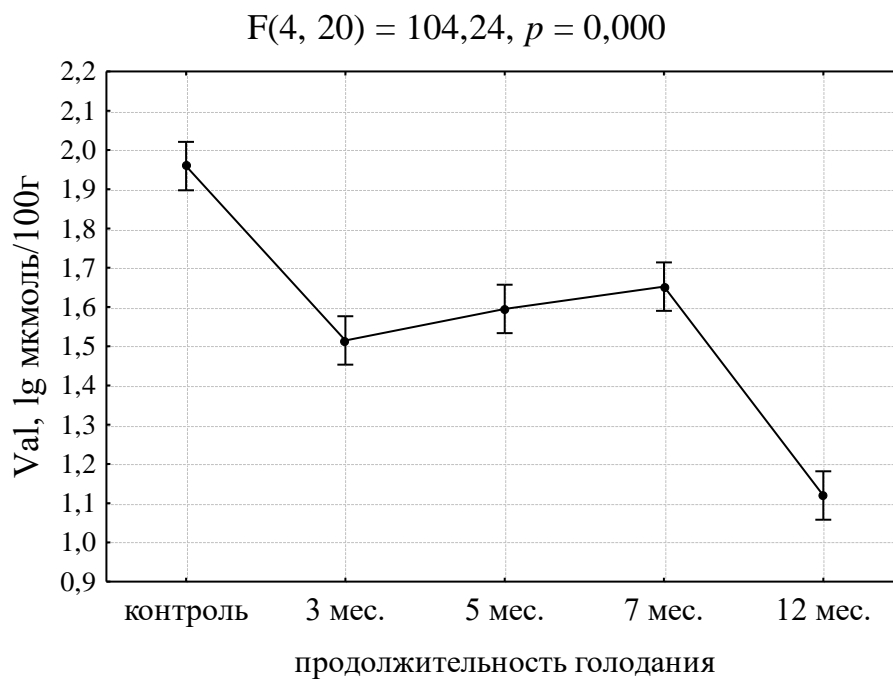
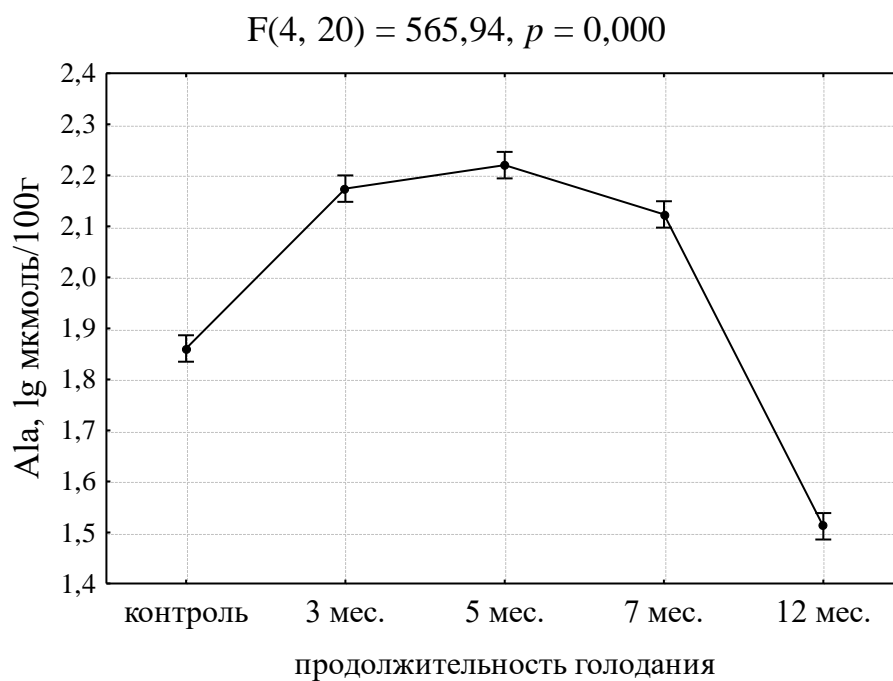


Рисунок 6.2.8 – Динамика концентраций аланина и валина ( $\mu\text{г } \mu\text{моль}/100\text{г}$ ) в тканях аптечной пиявки *H. verbana* из гирудокультуры при хроническом голодании (ANOVA)

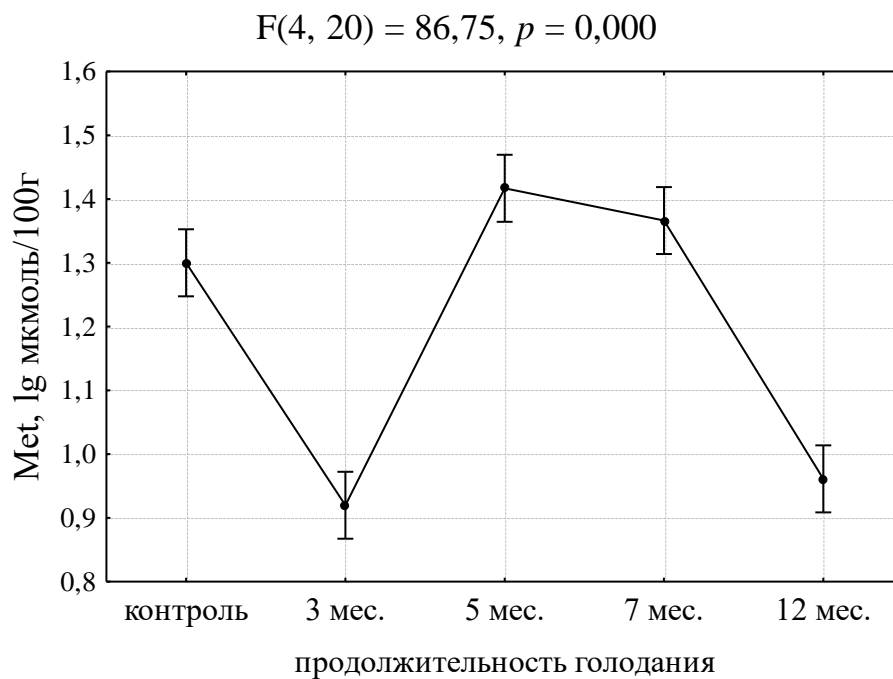
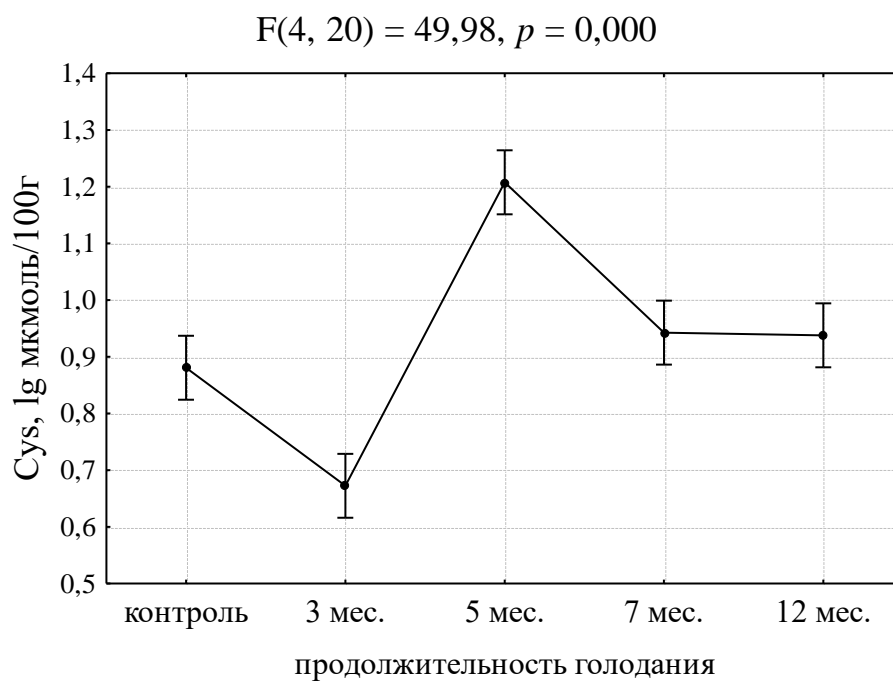


Рисунок 6.2.9 – Динамика концентраций цистеина и метионина ( $\mu\text{г } \mu\text{моль}/100\text{г}$ ) в тканях аптечной пиявки *H. verbana* из гирудокультуры при хроническом голодании (ANOVA)

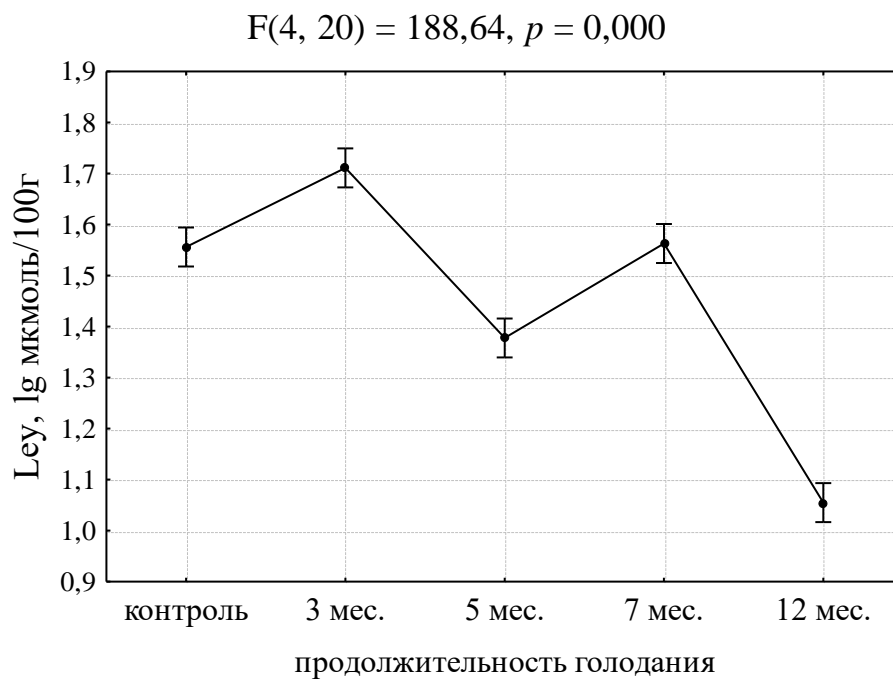
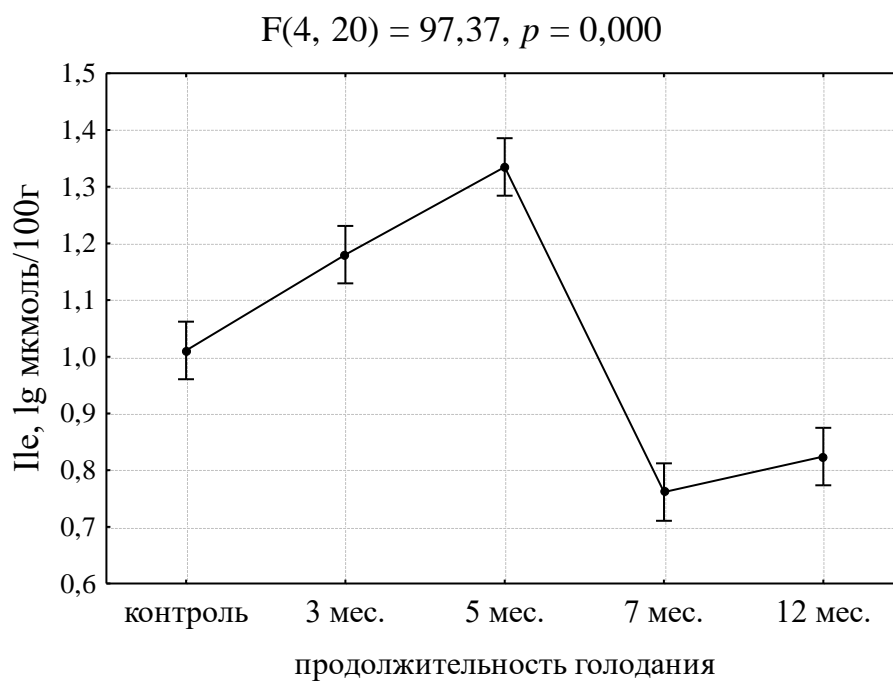


Рисунок 6.2.10 – Динамика концентраций изолейцина и лейцина ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) в тканях аптечной пиявки *H. verbana* из гирудокультуры при хроническом голодании (ANOVA)

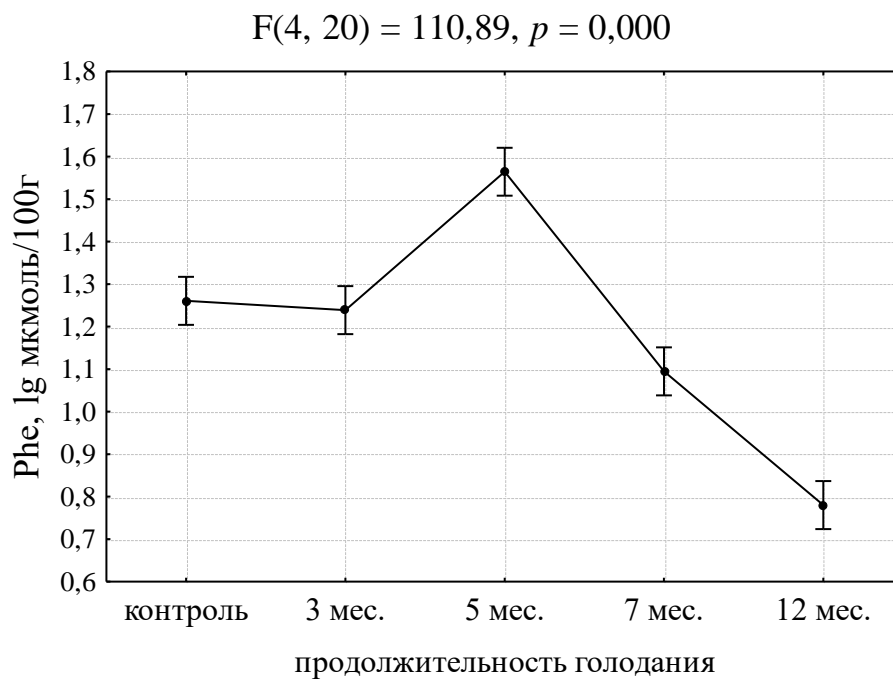
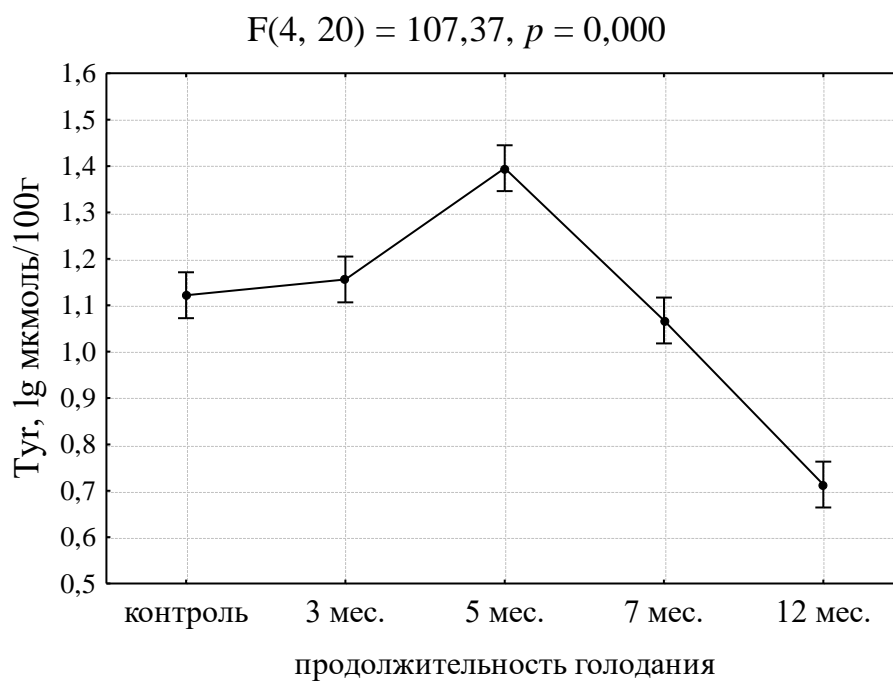


Рисунок 6.2.11 – Динамика концентраций тирозина и фенилаланина ( $\mu\text{г}/100\text{г}$ ) в тканях аптечной пиявки *H. verbana* из гирудокультуры при хроническом голодании (ANOVA)

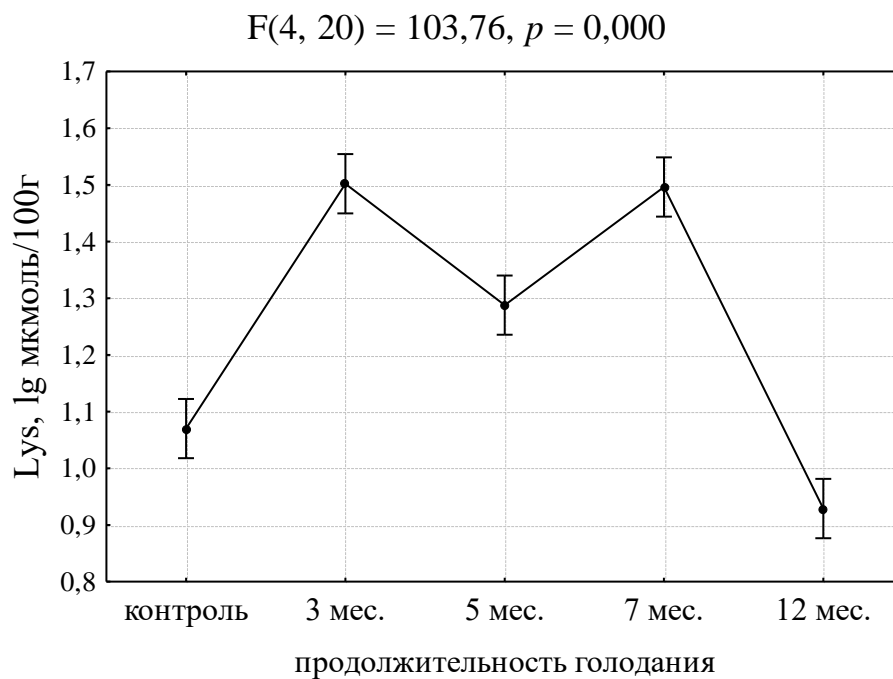
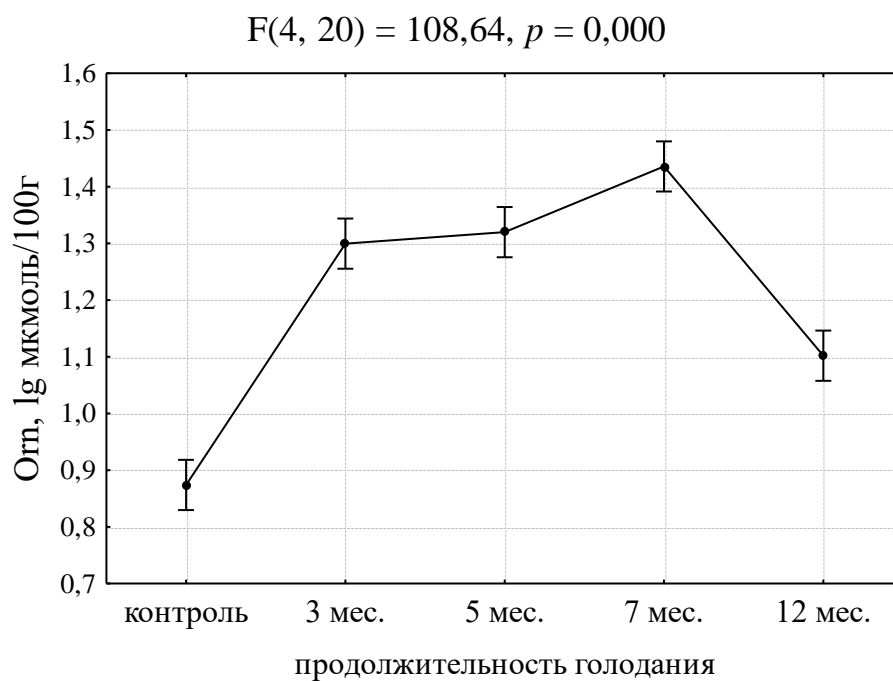


