

ПРОТЕОМИКА

УДК 577. 123

©Коллектив авторов

СТЕРОИДЫ, ГИСТАМИН И СЕРОТОНИН В СОСТАВЕ СЕКРЕТА СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ

И.П. Баскова^{1}, З. Фернер², А.С. Балкина³, С. Козин⁴, О.В. Харитонова¹,
Л.Л. Завалова⁵, В.Г. Згода⁴*

¹Биологический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова, 119992 Москва;
факс: (095)939-4309; эл. почта: Saliva1@yandex.ru

²Иммуно-биологические лаборатории (IBL GmbH) D-22335 Гамбург, Германия;
факс: +049 40-53 28 91-11; эл. почта: DFE@IBL-Hamburg.com

³Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова, 119992 Москва;
факс (095)54-17; эл. почта: balkina@enzyme.chem.msu.ru

⁴НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАН, 119992 Москва,
ул. Погодинская, 10; факс: (095) 245-0857; эл. почта: Vic@IBMH.MSK.SU

⁵Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
119997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10; факс: (095) 330-6538;
эл. почта: leech@humgen.siohc.ras.ru

Липиды составляют 20% от веса лиофильно высушенного пула секрета слюнных желез (ССЖ) медицинской пиявки, отобранного более чем от 50 животных. При полном отсутствии фосфолипидов в составе ССЖ обнаружены соединения стероидной природы. Методом иммунохемилюминесцентного анализа в составе ССЖ обнаружены свободные стероидные гормоны: кортизол, прогестерон, тестостерон, эстрадиол и дегидроэпиандростерон. Методом микрохроматомасс-спектрометрии ССЖ и его низкомолекулярной фракции (НМФ) (мол. массы 220-850 Да) выявлена высокая поликомпонентность последней. В сравнении со стандартными препаратами идентифицированы в составе ССЖ стероидные гормоны: кортизол, дегидроэпиандростерон, андростендион и тестостерон, а также гистамин и серотонин.

Ключевые слова: липиды, стероидные гормоны, гистамин, серотонин, секрет слюнных желез, медицинская пиявка.

ВВЕДЕНИЕ. Секрет слюнных желез (ССЖ) медицинской пиявки обеспечивает гуморальный эффект гирудотерапии, метода лечения различных заболеваний путем постановки пиявок на определенные участки кожи больного [1].

* - адресат для переписки

Успех лечения медицинскими пиявками во многом определяется высокой степенью адаптации этих животных к насасыванию крови теплокровных при внедрении их в микроциркуляторное русло кожи путем нанесения ранки и впрыскивания ССЖ. Свидетельством такой адаптации является исключительно высокая специфичность биологически активных белков пиявочного секрета (гирудин [2], ингибитор фактора Ха [3], ингибитор триптазы [4] и др.).

Поскольку в последние годы работами ряда авторов показано, что кожа представляет собой выраженную нейроэндокринную систему, участвующую в регуляции всех жизненно важных функций организма [5], представлялось необходимым проанализировать, имеет ли место адаптация пиявочного секрета к эндокринному статусу кожи человека и млекопитающих.

Не меньший интерес представляет проблема регуляции состояния сосудистой стенки микроциркуляторного крово- и лимфотока. До сих пор открытым оставался вопрос о том, что обеспечивает ее вазодилатацию и усиление кровотока в ответ на поступление ССЖ. Предполагалась возможная роль содержащегося в ССЖ гистамина, однако экспериментальных доказательств его присутствия в ССЖ не было.

Настоящая работа является первым шагом на пути определения гормонального статуса ССЖ и выявления нейромедиаторов, гистамина и серотонина, играющих важную роль в обеспечении лечебного эффекта медицинской пиявки при гирудотерапии.

МЕТОДИКА.

Секрет слюнных желез (ССЖ) медицинской пиявки отбирали от 50 голодных особей, выращенных на биофабрике “Гирудо-Мед” (г. Люберцы), используя описанный нами метод [6]. Концентрация белка, определенная методом Лоури, составляла 0,2 мг/мл.

Липидную фракцию ССЖ получали из нативного ССЖ путем экстрагирования тремя объемами смеси: хлороформ/метанол (2:1). Хлороформенный слой отделяли, промывали смесью хлороформ/метанол/0,1 М водный NaCl (10:5:3), упаривали досуха и остаток растворяли в 1 мл хлороформа. Определяли содержание фосфолипидов, используя метод тонкослойной хроматографии, качественно в системе: хлороформ/метанол/вода (65/25/4) с использованием реактива, предложенного Диттмером [7], и количественно – методом Бартлета в модификации Светашего и Васьковского [8]. Стероиды определяли качественно методом ТСХ, используя систему: хлороформ/метанол/вода (65:25:4), проявляли реактивом Либермана (смесь концентрированной серной и ледяной уксусной кислот в равных объемах) с последующим прогреванием 15 минут при температуре 90°C.

Низкомолекулярную фракцию (НМФ) ССЖ получали разработанным нами методом [5] путем использования ультрафильтрации секрета через мембрану Spectra/Por CE (Cellulose Ester) Membrane (MWCO:500, США), пропускающую соединения с молекулярной массой менее 500 Да.

Иммунохемилюминесцентный анализ. Использовали тест системы в микропланшетном формате, разработанные фирмой IBL (“Immuno-Biological Laboratories”), Гамбург (Германия) [9], каждая из которых рассчитана на выявление определённого стероидного гормона в составе слюны человека. Содержание свободных стероидных гормонов в препаратах ССЖ медицинской пиявки определяли путём их реконструирования в образцах слюны человека, лишённых стероидов [9]. Первичными антителами служили антитела к исследуемому гормону, вторичными – кроличьи антитела к Ig мыши. Ферментный конъюгат (анализируемый стероид с пероксидазой хрена) обеспечивает высвобождение энергии после взаимодействия с хемилюминесцентным реагентом, содержащим акридан. Хемилюминесценцию измеряли на микропланшетном люминометре Berhold “IBL”.

