



БИОЭЛЕМЕНТОЛОГИЯ В ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ МЕДИЦИНЕ

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

УДК 615.811.2 – 615.324/326-577.118:577.122.3

Ковальчук Л.А.: ведущий научный сотрудник, д.б.н.;

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

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

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

Koval'chuk LA; Chernaja LV

Введение

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

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

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

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

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

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

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

Материалы и методы исследования

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

Секрет слюнных желез получали по общепринятой методике: на головной конец зафиксированной пиявки клали несколько кристалликов хлористого натрия и по истечении 1–2 минут вводили в ротовую полость силиконизированную пипетку, содержащую физиологический раствор, и отсасывали секрет, повторяя процедуру несколько раз [14].

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

ляли методом атомно-абсорбционной спектрометрии на спектрофотометре AAS-3 и на приборе Analyst-100 фирмы Perkin Elmer. Концентрации свободных аминокислот (АК, мкмоль/100г влажной ткани, мкмоль/100мл, % от суммарного фонда) в кожно-мышечной ткани и в ССЖ пиявок исследовали методом ионообменной хроматографии с помощью автоматического анализатора аминокислот ААА-339 (Microtechna, Чехия).

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

Результаты и их обсуждение

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

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

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

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

ней при формировании микроэлементного профиля слюнной жидкости пиявок.

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

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

Сравнение аминокислотных спектров тканей и ССЖ медицинских пиявок также показало их существенные различия. Суммарные концентрации свободных АК в тканях *N.verbana* ($1993,1 \pm 82,3$ мкмоль/100г) были в 3,6 раза выше, чем в секрете слюнной железы ($553,2 \pm 3,69$ мкмоль/100мл) ($p < 0,01$).

В тканях медицинских пиявок не обнаружено таурина, пролина, цитруллина и триптофана, содержание которых в ССЖ составили 1,42%, 1,76%, 0,07% и 0,45 % соответственно. Выявлены достоверные различия в процентном содержании практически всех свободных АК в слюне и тканях медицинских пиявок ($p < 0,05$).

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

В гомогенатах тканей пиявок содержание аспарагиновой кислоты (в 5,7 раза) и аланина (в 1,8 раза) превышало таковое в ССЖ, но было значительно меньше для серина (в 3,1 раза), глицина (в 1,4 раза), цистеина (в 1,2 раза) и тирозина (в 1,3 раза) ($p < 0,05$) (рис.).

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

МЭ	Ткань		ССЖ		Ткань/ССЖ мкг
	мкг/г	%	мкг/мл	%	
Cu	$3,38 \pm 0,016^*$	0,61	$0,105 \pm 0,0023$	0,12	32,2
Zn	$58,4 \pm 1,84^*$	10,62	$2,07 \pm 0,042$	2,42	28,2
Mn	$0,63 \pm 0,03^*$	0,12	$0,025 \pm 0,0015$	0,03	25,2
Fe	$174,2 \pm 1,74^*$	31,7	$0,65 \pm 0,023$	0,76	268
Ca	$197,3 \pm 1,54^*$	35,9	$75,1 \pm 2,343$	87,5	2,6
Mg	$109,5 \pm 2,72^*$	19,9	$7,65 \pm 1,04$	8,92	14,3
Co	$1,15 \pm 0,021^*$	0,21	$0,0012 \pm 0,00006$	0,001	958
Sr	$0,25 \pm 0,032^*$	0,05	$0,21 \pm 0,012$	0,25	1,19
Ni	$2,51 \pm 0,06^*$	0,46	$0,012 \pm 0,0005$	0,014	209
Cd	$0,31 \pm 0,011^*$	0,06	$0,0007 \pm 0,00008$	0,0008	443
Pb	$2,08 \pm 0,024^*$	0,38	$0,021 \pm 0,0015$	0,025	99
Сумма МЭ	$549,7 \pm 8,03^*$	100	$85,81 \pm 2,57$	100	6,4