Рисунок 6.2.12 – Динамика концентраций орнитина и лизина (lg мкмоль/100г) в тканях аптечной пиявки *H. verbana* из гирудокультуры при хроническом голодании (ANOVA)

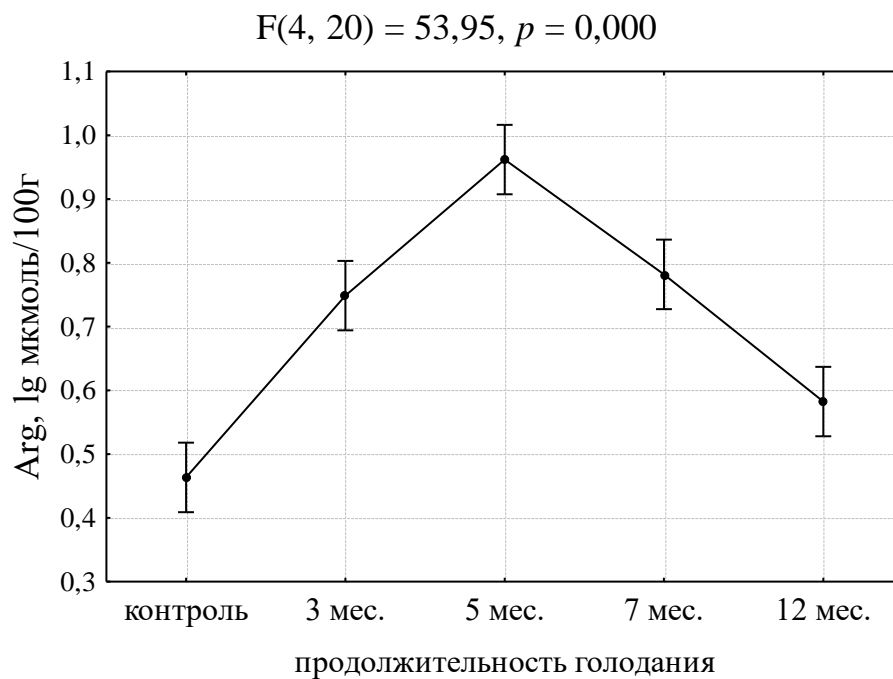
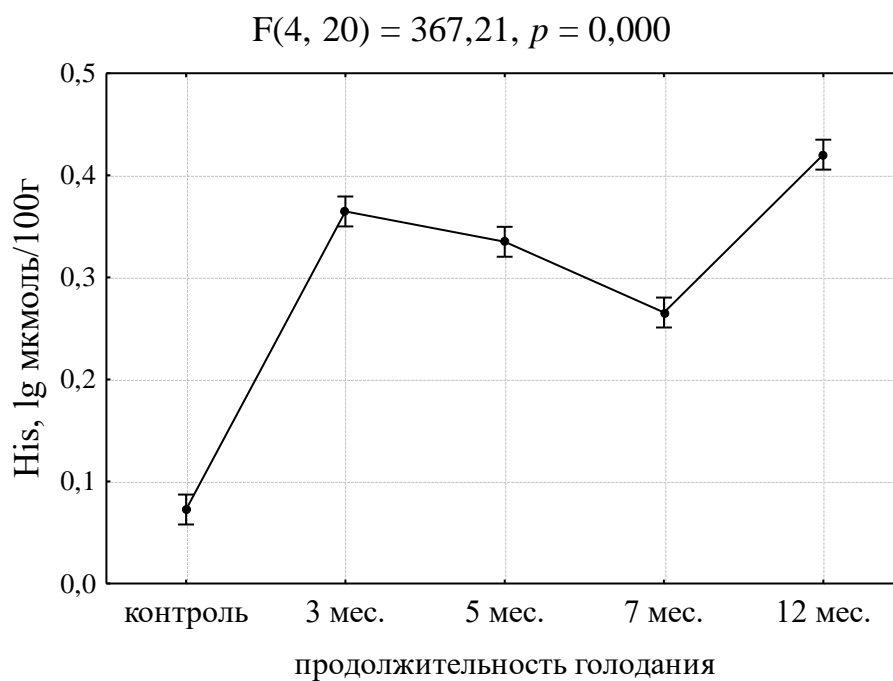


Рисунок 6.2.13 – Динамика концентраций гистидина и аргинина (lg мкмоль/100г) в тканях аптечной пиявки *H. verbana* из гирудокультуры при хроническом голодании (ANOVA)



Методом главных компонент визуализированы существенные изменения аминокислотного спектра тканей аптечной пиявки из гирудокультуры на разных сроках голодания (рис. 6.2.14, табл. 6.2.2). Показано, что все экспериментальные наблюдения оформлены в пять самостоятельных групп пиявок согласно особенностям аминокислотного состава тканей.

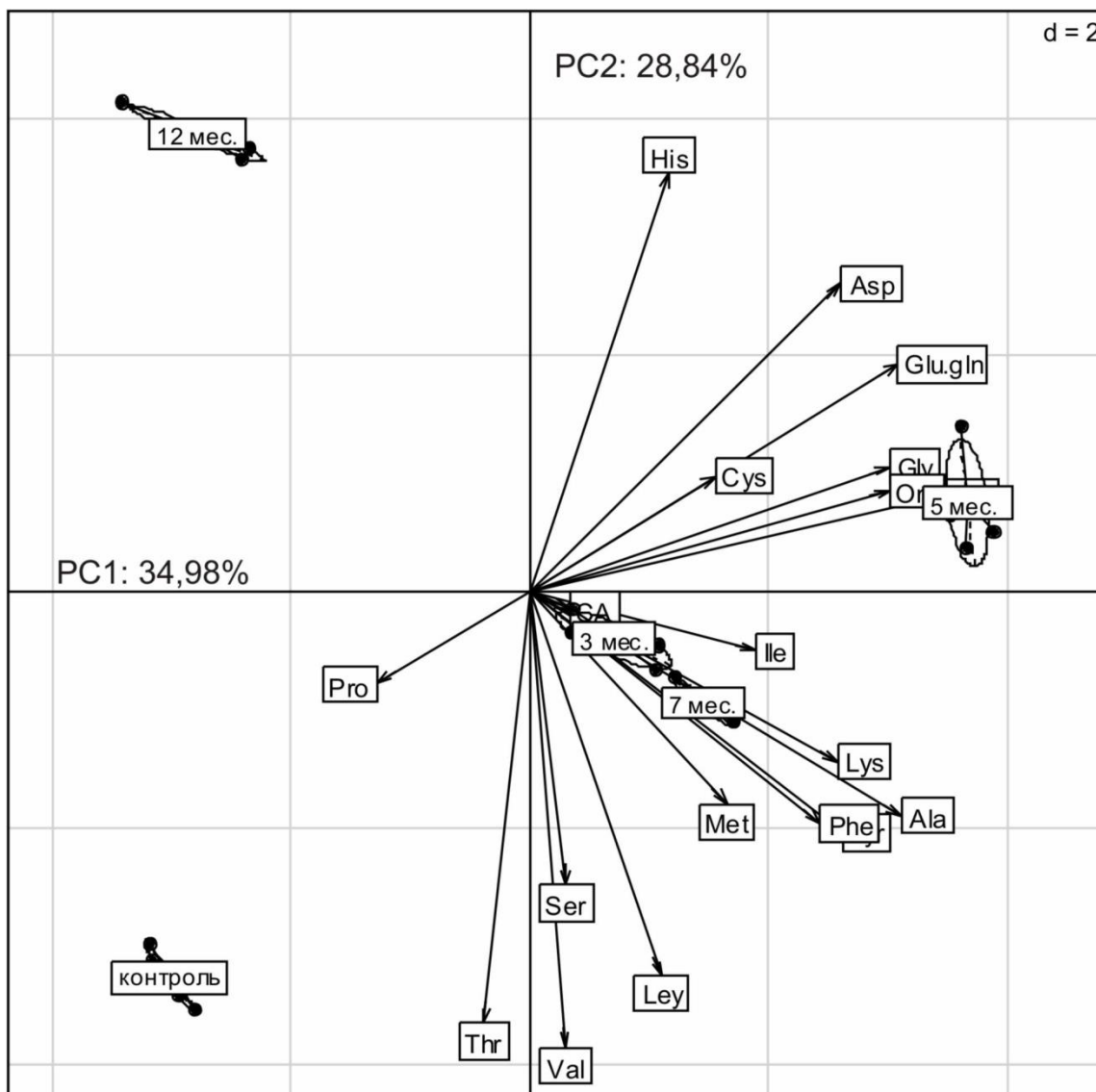


Рисунок 6.2.14 – Аминокислотный спектр (1г мкмоль/100г) тканей аптечной пиявки *H. verbana* из гирудокультуры при хроническом голодании в пространстве главных компонент

Таблица 6.2.2 – Результаты компонентного анализа свободных аминокислот (АК, Ig мкмоль/100г) в тканях аптечной пиявки *H. verbana* из гирудокультуры при хроническом голодании

АК, Ig мкмоль/100г (i = 19)	Нагрузки (loadings, a <sub>ij</sub> )			Вклад в главную компоненту (Contribution = (a <sup>2</sup> <sub>ij</sub> *100)/λ <sub>j</sub> , %)		
	Главные компоненты (Principal Components – PC), j = 1, 2, 3					
	1	2	3	1	2	3
Cysteic Acid	0,09	-0,04	-0,50*	0,12	0,03	6,78
Aspartic Acid	0,71***	0,64***	0,24	7,64	7,58	1,62
Threonine	-0,10	-0,91***	0,27	0,16	14,95	1,97
Serine	0,08	-0,62***	0,32	0,11	6,94	2,88
Glu+ Gln	0,84***	0,48*	-0,07	10,67	4,13	0,15
Proline	-0,35	-0,19	0,89***	1,84	0,68	21,49
Glycine	0,82***	0,26	0,42*	10,14	1,24	4,92
Alanine	0,85***	-0,47*	0,17	10,88	4,05	0,75
Valine	0,08	-0,96***	-0,23	0,10	16,73	1,38
Cystine	0,42*	0,24	-0,80***	2,71	1,06	17,52
Methionine	0,45*	-0,45*	-0,60**	3,07	3,62	9,95
Isoleucine	0,52**	-0,13	-0,29	4,02	0,29	2,24
Leucine	0,30	-0,81***	0,45*	1,35	11,88	5,57
Tyrosine	0,72***	-0,51**	-0,28	7,73	4,67	2,07
Phenylalanine	0,67***	-0,49*	-0,37	6,66	4,31	3,81
Ornithine	0,83***	0,21	0,43*	10,25	0,81	4,98
Lysine	0,70***	-0,36	0,58**	7,46	2,34	9,14
Histidine	0,32	0,88***	0,32	1,50	13,99	2,76
Arginine	0,95***	0,20	-0,02	13,59	0,72	0,01
	Собственные значения (eigenvalues, λ <sub>j</sub> ) PC			Дисперсия, объясненная PC (%)		
	6,65	5,48	3,67	34,98	28,84	19,29

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

Первая главная компонента (PC1), на которую приходится 34,98% общей дисперсии данных, наиболее значимо пространственно отделяет сытых (контроль) и голодающих 12 месяцев пиявок от особей *H. verbana*, период голодания которых составил три, пять и семь месяцев.

Наиболее значимо коррелируют и вносят весомый вклад в PC1, более 7,63%, аминокислоты, максимальные или повышенные концентрации которых отмечены в тканях особей *H. verbana* после пяти- и семимесячной принудительной голодовки – аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота и глутамин, глицин, аланин, тирозин, орнитин, аргинин ( $p < 0,001$ ) (рис. 6.2.14, табл. 6.2.1-6.2.2).

Вторая главная компонента (PC2), на которую приходится 28,84% общей дисперсии данных, визуализирует главным образом различия аминокислотного спектра тканей между контрольными особями и пиявками, голодающими 12 месяцев. Существенный вклад, более 13,98%, в выявленные различия вносят треонин и валин, максимальные концентрации которых отмечены в тканях сытых особей, а также гистидин, наибольшее содержание которого характерно для тканей пиявок, голодающих в течение года ( $p < 0,001$ ) (рис. 6.2.14, табл. 6.2.1-6.2.2). Наибольший вклад третью главную компоненту (PC3), на которую приходится 19,29% общей дисперсии данных, вносят пролин и лизин, а также цистеин и метионин, максимальные концентрации которых характерны для тканей пиявок, голодающих три и пять месяцев, соответственно ( $p < 0,01$ ) (табл. 6.2.1-6.2.2).

Корреляционные связи между концентрациями свободных АК и продолжительностью голодания оценивали с помощью рангового корреляционного анализа. Установлено, что длительное голодание аптечной пиявки *H. verbana*, в течение 12 месяцев, сопровождается повышением в ее тканях концентраций (мкмоль/100г): цистеиновой кислоты ( $r_s = 0,40$ ), аспарагиновой кислоты ( $r_s = 0,66$ ), глутаминовой кислоты и глутамина ( $r_s = 0,56$ ), глицина ( $r_s = 0,46$ ), орнитина ( $r_s = 0,41$ ), гистидина ( $r_s = 0,70$ ), пула ЗАК ( $r_s = 0,48$ ), на фоне снижения концентраций: треонина ( $r_s = -0,60$ ), аланина ( $r_s = -0,40$ ), валина ( $r_s = -0,79$ ), изолейцина ( $r_s = -0,51$ ), лейцина ( $r_s = -0,71$ ), тирозина ( $r_s = -0,57$ ), фенилаланина ( $r_s = -0,60$ ) и пулов НАК ( $r_s = -0,76$ ), АКРУЦ ( $r_s = -0,87$ ), АРАК ( $r_s = -0,60$ ) ( $p < 0,05$ ).

Поскольку суммарные концентрации свободных АК в тканях пиявок различных опытных групп кратно отличаются друг от друга, для полноты картины целесообразно было изучить влияние принудительного голодания на изменения процентного содержания (% от суммарного фонда АК) отдельных АК и основных метаболических групп по сравнению с контрольными показателями (рис. 6.2.15-6.2.17).

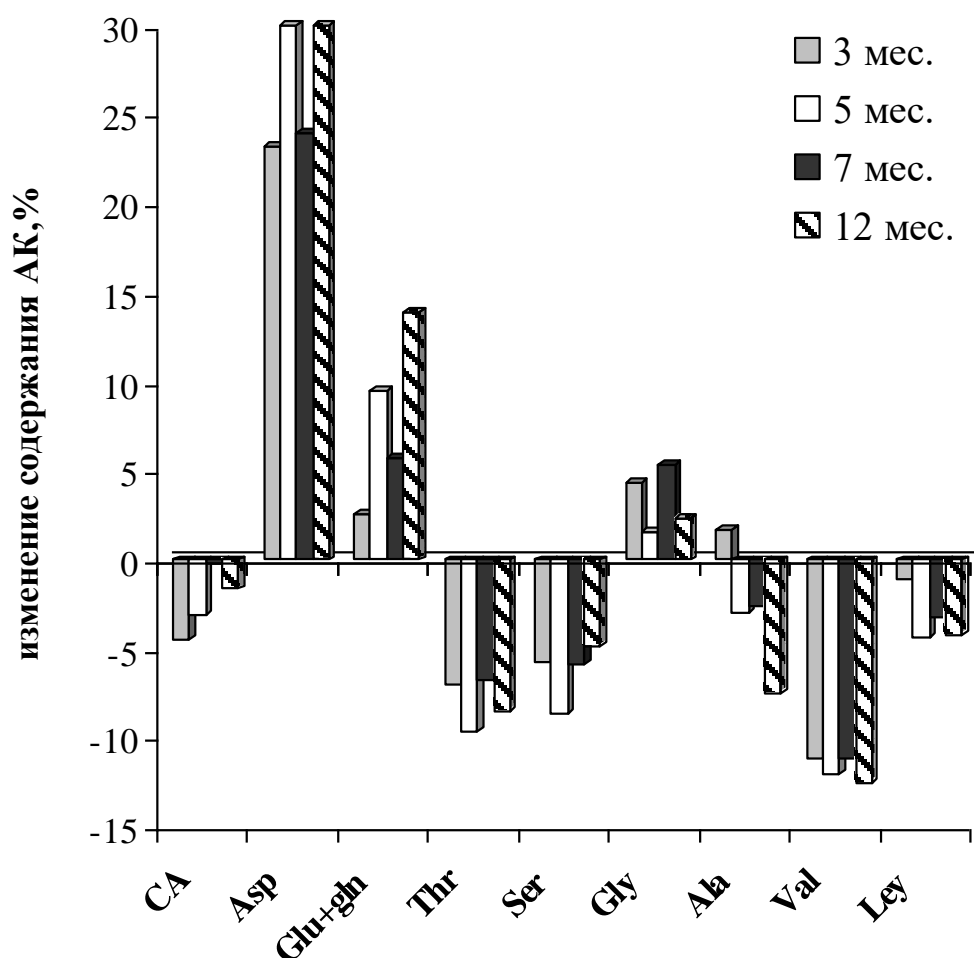


Рисунок 6.2.15 – Изменение процентного содержания свободных АК (% от фонда) относительно контрольных показателей в тканях медицинской пиявки *H. verbana* из гирудокультуры при хроническом голодании

Так, после трех месяцев содержания особей *H. verbana* без пищи, в их тканях наблюдался значимый рост процентного содержания девяти аминокислот: ас-

парагиновой кислоты (в 32,0 раз), глутаминовой кислоты и аланина (в 1,1), пролина и глицина (в 2,0), орнитина и лизина (в 1,7), гистидина (в 3,7), аргинина (в 1,3) ( $p < 0,01$ ). Доля остальных АК значительно снижалась. Наибольший спад зафиксирован для процентного содержания цистеиновой кислоты (в 10,0 раз) и незаменимых аминокислот: валина и метионина – в 5,0 и 4,6 раз, соответственно ( $p < 0,001$ ) (рис. 6.2.15-6.2.16).

