

УДК 574.2:595.143.6:577.112.3

## СЕЗОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ АМИНОКИСЛОТНОГО СПЕКТРА В ТКАНЯХ МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ *HIRUDO VERBANA* SARENA 1820

© 2015 г. Л. В. Черная\*, Л. А. Ковальчук\*, Е. С. Нохрина\*\*

\*Институт экологии растений и животных УрО РАН  
620144 Екатеринбург, ул. 8 Марта, 202  
e-mail: kovalchuk@ipae.uran.ru

\*\*Детская областная клиническая больница № 1  
620149 Екатеринбург, ул. С. Дерябиной, 32

Поступила в редакцию 30.10.2014 г.

*Ключевые слова:* адаптация, сезонная изменчивость, медицинские пиявки, свободные аминокислоты.

DOI: 10.7868/S0367059715040058

Медицинские пиявки – наиболее изученные представители фауны пиявок, что связано с их практическим использованием в медицине и фармакологии (Кустов и др., 2005; Никонов, 2007; Романова, Климина, 2010; Petrauskienė et al., 2011; Elliot, Kutschera, 2011). Однако их эколого-физиологические особенности и способность к поддержанию гомеостаза под влиянием биотических и абиотических факторов требуют дополнительных исследований. 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).

В литературе имеются сведения (Каранова, 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.

В исследованиях использованы взрослые особи медицинских пиявок *Hirudo verbana* Sarena 1820, отловленные в р. Челбас (Краснодарский край) весной (первая декада мая; температура во-

ды +10°C), летом (первая декада августа; +21°C) и осенью (последняя декада ноября; +2°C). Отлов и содержание животных, доставленных в лабораторию, осуществляли в соответствии с правилами, принятыми “II Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментов или в других научных целях” (1986). Содержание свободных аминокислот (АК) в тканях пиявок определяли методом ионообменной хроматографии с помощью автоматического анализатора аминокислот ААА-339М (Микротехна, Чехия). Концентрацию свободных АК выражали в мкмоль/100г ткани и в % от суммарного содержания. Подготовлено 30 биопроб, выполнено 630 элементоопределений. Экспериментальные данные обрабатывали с использованием пакета лицензионных прикладных программ “Statistica for Windows 6.0.”. Различия между сравниваемыми выборками считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$  – 0.0001.

Аминокислотный фонд тканей исследованных *Hirudo verbana* из весенней, летней и осенней природных популяций представлен 22 АК (табл. 1). Сезонные суммарные концентрации аминокислотного пула *H. verbana* убывают в ряду осень > весна > > лето ( $H_{2;30} = 25.81$ ;  $p = 0.0000$ ). Сравнительный анализ показал, что суммарное количество свободных АК в тканях осенних пиявок выше в 3.0 раза ( $2437.0 \pm 66.3$  мкмоль/100 г) в сравнении с летними особями ( $808.5 \pm 18.2$  мкмоль/100 г) ( $p < 0.05$ ).

Высокий уровень аминокислотного фонда в тканях осенних особей обеспечивают повышенные концентрации 11 АК: цистеиновой, аспарагиновой, треонина, серина, глутаминовой кислоты и глутамина, цистеина, изолейцина, триптофана, орнитина, лизина и аргинина ( $p = 0.000$ ).

**Таблица 1.** Сезонные изменения содержания свободных аминокислот в тканях *H. verbana*

Аминокислота, мкмоль/100 г	Весна (n = 10)	Лето (n = 10)	Осень (n = 10)	H (2; 30)	p
Cysteic Acid	15.1 ± 0.6	6.32 ± 0.3	41.6 ± 1.7	25.81	0.0000
Aspartic Acid	349.7 ± 3.2	235.3 ± 3.3	425.5 ± 8.1	25.81	0.0000
Threonine	39.2 ± 2.3	24.7 ± 1.1	57.4 ± 3.6	25.81	0.0000
Serine	66.9 ± 2.2	41.7 ± 1.7	102.9 ± 7.0	25.81	0.0000
Glu + Glu	690.8 ± 8.4	201.6 ± 5.5	1242.5 ± 15.5	25.81	0.0000
Proline	30.8 ± 0.9	2.42 ± 0.1	7.86 ± 0.2	25.81	0.0000
Glycine	128.4 ± 2.2	41.4 ± 1.7	59.5 ± 3.5	25.81	0.0000
Alanine	230.0 ± 1.5	166.3 ± 5.2	233.4 ± 8.9	19.45	0.0001
Valine	50.0 ± 0.8	7.16 ± 0.5	39.3 ± 1.8	25.81	0.0000
Cystine	8.53 ± 0.7	1.21 ± 0.04	33.4 ± 1.8	25.81	0.0000
Methionine	16.0 ± 0.7	2.58 ± 0.01	17.6 ± 1.0	20.61	0.0000
Isoleucine	18.5 ± 0.5	5.29 ± 0.40	32.3 ± 1.88	25.81	0.0000
Leucine	63.2 ± 0.5	32.6 ± 1.3	38.1 ± 1.7	21.67	0.0000
Tyrosine	12.5 ± 0.3	6.10 ± 0.4	7.81 ± 0.3	24.81	0.0000
Phenylalanine	22.3 ± 0.6	6.57 ± 0.5	6.95 ± 0.3	19.86	0.0000
Tryptophan	следы	следы	4.22 ± 0.1	27.49	0.0000
GABA	3.4 ± 0.2	следы	следы	26.80	0.0000
Ornithine	20.5 ± 0.5	10.8 ± 0.6	28.7 ± 1.7	25.81	0.0000
Lysine	38.2 ± 1.5	13.5 ± 0.8	40.5 ± 1.7	20.28	0.0000
Histidine	2.05 ± 0.1	0.49 ± 0.02	2.13 ± 0.1	19.61	0.0001
Arginine	1.75 ± 0.02	2.42 ± 0.04	15.3 ± 0.7	25.81	0.0000
Фонд АК	1807.9 ± 17.8	808.5 ± 18.2	2437.0 ± 66.3	25.81	0.0000
Незаменимые АК	251.2 ± 8.6	95.3 ± 3.6	253.8 ± 9.2	19.36	0.0001
Заменимые АК	1517.6 ± 15.3	696.1 ± 8.9	2112.9 ± 21.4	25.81	0.0000

