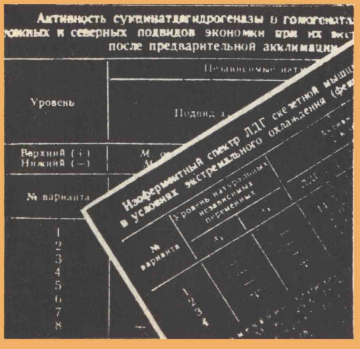
АКАДЕМИЯ НАУК СССР
УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НЕКОТОРЫХ ПРОБЛЕМ ПОПУЛЯЦИОННОЙ ЭКОЛОГИИ



СВЕРДЛОВСК, 1978

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ВЫП. 112 ТРУДЫ ИНСТИТУТА ЭКОЛОГИИ РАСТЕНИЙ И ЖИВОТНЫХ 1978

БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НЕКОТОРЫХ ПРОБЛЕМ ПОПУЛЯЦИОННОЙ ЭКОЛОГИИ

СВЕРДЛОВСК

УДК 577 : 591.5

Биохимические аспекты некоторых проблем популяционной экологии. Сб. статей. Свердловск, 1978 (УНЦ АН СССР).

Сборник посвящен изучению механизмов экзометаболической регуляции и микроэволюции на тканевом уровне. Исследования, главным образом эколого-биохимические, проведены на личинках амфибий, на серых полевках, а также на клеточных культурах. Использованы современные биохимические, биофизические и математические методы (спектрофотометрия, полярография, ионообменная хроматография, электрофорез в полиакриламидном геле, полный факторный эксперимент типа $2^к$, $2^к \cdot m$).

Сборник рассчитан на биохимиков, физиологов, экологов и специалистов, занимающихся изучением смежных биологических дисциплин.

Ответственные редакторы
Г. Г. Рункова, Н. Ф. Бабушкина

© УНЦ АН СССР, 1978. Б $\frac{21005-857}{055(02)7}$ 22—1978

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НЕКОТОРЫХ ПРОБЛЕМ
ПОПУЛЯЦИОННОЙ ЭКОЛОГИИ · 1978

Г. Г. РУНКОВА

ОБ ЭФФЕКТИВНОСТИ АКТИВНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА В ЭКОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКОМ ИССЛЕДОВАНИИ

Использование в научных исследованиях простейших методов математического планирования эксперимента имеет ряд преимуществ перед другими методами (Налимов, Чернова, 1965). Среди них для эколога-биохимика представляют интерес следующие:

1. Максимальная приближенность условий опыта к естественным, так как многофакторный эксперимент позволяет получить количественную характеристику влияния одного экологического фактора на фоне одновременного действия других.

2. Статистические свойства планов в активном эксперименте, в частности планов полного факторного эксперимента (ПФЭ) типа $2^к$ или $2^к \cdot m$, дают возможность изучить влияние каждого из факторов, включая взаимодействия, по данным всех опытов плана, в отличие от однофакторного эксперимента, где сравниваются два варианта: контроль и опыт.

Особенно остро при постановке опытов по плану ПФЭ экологами воспринимается вопрос о числе повторностей, который связан с эффективностью методов математического планирования, с возможностью изучения экологических явлений в популяциях на незначительном количестве животных.

Ошибку определения коэффициентов регрессии в активном эксперименте рассчитывают по формуле $S^2\{y\}=S^2\{b_i\}/Nn$, в однофакторном эксперименте — по формуле $S^2\{b_i\}=S^2\{y\}/2n$, где $S^2\{y\}$ — ошибка метода, N — число вариантов плана, n — число повторностей в варианте, b — коэффициент регрессии. Следовательно, при использовании одной методики определения показателя одни и те же точность и достоверность результатов в многофакторном эксперименте достигаются при значительно меньшем, чем в однофакторном, числе n, т. е. в условиях меньшего числа опытов, так как в многофакторном исследовании количество вариантов всегда больше двух. Поэтому постановка опытов по плану ПФЭ более эффективна, чем по плану хорошо известного и

давно практикуемого среди биологов и биохимиков классического однофакторного эксперимента. Эффективность активного эксперимента возрастает с увеличением числа исследуемых факторов, и чем сложнее опыт, тем больший экономический эффект даст при его постановке использование любого из планов активного эксперимента.

3. Проведение исследований по плану активного эксперимента позволяет получить ответ в виде сжатой информации, т. е. в виде конкретных уравнений, дает возможность изучить частные закономерности, связи между экологическими явлениями, которые приобретают определенное математическое выражение.

4. Активное планирование способствует более четкой организации исследования, требует ясности в постановке задачи и после соответствующего выбора плана и получения четкого ответа на поставленный вопрос позволяет целенаправленно менять тактику эксперимента, предполагает определенную стратегию в каждом исследовании.

Перечисленные преимущества активного эксперимента обосновываются специалистами в области математической теории эксперимента (Налимов, Чернова, 1965, и др.) и успешно используются в настоящее время в области неорганической и органической химии (Бородюк, Чирков, 1963; Грановский и др., 1963; Бояринов, Кафаров, 1970; Бекметова и др., 1973; Бишимбаев и др., 1973; Шестопалов и др., 1973), в микробиологических исследованиях (Куплетская и др., 1969; Максимов, Федоров, 1969; Голозубова и др., 1970), в популяционной экологии (Белоусова, 1970; Федоров, 1970; Карауш, Максимов, 1971; Федоров, Карауш, 1974).

В биохимии, молекулярной и медицинской биологии, биохимической экологии методы математического планирования эксперимента начали применять относительно недавно (Дедухова, Мохова, 1971; Барский и др., 1974; Васадзе и др., 1974; Лисенков, 1974; Рункова, 1974, 1975; Шварц и др., 1976).

Необходимость участия в решении ряда экологических проблем специалистов из смежных областей биологии — физиологов, биохимиков, биофизиков, молекулярных биологов и т. д.— на современном этапе бесспорна. Проникновение в сущность экологических явлений на новых уровнях биологической интеграции требует всестороннего, количественного подхода, т. е. одновременного использования при решении одной экологической проблемы физиологических, биохимических, биофизических и других методов.

Известно, что перечисленные методы основаны на использовании сложной аппаратуры и требуют особых, чисто лабораторных условий исследования (выделения нативных препаратов типа митохондрий, рибосом или активных биокомплексов, использования холодильных установок и т. д.).

Трудность разведения диких животных в виварных условиях

ограничивает возможности биохимического и биофизического экспериментирования на большом числе биологических объектов. Наконец, вопрос о минимальном количестве экспериментального материала при характеристике популяции по ее отдельным особям является спорным. Вероятно, экспериментальные животные должны составлять определенный процент от числа особей в природной популяции. Но проблема установления численности животных в естественных условиях тоже недостаточно решена.

При изучении модельной популяции, например лабораторной колонии, исследуют 10 или 20 особей в варианте, как принято в классическом однофакторном эксперименте. При этом получают характеристику животных, которые составляют 20—40% колонии, или модельной популяции. В этом случае возможность ошибки при перенесении данных, полученных в опыте, на всю модельную популяцию минимальна. Но какова численность популяции этого вида в естественных условиях? Исследуя то же, стандартное для биохимиков, количество животных из природной популяции, экспериментатор не знает, можно ли использовать полученные им выводы для характеристики всей популяции, которая насчитывает не десятки, а сотни, тысячи животных (20 исследованных им особей составляют в действительности не 40, а 4 и менее процента от общего числа индивидуумов данной популяции).

