

## СВОБОДНЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ ПИЯВОК С РАЗЛИЧНОЙ ТРОФИЧЕСКОЙ ОРГАНИЗАЦИЕЙ

Исследовано состояние пула свободных аминокислот в тканях 4 видов пиявок, характеризующихся различными способами питания. Отмечены количественные сдвиги всего аминокислотного пула и некоторых отдельно взятых аминокислот. У хищных пиявок исходный уровень незаменимых аминокислот в 1,5-2 раза выше, чем у пиявок-гематофагов. У пиявок, обитающих в водоеме, подверженном техногенному воздействию, обнаружены повышенные концентрации аминокислот, способных связывать тяжелые металлы в нетоксичные комплексы «металл – белок», что обеспечивает им высокую резистентность.

### Введение

Обеспечение физиологического транспорта аминокислот в организм является важным условием нормальной жизнедеятельности животных. Возможность включения аминокислот в различные метаболические процессы в значительной степени обусловлена величиной их пула, поэтому исследование концентрации свободных аминокислот в тканях позволяет оценить функциональные возможности организма при различных способах питания [10].

Пища всех представителей класса пиявок *Hirudinea* – исключительно животного происхождения. По способу питания пиявок разделяют на кровососов (гематофагов) и хищников. Класс *Hirudinea* возник в результате перехода их предков из класса *Oligocheta* к питанию кровью, связанного с временным пребыванием на других животных. Поскольку хищные пиявки произошли от кровососущих, то они унаследовали основные черты организации последних [8].

К настоящему времени накоплен значительный экспериментальный материал по азотистому метаболизму у представителей водных беспозвоночных [16, 17, 20]. Однако сведения по специфике белкового обмена и метаболизма азотсодержащих соединений у пиявок отсутствуют. Данные о влиянии характера питания на аминокислотный состав тканей также представляют несомненный интерес.

Цель исследования: дать сравнительную характеристику состояния пула свободных аминокислот в тканях пиявок, характеризующихся различными способами питания (гематофаги и хищники).

### Материалы и методы

Для исследования нами были выбраны половозрелые особи четырех видов пиявок из трех семейств, спектр организмов-жертв которых весьма различен: челюстные – медицинская пиявка *Hirudo medicinalis* L., 1758 (кровосос земноводных и млекопитающих) и большая ложноконская пиявка *Haemopsis sanguisuga* L., 1758 (хищник беспозвоночных и мелких позвоночных – головастики, мальки рыб); глоточные – малая ложноконская пиявка *Erpobdella octoculata* L., 1758 (хищник мелких беспозвоночных); плоские – улитковая пиявка *Glossiphonia complanata* L., 1758 (кровосос брюхоногих моллюсков). Медицинская пиявка доставлена из природных популяций реки Челбас (Краснодарский край), остальные виды пиявок отловлены в Белоярском водохранилище (Свердловская область). Все пиявки были отловлены в августе 2006 года и до начала эксперимента для стандартизации биологического материала содержались в равных условиях: в банках с отстоянной водой, при комнатной температуре в течение 1 месяца.

Содержание свободных аминокислот (мкмоль/л) в кожно-мышечной ткани пиявок определяли методом ионообменной хроматографии [6] с помощью автоматического анализатора аминокислот. На основании полученных аминокислотных профилей рассчитывали показатели суммарных концентраций: всех свободных аминокислот ткани пиявок; незаменимых и заменимых аминокислот и их соотношение; свободных аминокислот с разветвленной углеводородной цепью – АКРУЦ (валина, лейцина и изолейцина) и свободных ароматических аминокислот АРАК (тирози-

на и фенилаланина); индекс Фишера (ИФ) – отношение сумм концентраций свободных АКРУЦ / АРАК.

В эксперименте были использованы 93 особи пиявок.

Весь экспериментальный материал обработан стандартными методами математической статистики с использованием программ Statistica и MS Excel 2000. Различия между сравниваемыми выборками считали достоверными при  $p \leq 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Результаты исследования представлены в таблице. Аминокислотный пул всех исследованных пиявок независимо от их видовой принадлежности и специфики питания качественно постоянен и включает 22 аминокислоты. Однако отмечены количественные сдвиги всего аминокислотного пула и некоторых отдельно взятых аминокислот. Так, суммарные концентрации всех свободных аминокислот у исследованных видов пиявок уменьшаются в ряду: *H. sanguisuga*  $\geq$  *H. medicinalis*  $>$  *E. octoculata*  $>$  *G. complanata*.

