

Т. В. Плетенева¹, А. А. Мокроусов², Т. В. Максимова¹,
И. С. Лузанова³, М. А. Тамбовцева¹, А. В. Сыровешкин¹

ЭЛЕМЕНТОМ ПИЯВКИ МЕДИЦИНСКОЙ

¹ Российский университет дружбы народов, Москва, Россия;

² Экспертно-криминалистический центр МВД РФ, Москва, Россия;

³ Бюро судебно-медицинской экспертизы Департамента здравоохранения Москвы, Москва, Россия

Впервые осуществлен многоэлементный анализ пиявки медицинской *Hirudo medicinalis*. Описаны особенности подготовки биопробы к анализу и приведены результаты определения содержания более 60 элементов методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой. Обнаруженные *s*-, *p*-, *d*- и *f*-элементы сгруппированы по макро-, микро- и ультрамикросодержанию.

Ключевые слова: пиявка медицинская, микроэлементы, биогенные соединения

В природе существуют сотни видов пиявок [1], но к медицинскому применению разрешен только один — *Hirudo medicinalis* [2, 3]. Пиявка *Hirudo medicinalis* — единственный представитель фауны, внесенный в государственный реестр лекарственных средств РФ [2] и законодательно утвержденный FDA (США) [3]. Из секрета пиявки медицинской выделено более 100 биологически активных соединений органической природы, например, полипептид гирудин (65 – 66 аминокислот) — ингибитор агрегации тромбоцитов и свертывания крови. Медицинская пиявка — источник ингибиторов различных протеиназ: бделинов (ингибиторы трипсина, плазмина и акрозина), гирустазина (ингибитор тканевого калликреина, трипсина, альфа-химотрипсина и гранулоцитов катепсина G), эглинов (ингибиторы альфа-химотрипсина) и др. [4]. В настоящее время пиявки используются в микрохирургии для повышения венозного кровообращения [1], для лечения больных с различными типами тромбоэмболических осложнений, у пациентов с ишемической болезнью сердца, гепарин-индуцированной тромбоцитопенией, после ортопедических операций [5]. Разработаны, прошли клинические испытания и используются для лечения синтетические аналоги гирудина — бивалирудин (*bivalirudin*) [6] и лепирудин (*lepirudin*) [5].

Сведения о природе и роли эссенциальных элементов, входящих как в состав секрета, так и в организм пиявки в целом, практически отсутствуют, несмотря на то, что элементами различных организмов, включая человека, находятся в стадии активного изучения [7 – 10]. Например, при исследованиях *in vitro* получены данные о влиянии ионов металлов на связывание гирудина с тромбином [11]. Изучение элемента имеет особое значение для характеристики различных патологий, связанных с нарушением макро- и микроэлементных равновесий, так как изливаемый в ранку секрет слюнных желез пиявки воздействует на различные системы организма, непосредственно связанные с сис-

темой гемостаза, в стабилизации которой принимают участие эссенциальные макро- и микроэлементы.

Такая информация может быть получена методом элементомии, который позволяет идентифицировать и провести количественное определение содержания металлов, неметаллов и амфотерных элементов высокочувствительными методами анализа [12]. Определение содержания *s*-, *p*-, *d* и *f*-элементов в организме пиявки является первым шагом к детальной расшифровке ее элемента с последующим изучением соответствующих координационных структур и механизмов их действия. Есть основания считать, что они в значительной мере зависят от элементного состава пиявки, в первую очередь от элементов-комплексобразователей — меди, цинка, железа. Детальное изучение элемента пиявки медицинской *Hirudo medicinalis*, наряду с геномом, транскриптомом, протеомом, метаболомом, открывает перспективы научного обоснования ее альтернативного применения взамен химиотерапевтическим средствам при некоторых заболеваниях.