* – различия достоверны, $p < 0,05$

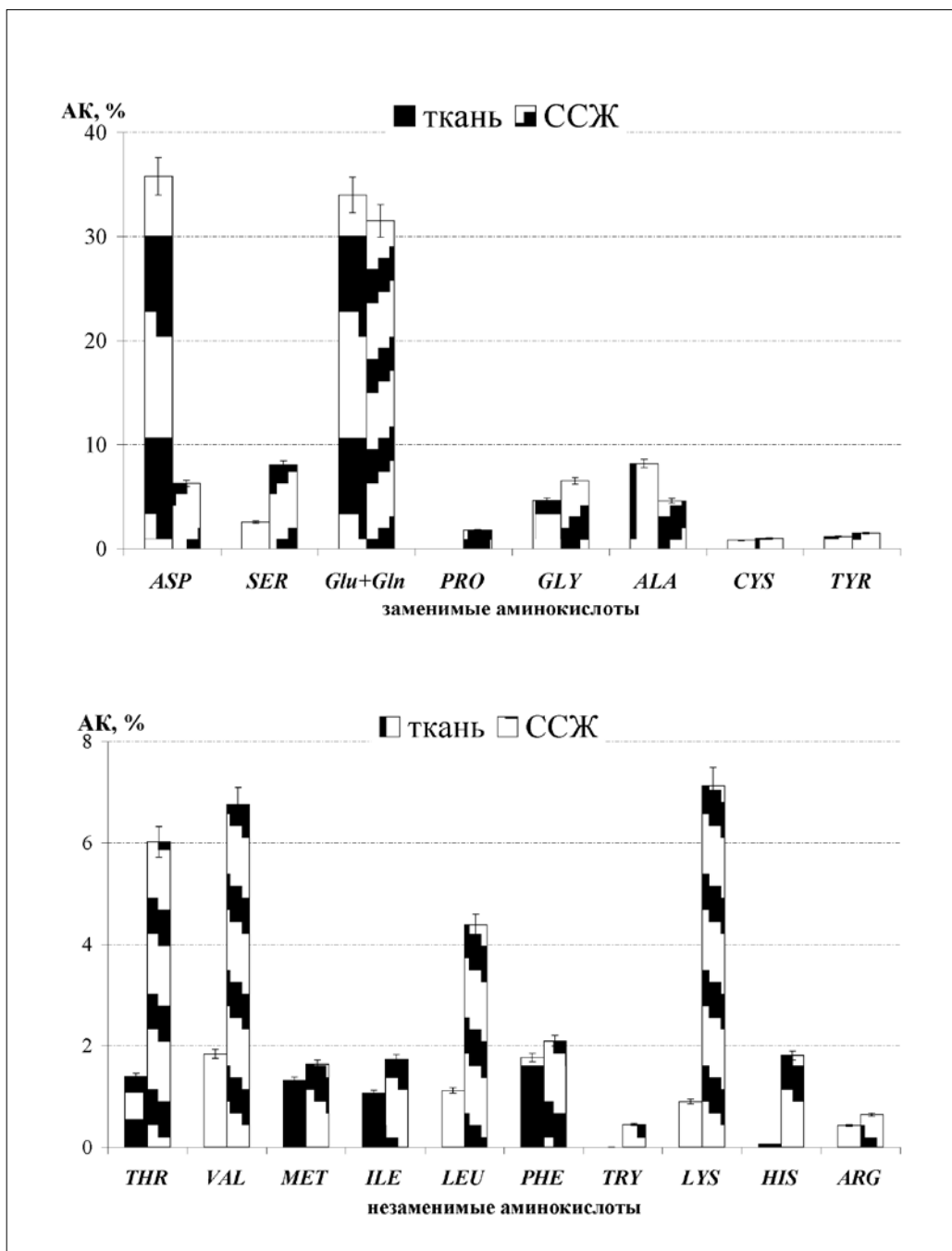


Рисунок. Содержание свободных аминокислот (% от суммарного фонда АК) в тканях и в секрете слюнных желез (ССЖ) медицинских пиявок