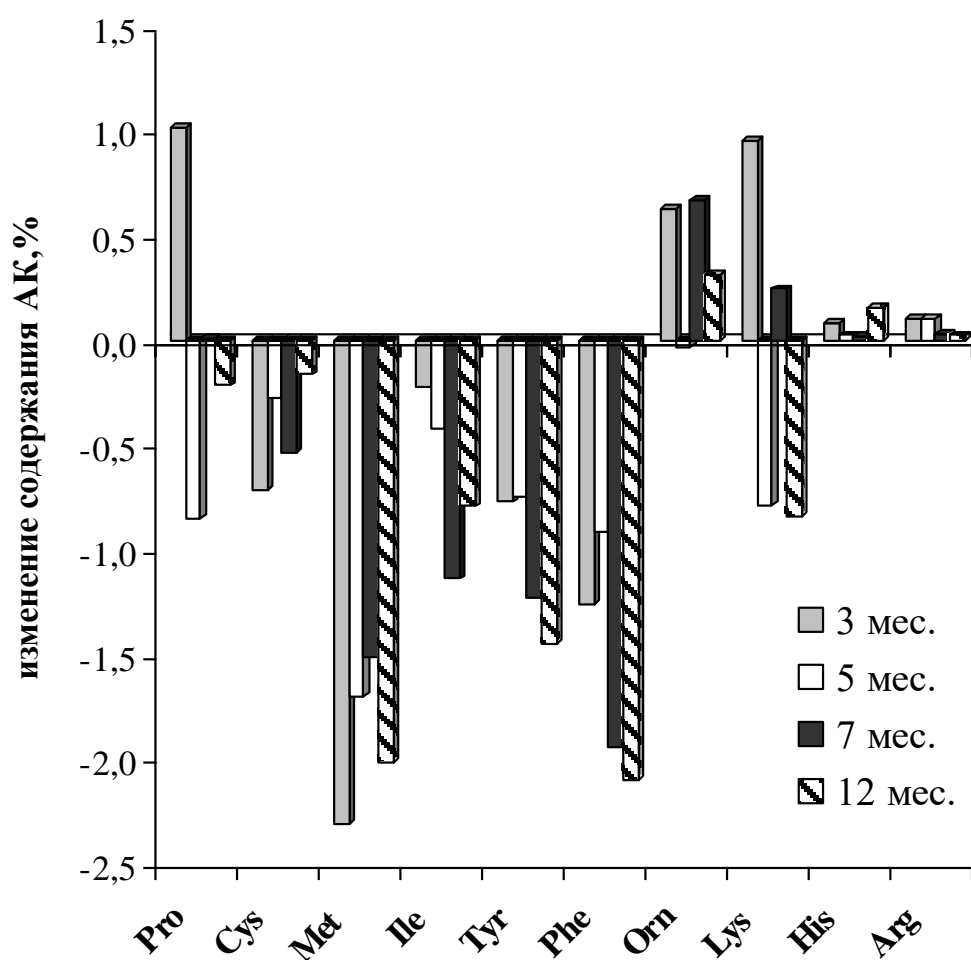


Рисунок 6.2.16 – Изменение процентного содержания свободных АК (% от фонда) относительно контрольных показателей в тканях медицинской пиявки *H. verbana* из гирудокультуры при хроническом голодании

После пятимесячной голодовки в тканях *H. verbana* повысилось, по сравнению с контролем, процентное содержание пяти АК: аспарагиновой кислоты (в

47,7 раз), глутаминовой кислоты и глутамина (в 1,4), глицина (в 1,5), гистидина (в 2,0), аргинина (в 1,4) ( $p < 0,01$ ). В этот период были отмечены полная утилизация пролина и неизменное тканевое содержание орнитина. Процентное содержание остальных АК в тканях голодающих пиявок значительно снижалось. Обвальное падение наблюдалось для незаменимых АК: треонина (в 8,0 раз), валина (в 7,6) и лейцина (в 4,8) ( $p < 0,01$ ) (рис. 6.2.15-6.2.16).

После семи месяцев нахождения особей *H. verbana* без пищи в их тканях повышалось, в сравнении с сытыми особями, процентное содержание пяти аминокислот: как и в предыдущие периоды это – аспарагиновая кислота (в 33,5 раз), глутаминовая кислота и глутамин (в 1,3), глицин (в 2,8), гистидин (в 1,7) и еще орнитин (в 1,7) ( $p < 0,01$ ). Тканевое содержание незаменимой АК лизина оставалось без изменений, а остальных АК – значительно снижалось ( $p < 0,05$ ). Наиболее существенное падение было характерно для процентного содержания незаменимых АК: треонина (в 3,7 раз), валина (в 5,0), изолейцина (в 4,6) и фенилаланина (в 3,5) ( $p < 0,001$ ).

На заключительном этапе эксперимента в тканях МП, голодающих в течение 12 месяцев, наблюдалось повышение процентного содержания тех же четырех АК, что и в более ранние сроки голодания. Это – аспарагиновая кислота (в 40,8 раз), глутаминовая кислота и глутамин (в 1,6), глицин (в 1,7), гистидин (в 6,0) ( $p < 0,001$ ). При этом ее отличалось от контрольных значений уровень содержания пролина, цистеина, орнитина и аргинина; содержание 11-ти аминокислот значительно снижалось, особенно сильно – треонина (в 4,3 раз), валина (в 10,3), лейцина (в 4,6), тирозина (в 3,7) и фенилаланина (в 4,5) ( $p < 0,001$ ).

Показано, что основной вклад в высокий уровень аминокислотного фонда тканей голодающих пиявок (до 70%) вносят аспарагиновая и глутаминовая кислоты. Глутаминовая кислота участвует в белковом и углеводном обмене, в детоксикационных процессах и является одним из источников гликогена, утилизация которого и обуславливает высокий уровень глутамата при хроническом голодании пиявок (Ленинджер, 1985).

Медицинская пиявка, в силу своих физиологических особенностей, насосавшись крови, длительное время ее переваривает. По данным исследователей кровь в кишечнике пиявок (до 5%) обнаруживается еще при шестимесячном голодании (Шестаков и др., 2007). Аспарагиновая кислота, возможно, принимает активное участие в процессах консервации крови в кишечнике пиявок. Вместе с тем, аспарагиновая кислота снижает токсичность высоких концентраций ксенобиотиков в организме (в том числе и ТМ, повышенное тканевое содержание которых мы наблюдали у *H. verbana* на седьмой месяц голодания).

В тканях голодных пиявок, помимо упомянутых АК, наблюдается значительное повышение процентного содержания глицина и гистидина в течение всего периода наблюдений, аргинина – на третий и пятый месяцы голодания, аланина и лизина – на начальном этапе эксперимента (3 месяца) ( $p < 0,05$ ) (рис. 6.2.15-6.2.16).

Повышение концентраций глутаминовой кислоты и глицина обеспечивает биосинтез глутатиона. Глутатион участвует в ферментативных и неферментативных реакциях, снижающих токсичность свободных радикалов и перекисей в желудочно-кишечном тракте, и его уровень в тканях уменьшается приблизительно в два раза при голодании и быстро увеличивается после еды (Зайко и др., 1996; Мазо, 1998).

Аланин является одним из источников глюкозы в организме. Известно, что аланин-глюкозный цикл непосредственно связан с промежуточным обменом белков, жиров и углеводов. Усиленное образование аланина в мышцах и выход его в циркуляцию наблюдается при мышечной деятельности. Именно в начальный период голодания (3 месяца), согласно визуальным наблюдениям, пиявки активно плавали в поисках жертвы. В последующие периоды голодания пиявки становились малоподвижными: в это время, вероятно, происходила глубокая перестройка обменных процессов, направленная на экономное расходование энергетических ресурсов. Аланину принадлежит ведущая роль в энергетическом гомеостазе, и его содержание снижается в мышечной ткани при дефиците белка, что наблюдалось на пятый, седьмой и двенадцатый месяцы голодания (рис. 6.2.15). При этом ката-

болизм эндогенных энергетических запасов направлен на обеспечение основного обмена и функций жизненно важных органов.

При влиянии хронического голодания в тканях МП обнаруживался дефицит отдельных групп АК и нарушение их оптимального соотношения (рис. 6.2.17).

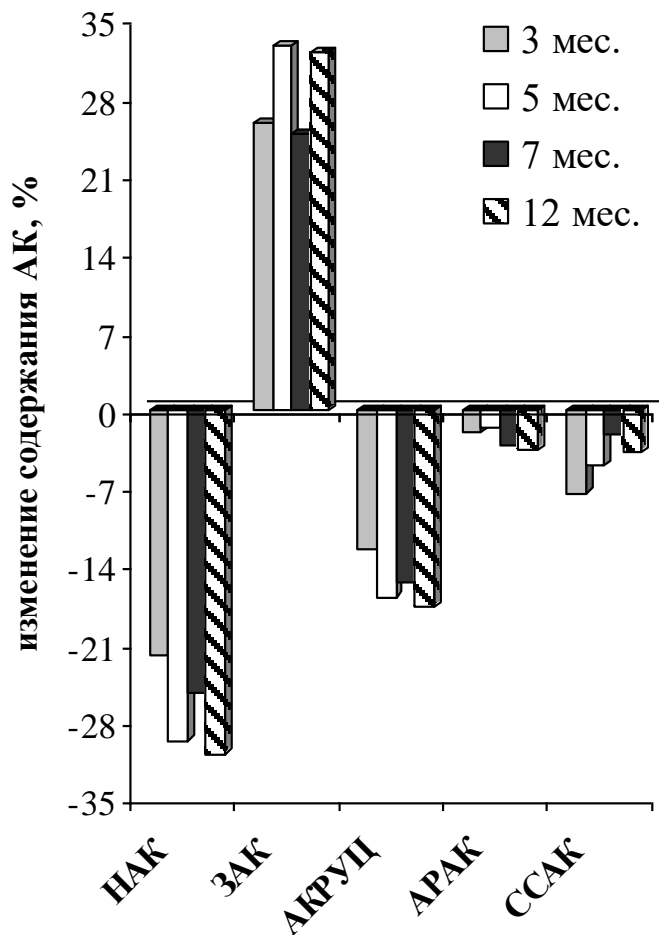


Рисунок 6.2.17 – Изменение процентного содержания метаболических групп АК (% от фонда) относительно контрольных показателей в тканях медицинской пиявки *H. verbana* из гирудокультуры при хроническом голодании

Так, в разы снижалось процентное содержание пула незаменимых АК (НАК) и соответственно показатели критерия НАК/ЗАК – от 0,72 в контроле до 0,10 после 12 месяцев голодания (табл. 6.2.1). Ощутимо снижался уровень АК с разветвленной углеродной цепью (АКРУЦ): валина, лейцина, изолейцина, ароматических АК (АРАК): тирозина и фенилаланина, серосодержащих АК (ССАК):



цистеиновая кислота, цистеин, метионин. Снижение антитоксического индекса Фишера (ИФ = АКРУЦ/АРАК), до 1,39, наступал одновременно с минимальным процентным содержанием НАК после пяти месяцев голодания. Вероятно, этот период, характеризующийся усилением распада белков и углеводов, расходуемых в качестве энергетического материала, является переломным в становлении адаптации пиявок к продолжительному голоданию.

Выявлены высокие корреляционные связи между продолжительностью голодания пиявок и процентным содержанием некоторых АК в их тканях: положительные для аспарагиновой кислоты ( $r_s = 0,70$ ;  $p = 0,002$ ) и глутаминовой кислоты ( $r_s = 0,91$ ;  $p = 0,000$ ); отрицательные – для аланина ( $r_s = -0,77$ ;  $p = 0,000$ ), валина ( $r_s = -0,78$ ;  $p = 0,000$ ), изолейцина ( $r_s = -0,84$ ;  $p = 0,000$ ), лейцина ( $r_s = -0,83$ ;  $p = 0,000$ ), тирозина ( $r_s = -0,90$ ;  $p = 0,000$ ), фенилаланина ( $r_s = -0,82$ ;  $p = 0,000$ ). Обнаруженные связи свидетельствуют о ключевой роли указанных АК в межклеточном обмене в условиях хронического голодания медицинских пиявок.

Ранее авторами было показано, что хроническое голодание, в течение 12 месяцев, оказывало существенное влияние и на микроэлементный обмен в тканях *H. verbana* из гирудокультуры (Черная, 2019а). Так, согласно результатам дисперсионного анализа (ANOVA), наибольшая изменчивость в тканях медицинских пиявок была отмечена для эссенциальных макро- и микроэлементов: Cu ( $F_{5, 24} = 524,74$ ,  $p = 0,000$ ), Ca ( $F_{5, 24} = 511,14$ ,  $p = 0,000$ ), Fe ( $F_{5, 24} = 344,68$ ,  $p = 0,000$ ), наименьшая – для токсичных металлов Ni ( $F_{5, 24} = 82,31$ ,  $p = 0,000$ ) и Cd ( $F_{5, 24} = 58,24$ ,  $p = 0,000$ ), что свидетельствует о регулирующей роли и эссенциальных элементов в поддержании гомеостаза голодающих особей.

На основании полученных данных авторами проведен корреляционный анализ и выявлены положительные и отрицательные корреляционные связи между концентрациями эссенциальных и токсичных металлов и свободных АК в тканях медицинских пиявок, голодающих 12 месяцев ( $p < 0,05$ ) (табл. 6.2.3).

Таблица 6.2.3 – Коэффициенты линейной корреляции между концентрациями макро- и микроэлементов (МЭ, lg мкг/г) и свободных аминокислот (АК, lg мкмоль/100г) в тканях *H. verbana* при хроническом голодании ( $p < 0,05$ )

$r_{\text{АК/МЭ}}$	Cu	Zn	Mn	Fe	Ca	Mg	Cd	Pb	Ni	Co
СА	0,45			0,58	0,53	0,43			0,79	0,60
Asp		0,56					-0,42	0,53	-0,49	
Thr										0,44
Ser			0,43			0,45		0,43		0,52
Glu+gln	0,55	0,61			0,48	0,46		0,63		0,50
Pro			0,60						-0,42	
Gly	0,49	0,77	0,42		0,40	0,51	-0,43	0,79	-0,49	0,55
Ala	0,62	0,81	0,33		0,54	0,61	-0,40	0,85	-0,35	0,68
Val										0,47
Cys	0,49		-0,44		0,52				0,51	0,41
Met	0,68			0,44	0,72	0,60		0,46	0,64	0,78
Ile										
Leu		0,48	0,47					0,50		0,40
Tyr	0,58	0,56			0,53	0,47		0,61		0,56
Phe	0,53	0,49			0,49	0,40		0,50		0,46
Orn	0,50	0,79	0,42		0,42	0,52	-0,42	0,80	-0,46	0,58
Lys	0,47	0,82	0,59			0,53		0,83	-0,50	0,61
His				-0,49					-0,60	
Arg	0,59	0,78			0,52	0,48	-0,45	0,76		0,53
Фонд АК	0,67	0,77			0,59	0,59	-0,41	0,81		0,66
НАК	0,47	0,46			0,46	0,50		0,54		0,62
ЗАК	0,55	0,70			0,46	0,48	-0,43	0,71		0,51
АКРУЦ										0,45
АРАК	0,56	0,53			0,52	0,45		0,56		0,52
ССАК	0,55			0,55	0,62	0,51			0,77	0,69

Установлено, что, обнаруженный в наших исследованиях повышенный уровень содержания макро- и микроэлементов в тканях голодающих пиявок сопровождается линейным ростом концентраций аминокислот, обладающих детоксицирующими свойствами – цистеиновой и глутаминовой кислот, глицина, цистеина, метионина, аргинина и суммарного фонда ССАК (табл. 6.2.3).

Наиболее высокие положительные связи ( $r > 0,80$ ) характерны для корреляционных пар «Zn-Ala» и «Zn-Lys», «Pb-Ala», «Pb-Orn» «Pb-Lys» «Pb-Фонд АК» ( $p < 0,001$ ). Выявленные корреляционные связи свидетельствует о тесной сопряженности минерального и аминокислотного обменов в организме аптечной пиявки *H. verbana*, направленной на поддержание гомеостаза в экстремальных условиях хронического голодания.

Комплексные экспериментальные исследования показали, что общими закономерностями для кровососущих и хищных челюстных пиявок из природных популяций в критические сроки голодания являются: повышение суммарных концентраций свободных аминокислот на фоне обвального падения пула незаменимых АК в тканях.

Обнаружено, что длительное голодание аптечной пиявки *H. verbana* из гиродукультуры сопровождается существенным повышением в тканях концентраций биологически активных соединений, в том числе полифункциональных аминокислот. Результаты данных исследований могут быть целенаправленно использованы при производстве фармацевтических препаратов и косметических средств. По-нашему мнению, оптимальным для использования гомогенатов тканей медицинских пиявок в промышленных целях, является пятимесячный срок голодания, при котором наблюдались максимальные тканевые концентрации свободных аминокислот, и как было показано авторами ранее, достаточно высокий уровень эссенциальных макро- и микроэлементов и пониженное содержание токсичных металлов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В книге представлены результаты многолетних комплексных экспедиционных и лабораторных исследований авторов, сосредоточенных на изучении закономерностей формирования в тканях медицинских пиявок аминокислотного спектра, как адекватного показателя их физиологического состояния, с учетом климатогеографических, сезонных, возрастных и антропогенных факторов.

Использование эколого-физиологического подхода позволило дать оценку адаптивных возможностей и биоресурсного потенциала экологически и физиологически контрастных групп медицинских пиявок, отличающихся, как таксономической самостоятельностью (виды: лечебная пиявка *H. medicinalis* и аптечная пиявка *H. verbana*), так и условиями роста и развития (водные экосистемы естественных ландшафтов и гирудокультура биофабрик). Учитывая практически полное отсутствие информации об аминокислотном обмене представителей челюстных пиявок (Hirudinidae) в онтогенезе и при влиянии экологических факторов, на всех этапах исследования нами были использованы, в сравнительном аспекте, особи фонового для медицинских пиявок вида – большой ложноконской пиявки *H. sanguisuga*, что позволило выявить, как общие для кровососущих и хищных гирудинид закономерности формирования аминокислотного состава тканей, так и трофическую специфику изучаемых параметров.

