

УДК 595.143.6:577.112.3

## ГЕОГРАФИЧЕСКАЯ И СЕЗОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ТКАНЕЙ ПРЕСНОВОДНОЙ ПИЯВКИ *HAEMOPIS SANGUISUGA* (L. 1758)

Черная Л.В.

ФГБУН Институт экологии растений и животных УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия (620144, Екатеринбург, ул. 8 Марта, 202), e-mail: [Chernaya\\_LV@mail.ru](mailto:Chernaya_LV@mail.ru)

Исследовано содержание свободных аминокислот в тканях пресноводной пиявки *Haemopsis sanguisuga* (L., 1758) из водных экосистем различных климатикогеографических зон и в разные сезоны года (весна, лето, осень). Обнаружено, что обитание пиявок в неблагоприятных климатических условиях сопровождается интенсификацией аминокислотного обмена и стабильно высоким уровнем паттерна незаменимых аминокислот в тканях. Показано, что наибольшее влияние на аминокислотный обмен пиявок *H. sanguisuga* оказывает осеннее понижение температуры. В тканях пиявок, уходящих в зимний анабиоз, наблюдается аминокислотный дисбаланс, что указывает на высокую экологическую пластичность их метаболических процессов. Установлено, что повышение суммарных концентраций свободных аминокислот в тканях является адаптивным механизмом пиявок *H. sanguisuga* к воздействию неблагоприятных факторов среды.

Ключевые слова: пиявки, свободные аминокислоты, адаптация, неблагоприятные климатические условия, сезоны года.

## THE GEOGRAPHICAL AND SEASONAL VARIABILITY AMINO ACID COMPOSITION OF TISSUE FRESHWATER LEECH *HAEMOPIS* *SANGUISUGA* (L. 1758)

Chernaya L.V.

Institute of Plant and Animal Ecology Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russia (620144, Yekaterinburg, street 8 Marta, 202), e-mail: [Chernaya\\_LV@mail.ru](mailto:Chernaya_LV@mail.ru)

The content of free amino acids in the tissues of freshwater leeches *Haemopsis sanguisuga* (L., 1758) of the aquatic ecosystems of different climatic zones and different seasons (spring, summer, autumn) were studied. Found that dwelling leeches in adverse weather conditions is accompanied by an intensification of amino acid metabolism and consistently high level pattern of essential amino acids in the tissues. It is shown that the greatest influence on the amino acid exchange leeches *H. sanguisuga* has autumn drop in temperature. In the tissues of leeches, going in winter hibernation, there is an amino acid imbalance, which indicates a high ecological plasticity of their metabolic processes. Found that an increase in the total concentration of free amino acids in the tissues is an adaptive mechanism leeches *H. sanguisuga* to adverse environmental factors.

Keywords: leeches, free amino acids, adaptation, adverse climatic conditions, seasons of the year.

Температура окружающей среды является важнейшим фактором, влияющим на распространение, численность и физиологическое состояние животных. Большая ложноконская пиявка *Haemopsis sanguisuga* (L., 1758) широко распространена и особенно многочисленна в водных экосистемах юга европейской части России и сопредельных государств [1,5, 7]. На территории Европейского Севера, Урала и Сибири этот вид пиявок становится редким и малочисленным компонентом гирудофауны, что обусловлено экстремальными условиями для ее размножения в условиях сурового климата (короткий безморозный период, глубокое промерзание грунта) [2, 4, 6, 8]. Поскольку большие ложноконские пиявки имеют многолетний жизненный цикл (пять и более лет), они при наступлении зимних холодов неоднократно впадают в длительный зимний анабиоз. С этих

позиций несомненна актуальность исследований, направленных на изучение адаптивных возможностей пиявок к неблагоприятным факторам среды. Известно, что одной из форм физиологической адаптации пойкилотермных животных к обитанию в условиях низких температур является накопление в тканях и жидкостях биологически активных соединений: низкомолекулярных спиртов, свободных углеводов и аминокислот [3, 9]. Данное исследование посвящено изучению географических и сезонных особенностей аминокислотного спектра тканей хищной пиявки *H. sanguisuga*.