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

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

Выводы

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

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

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Свиридкина Л.П., Боровая Е.П., Махнева А.В. Гирудотерапия в комплексном санаторно-курортном лечении больных ишемической болезнью сердца // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. – 2008. – № 3. – С. 12–15.
2. Кузнецова Л.П., Куликов А.Г., Семенова Е.Н. Изменение показателей гемостаза у больных хронической сердечной недостаточностью под влиянием гирудотерапии // Физиотерапия, бальнеология и реабилитация. – 2011. – № 3. – С. 12–17.
3. Жернов В.А. Немедикаментозная восстановительная коррекция при нарушениях состояния кардиореспираторной системы у пожилых людей // Вестник восстановительной медицины. – 2008. – № 5. – С. 28–32.
4. Никонов Г.И. Гирудотерапия. Наука и практика // Вестник Международного центра медицинской пиявки. Гирудотерапия и гирудофармакотерапия. – 2007. – Т. 5. – С. 8–22.
5. Horowitz S. Medicinal leeches in modern medicine an age-old remedy revived // Alternative and Complementary Therapies. – 2005. – Т. 11., № 1. – С. 12–16.
6. Баскова И.П., Юдина Т.Г., Завалова Л.Л., Дудкина А.С. Белково-липидные частицы секрета слюнных желез медицинской пиявки, их размеры и морфология // Биохимия. – 2010. – Т. 75., № 5. – С. 682–688.
7. Баскова И.П., Харитонова О.В., Завалова Л.Л. Лизоцимная активность секрета слюнных желез медицинской пиявки видов *H. verbana*, *H. medicinalis* и *H. orientalis* // Биомедицинская химия. – 2011. – Т. 57., № 5. – С. 511–518.
8. Гилязова А.Р., Самойлов А.Н. Изучение влияния препарата «Пиявит» на систему гемостаза у больных диабетической ретинопатией // Казанский медицинский журнал. – 2011. – Т. 92, № 4. – С. 516–519.
9. Шестаков В.В., Титова Е.А., Капусткина Н.И., Никонов Г.И. Метод определения качества медицинских пиявок // Вестник Международного центра медицинской пиявки. Гирудотерапия и гирудофармакотерапия. – 2007. – Т. 5. – С. 247–285.
10. 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
11. Chernaya L.V. Macro- and microelements in tissues of the medical leech (*Hirudo verbana* Carena), grown at a biofarm in the starvation dynamics // Trace elements in medicine. – 2010. – Vol. 11, №2. – P. 6.
12. Ковальчук Л.А., Черная Л.В., Тарханова А.Э., Нохрина Е.С. Основной обмен и содержание микроэлементов в тканях медицинских пиявок (*Hirudo medicinalis* L.) из природных популяций и выращенных в искусственных условиях биофабрики // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2007. – №4 (18). – С. 49–53.
13. Нохрина Е.С., Ковальчук Л.А., Черная Л.В. Динамика накопления тяжелых металлов в тканях медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* L. в модельном эксперименте // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2009. – № 2 (25). – С. 145–146.
14. Патент 2045954 РФ. Способ получения секрета слюнных желез кровососущих пиявок, обладающего способностью ингибировать адгезию, агрегацию тромбоцитов, снижать реологические свойства крови и оказывать иммуностимулирующее действие / Баскова, И.П. опубл. 20.10.1995, – Бюл. № 31. – 3 с.

Резюме

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

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

Abstract

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

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

Контакты:

Ковальчук Людмила Ахметовна. E-mail: kovalchuk@ipae.uran.ru, KLA@isnet.ru

Черная Людмила Владимировна. E-mail: Chernaya_LV@mail.ru