Микрохроматомасс-спектрометрия низкомолекулярной фракции (НМФ) ССЖ. Разделение проводили на колонке Zorbax 300SB C18 (150 мм × 0,75 мм) с использованием ВЭЖХ хроматографа nano-flow-Agilent 1100 series (“Agilent”, США) при градиентной элюции ацетонитрилом от 5 до 80%, содержащим 0,1% муравьиную кислоту, при потоке 0,3 мкл/мин, в течение 60 мин. Регистрацию сигнала проводили с использованием масс-спектрометра Agilent MSD Trap SL (“Agilent”) в диапазоне масс 200-1500 Да. Полученные результаты обрабатывали с использованием программы “Data Analysis” (Bruker Daltonics, Германия). Допустимая ошибка составляет $\pm 0,2$ Да.

Микрохроматомасс-спектрометрия цельного ССЖ медицинской пиявки. Подачу пробы проводили с использованием микропотокового хроматографа Agilent 1100, снабжённого диодно-матричным детектором UV-диапазона, детекцию (MS-анализ) и фрагментацию (MS-MS-анализ) анализов проводили на масс-спектрометре Bruker 3000-plus (“Bruker-Daltonics”). Для хроматографического разделения веществ использовали колонку с обращенной фазой C18 (Zorbax 300SB C18, 150×0,75 мм (“Agilent”) по следующей методике: на колонку, предварительно уравновешенную исходным раствором (95% воды, 5% ацетонитрила и 0,1% муравьиной кислоты), наносили 1-10 мкл (1-10 мкг) анализируемого препарата ССЖ, содержащего то же самое соотношение воды, ацетонитрила и муравьиной кислоты) и проводили элюцию с использованием градиента ацетонитрила (ACN) при потоке 0,3 мкл/мин по следующей схеме: 0-2 мин (5% ACN), 2-10 мин (5-95% ACN), 10-13 мин (95-100% ACN), 13-18 мин (100-50% ACN), 18-21 мин (50-5% ACN). Регистрацию сигнала проводили на масс-спектрометре Bruker 3000-plus в диапазоне молекулярных масс от 50 Да до 600 Да. Допустимая ошибка составляет $\pm 0,2$ Да.

Микрохроматомасс-спектрометрия препаратов стероидных гормонов, гистамина и серотонина. Аналогичным образом анализировали водные растворы предварительно перекристаллизованных препаратов стероидных гормонов (кортизол, дегидроэпиандростерон, эстрадиол, прогестерон, андростендион, тестостерон), любезно предоставленных проф. Н.П. Гончаровым (руководителем лаборатории биохимической эндокринологии и гормонального анализа Эндокринологического научного центра РАМН). Параллельно анализировали также препараты серотонина (“Sigma”, США) и гистамина (“Sigma”). Полученные результаты обрабатывали с использованием программы “Data Analysis”. Допустимая ошибка составляет $\pm 0,2$ Да.

РЕЗУЛЬТАТЫ.

Качественный анализ ССЖ. Сравнительный анализ весового соотношения массы лиофильно высушенного ССЖ и высушенной жирорастворимой его фракции показал, что на долю последней приходится около 20%. В составе жирорастворимой фракции ССЖ ни качественно, ни количественно не удалось обнаружить фосфолипиды. В то же время качественная реакция на стероиды указала на их присутствие.

Иммунохемилюминесцентный анализ ССЖ. Идентифицированы свободные стероидные гормоны (кортизол, прогестерон, тестостерон, эстрадиол и дегидроэпиандростерон) в препаратах лиофилизированного ССЖ медицинской пиявки путём их реконструирования в образцах слюны человека, лишенных стероидов [9].

Микрохроматомасс-спектрометрия стандартных образцов стероидных гормонов, серотонина и гистамина. Масс-спектральные характеристики препаратов гистамина и серотонина, и гормонов, обнаруженных с помощью иммунохемилюминесцентного анализа: кортизола, эстрадиола, тестостерона, дегидроэпиандростерона, андростендиона, прогестерона приведены в таблице 1.

СТЕРОИДЫ, ГИСТАМИН, СЕРОТОНИН СЕКРЕТА ПИЯВКИ

Таблица 1. Хроматомасс-спектральная идентификация стероидных гормонов, гистамина и серотонина. Курсивом отмечены соединения, масс-спектры которых не обнаружены в составе масс-спектров ССЖ и его низкомолекулярной фракции.

№	Название пробы	Мол. масса (Да)	Время схода с колонки (мин)	Главные ионы (m/z) и их интерпретация	
				Первичный масс-спектр	Масс-спектр фрагментации
1.	<u>Кортизол</u>	362,0	10,6	<u>363.2</u> [M + H ⁺]; <u>345.2</u> [M + H ⁺ - H ₂ O]	<u>345.2</u> [M + H ⁺ - H ₂ O]; <u>327.2</u> [M + H ⁺ - 2H ₂ O]; <u>309.2</u> [M + H ⁺ - 3H ₂ O]; 291.1 [M + H ⁺ - 42H ₂ O]
2	<u>Дегидроэпи-андростерон</u>	288,42	12,5	289.3 [M + H ⁺]; <u>271.2</u> [M + H ⁺ - H ₂ O]; <u>253.2</u> [M + H ⁺ - 2H ₂ O]; 213.2	<u>253.2</u> [M + H ⁺ - 2H ₂ O]; <u>213.2</u> ; <u>197.0</u> (< 253.2)
3	<u>Эстрадиол</u>	272,38	11,9	273.1 [M + H ⁺]; <u>255.1</u> [M + H ⁺ - H ₂ O]; 159	<u>159</u> ; <u>133</u>
4	<u>Прогестерон</u>	314,46	14,0	<u>315.3</u> [M + H ⁺]	<u>297.2</u> [M + H ⁺ - H ₂ O]; <u>279.2</u> [M + H ⁺ - 2H ₂ O]; 255.1; <u>109</u> ; <u>97</u>
5	<u>Андростендион</u>	286,41	12,6	<u>287.2</u> [M + H ⁺]	<u>269.1</u> [M + H ⁺ - H ₂ O]; <u>251.1</u> [M + H ⁺ - 2H ₂ O]; 211.1; <u>109</u> ; <u>97</u>
6	<u>Тестостерон</u>	288,4	12,1	<u>289.2</u> [M + H ⁺]; 271.2 [M + H ⁺ - H ₂ O]	<u>271.2</u> [M + H ⁺ - H ₂ O]; <u>253.2</u> [M + H ⁺ - 2H ₂ O]; 211.1 ; <u>109</u> ; <u>97</u>
7	<u>Серотонин</u>	176,1	4,2	177 [M + H ⁺]; <u>160</u> [M + H ⁺ - OH]	142 [M + H ⁺ - OH - H ₂ O]; <u>132</u> ;115
8	<u>Гистамин</u>	111,1	1,7	<u>112.1</u> [M + H ⁺]; <u>95</u> [M + H ⁺ - OH]	<u>95</u> [M + H ⁺ - OH]
9	<u>Неизвестное соединение</u>		8,3	<u>163</u>	391.2 \ 472.8 \ 551.3 \ 592.8