### **Материалы и методы**

В исследованиях было использовано 140 взрослых особей большой ложноконской пиявки *H. sanguisuga*. Для изучения географических особенностей аминокислотного обмена использованы пиявки из 11-ти водных объектов различных регионов России, Украины и Казахстана: оз. Горелое и р. Уды (Харьковская обл.), оз. Глубокое (Луганская обл.), р. Лесной Воронеж (Тамбовская обл.), ерик Судомойка (Волгоградская обл.), р. Челбас (Краснодарский край), р. Бобровка и р. Сысерть (Свердловская обл.), оз. Еловое (Челябинская обл.), р. Нура и оз. Боровое (Акмолинская обл.). При сравнительной оценке аминокислотного спектра тканей пиявок, обитающих в водных экосистемах различных природно-климатических зон, использовали условные термины: европейская форма *H. sanguisuga* (регионы восточной части Украины и европейской территории России, где среднегодовая температура находится в диапазоне от +6.1°C до +11.9°C) и азиатская форма (Урал и северная часть Казахстана – регионы со среднегодовой температурой от +2.3°C до +3.2°C). Сезонную динамику концентраций свободных аминокислот (АК) в тканях пиявок оценивали у особей, отловленных в разные сезоны года в Белоярском водохранилище (Свердловская обл.): весной (I-я декада мая), летом (I-я декада августа) и осенью (III-я декада октября). Содержание пиявок, доставленных в лабораторию, осуществляли в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и научных целей [1].

Пул свободных аминокислот в тканях пиявок определяли методом ионообменной хроматографии с помощью автоматического анализатора ААА-339М фирмы Mikrotechna (Czechia). Подготовлено 140 проб, проведено 3220 элементо-определений.

Экспериментальные данные обрабатывали с использованием пакета лицензионных прикладных программ «Statistica for Windows 6.0». Различия между сравниваемыми выборками считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ ;  $p < 0.01 - 0.001$ .

### **Результаты и обсуждение**

Показано, что независимо от региона исследования, качественный состав аминокислотного спектра тканей *H. sanguisuga* постоянен, а его количественная структура

претерпевает существенные изменения (табл.).

У европейской формы пиявок суммарный фонд свободных АК в тканях подвержен географической изменчивости ( $p < 0.001$ ). Наибольшая дисперсия характерна для тканевых концентраций глутаминовой кислоты, пролина, аланина, цистеина,  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, гистидина и аргинина ( $p = 0.000$ ); наименьшая изменчивость выявлена для содержания фенилаланина ( $p = 0.020$ ) (табл.).

У особой азиатской формы *H. sanguisuga*, в отличие от европейских пиявок, не выявлено географической изменчивости, как для суммарного фонда АК, так и для паттернов незаменимых (НАК) и заменимых (ЗАК) аминокислот ( $p > 0.05$ ) (табл.). Уровень содержания аланина и валина, которым принадлежит ключевая роль в энергетическом гомеостазе и синтезе глюкозы, в тканях азиатской формы большой ложноконской пиявки, как показал дисперсионный анализ, подвержен наименьшей изменчивости ( $p = 0.001$ ). Для концентраций остальных свободных АК, содержащихся в тканях пиявок азиатских популяций, выявлена достаточно высокая дисперсия ( $p < 0.000$ ). Наибольшей внутривидовой изменчивости подвержены тканевые концентрации цистеиновой кислоты, пролина, цистеина, метионина,  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, аргинина ( $p = 0.000$ ) (табл.).