Методом ионообменной хроматографии определено 23 аминокислоты и их производных в тканях медицинских пиявок, независимо от вида и географической приуроченности. Несмотря на сходство качественной структуры аминокислотного спектра тканей медицинских пиявок, установлена его видовая специфика у особей *H. medicinalis* и *H. verbana*, обитающих в равных экологических условиях одного водоема (оз. Горелое, Харьковская обл.). Показано, что аптечная пиявка *H. verbana*, тяготеющая к обитанию в южных широтах, отличается от лечебной *H. medicinalis* более высоким уровнем суммарного фонда свободных АК. В тканях особей *H. medicinalis*, по сравнению с *H. verbana*, отмечены более высокие концентрации глутамата, аланина, цистеина, изолейцина на фоне более низкого содержания аспара-

гиновой кислоты, серина, пролина, тирозина орнитина и пула незаменимых аминокислот.

Показано, что трофический статус обуславливает количественную специфичность аминокислотного спектра тканей гирудинид: концентрации практически всех свободных АК, исключая орнитин, у хищной пиявки *H. sanguisuga* значительно отличаются от таковых у *H. medicinalis* и *H. verbana*: содержание цистеиновой и аспарагиновой кислот кратно снижено, остальных АК – повышено. Таким образом, в равных экологических условиях одного водоема для челюстных пиявок характерна видовая и трофическая специфика аминокислотного спектра тканей, обусловленная их физиологическими особенностями.

При изучении влияния экологических факторов на формирование аминокислотного спектра тканей для нас особый интерес представляли особи медицинских пиявок, обитающие на границах ареала (климатический фактор) и на промышленно развитых территориях (антропогенный фактор). В данном контексте следует отметить высокий уровень аминокислотного обмена у *H. medicinalis* и *H. verbana*, обитающих в неблагоприятных климатических условиях на восточной и северной границах ареала, а также в экосистемах, отличающихся повышенным содержанием тяжелых металлов. Вместе с тем, в географическом аспекте аминокислотный состав тканей лечебных и аптечных пиявок теряет видовую специфику, и в значительной степени обусловлен физиологическим состоянием особей, обитающих в оптимальных и периферийных частях ареала. Что касается трофических особенностей аминокислотного обмена гирудинид, то в географическом масштабе он был очевиден.

Показано, что качественные и количественные изменения аминокислотного спектра в тканях аптечной пиявки *H. verbana* обусловлены физиологическими процессами, связанными с сезонными особенностями ее биологического цикла. Обнаружено, что сезонный фактор оказывает существенное влияние на состояние аминокислотного спектра в тканях медицинских пиявок. Суммарные концентрации свободных АК в тканях *H. verbana* значительно изменяются в ряду времен года: осень > весна > лето. Высокий уровень суммарного фонда АК в тканях осенних

особей аптечной пиявки *H. verbana* обеспечен максимальным содержанием цистеиновой и аспарагиновой кислот, треонина, серина, глутамата и глутамина, цистеина, изолейцина, триптофана, орнитина, лизина и аргинина, а также наблюдается существенное повышение, по сравнению с таковыми летней группы пиявок, суммарного фонда серосодержащих АК, обладающих детоксицирующими и иммуномодулирующими свойствами и выполняющих функцию протектора низкотемпературной адаптации.

Количественная оценка уровня содержания свободных АК в тканях молодежи и половозрелых особей *H. verbana* из природных популяций показала, что возрастная специфика биологически активных соединений обусловлена, как особенностями пищевого рациона, так и физиологическими особенностями медицинских пиявок в онтогенезе. Так, у молодежи *H. verbana* отмечен высокий исходный уровень азотистого обмена – суммарные концентрации свободных АК в их тканях вдвое превышают эти показатели взрослых особей. Обнаружены значимые различия концентраций всех свободных АК между тканями молодежи и взрослых особей *H. verbana*. Отмечено невероятно высокое содержание у молодых пиявок гистидина (в 50,2 раз выше, чем у взрослых особей) – незаменимой аминокислоты, способствующей росту и восстановлению тканей, участвующей в детоксикационных и иммуномодулирующих процессах.

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 аминокислотного спектра тканей медицинских пиявок, выявленная 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 *H. me-*

*dicinalis* и *H. verbana* в гирудокультуре, видоспецифичность их аминокислотного обмена проявляется более четко.

Результаты исследования внутривидовой изменчивости уровня содержания свободных АК 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 аминокислотный статус пиявок *H. medicinalis* и *H. verbana* в гирудокультуре. Вместе с тем, в тканях медицинских пиявок, независимо от географического расположения биофабрик, выявлены видовые особенности по содержанию в тканях основных метаболических групп АК. Так, у аптечной пиявки *H. verbana*, в сравнении с лечебной *H. medicinalis*, отмечены более высокие тканевые концентрации пулов НАК, АКРУЦ, АРАК, но пониженные – серосодержащих аминокислот (ССАК).

По нашим данным условия искусственного разведения также оказывают существенное влияние на уровень содержания полифункциональных АК в тканях и слюнной жидкости медицинских пиявок. Установлено, что медицинские пиявки из гирудокультуры, будучи потомками первого поколения особей из природных популяций, отличаются повышенным уровнем аминокислотного обмена, что согласуется с полученными данными о различиях основного и микроэлементного обмена экологически контрастных групп *H. medicinalis* и *H. verbana*.

Сравнительная оценка аминокислотного спектра тканей и слюнной жидкости медицинских пиявок *H. verbana* также показала существенные различия в процентном содержании отдельных свободных АК и основных метаболических групп АК. Установлено, что формирование аминокислотного фонда ССЖ пиявок направлено на более высокое содержание основных метаболических групп – НАК, АКРУЦ, АРАК, ССАК. Таким образом, экстремальные условия искусственного разведения обуславливают высокий уровень содержания биологически активных соединений в тканях и слюнной жидкости медицинских пиявок.

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 свободных АК в тканях аптечной пиявки *H. verbana* на разных стадиях развития и роста.

Установлено, что с возрастом в тканях особей аптечной пиявки *H. verbana* снижаются суммарные концентрации свободных аминокислот. Между возрастом медицинских пиявок и процентным содержанием большинства свободных АК и основных метаболических групп в тканях выявлены статистически значимые корреляционные связи, характеризующие физиологическую роль и востребованность первых на разных этапах онтогенеза в условиях ускоренного роста и развития в гирудокультуре. Необходимо отметить стабилизацию процентного содержания основных метаболических групп АК у взрослых особей *H. verbana*, из чего можно заключить, что формирование аминокислотного спектра тканей медицинских пиявок в гирудокультуре происходит уже в семимесячном возрасте. Согласно нашим данным, рост и развитие пиявки *H. verbana* в течение 9-ти месяцев сопровождается значительным снижением индикатора зрелости (ИЗ = глицин/аланин) от 0,75 до 0,25, что имеет важное практическое применение, поскольку оказалось, что ИЗ, предлагаемый для промысловых рыб, применим и при оценке возрастных особенностей аминокислотного спектра тканей медицинских пиявок в гирудокультуре. Полагаем, что новые данные об оптимальном соотношении жизненно важных АК в тканях медицинских пиявок на различных этапах роста и развития могут способствовать более эффективному и качественному воспроизводству этих ценных гидробионтов.

Обнаружено, что хроническое голодание вызывает существенные изменения аминокислотного спектра тканей гирудинид. Выявлены общие закономерности для аптечной и большой ложноконской пиявок из природных популяций в критические сроки голодания (7 и 5 месяцев, соответственно): значимое повышение суммарных концентраций свободных АК и обвальное падение пула незаменимых АК в их тканях.

Особь аптечной пиявки *H. verbana* из гирудокультуры оказались более устойчивы к принудительному голоданию, нежели природные особи. Показано,



что хроническое голодание в течение 12 месяцев оказывает существенное влияние на состояние аминокислотного обмена аптечной пиявки *H. verbana*. Обнаружено, что наиболее оптимальное соотношение свободных аминокислот и основных метаболических групп характерно для тканей пиявок, голодавших в течение пяти месяцев. Принимая во внимание то, что в настоящее время медицинские пиявки используются не только нативно, при гирудотерапии, но и гомогенаты их тканей служат сырьем для фармацевтической и косметологической продукции, результаты наших исследований по уровню содержания свободных АК в тканях опытных особей на разных сроках голодания будут способствовать рациональному использованию медицинских пиявок как природного ресурса биологически активных соединений.

Обобщая полученные результаты, можно заключить, что качественные и количественные изменения аминокислотного спектра тканей медицинских пиявок в онтогенезе и при влиянии экологических факторов адекватно отражают их физиологический и адаптивный статус и могут служить критерием состояния здоровья особей в природных водоемах и гирудокультуре.

Полагаем, что целенаправленный подбор особей из гирудокультуры региональных биофабрик в качестве натурального источника приоритетных свободных аминокислот, с учетом их видовой принадлежности, возраста или сроков голодания, расширяет перспективы рационального использования природных ресурсов медицинских пиявок.

На наш взгляд, высокий уровень обменных процессов медицинских пиявок, выращенных в экстремальных условиях ускоренного роста и развития на биофабриках, можно рассматривать как неспецифическую адаптивную реакцию, обеспечивающую высокую устойчивость особей к воздействию стресс-факторов различного генеза.

Результаты комплексных исследований эколого-физиологической изменчивости аминокислотного состава тканей медицинских пиявок на разных этапах биологического цикла и при влиянии природных и антропогенных факторов, представленные в монографии, не только расширяют знания об адаптивном и био-

ресурсном потенциале представителей *H. medicinalis* и *H. Verbena*, но также могут найти широкое применение при решении практических задач по оптимизации технологии искусственного воспроизводства и рационального использования этих ценных гидробионтов.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученные авторами новые данные по эколого-физиологическим особенностям представителей *H. medicinalis* и *H. verbana* легли в основу разработки практических рекомендаций и предложений по оптимизации технологии разведения и рационального использования природных ресурсов медицинских пиявок:

1. Показатели аминокислотного фонда тканей медицинских пиявок из естественных водоемов, с учетом климатогеографического, сезонного и возрастного факторов, могут быть использованы как референтные для осуществления экологического мониторинга при решении задач сохранения природных популяций *H. medicinalis* и *H. verbana*.

2. Материалы по региональным особенностям аминокислотного спектра тканей медицинских пиявок *H. medicinalis* и *H. verbana*, выращенных на биофабриках России, рекомендуются к использованию в качестве критерия состояния здоровья особей в гирудокультуре, а также для целевого подбора приоритетных аминокислот при разработке новых гирудофармакологических препаратов.

3. Выявленные физиологические потребности особей *H. verbana* в свободных аминокислотах на разных этапах роста и развития могут использоваться для оптимизации технологии разведения медицинских пиявок в гирудокультуре. Для возрастной диагностики пиявок в природе и гирудокультуре определены показатели индикатора зрелости (ИЗ = глицин/аланин).

4. Для рационального использования медицинских пиявок *H. verbana* в промышленных целях как природного ресурса биологически активных соединений установлен оптимальный период голодания особей (5 месяцев), обеспечивающий высокий уровень содержания полифункциональных свободных аминокислот и их производных.

## 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.

Акимова А.А. Постановка задачи исследования закономерностей жизнедеятельности пиявок / А.А. Акимова, В.П. Бирюков, Н.С. Жукова // X Міжнародна Конференція Асоціації гірудологів. Мат-лы конф., Харків, 2012. – С. 6-7.

Акопян В.П. Сдвиги в содержании свободных аминокислот в печеночной и сердечной тканях в условиях ограничения двигательной активности / В.П. Акопян, О.П. Соцкий, Л.Г. Жамгарян // Биомедицинская химия. – 2007. – Т. 53. – Вып. 3. – С. 307-312.

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 / Э. Альберт. – М.: Мир, 1971. – 431 с.

Аминов Р.Ф. Лейкоцитарный состав крови, гемограмма, морфометрия лимфоидных органов и тела крысы под влиянием биологически активных веществ слюны *Hirudo verbana* / Р.Ф. Аминов, А.К. Фролов, Е.Р. Федотов // Инфекция и иммунитет. – 2020. – Т. 10. – №1. – С. 167-174.

Андреев П.Н. О сохраняемости микроорганизмов и иммунных тел в пищеварительном канале пиявок и о роли последних в распространении заразных болезней / П.Н. Андреев // Арх. науч. и практ. ветеринарии. – 1923. – №1. – С. 38-45.

Анисимов В.Н. Мелатонин – роль в организме, применение в клинике / В.Н. Анисимов. – СПб: «Система», 2007. – 40 с.

Артюх В.П. Вплив селену, метіоніну та вітаміну Е на обмін метіоніну і метіонін – аденозилтрансферази в печінці щурів / В.П. Артюх, Ц.М. Штутман // Укр. біохім журн. – 1972. – №4. – С. 504-507.

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.

Баскова И.П. Биологически активные вещества, продуцируемые медицинской пиявкой (*Hirudo medicinalis*) и механизмы их действия / Баскова Изольда Порфирьевна // Автореф. дис. ... докт. 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 [и др.] // 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 [и др.] // 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 [и др.] // 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.

Баскович Г.А. Глутаминовая и аспарагиновая кислоты в комплексном лечении циркуляторной гипоксии / Г.А. Баскович, В.А. Бондина, Н.И. Кочетов, В.А. Чаплыгина // Патоллогич. физиология и эксперимент. Терапия. – 1978. – №1. – С. 20-25.

Баянов М.Г. К фауне пиявок Башкирии / М.Г. Баянов, Н.А. Кусая. // Мат-лы по фауне водоемов Башкирии. – Уфа, 1975. – С. 19-24.

Бауман В.К. Всасывание двухвалентных катионов. Физиология всасывания. – Л.: Наука, 1977. – С. 152-222.

Белокрылов Г.А. Неоднозначность действия больших и малых доз аминокислотных препаратов на иммунный ответ и фагоцитоз у мышей / Г.А. Белокрылов, О.Я. Попова, О.Н. Деревнина, И.В. Молчанова // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. – 1994. – Т. СХУП. – №5. – С. 500-501.

Березина Н.А. Влияние рН среды на пресноводных беспозвоночных в экспериментальных условиях / Н.А. Березина // 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.

Биохимия: Учебник для вузов / Е.С. Северин. – Изд-во «ГЭОТАР-МЕД», 2003. – 779 с.

Богатов В.В. Аккумуляция тяжелых металлов в мягких тканях двустворчатых моллюсков (*Bivalvia*) из природных озер Восточного Сихотэ-Алиня (Россия) и дельты Меконга (Вьетнам) / В.В. Богатов, Л.А. Прозорова, Е.Н. Чернова [и др.] // Доклады Академии наук. – 2019. – Т. 484. – №2. – С. 206-208.

Богданов В.Д. Оценка современного состояния водных экосистем и проблемы охраны биологических ресурсов при обустройстве Крузенштернского ГМК / В.Д. Богданов, Л.Н. Степанов, Е.Н. Богданова [и др.] // Экономика региона. – 2015. – №3(43). – С. 266-278.

Бокша И.С. Особенности метаболизма глутамата при шизофрении / И.С. Бокша // Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М., 2008. – 42 с.

Большаков В.Н. Озерная лягушка (*Rana ridibunda* Pall.) как объект мониторинга Рефтинской ГРЭС / В.Н. Большаков, Н.Л. Иванова // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2013. – №1(39). – С. 245-247.

Большая советская энциклопедия. — М.: Советская энциклопедия. – 1969–1978.

Бондаренко Л.Б. Пул свободных аминокислот сердца крыс в норме и при введении пиразинамида / Л.Б. Бондаренко, Н.А. Сапрыкина, В.Н. Коваленко // Токсикол. вестн. – 2007. – №6. – С. 24-28.

Боровик Л.П. Современные особенности режима сохранения эталонных сообществ в заповеднике Стрельцовская степь / Л.П. Боровик // Режимы степных особо охраняемых природных территорий, мат-лы межд. науч. конф. Курск. – 2012. – С. 11-14.

Браунштейн А.Е. Биохимия аминокислотного обмена – М.: АМН, 1949. – 426 с.

Буданов И.С. Динамика химических показателей воды при разных режимах содержания медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis*) / И.С. Буданов, А.А. Никишов, Н.А. Волкова [и др.] // Вестник Казанского ГАУ. – 2011. – №2 (20). – С. 117-119.

Вигдорович В.И. История и экология г. Тамбова / В.И. Вигдорович, Л.Е. Цыганкова. – Тамбов, 1996. – 216 с.

Видягина Е.О. Содержание свободных аминокислот в мышцах плотвы *Rutilus rutilus* (L.) Шекснинского плёса Рыбинского водохранилища / Е.О. Видягина // Организмы, популяции, экосистемы: проблемы и пути сохранения биоразнообразия: мат-лы Всерос. конф. с междунар. участием. Вологда. – 2008. – С. 14-16.

Виноградов А.П. Среднее содержание химических элементов в главных типах изверженных пород земной коры / А.П. Виноградов // 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.

Власюк П.А. Химические элементы и аминокислоты в жизни растений, животных и человека / П.А. Власюк, Н.М. Шкварук, С.Е. Сапатый, Г.Д. Шамотиенко. – Киев: «Наукова думка», 1974. – 220 с.

Волков М.С. Глутаминовая кислота. Биохимическое обоснование практического использования / М.С. Волков, А.М. Генкин, Н.А. Глотов, Е.И. Маевский. – Св.: Ср-Ур. изд-во, 1975. – 119 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 / Д.В. Воробьев // Автореф. дис. ...канд. биол. наук. Астрахань, 2008. – 22 с.

Воскресенский А. Монография врачебных пиявок / А. Воскресенский. – СПб., 1859. – 500 с.

Воскресенский Р.Н. Антиоксидантная система, онтогенез, старение / Р.Н. Воскресенский, А.А. Жутаев, В.Н. Бобырев // Вопр. мед. химии. – 1982. – №1. – С. 14-27.

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.

Гамуля Ю.Г. Заметки к флоре урочища «Горелая долина» (Змиевской район, Харьковской области) / Ю.Г. Гамуля // Мат-лы науч. конф. молодых ученых биол. ф-та и науч.-исслед. инст-та биологии. Харьков: ХГУ. – 1994. – С. 10-11.

Гараева С.Н. Аминокислоты в живом организме / С.Н. Гараева, Г.В. Редкозубова, Г.В. Постолати. – К.: Кишинев, 2009. – 552 с.

Гвоздецкий Н.А. Физическая география СССР. Общий обзор. Европейская часть СССР. Кавказ / Н.А. Гвоздецкий. – М.: Мысль. – 1969. – 461 с.