Микрохроматомасс-спектрометрия образцов ССЖ медицинской пиявки и его низкомолекулярной фракции (НМФ). На рисунках 1 и 2 представлены фрагменты масс-спектров препарата ССЖ медицинской пиявки, по времени соответствующие сходу с колонки гистамина и серотонина, а в таблицах 2 и 3 соответствующие масс-спектральные характеристики. Рисунки 3-6 и таблицы 4-7 демонстрируют присутствие на масс-спектрограммах ССЖ и его низкомолекулярной фракции пиков, соответствующих ионам стероидных гормонов: кортизола, дегидроэпиандростерона, андростендиона и тестостерона. Не удалось, однако, обнаружить масс-спектральных пиков, соответствующих эстрадиолу и прогестерону.

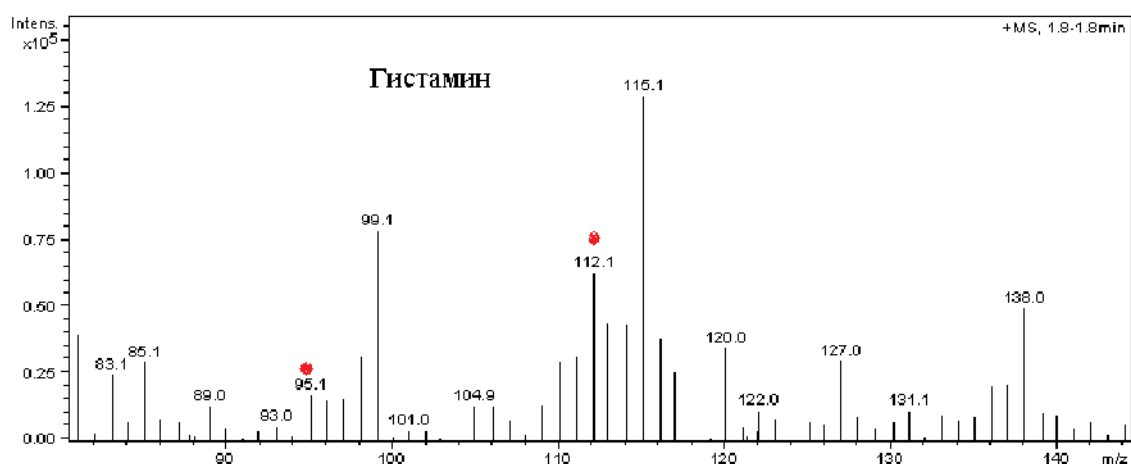


Рисунок 1.

Масс-спектр ССЖ, по времени, соответствующий сходу с колонки гистамина.

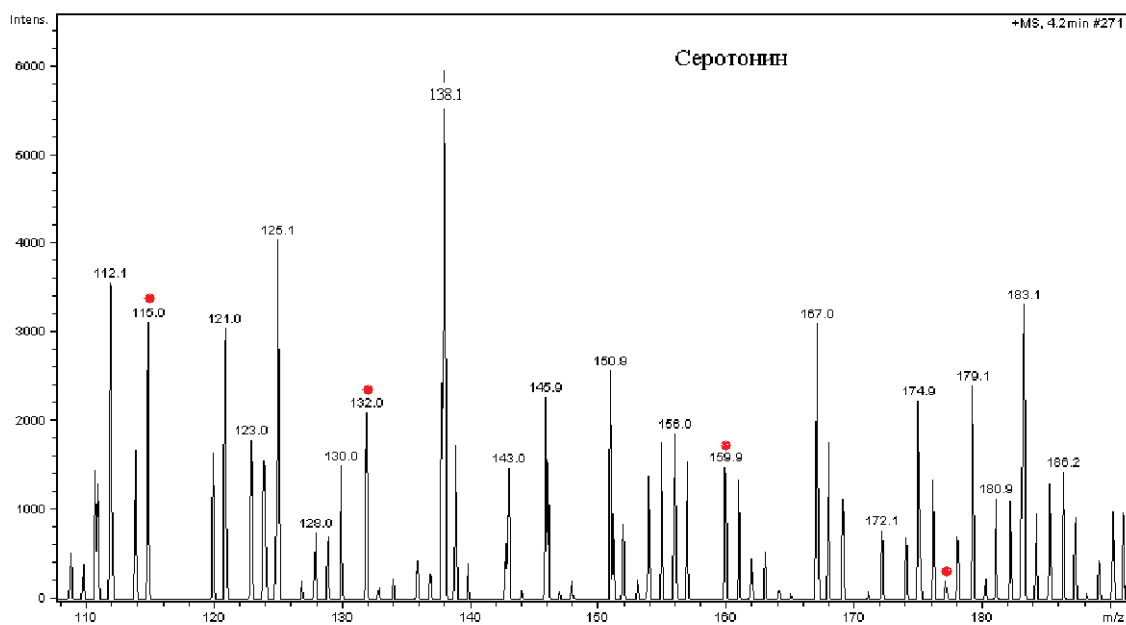


Рисунок 2.

Масс-спектр ССЖ, по времени, соответствующий сходу с колонки серотонина.