Элементный анализ проводили методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS) с помощью прибора ELAN DRC II (Германия). Пиявки (*N* = 17), реализуемые Международным центром медицинской пиявки (Москва), после девитализации замораживанием в морозильной камере, высушивали до постоянной массы при 105 °С в сушильном шкафу BINDER FD 23 (Германия). После взвешивания каждую пиявку помещали в отдельный герметичный тefлоновый реактор, добавляли концентрированную азотную кислоту (о.с.ч.), очищенную методом изотермической перегонки в термостойкой полипропиленовой системе, и 33 % пероксид водорода в соотношении 5:1. Минерализацию проб проводили с помощью системы микроволнового разложения (печь MDS 2000) под давлением, время минерализации — 10 мин при 80 % мощности. Параллельно при тех же условиях проводили контроль чистоты реактивов. Контроль содержания микроэлементов в среде обитания медицин-

ских пиявок — воде — проводили с помощью атомно-абсорбционного спектрометра “SpectrAA-800” с электротермической атомизацией и эффектом Зеемана по протоколу фирмы “Varian”. Содержание кремния, кальция, магния и натрия не превышало 0,01 %. Эссенциальные элементы находились в воде в следовых количествах.

В результате исследования осуществлено картирование элементов по уровню их содержания. Из 78 устойчивых элементов были обнаружены и количественно определены более 60. Результаты анализа (таблица) показали, что содержание элементов колеблется в широком интервале концентраций. В соответствии с общепринятой классификацией [13] результаты анализа были ранжированы следующим образом. Элементы, содержание которых превышает 0,1 мг/г (массовая доля $\omega > 10^{-2} \%$), включены в группу макроэлементов. Их содержание снижается в ряду $\text{Na} > \text{P} > \text{K} > \text{Mg} > \text{Fe}$.

При ранжировании по содержанию в группу микроэлементов ($10^{-5} \% < \omega < 10^{-2} \%$) вошли $\text{Zn} > \text{Cu} > \text{Cr} > \text{Ag} > \text{Ni} > \text{Ca} > \text{Al} > \text{Sr} > \text{Mn} > \text{Se} > \text{B} > \text{Pb} > \text{Rb} > \text{Mo} > \text{V} > \text{As} > \text{Li} > \text{Zr} > \text{Sn} > \text{Co}$. Содержа-

ние микроэлементов занимает широкий интервал концентраций. В рассматриваемую группу вошли не только эссенциальные и условно эссенциальные элементы, но и те, которые принято считать примесными — Ag, Al, Pb, As, B, Rb, Li, Zr, Sn.

Ультрамикроэлементы ($\omega < 10^{-5} \%$) образуют многочисленную группу, но в таблицу включены только те элементы, содержание которых превышало $10^{-7} \%$ (1 мкг/кг). Интервал их концентраций ограничен значениями от 50 (сурьма) до 3,73 мкг/кг (лантан).

Содержание Os, Ir, Ru, Rh, Pd, Re, W, Pr, Eu, Tb, Ho находилось ниже пределов количественного определения. Ни в одной из проб не были обнаружены: *s*-элементы — Cs, Ba; *p*-элементы — In, Te; *d*-элементы — Hg, Ti, Cd, Pt; *f*-элементы-лантаноиды — Nd, Sm, Gd, Dy, Er, Tm, Yb, Lu.

Значительное превышение (на порядок и более) содержания по сравнению с нормальным уровнем в плазме крови человека таких эссенциальных элементов, как медь, цинк, железо, марганец, селен, бор, молибден, ванадий, позволяет предположить участие этих элементов при использовании пиявки медицинской для лечения микроэлементозов и связанных с