Гвоздецкий Н.А. Физическая география СССР. Азиатская часть / Н.А. Гвоздецкий, Н.И. Михайлов. – М.: Мысль. – 1970. – 543с.

Геращенко Л. Вам поможет медицинская пиявка: энциклопедия гирудотерапии: лечение без лекарств / Л. Геращенко, Г. Никонов. – М.: АСТ. Астрель. Транзиткнига, 2005. – 334 с.



Герд С.В. Обзор гидробиологических исследований озер Карелии / С.В. Герд // Труды Карело-Финского отд. ВНИОРХ. – 1946. – Т. II. – С. 29-132.

Гидрографическое районирование территории Российской Федерации. Книга 1. – М.: НИИ-Природа, 2008. – 541 с.

Глинник С.В. Гормональный статус и содержание свободных аминокислот в плазме крови крыс с экспериментальным гипотиреозом при тепловом воздействии / С.В. Глинник, О.Н. Ринейская, И.В. Романовский, Т.П. Красенкова // Вестник Витебского гос. мед. университета. – 2007. – Т. 6. – №2. – С. 13-18.

Глотов Н.А. Окислительные процессы в митохондриях при гипоксии и их коррекция глутаминовой кислотой / Н.А. Глотов // Автореф. дис. ... д-ра. мед. наук. Свердловск, 1973. – 28 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.

Голиков С.Н. Общие механизмы токсического действия / С.Н. Голиков, Н.В. Сапоцкий, Л.А. Глухов. – Л.: Медицина, 1998. – 280 с.

Голованова И.Л. Физиолого-биохимический статус рыб под действием глифосатсодержащих гербицидов (Обзор) / И.Л. Голованова, А.И. Аминов // Биология внутренних вод. – 2019. – №2-2. – С. 83-94.

Головина И.В. Особенности метаболизма в тканях моллюска-вселенца в Черном море *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) (Bivalvia: Arcidae) / И.В. Головина, О.Л. Гостюхина, Т.И. Андреевко // Российский Журнал Биологических Инвазий. – 2016. – № 1. – С. 53–66.

Гольдберг Д.И. Справочник по гематологии / Д.И. Гольдберг, Е.Д. Гольдберг. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 1980. – 268 с.

Горбатова О.Н. Атлас Алтайского края / О.Н. Горбатова – Барнаул: НИИГП, 1998. – 137 с.

Горизонтов П.Д. Гомеостаз / П.Д. Горбатов – М.: Медицина, 1981. – 576 с.

Горшенев К.А. Путешествия по Краснодарскому краю / К.А. Горшенев. – 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 2021 г. – Екатеринбург, 2022. – 318 с.

Готовский Ю.В. Аминокислоты / Ю.В. Готовский, Л.Б. Косарева, Ю.Ф. Перов. – М.: ИМЕДИС, 2002. – 43 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 [и др.] // Физиология. – 1995. – Т. 340. – №6. – С. 830-831.

Гринберг А.А. Введение в химию комплексных соединений / А.А. Гринберг – Л.: Химия, 1971. – 326 с.

Гугушвили Н.Н. Влияние продуктов метаболизма *Echinococcus granulosus* на концентрацию свободных аминокислот в вытяжке мышечной ткани и внутренних органов крупного рогатого скота / Н.Н. Гугушвили, Т.А. Инюкина // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2009. – №2. – С. 201-204.

Давид О.Ф. Морфофизиологические основы локомоции аннелид / О.Ф. Давид. – Л.: Наука, 1990. – 168 с.

Даждо Р. Основные экологии / Р. Даждо. – М.: Мир, 1975. – 415 с.

Данилин И.А. Металлотионеины как биомаркеры при действии на организмы тяжелых металлов и ионизирующего излучения / И.А. Данилин // 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.

Дегтярева И.И. Нарушение аминокислотного фонда сыворотки крови и слизистой оболочки желудка у больных язвенной болезнью / И.И. Дегтярева, Е.В. Солодова // Терапевт. арх. – 1984. – №8. – С. 100–106.

Демченко, М.А. Гидрография Харьковской области / М.А. Демченко // Матлы Харьковского отд. Геогр. Общ-ва Украины. Выпуск VIII. Харьковская область. Природа и хозяйство. Из-во Харьковск. Гос Университета, Харьков, 1971. – С.125-149.

Джабаров М.И. Аминокислотный состав тканей различных видов рыб в онтогенезе и при изменении экологических условий / М.И. Джабаров. – М.: Изд-во ВНИРО, 2006. – 213 с.

Димитров А.Н. Практика лечения мигрени медицинскими пиявками / А.Н. Димитров // Инновации. Наука. Образование. – 2023. – № 80. – С. 136–141.

Добринская Л.А. Рост мальков карпа в экспериментальных условиях / Л.А. Добринская, Т.В. Следь // Экология. – 1974. – №6. – С. 62-68.

Догель В.А. Зоология беспозвоночных: Учебник для ун-тов / Под ред. проф. Полянского Ю. И. – 7-е изд., перераб. и доп. — М.: Высш. школа, 1981. – 606 с.

Донец М.М. Пищевая безопасность двустворчатых моллюсков Южного Вьетнама: хлорорганические соединения и тяжелые металлы как факторы риска для здоровья человека / М.М. Донец, В.Ю. Цыганков, В.И. Кульшова [и др.] // Медицинский академический журнал. – 2020. – Т. 20. – №2. – С. 45-58.

Дьюсбери Д. Поведение животных / Д. Дьюсбери. – 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).

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.

Жадкевич М.М. Аминокислоты плазмы крови у больных перитонитом: значение индекса Фишера / М.М. Жадкевич, Л.А. Баратова, Д.В. Матвеев // Лаб. дело. – 1989. – № 2. – С. 29-32.

Жаров Д.Г. Секреты гирудотерапии или как лечиться пиявками / Д.Г. Жаров. – 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 сальпингоофорита в стадии обострения по инфекционно-токсическому типу / Р.Н. Живогляд // 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 / Т.В. Загузова // Водные экосистемы Урала, их охрана и рациональное использование. – Свердловск, 1989. – С. 42.

Зайденберг М.А. Исследование репаративных процессов в тканях ран экспериментальных животных после введения глицина / М.А. Зайденберг, С.А. Писаржевский, И.М. Носова // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1981. – Т. 92. – №11. – С. 599-601.

Зайко Н.Н. Патологическая физиология. Учебник для студентов мед. Вузов / Н.Н. Зайко, Ю.В. Быць, А.В. Атаман. – К.: «Логос», 1996. – 345 с.

Зайцев К.С. Мембранные переносчики аминокислоты глицин в нервной ткани: структура, локализация, основные функции и регуляция / К.С. Зайцев, Е.В. Машковцева, Я.Р. Нарциссов // Успехи современной биологии. – 2012. – Т. 132. – № 4. – С. 391–400.

Залозный Н.А. Итоги изучения водных олигохет и пиявок Западной Сибири / Н.А. Залозный / В кн.: Водоемы Сибири и перспективы их рыбохозяйственного использования. – Томск, 1973. – С. 182-183.

Залозный Н.А. Итоги изучения водных олигохет и пиявок Западной Сибири / Н.А. Залозный // Новые данные о фауне и флоре Сибири. Томск, 1979. – С. 182-183.

Залозный Н.А. Роль олигохет и пиявок в экосистемах водоемов Западной Сибири / Н.А. Залозный // Биол.ресурсы водоемов Сибири и Дальнего Востока. – М.: Наука, 1984. – С. 124-143.

Западнюк В.И. Аминокислоты в медицине / В.И. Западнюк, Л.П. Купраш, М.У. Заика, И.С. Безверхая / Киев: Здоров'я. – 1982. – 199 с.

Запкунене Д.В. Разведение и выращивание медицинских пиявок в лабораторных условиях / Д.В. Запкунене // 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.

Зеленский В.Д. Исследования по морфологии и систематике *Hirudinea*. I. Организация *Ichthyobdellidae* / В.Д. Зеленский. – Пгр., 1915. – 256 с.

Зенкевич Л.А. Очерки по эволюции двигательного аппарата животных / Л.А. Зенкевич // Журн. общ. биол. – 1944. – Т. 3. – С. 129-170.

Зиненко А.И. Экология медицинских пиявок / А.И. Зиненко, С.Ю. Утевский, А.А. Атемасов [и др.] // X 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 / В.К. Иванов // Тез. докл. междунар. конф. – Петрозаводск, 1995. – С. 30.

Иванова Н.Л. Сравнительное изучение роста и развития личинок некоторых видов амфибий в контролируемых условиях / Н.Л. Иванова // 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.

Кадастр беспозвоночных животных Самарской Луки: учеб. пособие / под ред. Розенберга Г.С. – Самара, 2007. – 471с.

Каменев Ю.Я. Вам поможет пиявка: практ. руководство по гирудотерапии / Ю.Я. Каменев, О.Ю. Каменев. – СПб.: Весь, 2003. – 253 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 О.Ю. Ресурсы медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis* L.) в акваториях Западного Предкавказья и их рациональное использование / О.Ю. Каменев // Автореф. дис. ... канд. биол. наук / Кубан. гос. аграр. Ун-т. – Краснодар, 2007. – 24 с.

Каменев Ю.Я. Вам поможет пиявка: практическое руководство по гирудотерапии / Ю.Я. Каменев, О.Ю. Каменев. – СПб., 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.

Каранова М.В. Изменение содержания свободных аминокислот тканевых жидкостей пресноводного моллюска *Limnaea stagnalis* в процессе сезонной адаптации к низким положительным температурам / М.В. Каранова // Известия РАН. Серия биологическая. – 2006. – №6. – С. 719-724.

Каранова М.В. Эффект холодового шока на ответы фосфомоноэфиров и свободных аминокислот ротана *Perccottus glehni* в органах, богатых фосфолипидами / М.В. Каранова // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2017. – № 1. – С. 89–97.

Каталог річок України, Видавництво Академії наук Української РСР. – Київ, 1957. – 122с.

Кесслер К. Материалы для познания Онежского озера и Обонежского края, преимущественно в зоологическом отношении / К. Кесслер // Прилож. К Тр. 1-го съезда русск. естествоиспыт. – СПб, 1868. – С. 1-144.

Кобахидзе Д.Н. К выяснению местообитаний медицинской пиявки в природных условиях Грузии / Д.Н. Кобахидзе // Сообщ. АН Груз. ССР. – 1942. – Т. 3. – Вып. 1. – С. 69-72.

Кобахидзе Д.Н. К изучению гидростойкости медицинской пиявки / Д.Н. Кобахидзе // Сообщ. АН Груз. ССР. – 1944. – Т. 5. – Вып. 4. – С. 423-429.

Кобахидзе Д.Н. Материалы к инвентаризации гидрофауны Грузии / Д.Н. Кобахидзе // Тр. Зоол. ин-та АН Груз. ССР. – 1946. – Т. 6. – С. 291-297.

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 [и др.] // «Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія». – 2007. – Вип. 6. – №788. – С. 44-47.

Ковальчук Л.А. Особенности окислительного метаболизма хвостатых и бесхвостых амфибий в период постэмбрионального развития / Л.А. Ковальчук // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Свердловск, 1977. – 24 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. Эколого-физиологические аспекты адаптации к условиям техногенных экосистем. – Екатеринбург: УрО РАН, 2008. – 215 с.

Ковальчук Л.А. Изучение роли фонда свободных аминокислот в гомеостатических функциях организма (в природе и в лабораторном эксперименте) / Л.А. Ковальчук, А.Э. Тарханова, А.А. Тарханов // Экология в высшей школе: синтез науки и образования: материалы Всерос. науч.-практич. конф. в 2 ч. – Челябинск, 2009. – Ч. 1. – С. 244-249.

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 секрета 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, 1820 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 секрета слюнных желез и тканей медицинских пиявок. Значение для гирудотерапии / Л.А. Ковальчук, Л.В. Черная // Вестник восстановительной медицины. – 2013. – №2. – С. 36-39.

Ковальчук Л.А. Видовые особенности аминокислотного спектра плазмы крови рукокрылых (Mammalia: Chiroptera) Урала / Л.А. Ковальчук, В.А. Мищенко, Л.В. Черная, В.П. Снитько // Экология. – 2018. – №4. – С. 291-298.

Ковальчук Л.А. Свободные аминокислоты плазмы крови летучих мышей (*Myotis dasycneme*) при экспериментальном воздействии низких положительных и



околонулевых температур / Л.А. Ковальчук, В.А. Мищенко, Н.В. Микшевич, Л.В. Черная, М.В. Чибиряк, А.П. Ястребов // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2018. – Т. 54. – № 4. – С. 247-256.

Ковальчук Л.А. Возрастная динамика свободных аминокислот в тканях медицинской пиявки (*Hirudo verbana* Carena, 1820) при искусственном воспроизводстве в аквакультуре / Л.А. Ковальчук, Л.В. Черная, Н.В. Микшевич // Сельскохозяйственная биология. – 2021. – Т. 56. – № 2. – С. 335–346.

Ковальчук Л.А. Гематологические и биохимические параметры инвазивного вида земноводных *Pelophylax ridibundus* (Amphibia, Anura), интродуцированного в водные объекты Среднего Урала / Л.А. Ковальчук, Л.В. Черная, В.А. Мищенко, Н.В. Микшевич // Биология внутренних вод. – 2022. – № 4. – С. 431–439.

Ковальчук Л.А. Оценка сезонной изменчивости спектра свободных аминокислот плазмы крови бореального вида фауны рукокрылых Урала – прудовой ночницы *Myotis dasycneme* (Voie, 1825) / Л.А. Ковальчук, В.А. Мищенко, Л.В. Черная, В.П. Снитько, В.Н. Большаков // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. – 2022. – Т. 507. – С. 488–492.

Ковальчук Л.А. Эколого-физиологические параметры *Myotis dasycneme* (Mammalia Chiroptera: Vespertilionidae) фауны Урала / Л.А. Ковальчук, В.А. Мищенко, Л.В. Черная, Н.В. Микшевич // Nature Conservation Research. Заповедная наука. – 2023. – № 8(4). – С. 94–111.

Ковальчук Л.А. Аминокислотный фонд сыворотки крови европейских мигрирующих видов рукокрылых: *Vespertilio murinus* Linnaeus, 1758 и *Pipistrellus nathusii* Keyserling et Blasius, 1839, обитающих на Урале / Л.А. Ковальчук, В.А. Мищенко, Л.В. Черная, В.Н. Большаков // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. – 2024. – Т. 516. – С. 20–25.

Коденцова В.М. Функциональный ингредиент таурин: адекватные и клинически эффективные дозы / В.М. Коденцова, Д.В. Рисник, О.Б. Ладодо // Медицинский совет: журн. – 2022. – Т. 16. – № 14. – С. 88–95

Кожаева Д.К. Влияние биоэкологических факторов на рост молоди карпа / Д.К. Кожаева, А.Б. Хабжоков, С.Ч. Казанчев // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2015. – №2(52). – С. 193-195.

Козаренко Т.Д. Ионообменная хроматография аминокислот / Т.Д. Козаренко. – Новосибирск: Наука, 1975. – 133 с.

Комов В.Т. Содержание ртути в организме амфибий и пиявок водоемов Вологодской и Ярославской областей и экспериментальное подтверждение вызываемых ею биологических последствий / В.Т. Комов, Е.С. Иванова, В.А. Гремячих [и др.] // Труды Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН. – 2017а. – №77(80). – С. 57-76.

Константинов А.С. Общая гидробиология: учебник / А.С. Константинов. – М.: Высш. шк., 1979. – 480 с.

Красная книга Луганской Народной Республики. Электронное издание / Под общ. ред. Е.И. Соколовой. – Луганск: Министерство природных ресурсов и экологической безопасности, 2017. – 185 с.

Красная книга Республики Крым. Животные / отв. ред. С.П. Иванов, А.В. Фатерыга. Министерство экологии и природных ресурсов Республики Крым, 2015. Симферополь: «АРИАЛ». – 440 с.

Красная книга Краснодарского края. 2007 // <https://cicon.ru/kk-krasnodarskogo-kray.html>

Красная книга России. 2017 // <https://cicon.ru/piyavka-aptechnaya-krum.html>

Красуцкий Б.В. Медицинская пиявка – новый вид в фауне Челябинской области / Б.В. Красуцкий, В.А. Гашек // Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия. – 2023. – Т. 9. – № 2. С. 125–133.

Крячко О.В. Устройство для постановки пиявок кошкам на ухо / О.В. Крячко, Л.А. Лукоянова // Патент на полезную модель RU 216004 U1, 12.01.2023. Заявка № 2022124707 от 19.09.2022.

Крылова Е.Н. Фауна, распространение и экологические особенности олигохет (*Oligochaeta*) и пиявок (*Hirudinea*) бассейна реки Обь / Е.Н. Крылова, Д.М. Безматерных // Зоологический журнал. – 2019. – Т. 98. – № 6. С. 605-615.

Кулаев С.И. К биологии *Herpobdella testacea* Savigny, 1820 / С.И. Кулаев // 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. В 2-х частях. 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 / А.В. Лагунов // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2009. – №6. – С. 186-189.

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.

Ленинджер А. Метаболизм аминокислот. Основы биохимии / А. Ленинджер. – М.: Мир, 1985. – Т.1. – С.107-137; – Т.2. – С. 571-601, С. 653-683; – Т. 3. – С.812-849.

Ливанов Н.А. Пиявки – *Hirudinea* / В кн.: Животный мир СССР. – Л. 1937. – С. 558-561.

Литвиненко Л.И. Влияние факторов внешней среды на структуру и функционировании биоценозов гипергаллиных 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.

Лозина-Лозинский Л.К. Очерки по криобиологии. Адаптации и устойчивость организмов и клеток к низким и сверхнизким температурам / Л.К. Лозина-Лозинский. Л.: Наука, 1972. – 288 с.

Лукин Е.И. К вопросу о распространении медицинской пиявки в СССР / Е.И. Лукин // Зоол. журн. – 1957. – Т. 36. – Вып. 5. – С. 658-669.

Лукин Е.И. Географическое распространение пресноводных пиявок на территории СССР / Е.И. Лукин // Проблемы зоогеографии суши. – Львов, 1958. – С. 144-149.

Лукин Е.И. Класс пиявки (*Hirudinea*) / Е.И. Лукин // Жизнь животных. – М.: Просвещение, 1968. – Т. 1. – С. 509-526.

Лукин Е.И. Пиявки пресных и солоноватых водоемов / Е.И. Лукин. – Л., 1976. – Т. 1. – 484 с. – (Фауна СССР, №109).

Лукин Е.И. Определитель пресноводных беспозвоночных Европейской части СССР: Класс пиявки *Hirudinea* / Е.И. Лукин. – Л.: Гидрометеиздат, 1977. – 204 с.