Диапазоны процентного содержания свободных аминокислот (min-max) и дисперсия их концентраций (H-критерий Краскела – Уоллеса) в тканях *H. sanguisuga* различных географических популяций

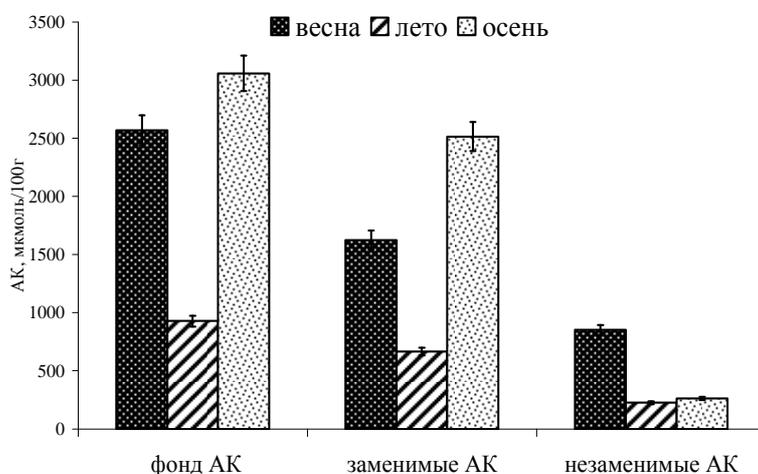
АК, %	<i>H. sanguisuga</i>					
	Европейская форма n = 60			Азиатская форма n = 50		
	min-max	H <sub>5, 60</sub>	p	min-max	H <sub>4, 50</sub>	p
Cysteic Acid	0.56 – 1.33	48.8	0.000	0.56 – 2.59	40.1	0.000
Aspartic Acid	5.93 – 10.7	42.4	0.000	8.17 – 14.3	37.9	0.000
Threonine	3.51 – 5.89	36.2	0.000	4.28 – 6.68	22.1	0.000
Serine	4.55 – 8.36	49.6	0.000	5.05 – 6.75	20.3	0.000
Glutamic Acid + Gln	24.6 – 29.3	54.0	0.000	17.1 – 25.5	25.1	0.000
Proline	0.66 – 3.55	51.1	0.000	0.30 – 0.72	43.5	0.000
Glycine	6.29 – 7.94	37.0	0.000	6.15 – 8.43	26.3	0.000
Alanine	14.1 – 19.4	52.8	0.000	14.6 – 17.9	18.7	0.001
Valine	5.87 – 7.19	46.1	0.000	5.47 – 7.70	18.7	0.001
Cystine	0.21 – 1.08	50.7	0.000	0.31 – 0.67	44.1	0.000
Methionine	0.94 – 1.80	26.8	0.000	1.77 – 3.83	42.7	0.000
Isoleucine	1.74 – 3.56	45.2	0.000	2.47 – 3.47	20.9	0.000
Leucine	2.60 – 6.01	32.9	0.000	4.16 – 5.88	33.0	0.000
Tyrosine	0.84 – 1.92	30.1	0.000	1.40 – 2.19	22.6	0.000
Phenylalanine	1.56 – 2.66	13.4	0.020	1.79 – 2.69	25.4	0.000
GABA	0.32 – 0.94	51.0	0.000	0.13 – 0.87	45.5	0.000
Ornithine	1.2 – 2.26	38.7	0.000	1.24 – 2.52	35.9	0.000
Lysine	2.74 – 5.55	46.3	0.000	3.95 – 5.72	33.2	0.000
Histidine	0.39 – 1.48	50.8	0.000	1.21 – 2.15	35.9	0.000

Arginine	0.30 – 0.89	55.8	0.000	0.68 – 1.72	43.0	0.000
Фонд АК, мкмоль/100г	1512 – 2311	34.9	0.000	2112 – 2559	7.42	0.115
НАК	23.5 – 30.3	22.2	0.005	31.5 – 33.6	7.42	0.115
ЗАК	66.1 – 72.7	46.3	0.000	63.0 – 66.0	6.29	0.178

Основным критерием аминокислотного баланса в организме являются показатели антитоксического индекса Фишера (ИФ) – соотношение концентраций аминокислот с разветвленной углеродной цепью (валин, изолейцин, лейцин) к ароматическим АК (тирозин, фенилаланин), составляющее в норме  $0.3 \pm 0.5$ . По нашим данным, значения ИФ у европейской формы пиявок лежат в диапазоне 3.23–4.43, а азиатской – от 3.22 до 3.94, что несколько отклонено от нормы, но не критично, и связано, скорее всего, с экологическими особенностями мест обитания.