СТЕРОИДЫ, ГИСТАМИН, СЕРОТОНИН СЕКРЕТА ПИЯВКИ

Таблица 2. Хроматомасс-спектральные характеристики гистамина и ССЖ.

Название пробы	Молярная масса (Да)	Время выхода с колонки (мин)	Главные пики (m/z) и их интерпретация	
			Первичный масс-спектр	Масс-спектр фрагментации
<u>Гистамин</u>	111,1	1,7	112,1 [M+H ⁺]	95 [M+H ⁺ -OH]
<u>ССЖ</u>		1,7	112,1	95,1

Таблица 3. Хроматомасс-спектральные характеристики серотонина и ССЖ.

Название пробы	Молярная масса (Да)	Время выхода с колонки (мин)	Главные пики (m/z) и их интерпретация	
			Первичный масс-спектр	Масс-спектр фрагментации
<u>Серотонин</u>	176,1	4,2	177 [M+H ⁺], 160 [M+H ⁺ -OH]	142 [M+H ⁺ -OH-H ₂ O], 132, 115
<u>ССЖ</u>		4,2	159,9; 177	132,0; 115,0

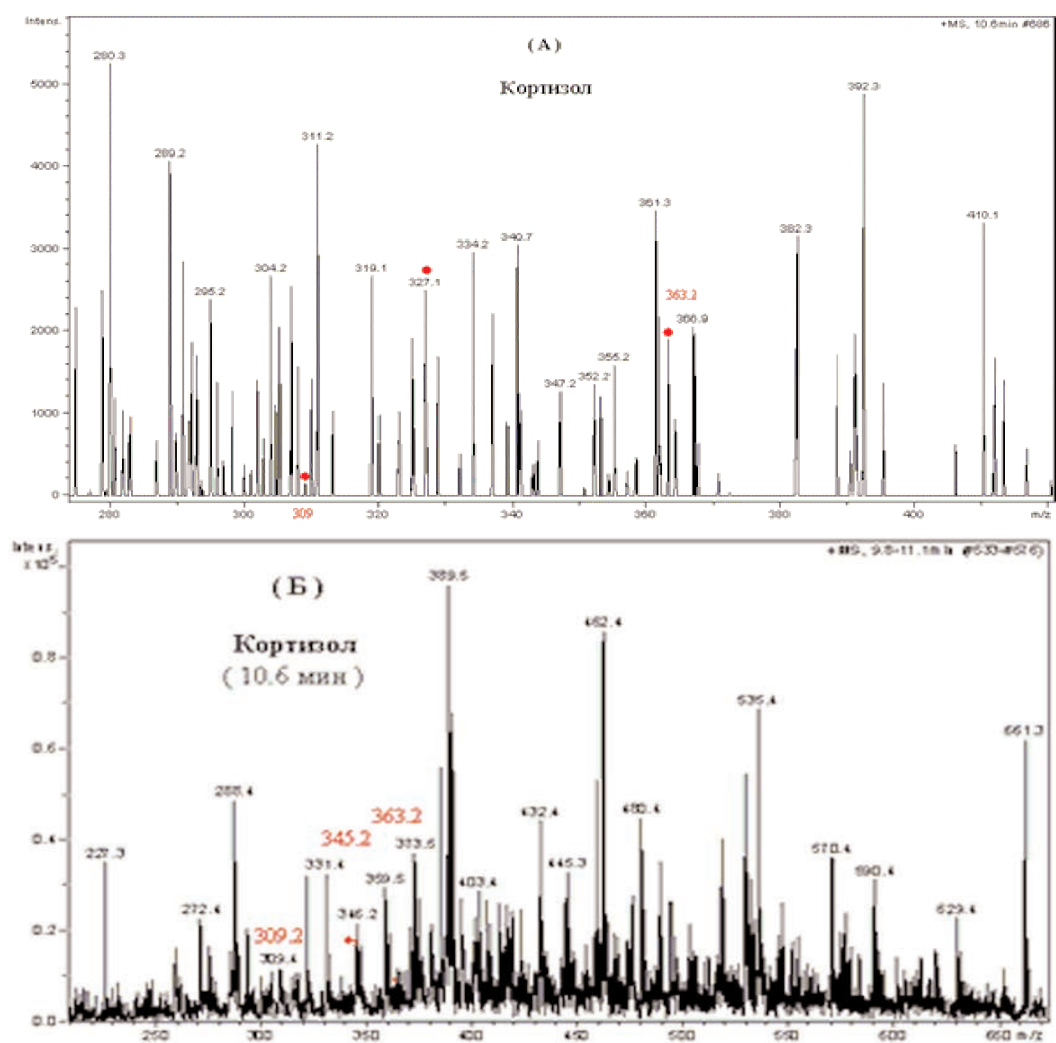


Рисунок 3.

Масс-спектры ССЖ (А) и НМФ секрета (Б), по времени, соответствующие сходу с колонки кортизола.

Таблица 4. Хроматомасс-спектральные характеристики кортизола, ССЖ и НМФ секрета.

Название пробы	Молекулярная масса (Да)	Время выхода с колонки (мин)	Главные пики (m/z) и их интерпретация	
			Первичный масс-спектр	Масс-спектр фрагментации
Кортизол	362,0	10,6	363,2 $[M+H]^+$; 345,2 $[M+H]^+ - H_2O$	345,2 $[M+H]^+ - H_2O$; 327,2 $[M+H]^+ - 2H_2O$; 309,2 $[M+H]^+ - 3H_2O$; 291,1 $[M+H]^+ - 42H_2O$
ССЖ		10,6	363,2	327,1 309,0
НМФ секрета		9,8-11,1	363,2	345,2 309,4