Лысенкова З. Современные ландшафты в региональной системе природопользования / З. Лысенкова. – Смоленск, 2010. – 273 с.

Лябзина С.Н. Беспозвоночные-некробионты литоральной зоны пресных водоемов Карелии / С.Н. Лябзина // 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.

Мазо В.К. Глутатион как компонент антиоксидантной системы желудочно-кишечного тракта / В.К. Мазо // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 1998. – №1. – С. 47-53.

Майстер А. Биохимия аминокислот / А. Майстер. – М.: Иностранная литература, 1961. – 530 с.

Максимова Е.А. Животные водоемов Челябинской области (беспозвоночные) / Е.А. Максимова // Доклады к научно-краеведческой конференции, посвященной 95-летию со дня рождения В.И. Ленина. – Челябинск, 1965. – С. 67-70.

Машковский М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский – М.: Медицина. – 1993. – Ч. 2. – Гл. 7-8. – С. 111-122.

Мешкова А.М. Пиявки озера Севан / А.М. Мешкова // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Баку, 1956. – 13 с.

Микшевич Н.В. Водная среда и экологическая безопасность человека: учеб. пособие по курсу «Экология и безопасность жизнедеятельности» / Н.В. Микшевич, Л.А. Ковальчук. – ФГБОУ ВПО «Урал.гос.пед.ун-т». – Екатеринбург, 2014. – Ч. 1. – 128 с.

Микшевич Н.В. Водная среда и экологическая безопасность человека. Часть 2. Инженерные методы обеспечения экологической безопасности водных ресурсов: учеб. пособие по курсу «Экология и безопасность жизнедеятельности» / Н.В. Микшевич, Л.А. Ковальчук. – ФГБОУ ВПО «Урал.гос.пед.ун-т». – Екатеринбург, 2018. – Ч. 2. – 128 с.

Мискевич Д.А. Влияние введения некоторых неполярных аминокислот на состояние углеводного обмена в печени крыс на фоне тиацетамидного гепатита / Д.А. Мискевич // Аминокислоты и их производные в биологии и медицине: материалы конф. – Гродно, 2001. – С. 79-80.

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 сопредельных территорий. – Краснодар, 2005. – С. 136-138.

Михайлов С.В. Распространение и биология медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis* L.) в Краснодарском крае / С.В. Михайлов // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Ставрополь, 2006 – 24 с.

Мищенко В.А. Адаптивные возможности озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771), интродуцированной в Верхне-Тагильское водохранилище Среднего Урала / В.А. Мищенко // Современная герпетология: проблемы и пути их решения. Статьи по мат. докл. Первой межд. молод. конф., Санкт-Петербург, 2013. – С. 115-117.

Мищук Е.В. Роль металлотионеинов в тканях двустворчатого моллюска *Anodonta cygnea* в детоксикации ионов меди / Е.В. Мищук, Р.Л. Мыхайлив // Биология – наука XXI века: 7 Пущин. шк.-конф. молодых ученых: сб. тез. – Пушкино, 2003. – С. 193-194.

Моисеенко Т.И. Водная экотоксикология: теоретические и прикладные аспекты / Т.И. Моисеенко. – Ин-т водных проблем РАН. – М.: Наука, 2009. – 400 с.

Мониторинг особо охраняемых природных территорий различных категорий Свердловской области / И.А. Кузнецова, Л. А. Пустовалова, М. Г. Головатин

[и др.]; отв. ред. И. А. Кузнецова. – Институт экологии растений и животных УрО РАН. – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2022. – 117 с.

Мортеза Юсефичахардехи. Биологические и хозяйственно-полезные признаки медицинской пиявки при совершенствовании технологии выращивания в условиях замкнутого оборота воды / Юсефичахардехи Мортеза // Автореферат дис. ... кандидата биологических наук: – Москва, 2016. – 22 с.

Морузи И.В. Биохимический состав мышечной ткани судака *Lucioperca lucioperca* (L.) Новосибирского водохранилища / И.В. Морузи, В.С. Токарев, П.Н. Смирнов, Е.В. Пищенко // Вестник Новосибирского государственного аграрного университета. – 2012. – Т. 1. – №22-2. – С. 74-76.

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, [и др.] // Вестник Новосибирского государственного аграрного университета. – 2012а. – №1-2(22). – С. 80-82.

Неклюдов А.Д. Биологические свойства ароматических, гетероциклических, алифатических аминокислот / А.Д. Неклюдов // Антибиотики и химиотерапия. – 1990. – Т. 35. – №5. – С.51-54.

Некрасова Л.С. Экспериментальное изучение влияния плотности поселений личинок кровососущих комаров *Aedes communis* Deg. на их биологические характеристики / Л.С. Некрасова // Экология. – 2004. – №3. – С. 223-228.

Немова Н.Н. Биохимическая индикация состояния рыб / Н.Н. Немова, Р.У. Высоцкая. – М.: Наука, 2004. – 212 с.

Нетяхата Ж.Н. Показатели аминокислотного обмена при патологии внутренних органов / Ж.Н. Нетяхата, С.Н. Ляпун // Сов. медицина. – 1973. – №3. – С.38-43.

Нефедов Л.И. Формирование фонда свободных аминокислот и их производных в условиях метаболического дисбаланса / Нефедов Л.И. // Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Минск, 1993. – 36 с.

Нечипоренко Н.А. Изменения белкового обмена и фонд свободных аминокислот у больных раком мочевого пузыря / Н.А. Нечипоренко, Л.И. Нефедов, И.И. Климович // Вопр. онкологии. – 1990. – Т. 36. – №10. – С. 1201-1205.

Никаноров А.М. Биомониторинг металлов в пресноводных экосистемах / А.М. Никаноров, А.В. Жулидов. – Л.: Гидрометеиздат, 1991. – 312 с.

Никаноров А.М. Биомониторинг тяжелых металлов в пресноводных экосистемах / А.М. Никаноров, А.В. Жулидов, А.Д. Покаржевский. – Л.: Гидрометеиздат, 1993. – 291 с.

Никишов А.А. Сравнительная оценка поведения медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis*) при разных режимах содержания / А.А. Никишов, Б. Абтахи, Юсефичахардехи Мортеза // Вестник российского университета дружбы народов. Серия: Агротомия и животноводство. – 2015. – №2. – С. 81-87.

Никонов Г.И. Медицинская пиявка: вчера, сегодня, завтра... / Г.И. Никонов. – М.: Электроника, 1992. – 123 с.

Никонов Г.И. Медицинская пиявка: основы гирудотерапии / Г.И. Никонов. – СПб.: СДС, 1998. – 294 с.

Никонов Г.И. Гирудотерапия: наука и практика / Г.И. Никонов // 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.

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 раз-



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

Нохрина Е.С. Эколого-физиологические особенности медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis* L.) из природных популяций и выращенной на биофабрике / Е.С. Нохрина // Автореф. дис. ... канд. биол. наук – Екатеринбург, 2010. – 20 с.

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

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

Нюкканов А.Н. Воздействие природных экотоксикантов на гидробионты Республики Саха (Якутия) / А.Н. Нюкканов // Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Красноярск, 2004. – 30 с.

ООПТ Нижней Волги как важнейший механизм сохранения биоразнообразия: итоги, проблемы и перспективы. – Волгоград, 2010. – 288 с.

Остроумов С.А. Удаление кадмия и других токсичных металлов из воды: термофилы и новые биотехнологии / С.А. Остроумов, И.В. Тропинин, А.В. Кирюшин // Экологическая химия. – 2018. – Т. 27. – №5. – С. 264-269.

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 / В.В. Павловская // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Калининград, 2007. – 25 с.

Парахуда Н.А. Оценка ландшафтных систем административного района и предложения по улучшению их экологического состояния: на примере Каневского района Краснодарского края / Н.А. Парахуда // 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.

Плотников В. *Glossiphoniidae*, *Hirudinidae* и *Herpobdellidae* Зоологического музея Академии Наук / В. Плотников // Ежегодн. Зоол. муз. Акад. наук. – 1907. – Т. 10. – С. 133-158.

Подгурская О.В. Механизмы детоксикации тяжёлых металлов у моллюсков семейства *Mytilidae* / О.В. Подгурская // 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, Укрग्रидропроект, Харьков, 2010. – 112 с.

Приказ Минсельхоза России от 18.12.2015 №648 "Об утверждении Перечня подконтрольных товаров, подлежащих сопровождению ветеринарными сопроводительными документами" (Зарегистрировано в Минюсте России 17.02.2016 N 41118).

Прокаев В.И. Физико-географическое районирование Свердловской области / В.И. Прокаев – Свердловск: Свердл. Гос. Пед. Ин-т. – 1976. – 137 с.

Пронина Г.И. Физиолого-иммунологическая оценка культивируемых гидробионтов: карпа, сома обыкновенного, речных раков / Г.И. Пронина // Автореф. дис. ... докт. биол. наук – Москва, 2012. – 37 с.

Проссер Л. Сравнительная физиология / Л. Проссер. – 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 др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2012. – Т. 52. – № 6. – С. 616.

Раковская Э.М. Физическая география России / Э.М. Раковская, М.И. Давыдова / Учеб. для студ. пед. выс. Учеб. заведений: В 2 ч. – 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 / Е.В. Рассадина // 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.

Ревякин В.С. География Алтайского края / В.С. Ревякин, В.М. Пушкарев. – Барнаул: Алт. книж. изд-во, 1989. – 223 с.

Решетняк О.С. Многолетняя изменчивость содержания соединений кадмия и свинца в речных экосистемах России / О.С. Решетняк, В.А. Брызгалов, Л.С. Косменко // География и природные ресурсы. – 2017. – № 1. – С. 71–80.

Розанов А.Я. Ферментативные процессы и их коррекция при экстремальных состояниях / А.Я. Розанов, А.И. Трещинский, Ю.В. Хмелевский. – Киев: Здоров'я, 1985. – 208 с.

Розенберг Г.С. Глобальная экология: становление и современное состояние (к 100-летию со дня рождения академика М.И. Будыко) / Г.С. Розенберг // Век глобализации, 2020. – № 1(33). – С. 57-70.

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. 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. 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. Оценка скорости роста африканского клариевого сома из географически изолированных популяций / Е.М. Романова, М.Э. Мухитова, В.В. Романов [и др.] // Рыбоводство и рыбное хозяйство. – 2019. – №6(161). – С. 56-62.

Рудакова С.Л. Обеспечение ихтиопатологического благополучия объектов и хозяйств аквакультуры России / С.Л. Рудакова // Труды ВНИРО. – 2016. – Т. 162. – С. 104-115.

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.

Рыженков В.Е. Гиполипидемическое действие глицина и его производных / В.Е. Рыженков, Д.С. Молоковский, Д.В. Иоффе // Вопросы мед. химии. – 1984. – №2. – С. 78-81.

Савина М.В. Свободные аминокислоты в плазме крови миног, лягушек и крыс / М.В. Савина, М.А. Егоянц, Е.М. Королева, Т.И. Иванова // Эволюционная биохимия и физиология. – 1990. – Т. 26. – №3. – С. 421-424.

Савинов В.А. Гирудотерапия в гастроэнтерологии / В.А. Савинов. – Брянск: Асклепейон, 2002. – 51 с.

Салтанов А.И. Аминокислотные смеси нового поколения. Неонутрин / А.И. Салтанов // Вестник интенсивной терапии. – 2003. – № 1. – С. 55–58.

Салтыков В.П. Выращивание медицинских пиявок в искусственных субстратах / В.П. Салтыков / X Міжнародна Конференція Асоціації гірудологів. Мат-лы конф., Харків, 2012. – С. 12-14.

Самойлов А.Н. «Пиявит»: сравнительная оценка эффективности при травме роговицы в эксперименте / А.Н. Самойлов // Гирудотерапия и гирудофармакотерапия. – 2001. – Т. 3. – С.103-109.

Северин Е.С. Биохимия: Учебник для вузов / Е.С. Северин. – Изд-во «ГЭОТАР-МЕД», 2003. – 779 с.

Северьянова Л.А. Механизмы действия аминокислоты L-аргинина на нервную и иммунную регуляторные системы / Л.А. Северьянова, И.И. Бобынцев // Курский научно-практич. вестник «Человек и его здоровье». – 2006. – №3. – С. 60-75.

Селезнев К.Г. Сравнительный анализ эффективности лекарственных препаратов «Пиявит» и «Супер-пиявит» по результатам клинических испытаний / К.Г. Селезнев // Гирудотерапия и гирудофармакотерапия. – 1996. – С. 30-43.

Сивков И.И. Свободные аминокислоты сыворотки крови некоторые показатели функционального состояния печени у больных с нарушениями кровообращения / И.И. Сивков, Н.А. Лебедева // Кардиология. – 1974. – №1. – С. 43-48.

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) / С.А. Сидоровский // Вестник зоологии. – 2012. – Т. 46(1) – С. 82.

Сідоровський С.А. Нова знахідка прісноводної каланоїдної копеподи *Hemidiaptomus hungaricus* (Copepoda, Calanoida) в урочищі «Горіла долина» (Україна) / С.А. Сідоровський // Вестник зоологии. – 2011. – Т.45(3) – С. 208.

Синева М.В. Биологические наблюдения над размножением медицинской пиявки / М.В. Синева // Зоол. журн. – 1949. – Т. 28. – Вып. 3. – С. 213-224.

Синева М.В. Наблюдения над выращиванием медицинских пиявок / М.В. Синева // Зоол. журн. – 1944. – Т. 23. – Вып. 6. – С. 293-303.

Скальская И.А. Реакция зооперифитона озер Дарвинского заповедника на ацидификацию / И.А. Скальская. – СПб.: Наука, 1994. – С. 170–185.

Слока Н.А. Определитель животных Латвийской ССР. Пиявки (*Hirudinea*) / Н.А. Слока. – Рига: ЛГУ, 1983. – 63 с.

Слотвицкий С.М. Влияние условий высокогорья Киргизии на гомеостаз свободных аминокислот крови белых крыс / С.М. Слотвицкий, Б.Н. Зуев // Вопросы анатомии и гистологии: сб. науч. тр. – Фрунзе, 1971. – Т. 74. – С. 279-284.

Сова Т.В. Луганський природний заповідник НАН України / Т.В. Сова // Екологія та природні багатства України. – Київ: Новий світ, 2008. – С. 176-177.

Соловьёв А.Ю. Механизмы стимуляции клеточной пролиферации под влиянием L-аминокислот в культуре тканей молодых и старых крыс / А.Ю. Соловьёв, Н.И. Чалисова, И.А. Чернова [и др.] // Успехи геронтологии. – 2013. – Т. 26. – №2. – С. 242-251.

Среднеуральская гидроэкспедиция [Электронный ресурс]. – URL: <http://uralgidrogeo.ru/interes/Sverdlovsk.htm> (Дата обращения: 19.02.2013).

Степанова З.Л. Изучение белково-пептидных веществ водной среды экспериментальных популяций личинок амфибий / З.Л. Степанова // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 1982. – 24 с.

Степанова Н.Ю. Зообентос как индикатор экотоксикологической обстановки в Куйбышевском водохранилище / Н.Ю. Степанова, В.А. Яковлев, В.З. Латыпо-

ва // Вестник РУДН. Сер. Экология и безопасность жизнедеятельности. – 2007. – №2. – С. 50-57.

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 металлотioneинов 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. Михайлив, Е.В. Мищук // Гидробиологический журнал. – 2004 – №3. – С. 91-102.

Стояновский Д.Н. Медицинская пиявка. Кровопускание / Д.Н. Стояновский. – 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.

Суджян А.В. Современные тенденции парентерального питания в США / А.В. Суджян, В.А. Горбунова // Гематология и трансфузиология. – 1983. – Т. 28. – №6. – С. 58-61.

Схема охраны вод реки Уды. Книга 4: Гидрология и гидрография. – Х.: Харьковгипроводхоз, 1985. – 60 с.

Тарханов Э.В. К фауне пиявок (Annelida, Hirudinea) Южного Зауралья / Э.В. Тарханов, В.А. Балахонова // «Зырянские чтения», мат-лы межрег. науч. конф. – Курган, 2005. – С. 227-228.

Тарханова А.Э. Особенности спектра незаменимых аминокислот плазмы крови у женщин при физиологически протекающей беременности в условиях промышленного города / А.Э. Тарханова, Л.А. Ковальчук // Вестн. Урал. мед. акад. науки. – 2009. – № 2(25) – С. 171-172.

Тер-Григорян М.А. Некоторые наблюдения над распространением медицинской пиявки в Армении / М.А. Тер-Григорян // Зоол. сб. – 1950. – Т. 7. – С. 122-126.

Титова Е.А. Биология медицинской пиявки / Е.А. Титова // Гирудотерапия и гирудофармакотерапия. – 2002. – Т. 4. – С. 12-17.

Титова Е.А. Краткие сведения по биологии медицинских пиявок / Е.А. Титова, Г.И. Никонов // Гирудотерапия и гирудофармакотерапия. – 2007. – Т. 5. – С. 207-247.

Трапезников А.В. Пресноводная радиоэкология / А.В. Трапезников, В.Н. Трапезникова. – Екатеринбург: Изд-во «АкадемНаука», 2012. – 544 с.

Трапезников А.В. Радиационно-гигиеническая оценка содержания и распределения  $^{90}\text{Sr}$  и  $^{137}\text{Cs}$  в ихтиофауне Обь-Иртышской речной системы / А.В. Трапезников, В.Н. Николкин, А.В. Коржавин, В.Н. Трапезникова // Радиационная гигиена, 2019. – Т. 12. – №3. – С. 16-26.

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.

Уголев А.М. Теория адекватного питания и трофология / А.М. Уголев. – Л.: Наука, 1991. – 272 с.

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 [и др.] // Вестник зоологии. – 2008 – Т. 42. – №1. – С. 56-58.

Федорова Л.И. Редкие и уязвимые виды пиявок России / Л.И. Федорова // Астраханский вестник экологического образования. – 2021. – № 4(64). – С. 186–194.



Филатова Т.А. Обзор условий выращивания медицинских пиявок в России и за рубежом / Т.А. Филатова // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2021. – № 6. – С. 51–56.

Флеров Б.А. Эколого-физиологические аспекты токсикологии пресноводных животных. – Л.: Наука, 1989. – 144 с.

Хатухов А.М. Пиявки Кабардино-Балкарии / А.М. Хатухов, А.В. Якимов, Е.А. Барагунова. – Метод. указания к изучению спецкурса «Фауна КБР». Нальчик, 2001. – 23 с.

Цветков И.Л. Биохимические параметры стресс-редуцирующей реакции гидробионтов при интоксикации / И.Л. Цветков // Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Москва, 2009. – 46 с.

Чалисова Н.И. Влияние аминокислот на культуру иммунокомпетентной ткани / Н.И. Чалисова, В.Д. Авелев // Тр. XXII съезда Физиологич. общ., им. И.П. Павлова. – Волгоград, 2013. – С. 574.