Экспериментальное получение характеристики популяции на основе обследования максимального числа особей, составляющих популяцию,— одна из многих задач современной популяционной экологии. Большой интерес представляет изучение отдельного организма в зависимости от тех специфических особенностей, которые связаны с его обязательным обитанием в экосистеме и, в первую очередь, в популяции.

Каждая популяция характеризуется параметрами, определяющими ее поведение, реакцию на любое экологическое воздействие. В связи с этим одна из центральных задач зарождающейся биохимической экологии, вероятно, состоит в изучении отдельного организма, его метаболизма, реакции на воздействие некоторых экологических факторов в зависимости от плотности популяции, ее возрастной и генетической структуры с учетом индивидуальных особенностей данного организма, его возраста, пола, степени развития и т. д.

Поиск видов, внутривидовых форм, генетических вариантов непосредственно в природе для решения вопроса о частоте встречаемости отдельных генотипов в пределах одной популяции требует от биолога-систематика обследования максимального количества особей непосредственно в местах их обитания. Однако исследование биохимической адаптации отдельных видов, внутривидовых форм, генетических вариантов в зависимости от популяционных параметров, по-видимому, возможно на ограни-

ченном числе животных. Вероятно, при комплексном исследовании, включающем и морфофизиологию, имеет значение выявление взаимосвязей между метаболизмом отдельного животного и особенностями его экологического окружения, что может быть использовано для прогнозирования численности, возрастной и генетической структуры популяции.

Вопрос о специфике дыхания и окислительного фосфорилирования головастика в процессе развития в условиях разной плотности изучался нами в сериях опытов, поставленных по планам однофакторного[1] и многофакторного эксперимента. Цель настоящей работы — выявить тождественность выводов однофакторного и многофакторного экспериментов, один из которых поставлен на большом количестве животных, другой — на малом. Отсюда экспериментальное решение вопроса о возможности в частных случаях экологического исследования перенесения выводов, полученных при изучении ограниченного числа представителей популяции, если не на всю популяцию, то по крайней мере на ее большую часть.

Материал и методика

Нами исследовалась свердловская популяция головастиков *Rana arvalis* (кладка привезена из района оз. Шарташ). Модельные популяции с нормальной (один головастик в 1 *л*) и повышенной (10 головастиков в 1 *л*) плотностью сформированы в апреле. Использовались личинки 25, 26, 27 и 28-й стадий развития (по Терентьеву). Головастики каждой стадии изучались на первый, второй или третий день, после появления характерных для каждой стадии морфологических признаков. Общее потребление кислорода и окислительное фосфорилирование определялось полярографическим методом на интактных головастиках. В качестве инкубационной среды в полярографической ячейке использовалась водная среда из популяции, в которой развивалась личинка (из «загущенной» и «незагущенной»). Об интенсивности окислительного фосфорилирования делали заключение по амиталчувствительному дыханию, определяя скорость потребления кислорода в присутствии амитала и без него (см. статью Л. А. Ковальчук, А. П. Ястребова в наст. сборнике). Поставлено пять серий опытов: 1, 2 и 3-я серии — по плану ПФЭ 2^2 на 48 головастиках, 4 и 5-я серии — как однофакторные эксперименты на 96 и 168 головастиках соответственно. Статистический анализ результатов проводился в соответствии с характером планов. (Урбах, 1963; Максимов, Федоров, 1969).

---

[1] Результаты однофакторных экспериментов получены сотрудницей нашей лаборатории Л. А. Ковальчук (1976).

Таблица 1

Динамика потребления кислорода и амиталчувствительного дыхания у головастиков *R. arvalis* в зависимости от плотности популяции и стадии развития личинки

Уровень			Плотность популяции $\tilde{x}_1$								Стадия развития личинки $\tilde{x}_2$								Плотность популяции $\tilde{x}_1$								Стадия развития личинки $\tilde{x}_2$							
Верхний (+)			20 головастиков в 20 л воды								25-я								20 головастиков в 20 л воды								26-я							
Нижний (—)			200 головастиков в 20 л воды								26-я								200 головастиков в 20 л воды								27-я							
№ варианта	Кодированные независимые переменные		Биохимический показатель																													
	x_1	x_2	y_1	y_2	y_3	y_4	y_5	y_6	$\bar{y}$	$\hat{y}$	y_1	y_2	y_3	y_4	y_5	y_6	$\bar{y}$	$\hat{y}$	y_1	y_2	y_3	y_4	y_5	y_6	$\bar{y}$	$\hat{y}$	y_1	y_2	y_3	y_4	y_5	y_6	$\bar{y}$	$\hat{y}$
Потребление кислорода, *мг/г·ч*																																
			Первая серия								*Вторая серия*								*Третья серия*													
1	—	—	0,30	0,40	0,30	0,30	0,24	0,23	0,30	—	0,24	0,43	0,25	0,31	0,26	0,21	0,28	—	0,14	0,50	0,32	0,33	0,35	0,23	0,31	0,29								
2	+	—	0,10	0,10	0,10	0,19	0,24	0,18	0,15	—	0,12	0,11	0,03	0,06	0,04	0,06	0,07	—	0,06	0,05	0,03	0,06	0,06	0,09	0,06	0,06								
3	—	+	0,30	0,30	0,30	0,36	0,26	0,48	0,33	—	0,30	0,40	0,30	0,30	0,24	0,23	0,30	—	0,24	0,43	0,25	0,31	0,26	0,21	0,28	0,29								
4	+	+	0,30	0,20	0,30	0,20	0,30	0,20	0,25	—	0,10	0,10	0,10	0,19	0,24	0,18	0,15	—	0,12	0,11	0,03	0,06	0,04	0,06	0,07	0,06								
Амиталчувствительное дыхание, % к исходному																																
1	—	—	5,0	56	50	20	33	5,0	28,1	28,7	42	33	44	25	20	20	30,6	30,6	43	20	34	58	20	40	35,8	34,9								
2	+	—	23	75	50	59	62	64	63,8	64,3	75	20	20	20	20	20	29,1	29,1	78	60	20	50	37	20	44,1	34,9								
3	—	+	75	50	30	20	71	56	50,3	49,7	5,0	56	50	20	33	5,0	28,1	28,1	42	33	44	25	20	20	30,6	34,9								
4	+	+	58	50	39	31	39	46	43,8	43,3	73	75	50	59	62	64	63,8	63,8	75	20	20	20	20	20	29,1	34,9								