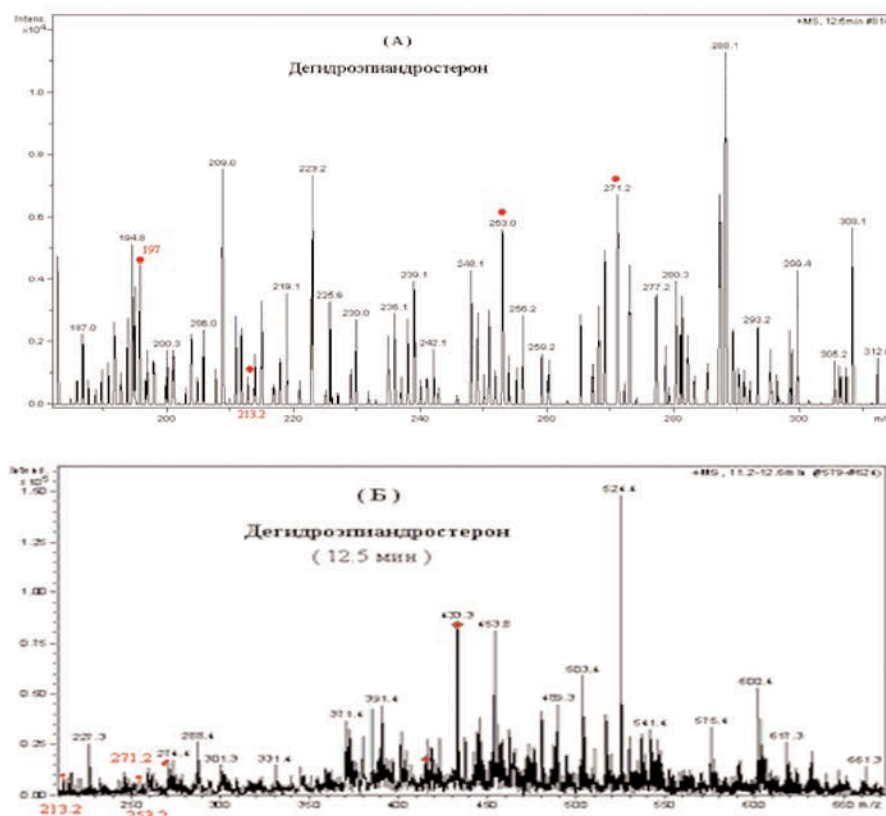


Рисунок 4.

Масс-спектры ССЖ (А) и НМФ секрета (Б), по времени соответствующие сходу с колонки дегидроэпиандростерона.

СТЕРОИДЫ, ГИСТАМИН, СЕРОТОНИН СЕКРЕТА ПИЯВКИ

Таблица 5. Хроматомасс-спектральные характеристики дигидроэпиандростерона, ССЖ и НМФ секрета.

Название пробы	Мол. масса (Да)	Время выхода с колонки (мин)	Главные пики (m/z) и их интерпретации	
			Первичный масс-спектр	Масс-спектр фрагментации
<u>Дегидроэпиандростерон</u>	288,42	12,5	<u>289.3</u> $[M+H]^+$; <u>271.2</u> $[M+H]^+ - H_2O$; <u>253.2</u> $[M+H]^+ - 2H_2O$; 213.2	<u>253.2</u> $[M+H]^+ - 2H_2O$; <u>197.0</u> (<253.2)
ССЖ		12,5	271.2; 253.0	197.0; 213.2
НМФ секрета		11,2 – 12,6	271.2; 253.2	213.2;

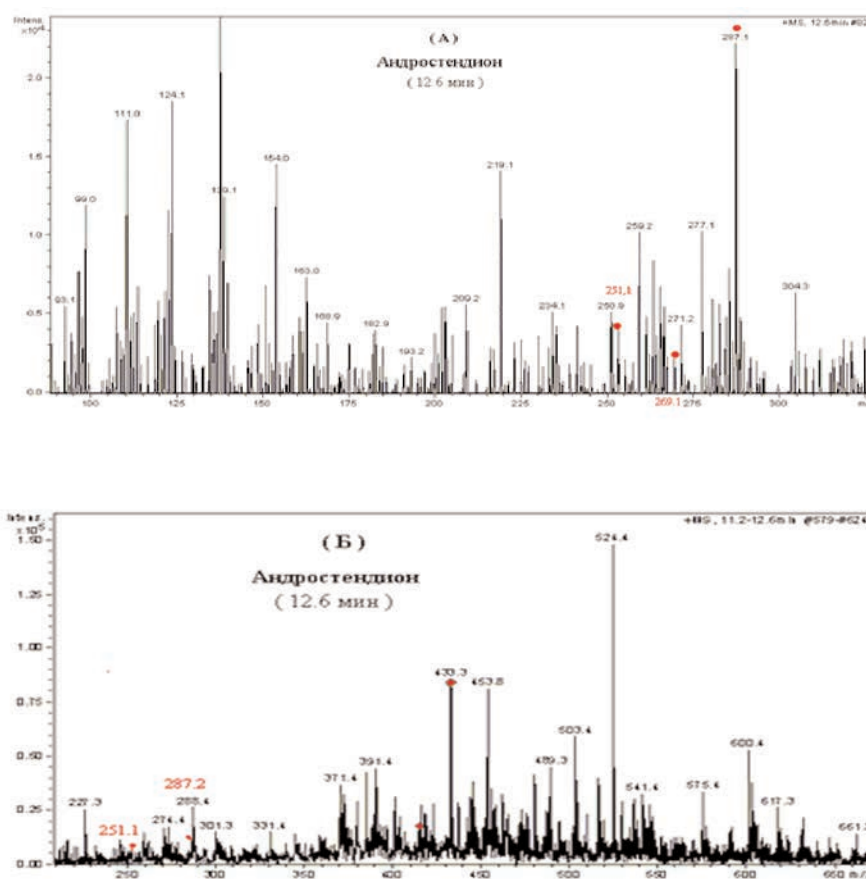


Рисунок 5.
Масс-спектры ССЖ (А) и НМФ секрета (Б), по времени соответствующие выходу с колонки андростендиона.

Таблица 6. Хроматомасс-спектральная характеристика андростендиона, ССЖ и НМФ секрета.