Следует отметить, что челюстные пиявки и медицинская и большая ложноконская,

величина аминокислотного пула которых в 1,5-2,5 раза превышает суммарные концентрации свободных аминокислот других видов пиявок, между собой достоверно не различаются ( $p \leq 0,05$ ). Они являются наиболее крупными представителями гирудофауны Палеарктики и отличаются завидным аппетитом. Так, в опытах медицинская пиявка за 30 минут поглощает крови в среднем 890% от собственной массы [18], а масса сытых медицинских пиявок превышает вес голодных особей более чем в 5 раз: средняя масса голодных пиявок составила  $0,79 \pm 0,23$  г, сытых –  $4,33 \pm 0,87$  г [12]. Отмечено, что среди хищных пиявок особенно прожорлива *Haemopis sanguisuga*, способная проглотить жертву значительно более крупную по величине, чем она [8]. Кроме того, эти челюстные пиявки потребляет в единицу времени значительно больше кислорода, чем остальные исследуемые виды пиявок, и уровень энергетического обмена изучаемых червей уменьшается в ряду, аналогичном приведенному выше: *H. sanguisuga*  $>$  *H. medicinalis*  $>$  *E. octoculata*  $\geq$  *G. complanata* [15, 19]. В наших исследованиях интенсивность потребления кислорода у медицинских пиявок достигала

Таблица. Содержание свободных аминокислот в тканях пиявок

Аминокислоты (%)	<i>H. sanguisuga</i>	<i>E. octoculata</i>	<i>G. complanata</i>	<i>H. medicinalis</i>
Цистеиновая к-та	1,02	0,37	2,95	0,78
Таурин	следы	следы	следы	следы
Аспарагиновая к.	9,45	5,08	11,9	29,1
Треонин	3,16	3,53	2,46	3,06
Серин	5,02	6,24	4,32	5,15
Аспарагин	следы	следы	следы	следы
Глутаминовая к.	18,3	23,06	37,8	24,94
Глутамин	0,46	0,45	11,6	следы
Пролин	4,86	2,97	следы	0,30
Глицин	8,70	6,19	7,89	5,12
Аланин	23,2	30,63	6,36	20,6
Валин	0,72	1,35	3,75	0,89
Цистеин	0,24	0,77	2,30	0,15
Метионин	1,81	1,14	0,26	0,32
Изолейцин	1,42	1,91	1,49	0,65
Лейцин	6,56	3,92	следы	4,04
Тирозин	1,63	1,00	0,94	0,75
Фенилаланин	2,20	1,94	0,54	0,81
Орнитин	2,71	3,85	1,92	1,34
Лизин	6,27	4,09	2,34	1,67
Гистидин	1,32	0,80	1,35	0,06
Аргинин	0,97	0,71	следы	0,30
Общее кол-во АК (мкмоль/л)	$3080,49 \pm 69,8$	$1836,46 \pm 63,53$	$1122,34 \pm 50,45$	$2872,89 \pm 89,58$
Индекс Фишера	2,3	2,4	3,5	3,6

0,64±0,035 мл O<sub>2</sub>/г/час [11]. Высокий уровень энергетического обмена обеспечивает повышенный исходный уровень азотистого метаболизма челюстных пиявок.

Поскольку суммарные концентрации свободных аминокислот у пиявок из разных семейств различаются достоверно ( $p \leq 0,05$ ), в дальнейшем мы выражали содержание отдельных аминокислот в процентах (%) от их общего содержания в тканях.

Сравнительный анализ содержания отдельных свободных аминокислот в тканях пиявок с различной трофической организацией показал, что во всех изученных биопробах сохраняются на одном уровне концентрации треонина (2,46%-3,53%), серина (4,32%-6,24%) и глицина (5,12%-8,70%). Общей тенденцией для всех пиявок является наличие следовых содержаний таурина и аспарагина (таблица). Для всех изучаемых видов характерны достаточно высокие концентрации глутаминовой кислоты – важнейшей заменимой аминокислоты.