Ранжирование элементов по содержанию в пиявке медицинской

Ранжирование элементов в соответствии с принятой классификацией	Содержание элемента, мкг/г		
	Пиявка медицинская (указано среднее значение и интервал содержания, на сухое вещество) N = 17	Плазма крови или кровь человека	
Макроэлементы	Na	$3,41 \cdot 10^3 (2,1 - 5,2) \cdot 10^3$	$(3,11 - 3,34) \cdot 10^3$ (плазма) [14, 15]
	P	$8,2 \cdot 10^2 (4,6 - 16,3) \cdot 10^2$	15 - 22,5 (плазма) [14]
	K	$6,7 \cdot 10^2 (2,1 - 12,1) \cdot 10^2$	$1,4 \cdot 10^2 - 1,95 \cdot 10^2$ (плазма) [14]
	Mg	$5,3 \cdot 10^2 (2,6 - 14,4) \cdot 10^2$	15,6 - 26,4 (плазма) [14]
	Fe	$2,4 \cdot 10^2 (1,3 - 4,1) \cdot 10^2$	0,6 - 1,68 (плазма) [15]
Микроэлементы	Zn	47,1 (23,0 - 120)	0,70 - 1,10 (плазма) [15, 16]
	Cu	27,9 (12,0 - 37,0)	0,7 - 1,6 (плазма) [14]
	Cr	18,2 (8,20 - 21,0)	$< 1 \cdot 10^{-3}$ (плазма) [17]
	Ag	15,2 (1,1 - 66,0)	$(0,4 - 1,2) \cdot 10^{-3}$ (плазма) [15]
	Ni	10,8 (4,1 - 15,0)	$(2,6 \pm 0,9) \cdot 10^{-3}$ (плазма) [18]
	Ca	7,45 (3,20 - 9,20)	89,2 - 102,8 (плазма) [14]
	Al	5,94 (0,85 - 9,30)	0,39 (кровь) [15]
	Sr	5,54 (1,40 - 11,0)	0,031 (кровь) [15]
	Mn	4,07 (2,10 - 6,70)	$(0,4 - 13,1) \cdot 10^{-3}$ (кровь) [19]
	Se	2,25 (0,74 - 5,20)	0,06 - 0,12 (плазма) [15]
	B	1,35 (0,71 - 1,90)	0,013 (кровь) [15]
	Pb	1,13 (0,35 - 2,30)	0,21 (кровь) [15]
	Rb	0,80 (0,29 - 1,10)	$0,2 \cdot 10^{-3}$ (плазма) [15]
	Mo	0,44 (0,32 - 0,65)	$0,2 \cdot 10^{-3}$ (кровь) [15]
	V	0,29 (0,012 - 0,62)	$1,5 \cdot 10^{-5} - 10^{-3}$ (плазма) [15]
	As	0,28 (0,14 - 0,65)	$(1,7 - 15,4) \cdot 10^{-3}$ (плазма) [15]
	Li	0,26 (0,24 - 0,30)	$(0,1 - 1) \cdot 10^{-3}$ (плазма) [15]
	Zr	0,22 (0,08 - 0,87)	...
	Sn	0,18 (0,09 - 0,63)	0,38 (кровь) [15]
	Co	0,16 (0,03 - 0,23)	$(0,2 - 40) \cdot 10^{-3}$ (кровь) [15]
Ультрамикроэлементы	Sb	$50,1 \cdot 10^{-3} (8,9 - 150) \cdot 10^{-3}$	$(3,2 - 54) \cdot 10^{-6}$ (плазма) [20]
	Be	$9,75 \cdot 10^{-3} (18,0 - 22,0) \cdot 10^{-3}$	$(0,02 - 3,0) \cdot 10^{-3}$ (кровь) [21]
	Ce	$6,24 \cdot 10^{-3} (0,04 - 39,0) \cdot 10^{-3}$...
	La	$3,73 \cdot 10^{-3} (0,62 - 21,0) \cdot 10^{-3}$...

ними заболеваниями. Проникая в кровь пациента, координационно связанные ионы металлов могут принимать участие в биогенных процессах, восстанавливая нарушения гомеостаза.