Название пробы	Молярная масса (Да)	Время выхода с колонки (мин)	Главные пики (m/z) и их интерпретации	
			Первичный масс-спектр	Масс-спектр фрагментации
<u>Андростендион</u>	286,41	12,6	<u>287.2</u> [M+H ⁺]	<u>269.1</u> [M+H ⁺ - H ₂ O]; <u>251.1</u> [M+H ⁺ - 2H ₂ O]; 211.1; 109; 97
ССЖ		12,6	287.1	269.1; 251.1;
НМФ секрета		11,2 – 12,6	287.2	251.1

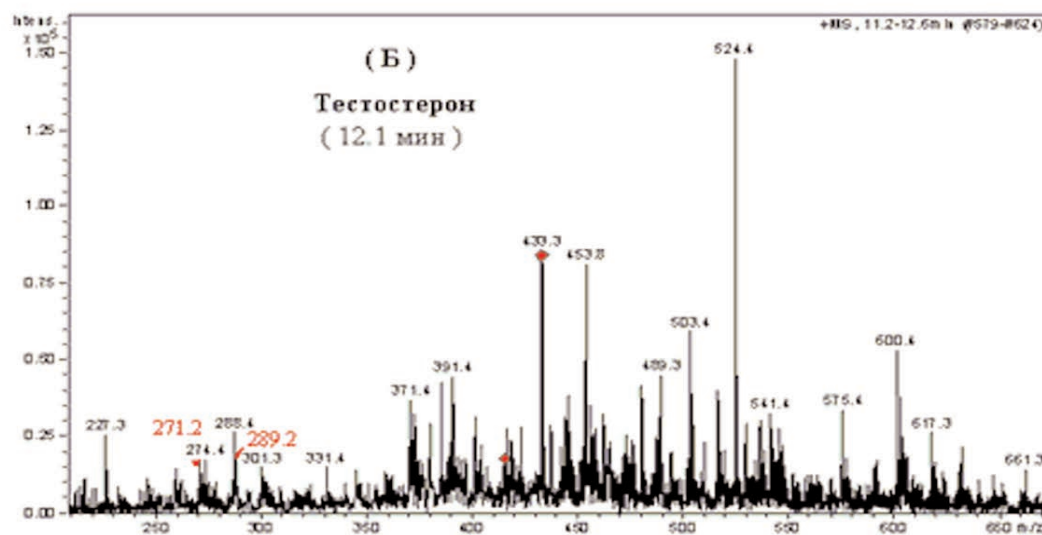
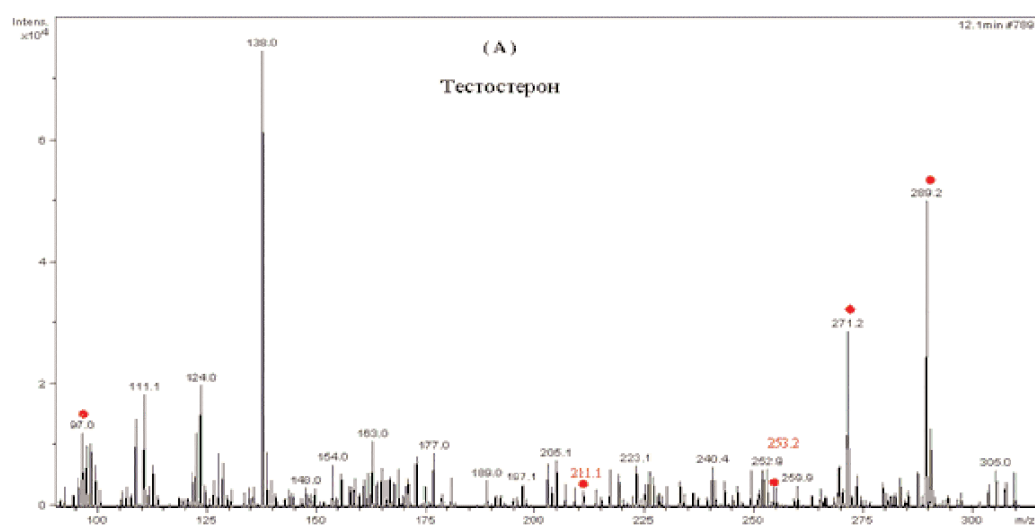


Рисунок 6.

Масс-спектры ССЖ (А) и НМФ секрета (Б), по времени соответствующие сходу с колонки тестостерона.

СТЕРОИДЫ, ГИСТАМИН, СЕРОТОНИН СЕКРЕТА ПИЯВКИ

Таблица 7. Хроматомасс-спектральные характеристики тестостерона, ССЖ и НМФ секрета.

Название пробы	Молекулярная масса (Да)	Время выхода с колонки (мин)	Главные пики (m/z) и их интерпретация	
			Первичный масс-спектр	Масс-спектр фрагментации
Тестостерон	288,4	12,1	289.2 [M+H⁺]; 271.2 [M+H⁺-H₂O]	271.2 [M+H⁺-H₂O]; 253.2 [M+H⁺-2H₂O]; 211.1; 109; 97
ССЖ		12,1	289.2;	271.2; 253.2; 97.0; 211.1
НМФ секрета		11,2-12,6	289.2;	271.2

Общая картина микрохроматомасс-спектра ССЖ медицинской пиявки. На рисунке 7 отчетливо видно положение пиков, соответствующих выходу с колонки гистамина (1,7 мин) и серотонина (4,2 мин). Особым образом выделяется пик, сходивший с колонки на 8,3 мин и соответствующий массе 162,0 Да.