Роль глутаминовой кислоты определяется прежде всего тем, что она участвует в синтезе белков и служит предшественником биологически активных соединений. Высокий уровень глутаминовой кислоты в тканях пиявок, по-видимому, является благоприятным метаболическим условием, обеспечивающим адекватную субстратную поддержку и регенераторных, и детоксикационных процессов в организме. Она в определенной мере берет на себя биохимические функции аргинина (фактор роста), что представляется актуальным для развития. Глутаминовая кислота занимает центральное место в процессах переаминирования в организме, участвует в углеводном обмене и является одним из источников гликогена. Важна роль аминокислоты в обезвреживании аммиака, образующегося в процессе жизнедеятельности животных тканей, и в синтезе мочевины [7].

Обращает на себя внимание состояние аминокислотного пула улитковой пиявки *G. complanata*, отличное от других изученных пиявок: пониженное содержание аланина (в 3-5 раз), следовые количества лейцина и аргинина на фоне повышенных концентраций цистеиновой (2,95 %) и глутаминовой кислот

(37,8 %), глутамина (11,6 %), валина (3,75 %) и цистеина (2,30 %) (таблица). Аланин относится к заменимым аминокислотам, так как в организме может синтезироваться из пировиноградной кислоты путем переаминирования, является одним из источников глюкозы в организме. Усиленное образование аланина в мышцах и выход его в циркуляцию наблюдается при мышечной деятельности и гипоксии [5]. Особенно высокое содержание аланина в мышцах и плазме отмечается у плавающих и ныряющих животных [13]. Аланину принадлежит ключевая роль в энергетическом гомеостазе, и его пул снижается в мышечной ткани при дефиците белка [9]. Улитковая пиявка, как и все представители семейства плоских пиявок, не способна плавать, равно как и ее жертвы – брюхоногие моллюски. Очевидно, малоподвижный образ жизни на фоне невысокого уровня энергетического обмена, а также качество корма (кровь беспозвоночных) обуславливают пониженное содержание аланина в тканях улитковой пиявки.

Цистеин вместе с метионином относится к серосодержащим аминокислотам, поэтому их пул отражает обеспеченность организма сульфгидрильными группами. Показано, что уровень цистеина в мышцах повышается при недостатке белка в рационе [9]. Возможно, кровь моллюсков, основной источник питания глоссифонии, уступает в белковой ценности организмам-жертвам других видов пиявок. Так или иначе, однообразный пищевой рацион (улитковая пиявка – узкоспецифичный в этом отношении вид) обуславливает своеобразие азотистого метаболизма в тканях этой пиявки.

Сравнительный анализ спектра свободных аминокислот у хищников и гематофагов показал различия в содержании отдельных групп аминокислот. Следует отметить низкий уровень незаменимых аминокислот у всех представителей исследуемых нами пиявок. Вместе с тем у хищных пиявок исходный уровень незаменимых аминокислот в 1,5-2 раза выше, чем у пиявок-гематофагов (рис. 1). Вероятно, это связано как с качеством потребляемой пиявками крови, так и с потенциальными способностями кровосо-

сущих пиявок к длительному голоданию. Можно предположить, что изначально низкий уровень пула незаменимых аминокислот в тканях пиявок-гематофагов «настраивает» организм на дефицитное поступление этих аминокислот извне в дальнейшем.

Как следствие, у кровососущих пиявок отмечено пониженное содержание свободных аминокислот с разветвленной углеводородной цепью (АКРУЦ) (рис. 2). Есть предположение, что в условиях нарушения утилизации стандартных энергетических субстратов (углеводов и жиров) окисление АКРУЦ становится главным источником энергии [4, 14]. Известно, что повышение концентраций свободных ароматических аминокислот (АРАК) свидетельствует о нарушении утилизации незаменимых аминокислот клетками тканей в результате блокирования ферментных систем [4].

Снижение утилизации ароматических аминокислот на фоне сохраненной способности тканей к окислению аминокислот с разветвленной углеводородной цепью приводит к формированию аминокислотного дисбаланса. Объективным его критерием является индекс Фишера (ИФ), который характеризует уровень развития эндотоксикоза в организме: в норме он составляет  $3,0 \pm 0,5$  [3].

Данные наших исследований (таблица) показывают, что ИФ у всех видов пиявок находится в пределах нормы, что указывает на отсутствие нарушений в процессах анти-токсических функций аминокислот в тканях и хищных, и кровососущих пиявок.