Чалисова Н.И. Нейроиммуноэндокринные механизмы действия пептидов и аминокислот в тканевых культурах / Н.И. Чалисова, И.В. Князькин, И.М. Кветной. – СПб.: ДЕАН, 2005. – 125с.

Чалисова Н.И. Регулирующая роль некоторых аминокислот при развитии апоптоза в культуре нервной и лимфоидной ткани / Н.И. Чалисова, В.А. Пеннийнен, Г. Хаазе // Рос. физиолог. журн. им. И.М. Сеченова. – 2002. – Т. 88. – №5. – С. 627-633.

Чалисова Н.И. Регулирующее действие аминокислот в органотипической культуре лимфоидных тканей с различной степенью иммунологической зрелости / Н.И. Чалисова, В.А. Пеннийнен, А.Д. Ноздрачев // Доклады АН – 2003. – Т. 389. – №5. – С. 714–717.

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. Пеннийнен [и др.] // 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.

Чеботина М.Я. Мониторинг трития в водных средах Уральского региона: монография / М.Я. Чеботина / отв. ред. Е.В. Поляков. – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2022. – 119 с.

Червона книга України, Тваринний світ. – К.: Глобалконсалтинг, 2009. – 624 с.

Черкесова Д.У. Физиологические аспекты клеточно-молекулярных закономерностей адаптации животных организмов к экстремальным ситуациям / Д.У. Черкесова // Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Астрахань, 2013. – 31 с.

Черная Л.В. Сравнительная эколого-физиологическая характеристика представителей гирудофауны Среднего Урала / Л.В. Черная // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Екатеринбург, 2003. – 24 с.

Черная Л.В. Возможность использования некоторых видов пиявок в качестве биоиндикаторов 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. 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. 2007. – С. 473.

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. – 2007а.– № 3. – С. 85-92.

Черная Л.В. Свободные аминокислоты пиявок с различной трофической организацией / Л.В. Черная, Л.А. Ковальчук // Вестник Оренбургского государственного университета. –2008.– № 10(92). – С. 225-229.

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. – 2009а. – С. 442-444.

Черная Л.В. Аминокислотный спектр тканей медицинских пиявок *Hirudo medicinalis* L. из различных природных популяций / Л.В. Черная // Первые Международные Беккеровские чтения. – Волгоград, 2010. – Ч. 1. – С. 558-560.

Черная Л.В. Влияние абиотических и биотических факторов среды на формирование аминокислотного спектра в тканях пресноводной хищной пиявки *Haemopsis sanguisuga* (Clitellata: Hirudinea) / Л.В. Черная, Л.А. Ковальчук // Сучасні проблеми біології, екології та хімії: сб. мат-лов межд. конф. – Запорожье. – 2012. – С. 172-173.

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, 2012а. – С. 78-80.

Черная Л.В. Оценка физиологического состояния медицинских пиявок *Hirudo medicinalis* L. и *Hirudo verbana* Cagena, 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. Географическая и сезонная изменчивость аминокислотного спектра тканей большой ложноконской пиявки *Haemoris sanguisuga* L. / Л.В. Черная // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – №6; URL: <http://www.science-education.ru/120-15322> (дата обращения: 11.11.2014).

Черная Л.В. Влияние тяжелых металлов на состояние аминокислотного пула тканей пиявок *Haemoris sanguisuga* (L. 1758) в модельном эксперименте / Л.В. Черная, Л.А. Ковальчук // Вода: химия и экология. – 2014. – №9. – С. 68-71.

Черная Л.В. Возрастные особенности аминокислотного пула в тканях хищной пиявки *Haemoris sanguisuga* L. 1758 (Hirudinea: Clitellata) / Л.В. Черная, Л.А. Ковальчук // Международный журнал экспериментального образования. – 2014а. – № 1 – С. 45-48.

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 гирудотерапии) / Л.В. Черная, Л.А. Ковальчук, Е.С. Нохрина, Г.И. Никонов, Г.В. Дугенец, М.П. Дугенец // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2014. – №3 (49). – С. 65-66.

Черная Л.В. Пиявки *Haemoris sanguisuga* Linnaeus, 1758 как биоиндикаторы при мониторинге загрязнения водных экосистем Урала тяжелыми металлами / Л.В. Черная, Л.А. Ковальчук, Н.В. Микшевич // 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.

Черная Л.В. Эссенциальные и токсичные металлы тканей медицинских пиявок (Эколого-физиологический аспект) / Л.В. Черная, Л.А. Ковальчук, Н.В. Микшевич / ФГБОУ ВО Ур ГПУ; Институт Экологии РиЖ УрО РАН. – Екатеринбург: УрГПУ, 2019а. – 320 с.

Черная Л.В. Аминокислотный спектр тканей как критерий благополучия медицинских пиявок в природе и гирудокультуре / Л.В. Черная, Л.А. Ковальчук, Н.В. Микшевич // Современное состояние и развитие аквакультуры: экологическое и ихтиопатологическое состояние водоемов и объектов разведения, технологии выращивания: Мат-лы межд. конф. / под ред. Е.В. Пищенко, И.В. Морузи. – Новосибирск: НГАУ. – 2020. – С. 217–221.

Черная Л.В. Особенности биоаккумуляции тяжёлых металлов в тканях большой ложноконской пиявки *Haemoris sanguisuga* L. в водных экосистемах Урала / Л.В. Черная, Л.А. Ковальчук, Н.В. Микшевич // Теоретическая и прикладная экология. – 2022. – №3. – С. 68–74.

Черная Л.В. Видовое разнообразие пиявок в водных экосистемах особо охраняемых природных территорий промышленных регионов России (на примере Урала и Донбасса) / Л.В. Черная, Л.А. Ковальчук, Н.В. Микшевич // Научные записки природного заповедника «Мыс Мартьян». Материалы научно-практической конференции с международным участием, посвященной 50-летию заповедника «Мыс Мартьян», Ялта, 23-26 октября 2023 г – 2023. – Вып. 14. – С. 357–362.

Черная Л.В. Новые находки медицинской пиявки *Hirudo verbana* (Cargena, 1820) в водных экосистемах Кабардино-Балкарии / Л.В. Черная, Л.А. Ковальчук, Д.К. Кожаева, Д.В. Жантеголов, Н.В. Микшевич // Водные биоресурсы и среда обитания. – 2024. – Т. 7. – №1. – С. 27-33.

Черная Л.В. Краснокнижный вид пиявок *Hirudo medicinalis* (Linnaeus, 1758) в Оренбургской области / Л.В. Черная, Л.А. Ковальчук, Н.В. Микшевич // Степи Северной Евразии: материалы X международного симпозиума / под научной редакцией академика РАН А.А. Чибилёва. – Оренбург: ИС УрО РАН, 2024. – С. 1460-1464.

Чистякова А.М. Влияние некоторых аминокислот на показатели липидного обмена в эксперименте / А.М. Чистякова, В.Н. Мирошкина, В.Е. Рыженков // Вопр. питания. – 1990. – №1. – С. 40-44.

Чуйко Г.М. Биомаркеры в системе оценки токсического воздействия на гидробионтов и в экологическом мониторинге водных экосистем / Г.М. Чуйко // Вода Magazine. – 2017. – № 7(119). – С. 66-77.

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.

Шарманов Т.Ш. Синтез, транспорт и утилизация аланина (аланин-глюкозный цикл) / Т.Ш. Шарманов, Э.К. Мухамеджанов // Вопросы медицинской химии. – 1981. – № 3. – С. 300-310.

Шарова И.Х. Зоология беспозвоночных / И.Х. Шарова. – М.: ВЛАДОС, 2002. – 592с.

Шейбак В.М. Влияние композиции, состоящей из таурина и цинка сульфата, на уровень свободных аминокислот плазмы, крови и печени / В.М. Шейбак, В.Ю. Смирнов, Г.М. Сухоцкая, М. В. Горецкая // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2007. – Т. 70. – №5. – С. 27-29.

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. МГАВ-МиБ им. К.И. Скрябина. – М., 1998. – С. 47-52.

Шепелева И.А. Возрастные особенности содержания свободных аминокислот в печени крыс, отравленных кадмием / И.А. Шепелева, Е.А. Деркач, Н.Н. Мельникова // Актуальные проблемы транспортной медицины, 2012. – №3 (29). – С. 94–100.

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 гирудотерапия. – 2007. – Т. 5. – С. 247-285.

Шишкина И.Д. Влияние медицинских пиявок на микроорганизмы и на организм человека / И.Д. Шишкина // 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.

Щеголев Г.Г. Жизнь пресных вод СССР / Г.Г. Щеголев. – 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 / Г.Г. Щеголев // Зоологич. журн. – 1948. – Т. 27. – №1 – С. 13-16.

Щеголев Г.Г. О применении видоизмененного метода Лонера для выкормки медицинских пиявок / Г.Г. Щеголев // Зоологич. журн. – 1946. – Т. 25 – №2. – С. 111-114.

Щеголев Г.Г. Пиявки Туркменистана / Г.Г. Щеголев, З.А. Щеголева // Тр. Мургаб. гидробиол. станции. – 1951. – Т. 1. – С. 77-102.

Щепин Ю.В. Мрфология и аминокислотный состав гонады морских ежей на основных стадиях полового цикла в норме и при кадмиевой интоксикации / Ю.В. Щепин // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Владивосток, 1985. – 24 с.

Щербань Э.П. Токсичность ионов некоторых тяжелых металлов для *Daphnia magna* Strans в зависимости от температуры / Э.П. Щербань // Гидробиол. журн. – 1977. – Т. 13. – № 4. – С. 86-91.

Экологический контроль состояния особо охраняемых природных территорий Свердловской области / И.А. Кузнецова, А.В. Гилев, М.Г. Головатин и [др.], отв. ред. И.А. Кузнецова. – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2019. – 72 с.

Эпштейн В.М. Рыбьи пиявки пресных вод и морей СССР / В.М. Эпштейн // Автореф. дис. ... канд.биол.наук. Харьков, 1963. –16 с.

Яковлев В.А. Воздействие тяжелых металлов на пресноводный зообентос: 1 бионакопление / В.А. Яковлев // Экол. химия. –2002. – Т. 11. – Вып. 1. – С. 27-39.

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 sanguivorous leeches / S.M. Abbas Zaidi, S.S. Jameel, F. Zaman [et al.] // *Alternative Medicine Review*. – 2011. – Vol. 16. – №1. – P. 59-65.

Ascenzi P. Protease inhibitors from European medicinal leech *Hirudo medicinalis*, structural and biomedical aspects / P. Ascenzi, G. Amiconi, W. Bode [et al.] // *Mol. Aspect Med.* – 1995. – Vol. 16. – P. 215-313.

Autrum H. *Hirudinea* / H. Autrum // *Die Tierwelt Mitteleuropas*. – Leipzig, 1958. – Vol. 1. – №7b. – S. 1-30.

Azuoma I. The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their precursors / I. Azuoma, B. Halliwell, B.M. Haey // *Biochem. J.* – 1988. – Vol. 256. – №1. – P. 251-255.

Barbul A. Immunostimulatory effects of arginine in normal and injured rats / A. Barbul, H.L. E. Wasserkrug, Seifter // *J. Surg. Res.* – 1980. – Vol. 29. – №3. – P. 228-235.

Bazyluk W. Przyczynek do znajomosci fauny pijawek (*Hirudinea*) Podlasia / W. Bazyluk // *Fragm. faun. Mus. Zool. Polonici*. – 1957. – Vol. 6. – S. 129-133.

Bender D.A. Amino acid metabolism / D.A. Bender. – New York: Willey&Sons, 1975. – 530 p.

Bennike S.A. Contribution to the ecology of Danish freshwater leeches (*Hirudinea*) / S.A. Bennike. – Kobenhavn, 1943. – 109 p.

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.

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.



Brucet S. Ontogenic changes of amino acid composition in planktonic crustacean species / S. Brucet, D. Boix, R. Lopez-Flores [et al.] // *Marine Biology*. – 2005. – Vol. 148. – P. 131–139.

Buczynski P. Occurrence of European Medicinal Leech (*Hirudo medicinalis* L., 1758) in birds' nests / P. Buczynski, G. Tonczyk, A. Jablonska // *Hirudinea: biology, taxonomy, faunistics*. – 4<sup>th</sup> intern. Conf., Poland, Wierzba. – 2011. – P. 11-12.

Budzinski A.Z. Interaction of hementin with fibrinogen and fibrin / A.Z. Budzinski // *Fibrinolyses*. – 1991. – Vol. 2. – P. 149-152.

Ceylan M. Reproduction efficiency of the Hors leech, *Haemopsis sanguisuga* (Linnaeus, 1758) / M. Ceylan, R. Küçükpara, U. Akçimen, O. Yener // *Invertebrate Reproduction and Development*. – 2017. – Vol. 61 (3). – P. 182–188.

Ceylan M. Effects of broodstock density on reproduction efficiency and survival of southern medicinal leech, *Hirudo verbana* Carena, 1820 / M. Ceylan, R. Küçükpara, U. Akçimen // *Aquaculture*. – 2019. – Vol. 498. – P. 279-284.

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. <https://cites.org/eng/app/appendices.php> (2017)

Chang Y.C. A sensitive new prenatal test for sickle cells anemia / Y.C. Chang, Y.W. Kan // *New Engl. J. Med.* – 1982. – Vol. 307. – P. 30-32.

Chernaya L.V. Macro- and microelements in tissues of the medical leech (*Hirudo verbana* Carena), grown at a biofarm in the starvation dynamics / L.V. Chernaya // *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. State of amino acid in the tissues of freshwater leeches, *Haemopsis sanguisuga* (L., 1758) (Hirudinea, Clitellata) of different age / L.V. Chernaya, L.A. Kovalchuk // *Hirudinea: biology, taxonomy, faunistics: 4th Intern. Conf.*, - Wierzba. – 2011. – P. 13.

Chernaya L. Hirudinea fauna of industrial region in the Ural Mountains / L. Chernaya // *Lauterbornia*. – 2012. – № 75. – P. 71-74.

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. Mikshevich // *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.

Costopulos James I. Uptake of amino acids by marine polychaetes under anoxic conditions / James I. Costopulos, Gover C. Stephens, Stephen H. Wright // *Biol. Bull.* – 1979. – Vol. 157. – №3. – P. 434-444.

Cousins R.J. Regulatory aspects of zinc metabolism in liver and metabolism in liver and intestine / R.J. Cousins // *Nutr. Rev.* – 1979. – Vol. 37. – №4. – P. 97-103.

Cowey, C.B. On the nutrition and metabolism of zooplankton / C.B. Cowey, E.D. Corner // *Marin boil. Ass. UK*. – 1963. – Vol. 43. – №2. – P. 47-52.

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.

Dabrowski K. Intermediary metabolism. In: Fish Nutrition, 3 rd. (Halver, J. E. and Hardy, R. W. eds.) / K. Dabrowski, H. Guderley // Academic Press, San Diego. – 2002. – Vol. 3. – P. 310–367.

Dathe H. Beitrag zum Vorkommen von *Hirudo medicinalis* in Mit-teldeutschland / H. Dathe // 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.

Deijen J.B. Effect of tyrosine on cognitive function and blood pressure under stress / J.B. Deijen, J.F. Orlebeke // Brain Res. Bull. – 1994. – Vol. 33. – №3. – P. 319-323.

Demirsoy A. Phenology of the medicinal leech, *Hirudo medicinalis* L., in north-western Turkey / A. Demirsoy, M. Kasperek, A. Akbulut [et al.] // Hydrobiologia. – 2001. – Vol. 462. – P. 19-24.

Deyl Z. Profillings of amino acids in body fluids and tissues by means of liquid chromatography / Z. Deyl, J. Hyanken, M. Hovakova // J. of Chromatography. – 1986. – Vol. 379. – №1. – P.177-250.

Dimitrova C.R. Estrogen and homocysteine / C.R. Dimitrova, K. DeGroot, A.K. Myers // Cardiovascular Res. – 2002. – Vol. 53. – P. 577-588.

Dobrowolski K.A. Pasozyty pijawek jeziora Druzno / K.A. Dobrowolski // 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 / G.L. Eichhorn // 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. – Vol. 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. – Vol. 16. – P. 405-415.

Elliott J.M. Population size, weight distribution and food in a persistent population of the rare medicinal leech, *Hirudo medicinalis* / J.M. Elliott // Freshwater Biology. – 2008. – Vol. 53. – P. 1502-1512.

Elliott J.M. Medicinal leeches: historical use, ecology, genetics and conservation / J.M. Elliott, U. Kutschera // Freshwater Reviews. – 2011. – Vol. 4. – P. 21-41.

Erseus C. Clitellate diversity in nationalstadsparken, an urban park in Stockholm, Sweden / C. Erseus, R. Grimm, B. Healy [et al.] // Hydrobiologia. – 1999. – Vol. 406. – P. 101-110.

Fau D. Imbalance through lysine excess and correction by a threonine supplement, as a function of nutritional status / D. Fau // Ann. Nutr. Aliment. – 1975. – Vol. 29. – №4. – P. 321-335.

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.

Fisher J.E. Nutritional support in the seriously ill patient / J.E. Fisher // Curr. Probl. Surg. – 1980. – Vol. 17. – № 9. – P. 465-532.

Fitzgerald L.M. Biosynthesis of “essential” amino acids by scleractinian corals / L.M. Fitzgerald, A.M. Szmant // Biochem. – 1997. – Vol. 322. – P. 213–221.

Frazier John M. Cadmium-binding proteins in the mussel, *Mytilus edulis* / John M. Frazier // Environ. Health Perspect. – 1986. – Vol. 65. – P. 39-43.

Fu Y.M. Specific amino acid dependency regulated invasiveness and viability of androgen-independent prostate cancer cells / Y.M. Fu, Z.X. Yu, Y.Q. Li // Nutr. Cancer. – 2003. – Vol. 45. – №.1. – P. 60-73.

Gagiu A. The first recorded occurrence of *Hirudo verbana* Carena, 1820 (Hirudinea: Arhynchobdellida: Hirudinidae) in Romania / A. Gagiu // Travaux du Museum National d'Histoire Naturelle "Grigore Antipa". – 2010. – Vol. LIII. – P. 7-11.

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.

Graf J. The effect of the symbionts on the physiology of *Hirudo medicinalis*, the medicinal leech / J. Graf // Invert. Reprod. Dev. – 2002. – Vol. 41. – P. 269-275.

Grosser C. Rote List der Egel (Hirudinidae) des Landes Sachsen Anhalt / C. Grosser // Berichte des Landesamtes für Umweltschutz Sachsen Anhalt. – 2004. – Vol. 39. – S. 161-164.

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.

Harper A.E. Some recent development in the study of amino acid metabolism / A.E. Harper // Proc. Nutr. Soc. – 1983. – Vol. 42. – №3. – P. 437-449.