Сравнительный анализ показал, что у особей *H. sanguisuga*, обитающих в водных экосистемах Урала и Северного Казахстана, по сравнению европейскими особями, более высокий уровень суммарных концентраций свободных АК тканей ( $p < 0.05$ ) (табл.). В тканях азиатских пиявок повышено процентное содержание цистеиновой кислоты, аспарагиновой кислоты, треонина, глицина, метионина, тирозина, гистидина и аргинина, но понижено – серина, глутамата и глутамина, пролина, аланина и цистеина. Обнаружено, что обитание пиявок в условиях короткого безморозного периода и холодной продолжительной зимы сопровождается значительным повышением пула НАК.

Установлено, что физиологические процессы, связанные с сезонными особенностями биологического цикла гирудинид, обуславливают качественные и количественные изменения аминокислотного спектра в их тканях. Суммарные концентрации свободных АК в тканях *H. sanguisuga* значительно изменяются по сезонам: осень > весна > лето ( $p < 0.05$ ) (рис.).



Сезонная динамика концентраций основных метаболических групп аминокислот в тканях больших ложноконских пиявок

Дисперсионный анализ выявил очень высокую сезонную изменчивость аминокислотного фонда ложноконской пиявки ( $H_2; 30 = 26.7; p = 0.000$ ). Максимальные концентрации свободных АК ( $3058.6 \pm 139.3$  мкмоль/100 г) выявлены в тканях осенних особей ( $p < 0.05$ ) (рис.). Аминокислотный пул, уходящих в анабиоз пиявок, повышен за счет кратного роста концентраций цистеиновой кислоты, глутаминовой кислоты и глутамина. Наиболее примечательными отличиями этой сезонной группы пиявок являются полная утилизация пролина, метионина и  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, и присутствие в их тканях цитруллина и незаменимой аминокислоты триптофана, которые в летних и весенних биопробах *H. sanguisuga* не выявлялись.

У весенних пиявок, вышедших из зимнего анабиоза, суммарный фонд АК в тканях по сравнению с осенними особями снижен в 1.2 раза ( $2570.1 \pm 222.9$  мкмоль/100г) ( $p < 0.05$ ) (рис.). Аминокислотный пул весенних пиявок за зимний сезон полностью утилизировал цитруллин и триптофан, а также потерял существенные количества цистеиновой кислоты и глутаминовой кислоты и глутамина, их содержание снизилось в 4.6 и 4.7 раза соответственно, однако концентрации остальных АК значительно повысились, что обусловлено активацией обменных процессов *H. sanguisuga* ( $p < 0.05$ ).

Летний период, наиболее благоприятный в биологическом цикле гирудинид, когда происходит интенсивное наращивание мышечной массы и основная репродуктивная деятельность, характеризуется пониженным уровнем аминокислотного обмена *H. sanguisuga*. Суммарные концентрации АК в тканях летних особей ( $927.6 \pm 73.4$  мкмоль/100г) ниже, чем у весенних и осенних пиявок в 2.8 и в 3.3 раза соответственно ( $p < 0.01$ ) (рис.). В тканях этой сезонной группы *H. sanguisuga* отмечены минимальные концентрации всех свободных АК, за исключением пролина, участвующего в синтезе коллагена ( $p < 0.05$ ). Наибольший обвал концентраций свободных АК в тканях летних особей, по сравнению с весенними, отмечен для цистеиновой кислоты, аспарагиновой кислоты, цистеина и для незаменимых АК: треонина, валина, метионина, изолейцина, лейцина, гистидина и аргинина ( $p < 0.01$ ).