В содержании заменимых аминокислот у хищных и кровососущих пиявок также наблюдаются различия. Так, у улитковой и медицинской пиявок отмечены повышенные концентрации аспарагиновой кислоты и малые количества пролина (табл.). Аспарагиновая кислота оказывает антигипоксическое действие [1, 2]. Эта аминокислота и ее про-

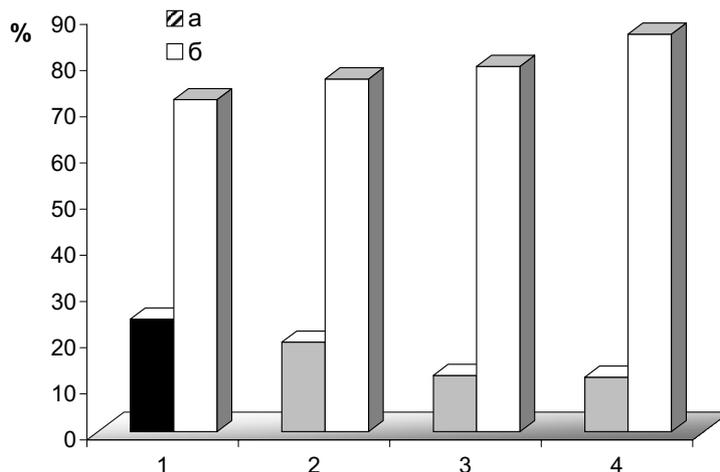


Рисунок 1. Суммарное содержание (%) заменимых (а) и незаменимых (б) аминокислот в тканях пиявок: 1 – *Haemopsis sanguisuga*, 2 – *Erpobdella octoculata*, 3 – *Glossiphonia complanata*, 4 – *Hirudo medicinalis*.

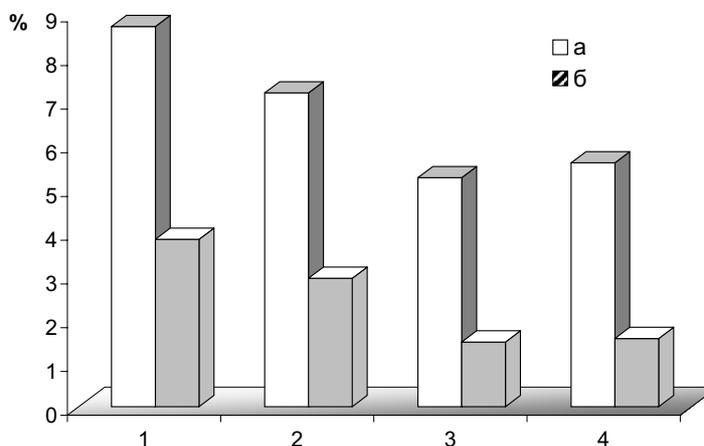


Рисунок 2. Суммарное содержание АКРУЦ (а) / АРАК (б) в тканях хищных (1 – *Haemopsis sanguisuga*, 2 – *Erpobdella octoculata*) и кровососущих (3 – *Glossiphonia complanata*, 4 – *Hirudo medicinalis*) пиявок.

изводные снижают уровень аммиака в крови, способствуя нормализации функционального состояния организма при токсических поражениях. Обладая антитератогенным свойством, аспарагиновая кислота снижает токсичность высоких концентраций канцерогенов в организме [7]. Возможно, аспарагиновая кислота принимает активное участие в процессах консервации крови жертв в кишечнике пиявок-кровососов, что особенно актуально для медицинской пиявки, в тканях которой отмечены значительные концентрации этой аминокислоты.

Медицинская пиявка, будучи теплолюбивым видом, не обитает на Урале. Кроме того,

она очень чувствительна к химическим загрязнениям водной среды. Этим объясняются пониженные концентрации у нее аминокислот, способных связывать тяжелые металлы в нетоксичные комплексы «металл – белок» – цистеина, гистидина, метионина, аргинина. У уральских пиявок, обитающих в водоеме-охладителе АЭС и априори подверженных техногенному воздействию, указанные аминокислоты присутствуют в необходимых количествах, что обеспечивает им высокую ре-

зистентность в условиях постоянного поступления токсичных соединений в водоем.

Обобщая результаты нашего исследования, можно заключить, что качественный состав аминокислотного фонда тканей представленных видов пиявок, независимо от способа питания, постоянен. При этом количественные характеристики исходного уровня азотистого метаболизма пиявок обусловлены как видовой спецификой питания, так и воздействием постоянных факторов среды обитания.