Heath A.G. Water pollution and fish physiology. – L.: Lewis Publ., 2002. – 506 p.

Hecht G. Beiträge zur Verbreitung von *Hirudo medicinalis* in Deutschland / G. Hecht // Zool. Anz. – 1929. – Vol. 85. – S. 105-110.

Herter K. Hirudineen / K. Herter // Egel. Biologie der Tiere Deutschland. – 1932. – Vol. 35. – Bd. 12. – S. 1-158.

Herter K. Die Physiologie der Hirudineen / K. Herter // Bronn Klassen und Ordnungen des Tierreichs. – Leipzig, 1936. – Bd. 4. – Abt. 4. – Teil 2. – S. 123-319.

Herter K. Die Ökologie der Hirudineer / K. Herter // Bronn Klassen und Ordnungen des Tierreichs. – 1937. – Teil 2. – S. 321-496.

Herter, K. Der medicinische Blutegel und seine Verwandten. A. Zeinsen Verlag / K. Herter. – Wittenberg; Lutherstadt, 1968. – 199 s.

Hesse E. Über einige faunistische Vorkommen aus dem Leipziger Gebiet / E. Hesse // Zool. Anz. – 1920. – Vol. 51. – S. 258.

Hochachka P.W. Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution / P.W. Hochachka, G.N. Somero. – Oxford University Press, New York. – 2002. – 235 p.

Hoffman J. Notules Hirudinologiques / J. Hoffman // Archives de la Section des Sciences Naturelle, Physiques et Mathematiques de Institut Grand-Ducal de Luxemburg. – 1960. – Vol. 27. – P. 285-291.

Huxtable R.J. Physiological action of taurine / R.J. Huxtable // Physiol. Rev. – 1992. – Vol. 72. – P. 101-183.

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.

Iorgensen N. Uptake of amino acids by three species of *Nereis* (Annelidae: Polychaeta). I. Transport kinetics and net uptake from natural concentrations / N. Iorgensen, E. Kristensen // Mar. Ecol. Progr. Ser. – 1980a. – Vol. 3 – №4. – P. 329-340.

Iorgensen N. Uptake of amino acids by three species of *Nereis* (Annelidae: Polychaeta). II. Effects of anaerobiosis / N. Iorgensen, E. Kristensen // Mar. Ecol. Progr. Ser. – 1980b. – Vol. 3 – №4. – P. 341-346.

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. – Vol. 32. – P. – 69-75.

Kaiser F. Beiträge zur Bewegungphysiologie der Hirudineen / F. Kaiser // Zoologisch Jahrbücher – 1954. – Vol. 65. – S. 59-90.

Karanova M.V. Free amino acid composition in blood and muscle of the gobi *Percottus glehni* at the period of preparation and completion of hibernation / M.V. Karanova // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. – 2009. – T. 45. – №1. – C. 67-77.

Karanova M.V. The effect of cold shock on the free amino acid pool of rotan pondfish *Percottus glehni* (Eleotridae, Perciformes) / M.V. Karanova // Biology Bulletin. – 2011. – T. 38. – №2. – C. 116-124.

Kasperek M. Distribution and status of medicinal leech (*Hirudo medicinalis* L.) in Turkey / M. Kasperek, A. Demirsoy, A. Akbulut [et al.] // *Hydrobiologia*. – 2000. – Vol. 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 / I. Kaygorodova // *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. Svecevicus, 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) / D.L. Klemm. – Washington: Gov. print. off., 1982. – 350 p.

Kovalchuk L.A. Species-specific features of blood plasma amino acid spectrum of bats (Mammalia: Chiroptera) in the Urals / L.A. Kovalchuk, V.A. Mishchenko, L.V. Chernaya, V.P. Snitko // *Russian Journal of Ecology*. – 2018. – Vol. 49. – № 4. – P. 325-331.

Kovalchuk, L.A. Amino acid spectrum of blood of the lake frog *Pelophylax ridibundus* introduced into the ponds of the Middle Urals / L.A. Kovalchuk, L.V. Chernaya, V.A. Mishchenko, N.V. Mikshevich // *Hydrobiological Journal*. – 2021. – T. 57. – №3. – C. 80–89.

Kovalenko M. Size structures and comparative phenology of syntopic populations of *Hirudo verbana* and *Hirudo medicinalis* in eastern Ukraine / M. Kovalenko, S.Y. Utevsky // *Biologia*. – 2012 – Vol. 67. – P. 934–938.

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. 4<sup>th</sup> intern. Conf.* – Poland, Wierzba – 2011. – P. 15-16.

Koyuncuoglu H. The antagonizing effect of aspartic acid on morphine with drawal and Leval-lorphanprecipitated absteince syndrom since and on associated changes in brain levels of free amino acids in the rat / H. Koyuncuoglu, M. Gungor, L. Erogin, H. Sagduyn // *Psychopharmacology*. – 1979. – Vol. 62. – №1. – P. 89-95.

Kurbat M.N. L-glutamate: A modern view on a well-known amino acid / M.N. Kurbat // *Neurochemical Journal*. – 2009. – T. 3. – №3. – P. 173-178.

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 / U. Kutschera // *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.

Lemke S. European medicinal leeches – new roles in modern medicine / S. Lemke, A. Vilcinskas // *Biomedicines*. –2020. –Vol. 8(5). –P. 99.

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 Isoped *Asellus communis* at three Different pH levels / T.E. Lewis, A.W. Mc Intonsh // *Arch. Environ. Contam. and Toxicol*. – 1986. – Vol. 15. – №5. – P. 495-504.



Li J.Y. Sequential changes of free amino acid pool in burned rabbits / J.Y. Li // Zhonghua Zh. – 1991. – Vol. 7. – №3 – P. 208-211.

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.

Love R.M. The chemical biology of fishes. London, New York, 1970. – 349 p.

Maksimova T.V. Elementome of *Hirudo medicinalis* / T.V. Maksimova, A.A. Mokrousov, T.V. Pletneva [et al.] // Микроэлементы в медицине. – 2010. – Т. 11. – №2. – С. 79.

Malek M. Culture of a new medicinal leech: growth, survival and reproductions of *Hirudo orientalis* Utevsky and Trontelj, 2005 under laboratory conditions / M. Malek, F. Jafarifar, H. Salehi [et al.] // Journal of Natural History. – 2019. – Т. 53. – №11-12. – P. 627-637.

Maneiro I. Comparisons among the amino acid composition of females, eggs and food to determine the relative importance of food quantity and food quality to copepod reproduction / I. Maneiro // Mar. Ecol. Prog. – 2000. – Ser. 202. – P. 135–142.

Mann K.H. Leeches (*Hirudinea*), their structure, physiology, ecology and embryology / K.H. Mann. – Oxford, 1962. – Т. 10. – 201 p.

Marks D.B. Biochemistry / ed. Williams&Wilkins. – Baltimore, 1994. – P. 234-249.

Markward F. Pharmacology of Hirudin: one hundred years after the first report of the anticoagulant agent in medicinal leeches / F. Markward // Biomedica Biochimica Acta. – 1985. – Vol. 44. – P. 1007-1013.

Martinez M.J. Plasma aminogramm in critical patients / M.J. Martinez, J. Giraldez // Nutr. Hosp. – 1993. – Vol. 8. – №2. – P. 79-93.

Merilä J. Medicinal leeches (*Hirudo medicinalis*) attacking and killing adult amphibians / J. Merilä, M. Sterner // Annales Zoologici Fennici. – 2002. – Vol. 39. – P. 343-349.

Michalsen A. Blutegeltherapie / A. Michalsen, M. Roth. – Haug Verlag, Stuttgart, 2006. – 145 p.

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 / J.P. Moore // *Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia*. – 1930 – Vol. 82. – P. 169-192.

Moquin-Tandon A. Monographie de la famille des Hirudinees / A. Moquin-Tandon. – Paris, 1846. – 448 p.

Nesemann H. Annelida, Clitellata: Branchiobdellida, Acanthobdellea, Hirudinea / H. Nesemann, E. Neubert. – Heidelberg: Spectrum Akademischer Verlag, 1999. – 178 p.

Nigriotis J.G. The effects of an arginine-free enteral diet on wound healing and immune function in the postsurgical rat / J.G. Nigriotis, P.J. Hennesey, R.J. Andrassy // *J. Pediatr. Surg.* – 1991. – Vol. 26. – №8. – P. 936-941.

Nogushi T. Mechanism and regulation of intracellular protein degradation / T. Nogushi, H. Naito // *Nutrition, proteins and amino acids / Jap. Sci. Soc. press.* – Tokyo: Springer-Uerlag. – 1990. – P. 26-27.

Nokhrina E. Estimation of the physiological state of medical leeches (*Hirudo medicinalis* L.) in Lugansk National Reserve / E. Nokhrina, L. Kovalchuk, L. Chernaya // *Hirudinea: biology, taxonomy, faunistics: 4th Intern. Conf.* – Wierzba. – 2011. – P. 18-19.

O`Dell S.I. Uptake of amino acids by *Pareurythoe* California: substrate interaction modifies net influx from the environment / S.I. O`Dell, G.C. Stephens // *Biol. Bull.* – 1986. – Vol. 171. – № 3. – P. 682-693.

Oehler R. Regulative capacity of glutamine / R. Oehler, E. Roth // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* – 2003. – Vol. 6. – №.3. – P. 277-282.

Oka A. Vertrockung und Wiederbelebung bei einer Susswasser-Hirudineen / A. Oka // *Zool. Anz.* – 1935. – Bd. 54. – S. 92-94.

Padovan A. Trace metal concentrations in the tropical sponge *Sphaciospongia vagabunda* at a sewage outfall: synchrotron X-ray imaging reveals the micron-scale distribution of accumulated metals / A. Padovan, N. Munksgaard, B. Alvarez [et al.] // *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. – С. 189-194.

Parvathi K. Influences of isolated probiotics on amino acid profile of fresh water fish *Cyprinus carpio* / K. Parvathi, J. Karthegaa // Intern. Journal of Recent Scientific Research. – 2017. – Vol. 8. – Issue 11. – P. 12417–12419.

Paspaleff G. Durch rickettsieähnliche Mikroorganismen hervorgerufene entzündlich-nekrotische Veränderungen in Seefrosch (*Rana ridibunda* Pall.) / G. Paspaleff, V. Dokov, E. Tchacarof [et al.] // Докл. Болг. АН. – 1961. – Т. 14. – № 3. – С. 317-320.

Paspaleff G. *Batracobdella algira* (Moquin-Tandon), 1846 (*Hirudinea, Glossiphoniidae*) Übertragen einer Infektiosen 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*) / L.K. Pawlowski. – Warszawa, 1936. – 176 с. – (Fauna słodkowodna Polski).

Pawlowski L.K. Zur Ökologie der Hirudineenfauna der Wigryseen / L.K. Pawlowski // Arch. Hydrobiol. Ryb., Suwalki. – 1936a. – Bd.10. – S. 1-47.

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 [et al.] // Biology letters. – 2011. – Vol. 4. – P.3-7.

Petrauskiene L. Water and sediment toxicity assessment by use of behavioral responses of medicinal leeches / L. Petrauskiene // Environ. Int. – 2003. – Vol. 28. – №8. – С. 729-736.

Petrauskiene L. Reproductive biology and ecological strategies of three species of medicinal leeches (genus *Hirudo*) / L. Petrauskiene, O. Utevska, S. Utevsky // J. of Natural History. – 2011. – Vol. 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 [et al.] // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2011. – T. 44. – №11. – P. 632-634.

Pokarzhevskii A.D. Amino acids in earthworms: are earthworms ecosystemivorous / A.D. Pokarzhevskii, D.P. Zaboev, G.N. Ganin, S.A. Gordienko // *Soil Biol. Biochem.* – 1997. – Vol. 29. – № 3/4. – P. 559-597.

Possingham J.V. The effect of molybdenum on the organic acid and inorganic phosphorous of plants / J.V. Possingham // *Austral. J. Biol. Sci.* – 1954. – Vol. 7. – P. 221–224.

Prasad A.S. Clinical, biochemical and pharmacological role of zinc / A.S. Prasad // *Annu. Rev. Pharm. Toxicol.* – 1979. – Vol. 19. – P. 241-269.

Remy P. Sangsues de Yugoslavie / P. Remy // *Bull.Soc. Zool. France.* – 1937. – Vol. 62. – P. 140-148.

Reshetnikov A.N. The introduced fish, rotan (*Perccottus glenii*), depresses populations of aquatic animals (macroinvertebrates, amphibians, and a fish) / A.N. Reshetnikov // *Hydrobiologia.* – 2001. – T. 510. – P. 83-90.

Richards Sylvia K. Transintegumentary up take of amino acid by the lumbricid earthworm *Eisenia foetida* / Sylvia K. Richards, C. Arme // *Comp. Biochem. and Physiol.* – 1979. – Vol. 64. – № 3. – P. 351-356.

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.

Rodrigues A.P.O. Muscle amino acid profile of wild and farmed pirarucu (*Arapaima gigas*) in two size classes and an estimation of their dietary essential amino acid requirements / A.P.O. Rodrigues, Á.J.A. Bicudo, G.V. Moro [et al.] // *Journal of Applied Aquaculture.* – 2021. – Vol. 34(2). – P. 441–455.

Roth M. Biologie der Blutegel und ihre therapeutische Wirksamkeit / M. Roth // *Erfahrungsheilkunde.* – 2002. – T. 9. – S. 615-623.

Rutt G.P. The macrozoobenth communities of acid 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*. 4<sup>th</sup> 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 / H. Sandner // *Acta zool. et oecol. Univ. lodzozensis*. – 1951. – Vol. 4. – S. 5-50.

Schrauser G.N. The discovery of the essential trace elements: An outline of the history of biological trace elements research / G.N. Schrauser // *Biochemistry of the ultratrace elements* / ed. E. Freiden. – New York; London: Plenum Press. – 1994. – P. 17-32.

Shikov E.V. *Haemopsis sanguisuga* (Linnaeus, 1758) (Hirudinea) – the first observation of a leech predation on terrestrial gastropods / E.V. Shikov // *Folia Malacologica*. – 2011. – Vol. 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 [et al.] // *Proc. R. Soc. B*. – 2007. – №274. – P. 1481-1487.

Sket B. Global diversity of leeches (Hirudinea) in freshwater / B. Sket, P. Trontelj // *Hydrobiologia*. – 2008. – Vol. 595. – P. 129-137.

Stein T.P. Metabolism of nonessential N-labeled amino acid and the measurement of human whole-body protein synthesis rates / T.P. Stein, R.G. Settle // *J. Nutr.* – 1986. – Vol. 116. – № 9. – P.1651-1659.

Storey K.B., Storey J.M. Biochemistry of cryoprotectants // *Insects at Low Temperature* / Eds R. E. Lee, D. L. Denlinger. New York, 1991. – P. 64-93.

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*. 4<sup>th</sup> intern. Conf., Poland, Wierzba. – 2011. – P. 21-22.

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 / R. Tabata // Bull. Tokai Regional Fish. Res. laborat. – 1969. – № 58. – P. 215-232.

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. – Vol. 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.

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. – Vol. 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 [et al.] // 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 [et al.] // 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, M. Zagamajster, A. Atemasov [et al.] // Aquatic Conserv.: Mar. Freshw. Ecosyst. – 2010. – Vol. 20. – P. 198-210.

Utevsky S. *Hirudo medicinalis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2014 / S. Utevsky, M. Zagamajster, P. Trontelj // e.T10190A21415816. <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.

Van Breukelen F. Proteolysis in hibernators // *Life in the cold: evolution, adaptation, mechanisms and applications* / Eds. Barnes B.M., Carey H.V. Fairbanks: Inst. Arctic Biol. Univ. Alaska. 2004. – P. 461-465.

Vitturi R. Chromosome analysis and FISH mapping of ribosomal DNA (rDNA). Telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> and (GATA)<sub>n</sub> repeats in the leech *Haemopsis sanguisuga* (L.) (Annelida: Hirudinea) / R. Vitturi, A. Libertini, F. Armetta [et al.] // *Genetica.* – 2002. – Vol. 115. – P.189–194.

Warwick T. The vice-county distribution of the Scottish freshwater leeches and notes of the ecology of *Trocheta bykovsky* and *Hirudo medicinalis* in Scotland / T. Warwick // *Glasgow Naturalist.* – 1961. – Vol. 18. – №3. – P.130-135.

Wendrowsky V. Über die Chromosomencomplexe der Hirudineen / V. Wendrowsky // *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie.* – 1928. – Vol. 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. Historical Article: *Hirudo medicinalis*: ancient origins of an trends in the use of medicinal leeches throughout history / I.S. Whitaker, J. Rao, D. Izadi, P.E. Bulter // *British J. of Oral and Maxillofacial Surgery.* – 2004. – Vol. 42. – P. 133-137.

Wilkin P.J. The medicinal leech, *Hirudo medicinalis* (Hirudinea: Gnatobdella), at Dungeness, Kent / P.J. Wilkin // *Botanical journal of the Linnean Society.* – 1989. – Vol. 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. – Vol. 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. – Vol. 25. – P. 547-553.

Williams R. The distribution of freshwater leeches in the Glasgow region, with notes on their ecology / R. Williams // *Glasgow Naturalist*. – 1961. – Vol. 18. – №3. – P. 136-146.

Wisniewski W.L. Characterization of the parasitofauna of an eutrophic lake / W.L. Wisniewski // *Acta Parasitol. Pol.* – 1958. – Vol. 6. – P. 1-64.

Wong C.G. GABA, gamma-hydroxybutyric acid, and neurological disease / C.G. Wong, T. Bottiglieri, O.C. Snead // *Ann. Neurol.* – 2003. – Vol. 54. – S. 6. S3-12.

Young U.R. Kinetics of human amino acids metabolism: Nutritional implications and some lessons / U.R. Young // *Amer. J. Clin. Nutr.* – 1987. – Vol. 46, №5. – P. 709-725.

Zick K. Zur Frage der Verbreitung des Medizinischen Blutegels (*Hirudo medicinalis*) in Deutschland / K. Zick // *Zool. Anz.* – 1931. – Vol. 96. – S. 328-33.



Научное издание

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

**Свободные аминокислоты тканей  
медицинских пиявок  
(ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ АСПЕКТ)**

**Коллективная монография**

Подписано в печать 09.12.2024. Формат 60x84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>  
Бумага для множ. аппаратов. Печать на ризографе.  
Гарнитура «Times New Roman».  
Усл. печ. л. 21. Уч.-изд. л. 12,9.  
Тираж 500. Заказ 5532.

Оригинал-макет отпечатан в издательском отделе  
Уральского государственного педагогического университета.  
620091 Екатеринбург, пр-т Космонавтов, 26.  
E-mail: uspu@uspu.ru