Примечание: H – критерий Краскела-Уоллеса; p – уровень значимости.

Количество глутаминовой кислоты и глутамин превышает суммарное содержание 20 свободных аминокислот у осенних особей и составляет 51% общего пула АК. Наибольшее возрастание концентрации глутаминовой кислоты и глутамин наблюдается у пиявок в осенний период при низких положительных температурах в сравнении с весенними и летними особями – в 1.8 раза и 6.2 раза соответственно. У пиявок осенней и летней популяций отмечено падение до следовых количеств уровней непротеиновой аминокислоты ГАМК (см. табл. 1). В сравнении с летними особями отмечен рост концентрации метаболитически инертной незаменимой АК – лизина – у пиявок весенних (в 2.8 раза) и осенних (в 3.0 раза) популяций.

Низкие положительные температуры весеннего и осеннего сезонов стимулируют увеличение содержания аргинина в тканях пиявок в 8.7 раза и 6.3 раза соответственно в сравнении с летним периодом. Возросшие концентрации лизина и аргинина выступают, вероятно, как протекторы в период адаптации пиявок к низким положительным температурам. Суммарный пул АК весенних особей *H. verbana* после зимнего анабиоза снижен в 1.3 раза, в основном за счет значительной утилизации цистеиновой кислоты (в 2.8 раза), цистеина (3.9), аргинина (8.7), глутаминовой кислоты и глутамин (1.8), изолейцина (1.7), триптофана (100%) ( $p < 0.05$ ) (см. табл. 1). При этом на одном уровне с осенними остаются концентрации аланина, метионина, лизина, гистидина и паттерна незаменимых АК (НАК) ( $p > 0.05$ ). Повышенные

концентрации этих АК и паттерна НАК, по-видимому, являются одним из условий поддержания гомеостаза *H. verbana* в осенний и весенний сезоны (колебания температурного режима воды от +10°C до +2°C). После продолжительного зимнего анабиоза в тканях весенних пиявок отмечены повышенные концентрации пролина, глицина, лейцина, тирозина, фенилаланина, что указывает на их роль в активации метаболических процессов, способствующих сезонной адаптации ( $p < 0.001$ ).

Летом, в период размножения и наращивания мышечной массы, суммарные концентрации АК в тканях пиявок снижаются по сравнению с весенними в 2.2 раза ( $p < 0.01$ ). В наибольшей степени это выражено для цистеиновой кислоты (в 2.4 раза), пролина (12.7), глицина (3.1), цистеина (7) и ряда незаменимых АК: валина (в 7 раз), метионина (6.2), изолейцина (3.5), фенилаланина (3.4), лизина (2.8), гистидина (4.2) ( $p < 0.01$ ) (см. табл. 1). Не выявлено различий между концентрациями лейцина, тирозина, фенилаланина у летних и осенних особей ( $p > 0.05$ ). Наименьшая сезонная изменчивость характерна для аланина, гистидина и пула НАК ( $p = 0.0001$ ). Дисперсионный анализ показал, что смена времен года оказывает существенное влияние на динамику содержания всех изучаемых АК, обнаруженных в тканях *H. verbana* ( $p < 0.0001$ ) (см. табл. 1).

При изучении сезонных изменений количества метаболических групп АК в тканях *H. verbana* было установлено, что процентное содержание пула незаменимых аминокислот уменьшается в ряду весна > лето > осень, а показатели соотношения НАК/ЗАК осенью значительно снижены, что свидетельствует об изменении аминокислотного баланса (табл. 2). За счет многократного снижения содержания ароматических АК в тканях *H. verbana* в условиях похолодания и перехода в зимний анабиоз высокие значения антиоксидантного ИФ (показатели которого в норме составляют  $3.0 \pm 0.5$ ) могут служить признаками эндогенного токсикоза.