#### Список использованной литературы:

1. Баскович Г.А., Бондина В.А., Кочетов Н.И., Чаплыгина В.А. Глутаминовая и аспарагиновая кислоты в комплексном лечении циркуляторной гипоксии // Патологич. физиология и эксперимент. терапия. 1978. №1. С. 20 – 25.
2. Гловатов Н.А. Окислительные процессы в митохондриях при гипоксии и их коррекция глутаминовой кислотой. Автореф. дис. .... докт. мед.наук. – Свердловск, 1973. 28 с.
3. Ерюхин И. А., Шапков Б. В. Эндотоксикоз в хирургической практике. – Спб., 1995. 304 с.
4. Жадкевич М. М., Баратова Л. А., Матвеев Д. В. Аминокислоты плазмы крови у больных перитонитом: значение индекса Фишера // Лабораторное дело. 1989. № 2. С. 29-32.
5. Западнюк В.И., Купраш Л.П., Заика М.У., Безверхая И.С. Аминокислоты в медицине. – Киев: Здоров'я, 1982. 199 с.
6. Казаренко Т. Д. Ионнообменная хроматография аминокислот. – Новосибирск: Наука, 1975. 133 с.
7. Ленинджер А. Метаболизм аминокислот // Основы биохимии. М.: Мир, 1985. Т.1. С.107 – 137; Т.2. С.571 – 601, 653 – 683; Т.3. С.812 – 849.
8. Лукин Е. И. Пиявки пресных и солоноватых водоемов. В серии: Фауна СССР. Пиявки. Т.1. – Л.: Наука, 1976. 484 с.
9. Мухамеджанов Э. К. Влияние различной обеспеченности организма белком и незаменимыми аминокислотами на пул свободных аминокислот крови и тканей // Вопросы питания. 1988. № 2. С.27-31.
10. Нефедов Л. И., Шейбак В. М., Островский Ю. М., Мороз А. Р. Формирование фонда свободных аминокислот печени крыс в динамике голодания // Вопросы питания. 1990. №5. С.30-34.
11. Нохрина Е.С., Басмаджян Е.А., Черная Л.В., Ковальчук Л.А. Сравнительная характеристика физиологических особенностей медицинских пиявок (*Hirudo medicinalis* L.) из природной популяции и выращенных в искусственных условиях биофабрики // Экология в меняющемся мире. Мат-лы докл. конф., Екатеринбург, 2006. С.170-171.
12. Черная Л. В., Ковальчук Л. А., Басмаджян Е. А. Содержание свободных аминокислот в тканях медицинских пиявок различных физиологических групп // Вестник Уральской медицинской академической науки. Екатеринбург, 2006. №3 (2). С. 123-124.
13. Шарманов Т. Ш., Мухамеджанов Э.К. Синтез, транспорт и утилизация аланина (аланин-глюкозный цикл) // Вопросы медицинской химии. 1981. № 3. С. 300-310.
14. Fisher J. E. // Curr.Probl. Surg. 1980. Vol. 17. № 9. P. 469-532.
15. Herter K. Die Physiologie der Hirudineen // Bronn Klassen und Ordnungen des Tierreichs. Leipzig, 1936b. Bd. 4. Abt. 4. Teil 2. S. 123-319.
16. Jorgensen N., Kristensen E. Uptake of amino acids by three species of Nereis (*Annelidae: Polychaeta*). I. Transport kinetics and net uptake from natural concentrations // Mar. Ecol. Progr. Ser. 1980. V. 3. № 4. P. 329-340.
17. Jorgensen N., Kristensen E. Uptake of amino acids by three species of Nereis (*Annelidae: Polychaeta*). II. Effects of anaerobiosis // Mar. Ecol. Progr. Ser. 1980a. V. 3. № 4. P. 341-346.
18. Lent Charles M., Dickinson Michael H. On the termination of ingestive behaviour by the medicinal leech // J. Exp. Biol. 1987. V. 131. P. 1-15.
19. Mann K.H. A study of the oxygen consumption of five species of leech // Journ. Exper. Biol., 1956. V. 33. P. 615-626.
20. O'Dell Steven I., Stephens Graver C. Uptake of amino acids by *Pareurythoe californica*: substrate interaction modifies net influx from the environment // Biol. Bull. 1986. V. 171. № 3. P. 682-693.