Отмечено, что суммарные концентрации пула незаменимых АК пиявок достаточно высоки и убывают в ряду весна < осень  $\leq$  лето (рис.). В то же время 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). Пул заменимых АК в тканях осенних особей *H. sanguisuga* составляет 82.2 % от суммарного фонда, при этом на долю глутаминовой кислоты и глутамина приходится 67.0 %. Глутаминовая кислота поддерживает энергетический, медиаторный и пластический обмены в организме. Она служит предшественником при синтезе белков, ряда биологически

активных соединений, обеспечивает синтез заменимых АК. При стрессовом напряжении организма (в нашем случае – околонулевая температура воды) глутамат служит естественным поставщиком кетоглутарата и янтарной кислоты, являясь наиболее эффективным субстратом в энергообеспечении. У особой ложноконских пиявок других сезонных групп глутаминовая кислота содержится в гораздо меньшем количестве: у летних особей – 23.6 %, у весенних – 17.0 % от суммарного фонда АК. Таким образом, выявленный нами высокий уровень глутамата в тканях осенних пиявок является необходимым метаболическим условием для поддержания процессов жизнеобеспечения *H. sanguisuga*, переходящих в зимний продолжительный анабиоз.

**Заключение.** Проведенные исследования установили общую закономерность внутривидовой изменчивости тканевого содержания пролина, цистеина,  $\gamma$ -аминоасляной кислоты и аргинина у обеих географических форм *H. sanguisuga*, что указывает на регулируемую роль данных АК в адаптации пиявок к экологическим особенностям изучаемых регионов. Обитание больших ложноконских пиявок в экстремальных климатических условиях сопровождается интенсификацией аминокислотного обмена и стабильно высокими концентрациями паттерна незаменимых аминокислот в тканях. Исследования сезонной изменчивости аминокислотного спектра в тканях пиявок *H. sanguisuga* показали, что наибольшее влияние на обменные процессы гирудинид оказывает осеннее понижение температуры. Высокая степень аминокислотного дисбаланса в тканях пиявок, уходящих в зимний анабиоз, по-нашему мнению, может способствовать развитию экологической пластичности метаболических процессов и выживанию не только в период зимнего анабиоза, но и формированию адаптивных стратегий при влиянии экстремальных факторов различного генеза.

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

### Список литературы

1. Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ets n 123) (Страсбург, 18 марта 1986 года). – Режим доступа: <http://conventions.coe.int/Treaty/Commun/QueVoulezVous...>
2. Залозный Н.А. Роль олигохет и пиявок в экосистемах водоемов Западной Сибири // Биол. ресурсы водоемов Сибири и Дальнего Востока. – М.: Наука, 1984. – С. 124-143.
3. Каранова М.В. Изменение содержания свободных аминокислот тканевых жидкостей пресноводного моллюска *Limnaea stagnalis* в процессе сезонной адаптации к низким

положительным температурам // Известия РАН. Серия биологическая, 2006. – № 6. – С. 719-724.

4. Лукин Е.И. Пиявки пресных и солоноватых водоемов. – Л., 1976. – Т.1. – 484 с.

5. Романова Е.М., Климина О.М. Биоресурсы класса Hirudinea в зоне Среднего Поволжья: экологическая значимость и перспективы использования // Известия Самарского научного центра РАН, 2010. – Т. 12. – № 1. – С. 208-211.

6. Черная Л.В., Ковальчук Л.А. Распространение пиявок в водных экосистемах города Екатеринбурга и его окрестностей // Экология. – 2009. – № 2. – С. 122-126.

7. Шаповалов М.И., Моторин А.А., Тхабисимова А.У. Пиявки (Hirudinea) в условиях антропогенной трансформации водных экосистем Северо-Западного Кавказа // Вода: химия и экология. – 2012. – № 4. – С. 61-67.

8. Chernaya L. Hirudinea fauna of industrial region in the Ural Mountains // *Lauterbornia*, 2012. N.75. P. 71-74.

9. Hochachka P.W., Somero G.N. Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution. Oxford University Press, New York. 2002. 235 p.

#### **Рецензенты:**

Хохуткин И.М., д.б.н., ведущий научный сотрудник Института экологии растений и животных, Уральское отделение Российской Академии наук, г. Екатеринбург;

Ковальчук Л.А., д.б.н., ведущий научный сотрудник Института экологии растений и животных, Уральское отделение Российской Академии наук, г. Екатеринбург.