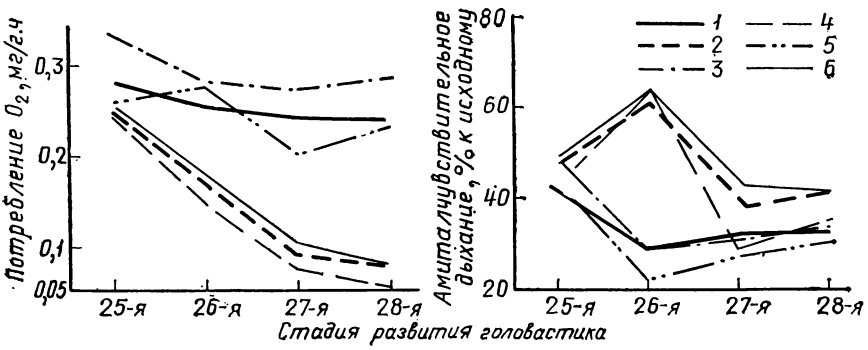
Примечание: Статистические показатели: $b_0=0{,}26$; $b_1=0{,}06$; $b_2=0{,}032$; $b_{12}=0{,}018$; $S^2\{y\}=0{,}0034$; $tS\{b_i\}=0{,}025$; $y=0{,}26-0{,}06x_1+0{,}035x_2+0{,}018x_1x_2$ (потребление кислорода, первая серия); $b_0=46{,}5$; $b_1=7{,}3$; $b_2=5{,}5$; $b_{12}=-10{,}5$; $S^2\{y\}=284{,}9$; $tS\{b_i\}=7{,}18$; $y=46{,}5+7{,}3x_1-10{,}5x_1x_2$; $S^2_{ад}=1{,}22<FS^2\{\bar{y}\}=209$ (амиталчувствительное дыхание, первая серия); $b_0=0{,}20$; $b_1=-0{,}09$; $b_2=0{,}025$; $b_{12}=0{,}015$; $S^2\{y\}=0{,}0035$; $tS\{b_i\}=0{,}025$; $y=0{,}20-0{,}09x_1+0{,}025x_2+0{,}015x_1x_2$ (потребление кислорода, вторая серия); $b_0=37{,}9$; $b_1=8{,}05$; $b_{12}=9{,}3$; $S^2\{y\}=121{,}8$; $tS\{b_i\}=4{,}7$; $y=37{,}9+8{,}55x_1+8{,}05x_2+9{,}3x_1x_2$ (амиталчувствительное дыхание, вторая серия); $b_0=0{,}18$; $b_1=-0{,}115$; $b_2=-0{,}005$; $b_{12}=-0{,}01$; $S^2\{y\}=0{,}005$; $tS\{b_i\}=0{,}03$; $y=0{,}18-0{,}115x_1$; $S^2_{ад}=0{,}0003<FS^2\{\bar{y}\}=0{,}003$ (потребление кислорода, третья серия); $b_0=34{,}9$; $b_1=1{,}7$; $b_2=-5{,}0$; $b_{12}=-2{,}4$; $S^2\{y\}=340{,}2$; $tS\{b_i\}=7{,}87$ (амиталчувствительное дыхание, третья серия).

Результаты и их обсуждение

Матрица, результаты и данные регрессионного анализа опытов, поставленных по плану ПФЭ 2^2, приведены в табл. 1, результаты однофактных экспериментов и данные статистического анализа — в табл. 2. Конечные результаты в виде средних (y) и расчетных (y), полученных из соответствующих уравнений, представлены на рисунке.

В первых трех сериях опыта определяли общее потребление кислорода и амиталчувствительное дыхание у головастиков из нормальных и «загущенных» популяций (x_1) в зависимости от их стадий развития (x_2). В каждом из вариантов плана использовали шесть личинок. Из 12 вариантов (см. табл. 1) четыре можно было исключить (3-й и 4-й во второй серии выполнялись как 1-й и 2-й в первой; 3-й и 4-й в третьей серии выполнялись как 1-й и 2-й во второй). В связи с этим поставленная задача по выявлению степени влияния плотности и стадий развития головастиков на их энергетический обмен решалась в первых сериях на 48 животных. В однофакторных экспериментах (см. табл. 2) в четвертой серии в каждом варианте исследовалось по 12 личинок, в пятой — в среднем по 22. Общее количество животных в четвертой серии составляло 96, в пятой — 168.

В двухфакторных и однофакторных экспериментах влияние плотности и стадии развития на дыхание и окислительное фосфорилирование головастиков изучалось в условиях одинаковой достоверности и точности[2] ($S^2\{b_i\}$ в трех первых сериях составляло величину $S^2\{y\}/4\cdot 6$; $S^2\{b_i\}$ в однофакторных экспериментах — $S^2\{y\}/2\cdot 12$ при 5-процентном уровне значимости в обеих



Дыхание и окислительное фосфорилирование головастиков R. arvalis на различных стадиях их развития в нормальных (*2, 4, 6*) и «загущенных» (*1, 3, 5*) популяциях.

1, 2 — однофакторный эксперимент, 96 головастиков; *3, 4* — то же, 168 головастиков; *5, 6* — двухфакторный эксперимент, 48 головастиков.

---

[2] В пятой серии $S^2\{b_i\} = S^2\{y\}/2\cdot 22$.

Таблица 2

Динамика потребления кислорода и окислительного фосфорилирования у головастиков *R. arvalis* из популяций с разной плотностью на разных стадиях развития при однофакторном эксперименте

Характеристика популяции	Стадия развития			
	25-я $\bar{y} \pm m$	26-я $\bar{y} \pm m$	27-я $\bar{y} \pm m$	28-я $\bar{y} \pm m$
	Потребление кислорода, *мг/г·ч*			
I	12	12	12	12
II	0,25±0001 (1)**	0,17±0,02 (2)	0,09±0,01 (3)	0,08±0,01 (4)
III	0,28±0,02 (5)	0,26±0,02 (6)	0,25±0,03 (7)	0,24±0,03 (8)
I	19	20	19	13
II	0,25±0,01 (9)	0,18±0,01 (10)	0,11±0,01 (11)	0,08±0,01 (12)
I	23	23	23	23
III	0,26±0,01 (13)	0,28±0,02 (14)	0,20±0,02 (15)	0,23±0,02 (16)
	Амиталчувствительное дыхание, % к исходному			
I	12	12	12	12
II	48±3,0 (17)	62±2,3 (18)	39±6,4 (19)	40±6,1 (20)
III	41±5,9 (21)	28±5,4 (22)	32±4,4 (23)	34±3,8 (24)
I	18	13	19	13
II	46±1,9 (25)	62±2,1 (26)	43±5,1 (27)	41±2,0 (28)
I	23	23	23	23
II	44±4,0 (29)	23±3,4 (30)	28±3,0 (31)	30±3,3 (32)

Примечания: 1. Статистические показатели: $t_{1,5}=1,33$; $t_{2,6}=3,2$; $t_{3,7}=5,0$; $t_{4,8}=5,0$; $t_{1,2}=3,64$; $t_{2,3}=4,0$; $t_{3,4}=0,21$; $t_{5,6}=0,67$; $t_{6,7}=0,27$; $t_{7,8}=0,22$; $t_{9,13}=0,77$; $t_{10,14}=4,46$; $t_{11,15}=4,01$; $t_{12,16}=6,7$; $t_{9,10}=4,12$; $t_{10,11}=3,5$; $t_{11,12}=2,12$; $t_{13,14}=0,89$; $t_{14,15}=2,9$; $t_{15,16}=1,06$; $t_{17,21}=1,0$; $t_{18,22}=5,7$; $t_{19,23}=0,9$; $t_{20,24}=0,83$; $t_{17,18}=3,7$; $t_{18,19}=2,8$; $t_{19,20}=0,1$; $t_{21,22}=1,6$; $t_{22,23}=0,5$; $t_{23,24}=0,3$; $t_{25,29}=0,45$; $t_{26,30}=9,7$; $t_{27,31}=2,5$; $t_{28,32}=2,8$; $t_{25,26}=5,50$; $t_{26,27}=2,47$; $t_{27,28}=0,78$; $t_{29,30}=4,12$; $t_{30,31}=1,10$; $t_{31,32}=0,45$; $t_{0,95\,(22)}=2,07$; $t_{0,95\,(42)}=2,02$.