Таким образом, сделан первый важный шаг на пути исследования элемента пиявки медицинской — проведены идентификация и количественное определение более 60 *s*-, *p*- *d*- и *f*-элементов в пиявке медицинской. Полученные результаты являются основой для последующего выяснения природы координационных связей в металлсодержащих биогенных соединениях и их роли при использовании пиявки в качестве медицинского средства.

ЛИТЕРАТУРА

1. D. Massart, S. Sohawon, and O. Noordally, *Rev. Med. Brux.*, **30**(5), 533 – 536 (2009).
2. Справочник лекарств РЛС (2009); <http://www.rlsnet.ru>.
3. C. Rados, *FDA Consum*, **38**(5), 9 (2004).
4. И. П. Баскова, Л. Л. Завалова, *Биохимия*, **66**(7), 703 – 714 (2001).
5. A. Cheng-Lai, *Heart Dis.*, **1**(1), 41 – 49 (1999).
6. T. D. Gladwell, *Clin. Ther.*, **24**(1), 38 – 58 (2002).
7. R. C. Todd and S. J. Lippard, *Metallomics*, **1**, 280 – 291 (2009).
8. H. Kodama and C. Fujisawa, *Metallomics*, **1**, 42 – 52 (2009).
9. K. T. Suzuki, C. Doi and N. Suzuki, *Pure Appl. Chem.*, **80**(12), 2699 – 2713 (2008).
10. Yu-Feng Li, C. Chen, and Y. Qu, et al., *Pure Appl. Chem.*, **80**(12), 2577 – 2594 (2008).
11. P. Zoldhelyi, J. H. Chesebro, and W. G. Owen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Med. Sci.*, **90**, 1819 – 1823 (1993).
12. M. Krachler, *J. Environ. Monit.*, **9**, 790 – 804 (2007).
13. M. Krachler and W. Shotyk, *Science of The Total Envir.*, **407**, 1089 – 1096 (2009).
14. В. В. Горбачев, В. Н. Горбачева, *Витамины, микро- и макроэлементы. Справочник*, Книжный дом, Минск (2002), сс. 245 – 442.
15. А. В. Скальный, *Химические элементы в физиологии и экологии человека*, Изд. дом «ОНИКС 21 век»: Мир, Москва (2004), сс. 79 – 208.
16. A. Jain, M. Varma, and B. K. Agrawal, *J. Nutr. Sci. Vitamin.*, **54**, 392 – 395 (2008).
17. J. J. McAughey, *Sci. Total Environ.*, **71**, 317 – 322 (1988).
18. J. Doull, C. D. Klassen, and M. D. Amdur (eds.), *Casarett and Doull's Toxicol. Macmillan Co., Inc.*, New York (1986).
19. H. Roels, *Am. J. Ind. Med.*, **11**(3), 297 – 305 (1987).
20. U. Krishnan, S. S. Que Hee, *Bul. Environ Contam. Toxicol.*, **48**, 481 – 486 (1992).
21. Health Assessment Document for Beryllium USEPA 600 / 8 – 84 / 0267 (1987), pp. 4 – 6.

Поступила 14.04.10

ELEMENTAL ANALYSIS OF MEDICINAL LEECH

T. V. Pleteneva¹, A. A. Mokrousov², T. V. Maksimova¹, I. S. Luzanova³, M. A. Tambovtseva¹, and A. V. Syroeshkin¹

¹ Medical Faculty, Russian University of Peoples Friendship, Moscow, Russia;

² Forensic Expertise Center, Ministry of Internal Affairs, Moscow, Russia;

³ Bureau of Forensic Expertise, Municipal Department of Health, Moscow, Russia

Medicinal leeches *Hirudo medicinalis* have been analyzed for *s*-, *p*-, *d*-, and *f*-elements. The details of the preparation of biological material for analysis and the results of the determination of more than 60 elements by induction-coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) are presented. All elements were classified into macro-, micro-, and ultramicroelement groups according to their content in leeches.

Key words: *Hirudo medicinalis*, microelements, biogenous compounds