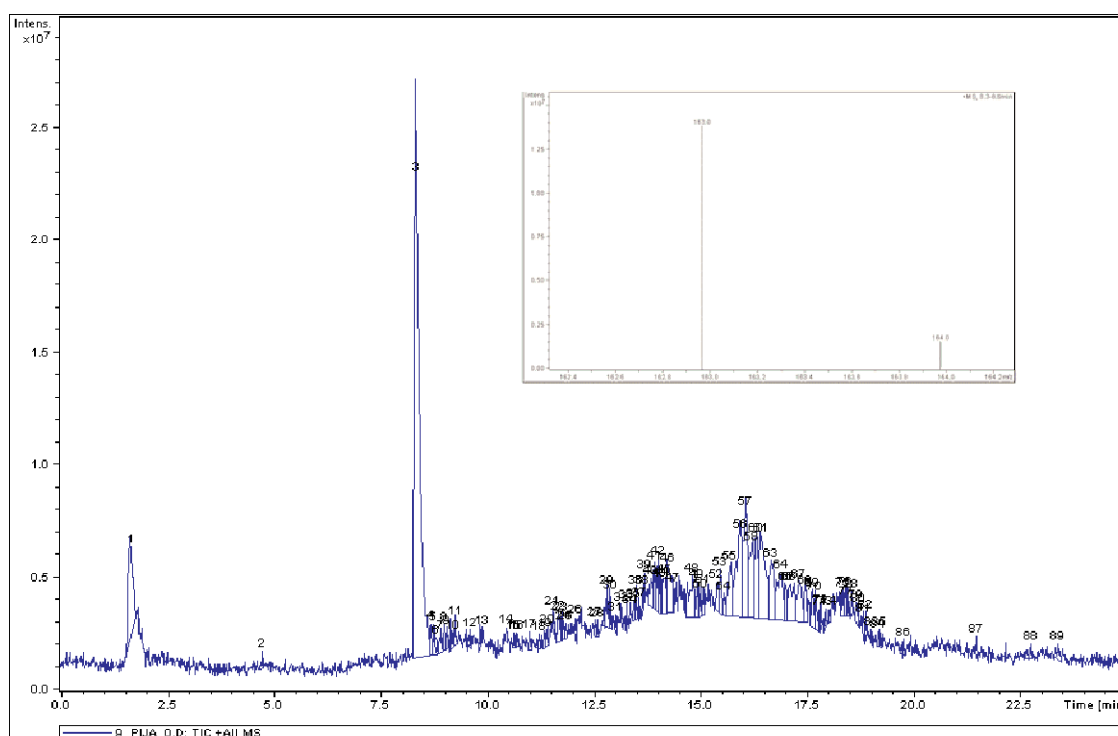


Рисунок 7.

Микрохроматомасс-спектр ССЖ медицинской пиявки. Цифрами обозначены порядковые номера пиков. Во вставке - масс-пики, которые сходят с колонки в интервале 8,3–8,6 мин.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ. Настоящее исследование является первым, посвященным анализу липидов секрета слюнных желез медицинской пиявки. Липидный профиль слюны пиявки *Hirudo medicinalis*, опубликованный в статье Rabinowitz [10] и указавший на наличие в ней нейтральных липидов, фосфолипидов и холестерина, не отражает ее истинного состояния, поскольку автор анализировал не нативный ССЖ, а “слюнную жидкость”, ссылаясь на метод её получения, описанный Rigbi и соавторами [11]. При этом способе секрет выжимают из пиявки через ротовое отверстие после его поступления в кишечный канал животного вместе с солевым раствором, имитирующим кровь теплокровных, который насасывает пиявка. Такой “секрет”, естественно, содержит не только остатки крови, которой ранее питалась пиявка, но и продукты, секретлируемые стенкой кишечного канала [6]. Такой же “секрет слюнных желез” анализировали авторы описанного выше способа его получения; в продуктах фракционирования которого они обнаружили фракцию фосфолипидной природы, которая ингибирует агрегацию тромбоцитов, стимулированную фактором активирующим тромбоциты (platelet activating factor, PAF) [12]. В настоящей работе мы использовали нативный ССЖ, выделяемый пиявкой непосредственно из её ротовой полости в солевой раствор, имитирующий кровь теплокровных [6].

Ранее Zipser и соавторы [13], выделили из экстрактов, приготовленных из цельных медицинских пиявок, стероиды и изучили их структуру. Авторы полагают, что источником обнаруженного ими холестерина и его производных в составе кровососущих пиявок является кровь теплокровных, единственный источник их питания. Таков результат их адаптации к питанию кровью теплокровных животных и человека. Мы также наблюдали связывание пиявочного секрета с высокочувствительным зондом на холестерин, cholesteryl 4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-dodecanoate (cholesterol BODIPY FL) (неопубликованные данные).

В настоящей работе впервые показано, что липиды ССЖ представлены, в основном, стероидными соединениями, в числе которых стероидные гормоны. Для их определения был использован метод иммунохемилюминесцентного анализа, позволивший идентифицировать в составе ССЖ: эстрадиол, тестостерон, дегидроэпиандростерон, прогестерон и кортизол. Для дополнительной идентификации стероидных гормонов была использована хроматомасс-спектрометрия. Этим методом тестировали стандартные образцы стероидных гормонов и идентифицировали их в пиявочном секрете (ССЖ) и в его низкомолекулярной фракции (НМФ). Путем анализа масс-спектров ССЖ и НМФ секрета во временной точке или во временном интервале (для НМФ секрета), соответствующим сходу с колонки стандартного образца определенного стероидного гормона (табл. 1), нам удалось подтвердить наличие в составе ССЖ и его НМФ кортизола, тестостерона, дегидроэпиандростерона, обнаруженных иммунохемилюминесцентным анализом, а также показать присутствие андростендиона. Однако этим методом не удалось обнаружить в секрете прогестерона и эстрадиола, выявленных с помощью иммунохемилюминесцентного анализа. Возможно, это связано с тем, что были использованы препараты ССЖ, полученные от пиявок различной сезонности или от пиявок разных видов, что стало ясным только в результате наших последних исследований. Так, используя методы протеомного анализа, мы показали, что состав ССЖ меняется в зависимости от сезонности и от вида используемых медицинских пиявок [14, 15].

Важными нейромедиаторами ССЖ являются серотонин и гистамин. Так, серотонин представляет собой важнейший регулятор пищевого поведения медицинской пиявки [16], а присутствием гистамина в составе ССЖ объясняют вазодилатацию сосудов микроциркуляции. По-видимому, он же, совместно с серотонином, обуславливает местную аллергическую реакцию вблизи ранки, нанесенной укусом медицинской пиявки. Однако, в литературе отсутствуют сведения об обнаружении серотонина и гистамина непосредственно в составе

ССЖ медицинской пиявки. Полученные нами результаты, представленные на рисунках 1 и 2, являются первым свидетельством наличия этих нейромедиаторов в составе пиявочного секрета. При хроматомасс-спектрометрии нам удалось обнаружить в составе ССЖ соединение с молекулярной массой 162 Да, сходящее с колонки на 8,3 мин (рис. 6). Высокое значение этого пика на спектрограмме ССЖ позволяет предположить, что оно является мажором в составе ССЖ и может соответствовать никотину (мол. масса 162,13 Да) или метаникотину (мол. масса 162,23 Да), которые, возможно, совместно с кининазами в составе ССЖ [17], оказывают анальгезирующий эффект при гирудотерапии патологических состояний, сопровождающихся ярко выраженным болевым синдромом [18].