2. I — число повторностей; II — 20 головастиков в 20 *л* воды; III — 200 головастиков в 20 *л* воды; в скобках — номер варианта.

случаях). В результате регрессионного анализа данных, полученных в первых трех сериях на 48 личинках, составлены уравнения:

для общего потребления кислорода:

$y=0,26-0,06x_1+0,035x_2+0,018x_1x_2$; $tS\{b_i\}=0,02$ (25-я и 26-я стадии развития);

$y=0,20-0,09x_1+0,025x_2+0,015x_1x_2$; $tS\{b_i\}=0,02$ (26-я и 27-я стадии развития);

$y=0,18-0,115x_1$; $tS\{b_i\}=0,03$ (27-я и 28-я стадии развития);

для амиталчувствительного дыхания:

$y=46,5+7,3x_1-10,5x_1x_2$; $tS\{b_i\}=7,18$ (25-я и 26-я стадии развития);

$y=37,9+8,55x_1+8,05x_2+9,3x_1x_2$; $tS\{b_i\}=4,7$ (26-я и 27-я стадии развития).

Достоверных изменений в уровне амиталчувствительного дыха-

ния головастиков в третьей серии не обнаружено. Анализ уравнений показывает, что при постановке опытов на малом числе животных (48) уже отчетливо выявились достоверные различия в общем потреблении кислорода и окислительном фосфорилировании у головастиков из нормальных и «загущенных» популяций (в первых трех сериях $b_1 > tS\{b_i\}$). Обнаруживаются достоверные изменения и при переходе личинок от одной стадии к другой ($b_2 > tS\{b_i\}$). Значимость коэффициентов регрессии по взаимодействиям указывает, что не на всех исследованных стадиях развития наблюдаются различия между личинкой из «незагущенных» и «загущенных» популяций ($b_{12} > tS\{b_i\}$). Изменения в обмене от стадии к стадии также определяются и характером стадии, и плотностью популяций ($b_{12} > tS\{b_i\}$).

Уровень общего потребления кислорода у исследованных головастиков *R. arvalis* в популяциях с нормальной плотностью ниже, а уровень фосфорилирующего окисления выше в сравнении с «загущенными» популяциями (см. рисунок). В то же время на 25-й стадии развития личинки из популяций с разной плотностью не различаются по скорости потребления кислорода. Уровни окислительного фосфорилирования личинок 25, 27 и 28-й стадий развития близки. Изменения в дыхании головастиков по стадиям ярче выражены в популяциях с нормальной плотностью.

Фосфорилирующее окисление личинок на 25, 26 и 27-й стадиях развития более отчетливо изменяется в условиях нормальной плотности.

Из данных однофакторных экспериментов, где исследовалось больше животных (четвертая и пятая серии), сделаны те же выводы. Различия между «загущенными» и «незагущенными» популяциями достоверны для общего потребления кислорода на всех изученных стадиях, кроме 25-й ($t_{2,6}$, $t_{3,7}$, $t_{4,8}$, $t_{10,14}$, $t_{11,15}$, $t_{12,16} > 2{,}09$). Изменения в общем потреблении кислорода и амиталчувствительном дыхании при переходе от одной исследуемой стадии к последующей (за исключением 27-й и 28-й стадий) у головастиков из нормальной популяции достоверны ($t_{1,2}$, $t_{2,3}$, $t_{9,10}$, $t_{10,11}$, $t_{17,18}$, $t_{18,19}$, $t_{25,26}$ и $t_{26,27} > 2{,}09$). Изменения тех же показателей у головастиков из «загущенной» популяции на тех же стадиях развития по данным однофакторных экспериментов недостоверны ($t_{5,6}$, $t_{6,7}$, $t_{7,8}$, $t_{13,14}$, $t_{15,16}$, $t_{21,22}$, $t_{22,23}$, $t_{23,24}$, $t_{30,31}$ и $t_{31,32} < 2{,}09$).

Таким образом, постановка опытов на ограниченном числе животных (48 головастиков) и на относительно большом количестве особей (96 и 168 головастиков) привела к обнаружению одной и той же зависимости.

Специфика развития головастиков *R. arvalis* в условиях разной плотности определяется не только интенсивностью общего потребления кислорода, но и характером его распределения между двумя типами окисления: свободным и фосфорилирую-

щим. В период, предшествующий активному метаморфозу, в условиях высокой плотности головастики *R. arvalis* имеют более высокий уровень общего потребления кислорода, чем у нормальных популяций и расходуют его в большей степени на свободное окисление (в среднем 70%).

Головастики *R. arvalis* в условиях нормальной плотности в тот же период развития (за исключением 27-й и 28-й стадий) на свободное и фосфорилирующее окисление тратят равное количество кислорода или больше потребляют его для нужд фосфорилирующего окисления (в среднем 50 или 60% — фосфорилирующее и 50 или 40% — свободное).

Из тождественности выводов по результатам, полученным нами в двухфакторных и однофакторных экспериментах в дополнение к нашему обобщению (Рункова, 1975), мы можем заключить, что исследования в области биохимической экологии лучше проводить на основе математической теории эксперимента.

Решение экологических задач биохимику, по-видимому, следует начинать на ограниченном количестве животных, подобрав план, обеспечивающий достаточно высокую точность и достоверность результатов. Если зависимости выявляются отчетливо, то нет необходимости продолжать опыты. Выводы, сделанные на основе регрессионного анализа данных многофакторного эксперимента, в зависимости от заданной точности и достоверности, могут быть перенесены на значительно бо́льшую выборку, чем та, которая исследовалась непосредственно в эксперименте. Использование ПФЭ типа 2^2, как показывают данные настоящей работы, в условиях точности, меньшей ошибки полярографического метода в 24 раза, и вероятности 95% позволяет перенести выводы, полученные при изучении 48 особей, на выборку популяции, составляющую 96—160 животных.

ЛИТЕРАТУРА

Барский В. Д., Оранский И. Е., Рудакова А. А. Математическая теория эксперимента в задачах оптимизации бальнеотерапевтического воздействия.— Биологическая и медицинская кибернетика, ч. 5. М., 1974.

Бекметова Н. Х., Торочетников Н. С., Ким Лин Зу. Исследования водной промывки фосфоритов Каратау от глин и суглинков.— Технология неорганических веществ, процессы и аппараты, кибернетика химических процессов. М., «Химия», 1973.