Результаты проведенных исследований показали, что физиологические процессы, связанные с сезонными биологическими циклами *H. verbana*, обуславливают качественные и количественные изменения аминокислотного спектра тканей. Наибольшее влияние на аминокислотный фонд медицинских пиявок оказывает осеннее понижение температуры.

Аминокислотный спектр тканей пиявок, уходящих в зимний анабиоз (максимальные суммарные концентрации), по-нашему мнению, обусловлен адаптивной реакцией организма на низкие положительные температуры. Полагаем, что выявленные изменения в содержании АК в тка-

**Таблица 2.** Содержание метаболических групп свободных аминокислот в тканях медицинской пиявки

АК, %	Весна	Лето	Осень
Незаменимые АК	13.9	11.8	10.4
Заменимые АК	83.9	86.1	86.7
НАК/ЗАК	0.2	0.1	0.1
АКРУЦ	7.3	5.6	4.5
АРАК	1.9	1.6	0.6
ИФ	3.8	3.6	7.5

Примечание: АКРУЦ – аминокислоты с разветвленной углеродной цепью; АРАК – ароматические аминокислоты; ИФ – антиоксидантный индекс Фишера (АКРУЦ/АРАК).

нях пиявок отражают не только энергетический метаболизм и их участие в синтезе белка, но и комплекс приспособительных реакций организма на сезонные понижения температурного режима окружающей среды (Нохрина и др., 2009; Ковальчук и др., 2011; Черная и др., 2012; Chernaya, 2010).

Работа поддержана грантом № 12-П-4-1049 Президиума РАН “Фундаментальные науки – медицине”.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ets n 123) (Страсбург, 18.03.1986). Режим доступа: <http://conventions.coe.int/Treaty/Commun/QueVoulezVous...>
- Каранова М.В. Изменение содержания свободных аминокислот тканевых жидкостей пресноводного моллюска *Limnaea stagnalis* в процессе сезонной адаптации к низким положительным температурам // Изв. РАН. Сер. биол. 2006. № 6. С. 719–724.
- Ковальчук Л.А., Черная Л.В., Нохрина Е.С. Элементный и аминокислотный состав тканей медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* L. при хроническом голодании // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2011. № 6. С. 61–64.
- Кустов С.Ю., Каменев О.Ю., Ярошенко В.А. Медицинская пиявка в Краснодарском крае: современное состояние популяции и проблемы ее охраны // Актуальные вопросы экологии и охраны природы экосистем южных регионов России и сопредельных территорий. Краснодар, 2005. С. 118–121.
- Лукин Е.И. Пиявки пресных и солоноватых водоемов // Фауна СССР. Л., 1976. Т. 1. № 109. 484 с.
- Никонов Г.И. Гирудотерапия: наука и практика // Гирудотерапия и гирудотерапевтика. 2007. Т. 5. С. 8–22.
- Нохрина Е.С., Ковальчук Л.А., Черная Л.В. Динамика накопления тяжелых металлов в тканях медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* L. в модельном эксперимен-

- те // Вестн. Уральской медиц. академ. науки. 2009. № 2(25). С. 145–146.
- Романова Е.М., Климина О.М. Биоресурсы класса Hirudinea в зоне Среднего Поволжья: экологическая значимость и перспективы использования // Изв. Самарского научного центра РАН. 2010. Т. 12. № 1. С. 208–211.
- Синева М.В. Биологические наблюдения над размножением медицинской пиявки // Зоол. журн. 1949. Т. 28. Вып. 3. С. 213–224.
- Черная Л.В., Ковальчук Л.А., Нохрина Е.С. Оценка физиологического состояния медицинских пиявок *Hirudo medicinalis* L. и *Hirudo verbana* Carena, обитающих в водных экосистемах России и Украины // X Міжнар. конф. асоціації гірудологів. Харків, 2012. С. 27–28.
- Chernaya L.V. Macro- and microelements in tissues of the medical leech (*Hirudo verbana* Carena), grown at a biofarm in the starvation dynamics // Микроэлементы в медицине. М., 2010. Т. 11. Вып. 2. С. 6.
- Elliot J.M., Kutschera U. Medicinal leeches: historical use, ecology, genetics and conservation // Freshwater Reviews. 2011. V. 4. P. 21–41.
- Karanova M.V. The effect of cold shock on the free amino acid pool of roatan pondfish *Percottus glehni* (Eleotridae, Perciformes) // Biology Bulletin. 2011. Т. 38. № 2. С. 116–124.
- Petrauskiene L., Utevska O., Utevsky S. Reproductive biology and ecological strategies of three species of medicinal leeches (genus *Hirudo*) // J. Natural History, 2011. V. 45. Issue 11–12. P. 737–747.