Полученные результаты позволяют с принципиально новых позиций оценивать воздействие пиявочного секрета на компоненты кожной микроциркуляции, которые являются мишенью для гормонов, нейрогормонов и нейромедиаторов [5]. Насыщенный спектр низкомолекулярных соединений ССЖ свидетельствует о высоком потенциале биологически активных соединений медицинской пиявки, который проявляется и реализуется при гирудотерапии самых разных заболеваний. Для объяснения механизмов, обеспечивающих эффективность ССЖ при конкретных патологических состояниях, необходимы исследования, направленные на дальнейшую идентификацию входящих в его состав компонентов.

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований(№ 03-04-48508).

Выражаем благодарность профессору Н.П. Гончарову, руководителю лаборатории биохимической эндокринологии и гормонального анализа Эндокринологического Научного Центра РАМН за предоставление перекристаллизованных препаратов стероидных гормонов: кортизола, дегидро-эпиандростерона, эстрадиола, прогестерона, андростендиона и тестостерона.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баскова И.П., Исаханян Г.С. (2004) Гирудотерапия. Наука и практика. "Монолит", М.
2. Stone S.R., Hofsteenge J. (1986) Biochemistry, **25**, 4622-4628.
3. Rigbi M., Jackson C.M., Atamna H., Giguzin I., Goldlust A., Zeelon E., Guy R., Kook M., Levanon A., Werber M., Panet A. (1995) Thrombosis and Haemostasis, **73**, 1306.
4. Pohlig G., Fendrich G., Knecht R., Eder B., Piechottka C., Sommerhoff C., Heim J. (1996) Eur. J. Biochem., **241**, 619-626.
5. Slominski A., Wortsman J. (2000) Endocrine Reviews, **21**, 457-487.
6. Баскова И.П., Завалова Л.Л., Басанова А.В., Сасс А.В. (2001) Биохимия, **66**, 1690-1697.
7. Dittmer J.C., Lester R.L. (1964) J. Lipid Res. **5**, 126-129.
8. Svetashev V.I., Vaskovski V.E. (1972) J. Chromat. **65**, 451-455.
9. Определение гормонов в слюне. IBL Immuno-Biological Laboratories, Hamburg, Germany.
10. Rabinowitz J.L. (1996) Lipids, **31**, 887-888.
11. Rigbi M., Levey H., Iraqui F., Teitelbaum M., Orevi M., Alajoutsigarri A., Horowitz, A., Galun R. (1987) Comp. Biochem. Physiol., B. **87**, 567-573.
12. Orevi M., Rigbi M., Hy-Am E., Matzner Y., Eldor A. (1992) Prostaglandins, **43**, 483-485.

13. Zipser B., Bradford J.J., Hollingsworth R.I. (1998) *Comp. Biochem. Physiol.*, C, **120**, 269-282.
14. Баскова И.П., Завалова Л.Л., Кострюкова Е.С., Титова Г.А., Лазарев В.Н., Згода В.Г. (2007) *Биохимия*, **72**, 270-278.
15. Баскова И.П., Кострюкова Е.С., Власова М.А., Харитонов О.В., Левицкий С.А., Завалова Л.Л., Мошковский С.А., Лазарев В.Н. (2008) *Биохимия*, **73**, 388-394.
16. Lent C.M., Zundel D., Freedman E., Groome J.R. (1991) *J. Comp. Physiol. (A)*, **168**, 191-200.
17. Baskova I.P., Khalil S., Nartikova V.F., Paskhina T.S. (1992) *Thrombosis Research*, **67**, 721-730.
18. Michalsen A., Roth M. (2006) *Blutegeltherapie*, Haug Verlag, Stuttgart.

Поступила: 17. 01. 2008.

STEROIDS, HISTAMINE AND SEROTONIN CONSISTING OF MEDICINAL LEECH SALIVARY GLAND SECRETION

I.P. Baskova¹, Z. Ferner², A.S. Balkina³, S.A. Kozin⁴, O.V. Kharitonova¹, O.V. Zavalova⁵, V.G. Zgoda⁴

¹Biological Faculty, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119899, Russia;
fax: (495)939-1745; e-mail: Salival@yandex.ru

²Immuno Biological Laboratories (IBL GmbH)D-22335, Hamburg, Germany; fax: +049 40-53 28 91-11;
e-mail: DFE@IBL-Hamburg.com

³Chemical Faculty, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119899, Russia;
fax: (095) 939-54-17; e-mail: balkina@enzyme.chem.msu.ru

⁴V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Medical Academy of Sciences,
ul. Pogodinskaya, 10, Moscow 119992, Russia; fax: (495) 245-0857; e-mail: Vic@IBMH.MSK.SU

⁵M.M. Shemiakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of
Sciences, ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow 119997, Russia; fax: (495)330-6538;
e-mail: leech@humgen.siobc.ras.ru

Lipids represent 20% of the total weight of dried pool of medicinal leech salivary gland secretion (SGS) received from about 50 individual animals. There were detected steroids, but not phospholipids in SGS lipid fraction. Immunochemiluminescent analysis identified free steroid hormones in SGS: cortisol, progesterone, testosterone, estradiol and dehydroepiandrosterone. Microchromatographic-mass-spectrometric analysis of SGS and of low-molecular weight fraction (LMW) (molecular masses ranged from 220 to 850 Da) has shown the multicomponent nature of the LMW fraction. Using standart preparations as the reference steroid hormones (cortisol, dehydroepiandrosterone, androstenedione and testosterone) and histamine and serotonin have been identified in SGS.

Key words: lipids, steroid hormones, histamine, serotonin, salivary gland secretion, medicinal leech.