Белоусова А. А. Исследования способности зеленой серобактерии к фотогетеротрофному росту. Автореф. канд. дисс. М., 1970 (МГУ).

Бишимбаев В. К., Токин И. Н., Кузнецова А. Г., Ахнизарова С. Л. Исследование процесса окисления сульфита калия в сульфат в реакторе с мешалкой.— Технология неорганических веществ, процессы и аппараты, кибернетика химических процессов. М., «Химия», 1973.

Бородюк В. П., Чирков И. М. Получение математического описания методами пассивного и активного экспериментов.— Труды МЭИ, 1963, вып. 51.

Бояринов А. И., Кафаров В. В. Методы оптимизации в химической технологии. М., «Химия», 1970.

Васадзе Т. Ш., Хатиашвили В. Г., Чилая С. М. Планирование экспериментов и обобщенный критерий в задаче поиска оптимальных режимов консервации сердца комбинированным методом нормотермической перфузии и бесперфузионной гипотермии.— Биологическая и медицинская кибернетика, ч. 5. М., 1974.

Голозубова Г. А., Воробьева Л. И., Максимов В. Н. Оптимизация среды для получения витамина B_{12} пропионовокислыми бактериями методом математического планирования.—Прикладная биохимия и микробиология, 1970, т. 6, вып. 4, № 6.

Грановский Ю. В., Никишева В. В., Адлер Ю. П., Налимов В. В., Комиссарова Л. И. Отсеивающие эксперименты при изучении экстракции циркония трибутилфосфатом.— Завод. лабор., 1963, т. 29, № 3.

Дедухова В. И., Мохова Е. И. Выбор условий полярографической регистрации дыхания гомогената мозга.— Биол. науки, 1971, № 4.

Карауш Г. А., Максимов В. И. Изучение активности смешанных культур водорослей с помощью симплексно-решетчатых планов.— Биол. науки, 1971, № 8.

Ковальчук Л. А. Интенсивность дыхания и окислительное фосфорилирование в онтогенезе бесхвостых амфибий. Свердловск, 1976.

Ковальчук Л. А., Рункова Г. Г. О влиянии метаболитов личинок некоторых видов земноводных на эндогенный метаболизм отдельных особей в популяции и их чувствительность к кислородному голоданию.— Тезисы докладов Уральской конференции молодых ученых «Человек и биосфера». Свердловск, 1973.

Куплетская М. Б., Максимов В. И., Касаткина Т. Б. Подбор среды для биосинтеза грамицидина с помощью метода крутого восхождения.— Прикладная биохимия и микробиология, 1969, т. 5, вып. 5, № 5.

Лисенков А. Н. Применение методов планирования эксперимента при исследовании медико-биологических объектов с дрейфом. — Биологическая и медицинская кибернетика, ч. 5. Прикладные вопросы биологической и медицинской кибернетики. М.— Л., 1974.

Максимов В. И., Федоров В. Д. Применение методов математического планирования эксперимента при отыскании оптимальных условий культивирования микроорганизмов. М., Изд-во МГУ, 1969.

Рункова Г. Г. О влиянии метаболитов земноводных разной степени генетической близости на эндогенный метаболизм головастиков *R. arvalis* в зависимости от стадии их развития и концентрации метаболитов.— Информационные материалы Ин-та экологии растений и животных УНЦ АН СССР. Свердловск, 1974.

Рункова Г. Г. Опыт применения некоторых методов математического планирования эксперимента в эколого-биохимических исследованиях.— Математическое планирование эксперимента в биологических исследованиях. Труды Ин-та экологии растений и животных УНЦ АН СССР, 1975, вып. 97.

Федоров В. Д. Экспериментально-экологическое изучение структуры и функции фитопланктона как сообщества. Автореф. докт. дисс. М., 1970.

Федоров В. Д., Карауш Г. А. Исследование физиологической активности моно- и смешанных культур некоторых сине-зеленых водорослей.— Актуальные проблемы биологии сине-зеленых водорослей. М., 1974.

Шварц С. С., Пястолова О. А., Добринская Л. А., Рункова Г. Г. Эффект группы в популяциях водных животных и химическая экология. М., «Наука», 1976.

Шестопалов В. В., Кафаров В. В., Регент Ж. Н., Гусев В. И., Кузьминский Л. К. Анализ процесса ректификации многокомпонентной смеси на примере выделения изопропилбензола.— Технология неорганических веществ, процессы и аппараты, кибернетика химических процессов. М., 1973.

Урбах В. Ю. Математическая статистика для биологов и медиков. М., Изд-во АН СССР, 1963.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НЕКОТОРЫХ ПРОБЛЕМ
ПОПУЛЯЦИОННОЙ ЭКОЛОГИИ · 1978

Г. Г. РУНКОВА, З. Л. СТЕПАНОВА

О ЗАВИСИМОСТИ РЕГУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ ОТ ВОЗРАСТНОЙ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИИ

Изучая процесс влияния водной среды головастиков на их обмен и развитие, мы неоднократно обнаруживали, что принадлежность личинки к определенному классу и стадии развития (по Терентьеву) не гарантирует абсолютной повторяемости результатов. Разница во влиянии водной среды на метаболизм головастиков в зависимости от степени генетического родства его с донором и стадии развития, как правило, обнаруживается четко, но направленность этого влияния явно варьирует (Рункова, 1974; Рункова, Рудакова, 1974; Рункова и др., 1974а, б; Рункова, Ковальчук, 1975; Шварц и др., 1976, и др.).

Важно отметить, что не только направленность действия водной среды на обмен личинки в отдельные периоды развития разная, но и аминокислотный состав белково-пептидных компонентов данной среды также неодинаков (Степанова, 1974).

Возникла необходимость исследовать экзометаболический эффект в течение длительного промежутка времени с учетом возрастной структуры популяции как дополнительного, варьируемого на нескольких уровнях экологического фактора. При такой постановке задачи открываются возможности для создания элементарной модели, позволяющей прогнозировать сроки выделения экзометаболитов с определенными ингибирующими или активирующими свойствами.

Материал и методика

В качестве объекта исследования использовались головастики *R. arvalis* (кладки привезены из района оз. Шарташ, г. Свердловск). 12 апреля 1974 г. сформировали две модельные популяции (кладки № 1 и 2, плотность 10 головастиков в 1 *л*).

Исследовали действие водной среды и ее белков из «загущенной» популяции головастиков разных стадий развития

Уровень	Метаболиты $\widehat{x_1}$		Характеристика и номер кладки реципиента $\widehat{x_2}$	Стадия развития реципиента $\widehat{x_3}$	
	Первая, вторая серии	Третья, четвертая серии		Первая, третья серии	Вторая, четвертая серии
Первый	Водная среда из популяции (кладка № 1)	Белки водной среды из популяции	Своя № 1	25-я	27-я
Второй	Не вводились	Не вводились	Чужая № 2	До 25-й	26-я
Третий	—	—	—	—	—
Четвертый	—	—	—	—	—

Примечание. Для $\widehat{x_1}$, $\widehat{x_2}$ и $\widehat{x_3}$ взяты два уровня: верхний (+) и нижний (—).

(кладка № 1) на их эндогенный метаболизм в течение месяца (в последовательные восемь периодов, через 18, 21, 24 и 29 дней с момента формирования популяций, когда личинки находятся до 25-й и на 25-й стадиях развития и образуется околожаберная полость, и через 38, 42, 45 и 49 дней, когда популяция состоит из головастиков 26-й и 27-й стадий и происходит формирование задних конечностей).

Поставили пять серий опытов: первая и вторая — изучение водной среды головастиков; третья, четвертая — изучение некоторых ее белков; пятая — изучение влияния лиофилизата водной среды на скорость метаморфоза головастиков при непосредственном введении препарата в среду их обитания.

Первые четыре серии проводили по плану полного факторного эксперимента (ПФЭ) типа $2^3 \cdot 4$. Независимые переменные и их уровни приведены в табл. 1. Определяли интенсивность эндогенного метаболизма (y) в гомогенатах головастиков двух разных стадий (x_3) из популяций своей и чужой кладки (x_2) при введении водопроводной, предварительно выдержанной воды и экзометаболитов в виде водной среды или ее белков (x_1), которые брали из популяции одной кладки в указанные восемь периодов (x_4).

Лиофилизат в опытах in vivo получали на промышленной установке типа К-30 фирмы «Frigera» (ЧССР) по режиму, принятому для высушивания сывороточных белков.

Регрессионный анализ проводили стандартным методом в соответствии с использованным планом (Good, 1958; Налимов, Чернова, 1965; Margolin, 1967; Максимов, Федоров, 1969). Значимость коэффициентов регрессии находили, сравнивая их абсо-

Таблица 1

ные и их уровни

Период развития популяции (дата опыта, возраст личинок, дни) $\hat{x}_i$					
Первая, третья серии	Вторая, четвертая серии	Первая, третья серии	Вторая, четвертая серии	Первая, третья серии	Вторая, четвертая серии
I	V	30.V	20.VI	18	38
II	VI	3.VI	24.VI	21	42
III	VII	6.VI	27.VI	24	45
IV	VIII	11.VI	1.VII	29	49

лютную величину с ошибкой в определении, контролируя выполнение неравенства $b \geqslant tS\{b_i\}$.

Для выделения белков водной среды использовали метод высаливания. К 500 *мл* водной среды порциями при непрерывном помешивании добавляли сульфат аммония до 60% насыщения, после чего пробу выдерживали в течение 24 *ч* в условиях комнатной температуры. Выпавший осадок центрифугировали (3000 *об/мин*) и растворяли в 10 *мл* дистиллированной воды. Обессоливание проводили пропусканием раствора через колонку с сефадексом Г-25 (объем колонки 45 *мл*; элюирующая жидкость — дистиллированная вода). В вытекающем из колонки элюате содержание белка определяли, спектрофотометрируя пробу при длине волны 220 *ммк*, ионы аммония — по Несслеру.

При изучении кладо- и стадиоспецифичности действия белков водной среды использовали белковый раствор, полученный объединением первых фракций элюата, не содержавших ионов аммония. При этом содержание белка доводили до исходного, разбавляя белковый элюат и определяя в нем и водной среде белок по Лоури: 1 *мл* 0,5%-ного раствора С и $SO_4 \cdot 5H_2O$ в 1%-ном цитрате натрия смешивали с 50 *мл* 2%-ного раствора Na_2CO_3 в 0,1 NaOH и 2 *мл* полученной смеси вводили в 0,4 *мл* водной среды головастиков или элюата. Через 10 *мин* выдерживания пробы при комнатной температуре в нее добавляли по 0,2 *мл* реактива Фолина — Чокательтеу (Кочетов, 1971), содержимое перемешивали и через 30—40 *мин* измеряли величину оптической плотности в области 750 *нм*. Для построения калибровочной кривой использовали раствор альбумина с содержанием 0,25 *мг* белка в 1 *мл*. Пробы по 0,04; 0,08; 0,16; 0,24; 0,32 *мл* доводили дистиллированной водой до 0,4 *мл*. Для определения

белка после его выделения в воде скоплений и в элюате брали также по 0,4 *мл*.

Эндогенную активность оксидаз (или эндогенный аэробный метаболизм) измеряли по степени ингибирования «тетразоловой реакции» кислородом воздуха с помощью параллельного определения интенсивности восстановления 2, 3, 5-трифенилтетразолхлорида при инкубации гомогената в атмосфере аргона и воздуха (Рункова, Завада, 1975). Семь-восемь головастиков гомогенизировали в 0,05 М-трисбуфере, который содержал 0,05 М KCl и 0,001 М $MgCl_2$ при pH 7,4 и температуре от 0 до +2° С. Затем гомогенат разводили до нужного содержания ткани (20 *мг/мл*) и переносили (по 1 *мл*) в пробирки типа сосуда Варбурга с двумя отростками, кранами на шлифах и стеклянной, хорошо пришлифованной пробкой. Предварительно в основное пространство пробирок добавляли по 1 *мл* трисбуфера указанного состава и в боковой отросток по 0,2 *мл* 1,6%-ного раствора 2, 3, 5-трифенилтетразолхлорида. Часть пробирок тщательно закрывали для создания полной герметичности (аналогично сосудам Варбурга), а содержимое их насыщали аргоном в течение 30 *мин*. Затем перекрывали краны, раствор тетразолхлорида переносили из боковых отростков в пробы и все пробирки с аргоном и воздухом ставили в воздушный термостат на 24 *ч* при 37° С. Образовавшийся в результате восстановления формазан последовательно экстрагировали при непрерывном встряхивании с ацетоном, толуолом и бутанолом (по 2 *мл* каждого). Окрашенный верхний слой содержимого пробирок спектрофотометрировали при длине волны 494 *ммк* в кювете толщиной 1 *см*, используя в качестве эталона контрольную пробу, которая имела все указанные нами реактивы, кроме гомогената (вместо него добавляли равный объем дистиллированной воды).

Эндогенная активность оксидаз представлена в таблицах и на рисунках в виде относительной величины — коэффициента ТТХ аргон/ТТХ воздух, который рассчитывали по тетразолвосстанавливающей активности гомогената, взяв за числитель результаты измерения пробы, инкубированной в аргоне, за знаменатель — результаты измерения пробы, инкубированной в воздухе.

Результаты опытов и их обсуждение

Результаты экспериментов и данные регрессионного анализа приведены в табл. 2. Получены уравнения:

для водной среды в периоды формирования околожаберной полости (первая серия):

$$y = 3{,}25 - 0{,}66x_1x_2 - 0{,}35x_2x_3 + 0{,}76x_4 - 0{,}51x_1x_2x_4 + \\ + 1{,}39x_4^2 + 0{,}42x_4^2 - 0{,}65x_1x_2x_4^2;$$

$$S^2_{\text{ад}}/S^2\{\bar{y}\} = 1{,}8 \geqslant F_{0{,}95\,(24{,}64)} = 1{,}7;$$

Таблица 2

Матрица ПФЭ 2^3 4, результаты опытов и данные регрессионного анализа. Специфичность действия водной среды из «загущенной» популяции головастиков на их эндогенный метаболизм в периоды формирования околожаберной полости

Кодированные переменные и их уровни				ТТХ аргон/ТТХ воздух				Эффект	Коэффициент регрессии
x_1	x_2	x_3	x_4	$\bar{y}$	y_1	y_2	y_3		
Первая серия									
—	—	—	—3	3,55	3,89	2,89	3,86	«1»	3,250
								x_1	0,006
+	—	—	—3	1,99	2,45	2,45	1,52	x_2	0,22
—	+	—	—3	2,42	2,71	2,12	2,12	x_1x_2	—0,66
+	+	—	—3	2,17	2,23	2,17	2,12	x_3	—0,24
—	—	+	—3	2,29	2,50	2,08	2,30	x_1x_3	0,07
+	—	+	—3	1,08	1,06	1,00	1,12	x_2x_3	—0,35
—	+	+	—3	1,62	1,26	1,64	1,97	$x_1x_2x_3$	0,006
+	+	+	—3	1,98	2,10	1,63	2,20	x_4	0,76
—	—	—	—1	1,70	1,48	1,52	1,71	x_1x_4	0,02
+	—	—	—1	2,28	1,84	2,61	2,40	x_2x_4	0,22
—	+	—	—1	1,57	1,81	1,13	1,78	$x_1x_2x_4$	—0,51
+	+	—	—1	2,76	2,77	2,42	3,08	x_3x_4	0,05
—	—	+	—1	1,88	2,00	1,80	1,83	$x_1x_3x_4$	0,05
+	—	+	—1	2,23	2,53	2,42	1,75	$x_2x_3x_4$	—0,13
—	+	+	—1	0,73	0,68	0,72	0,73	$x_1x_2x_3x_4$	—0,002
+	+	+	—1	1,35	1,23	1,55	1,26	x_4^2	1,39
—	—	—	+1	1,10	0,92	1,14	1,24	$x_1x_4^2$	—0,25
+	—	—	+1	2,36	2,25	2,29	2,55	$x_2x_4^2$	0,42
—	+	—	+1	2,50	2,31	2,88	2,31	$x_1x_2x_4^2$	—0,65
+	+	—	+1	2,83	2,38	3,11	3,00	$x_3x_4^2$	0,03
—	—	+	+1	2,48	2,50	2,46	2,46	$x_1x_3x_4^2$	0,24
+	—	+	+1	2,43	2,23	2,23	2,82	$x_2x_3x_4^2$	0,12
—	+	+	+1	0,87	0,68	1,09	0,84	$x_1x_2x_3x_4^2$	—0,02
+	+	+	+1	0,71	0,78	0,71	0,65	x_4^3	0,24
—	—	—	+3	2,96	2,88	3,50	2,50	$x_1x_4^3$	0,03
+	—	—	+3	7,46	9,75	9,50	3,14	$x_2x_4^3$	0,07
—	+	—	+3	12,67	17,00	9,50	11,50	$x_1x_2x_4^3$	—0,14
+	+	—	+3	5,57	4,00	8,50	4,20	$x_3x_4^3$	0,02
—	—	+	+3	2,98	3,13	3,00	2,82	$x_1x_3x_4^3$	0,04
+	—	+	+3	9,72	4,00	12,67	12,5	$x_2x_3x_4^3$	0,02
—	+	+	+3	10,56	2,67	13,0	11,0	$x_1x_2x_3x_4^3$	—0,03
+	+	+	+3	5,17	6,83	4,00	4,67	—	—
Вторая серия									
—	—	—	—3	8,72	7,40	8,75	10,0	«1»	4,13
+	—	—	—3	3,22	3,00	3,50	3,16	x_1	—0,57
—	+	—	—3	3,09	3,13	3,29	2,86	x_2	0,39

Кодированные переменные и их уровни				ТТХ аргон/ТТХ воздух				Эффект	Коэффициент регрессии
x_1	x_2	x_3	x_4	$\bar{y}$	y_1	y_2	y_3		
+	+	—	—3	2,02	2,05	1,94	2,06	x_1x_2	—0,71
—	—	+	—3	3,53	4,00	3,06	3,06	x_3	0,02
+	—	+	—3	1,86	1,91	1,81	1,85	x_1x_3	—0,48
—	+	+	—3	2,90	3,05	2,33	3,33	x_2x_3	1,18
+	—	+	—3	1,75	1,48	1,69	2,09	$x_1x_2x_3$	—0,18
—	—	—	—1	2,44	2,50	2,33	2,50	x_4	0,12
+	—	—	—1	4,23	4,44	3,69	4,56	x_1x_4	—0,99
—	+	—	—1	6,82	6,00	8,20	6,25	x_2x_4	0,34
+	+	—	—1	3,47	3,42	3,83	3,17	$x_1x_2x_4$	—0,47
—	—	+	—1	2,68	2,40	2,76	2,87	x_3x_4	0,42
+	—	+	—1	2,81	2,47	3,00	2,97	$x_1x_3x_4$	—0,45
—	+	+	—1	5,18	5,00	5,62	4,88	$x_2x_3x_4$	0,22
+	+	+	—1	6,99	7,00	6,07	7,91	$x_1x_2x_3x_4$	—0,19
—	—	—	+1	6,09	8,25	4,90	4,63	x_2^4	—0,40
+	—	—	+1	11,62	6,86	12,00	16,00	$x_1x_4^2$	—1,03
—	+	—	+1	3,31	3,07	3,58	3,27	$x_2x_4^2$	0,15
+	+	—	+1	4,16	3,68	4,00	4,81	$x_1x_2x_4^2$	—0,19
—	—	+	+1	2,11	1,88	2,21	2,25	$x_3x_4^2$	0,76
+	—	+	+1	2,39	2,17	2,75	2,25	$x_1x_3x_4^2$	—0,34
—	+	+	+1	4,04	4,00	4,00	4,11	$x_2x_3x_4^2$	0,11
+	+	+	+1	4,29	4,34	4,27	4,26	$x_1x_2x_3x_4^2$	—0,90
—	—	—	+3	0,58	0,53	0,65	0,55	x_4^3	—0,03
+	—	—	+3	2,23	2,18	2,29	2,23	$x_1x_4^3$	—0,16
—	+	—	+3	2,52	2,22	2,13	3,20	$x_2x_4^3$	0,46
+	+	—	+3	1,12	1,23	1,10	1,10	$x_1x_2x_4^3$	—0,12
—	—	+	+3	2,69	2,57	2,29	3,20	$x_3x_4^3$	0,41
+	—	+	+3	2,61	2,50	2,62	2,70	$x_1x_3x_4^3$	0,04
—	+	+	+3	18,67	20,0	16,00	20,00	$x_2x_3x_4^3$	—0,15
+	+	+	+3	2,13	1,80	2,60	2,00	$x_1x_2x_3x_4^3$	—0,01
				Третья серия					
—	—	—	—3	3,55	3,89	2,89	3,86		2,91
+	—	—	—3	1,22	1,40	1,04	1,40	x_1	—0,33
—	+	—	—3	2,42	2,71	2,12	2,12	x_2	0,50
+	+	—	—3	2,06	2,02	1,89	2,27	x_1x_2	—0,37
—	—	+	—3	2,29	2,50	2,08	2,30	x_3	—0,40
+	—	+	—3	0,92	1,13	0,71	1,13	x_1x_3	—0,08
—	+	+	—3	1,62	1,26	1,64	1,97	x_2x_3	—0,40
+	+	+	—3	1,13	1,55	1,05	0,78	$x_1x_2x_3$	—0,04
—	—	—	—1	1,70	1,48	1,52	1,71	x_4	0,55
+	—	—	—1	4,11	3,83	4,38	3,83	x_1x_4	—0,18
—	+	—	—1	1,57	1,81	1,13	1,78	x_2x_4	0,46

Кодированные переменные и их уровни				ТТХ аргон/ТТХ воздух				Эффект	Коэффициент регрессии
x_1	x_2	x_3	x_4	$\bar{y}$	y_1	y_2	y_3		
+	+	—	—1	2,22	1,76	2,67	1,76	$x_1x_2x_4$	—0,27
—	—	+	—1	1,88	2,00	1,80	1,83	x_3x_4	—0,05
+	—	+	—1	3,44	3,79	3,08	—	$x_1x_3x_4$	—0,06
—	+	+	—1	0,73	0,68	0,77	0,73	$x_2x_3x_4$	—0,14
+	+	+	—1	1,85	1,85	1,85	1,85	$x_1x_2x_3x_4$	—0,02
—	—	—	+1	1,10	0,92	1,14	1,24	x_4^2	0,88
+	—	—	+1	1,68	1,64	1,86	1,54	x_1x_4	—0,76
—	+	—	+1	2,50	2,31	2,88	2,31	$x_2x_4^2$	0,83
+	+	—	+1	2,93	2,92	3,10	2,77	$x_1x_2x_4^2$	—0,23
—	—	+	+1	2,48	2,50	2,46	2,46	$x_3x_4^2$	—0,21
+	—	+	+1	2,56	2,69	2,56	2,43	$x_1x_3x_4^2$	—0,005
—	+	+	+1	0,82	0,68	1,09	0,84	$x_2x_3x_4^2$	0,011
+	+	+	+1	0,97	1,07	0,92	0,91	$x_1x_2x_3x_4^2$	—0,13
—	—	—	+3	2,96	2,88	3,50	2,50	x_4^3	0,23
+	—	—	+3	2,97	2,92	3,08	2,92	$x_1x_4^3$	0,03
—	+	—	+3	12,67	17,00	9,50	11,50	$x_2x_4^3$	0,06
+	+	—	+3	7,33	6,50	7,50	8,00	$x_1x_2x_4^3$	—0,13
—	—	+	+3	2,98	3,13	3,00	2,82	$x_3x_4^3$	—0,03
+	—	+	+3	2,77	2,00	2,82	3,50	$x_1x_3x_4^3$	—0,01
—	+	+	+3	10,56	7,62	13,00	11,00	$x_2x_3x_4^3$	0,06
+	+	+	+3	3,23	3,58	2,87	3,24	$x_1x_2x_3x_4^3$	0,02
				Четвертая серия					
—	—	—	—3	8,72	7,40	8,75	10,0	«1»	4,29
+	—	—	—3	5,69	5,63	6,00	5,44	x_1	—0,42
—	+	—	—3	3,09	3,13	3,29	2,86	x_2	0,58
+	+	—	—3	2,05	2,20	1,94	2,00	x_1x_2	—0,53
—	—	+	—3	3,53	4,0	3,06	3,06	x_3	0,34
+	—	+	—3	3,41	2,80	3,53	3,90	x_1x_3	—0,17
—	+	+	—3	2,90	3,05	2,33	3,33	x_2x_3	1,09
+	+	+	—3	1,82	1,88	1,81	1,78	$x_1x_2x_3$	—0,28
—	—	—	—1	2,44	2,50	2,33	2,50	x_4	0,23
+	—	—	—1	4,97	4,75	5,60	4,57	x_1x_4	0,01
—	+	—	—1	6,82	6,00	8,20	6,25	x_2x_4	0,64
+	+	—	—1	2,20	2,57	1,65	2,38	$x_1x_2x_4$	—0,16
—	—	+	—1	2,68	2,40	2,76	2,87	x_3x_4	0,58
+	—	+	—1	3,10	2,88	3,03	3,38	$x_1x_3x_4$	—0,28
—	+	+	—1	5,18	5,00	5,67	4,88	$x_2x_3x_4$	0,27
+	+	+	—1	3,19	3,89	3,25	2,44	$x_1x_2x_3x_4$	—0,15
—	—	—	+1	6,09	8,75	4,90	4,63	x_4^2	0,31
+	—	—	+1	3,94	3,15	3,80	4,86	$x_1x_4^2$	—0,31

Кодированные переменные и их уровни				ТТХ аргон/ТТХ воздух				Эффект	Коэффициент регрессии
x_1	x_2	x_3	x_4	$\bar{y}$	y_1	y_2	y_3		
—	+	—	+1	3,31	3,07	3,58	3,27	$x_2x_4^2$	0,16
+	+	—	+1	4,22	4,15	4,00	4,50	$x_1x_2x_4^2$	—0,19
—	—	+	+1	2,11	1,88	2,21	2,25	$x_3x_4^2$	0,61
+	—	+	+1	3,14	3,11	3,12	3,20	$x_1x_3x_4^2$	—0,48
—	+	+	+1	4,04	4,00	4,00	4,11	$x_2x_3x_4^2$	0,56
+	+	+	+1	6,21	5,88	6,36	6,38	$x_1x_2x_3x_4^2$	—0,47
—	—	—	+3	0,58	0,53	0,65	0,55	x_4^3	0,02
+	—	—	+3	3,24	3,40	3,33	3,00	$x_1x_4^3$	—0,11
—	+	—	+3	2,52	2,22	2,13	3,90	$x_2x_4^3$	0,25
+	+	—	+3	3,33	3,00	4,00	3,00	$x_1x_2x_4^3$	—0,34
—	—	+	+3	2,69	2,57	2,29	3,90	$x_3x_4^3$	—0,19
+	—	+	+3	3,06	3,00	3,33	2,86	$x_1x_3x_4^3$	—0,17
—	+	+	+3	18,67	20,00	16,00	20,00	$x_2x_3x_4^3$	—0,04
+	+	+	+3	8,39	12,00	7,50	5,67	$x_1x_2x_3x_4^3$	0,08

Примечание. Статистические показатели: $S^2\{y\}=2,25$; $S^2\{\bar{y}\}=0,75$; $S^2\{b_i\}=0,023$; $tS\{b_i\}=0,31$ (первая серия); $S^2\{y\}=1,16$; $S^2\{\bar{y}\}=0,39$; $S^2\{b_i\}=0,012$; $tS\{b_i\}=0,22$ (вторая серия); $S^2\{y\}=3,80$; $S^2\{\bar{y}\}=1,26$; $S^2\{b_i\}=0,039$; $tS\{b_i\}=0,39$ (третья серия); $S^2\{y\}=0,90$; $S^2\{\bar{y}\}=0,30$; $S^2\{b_i\}=0,009$; $tS\{b_i\}=0,19$ (четвертая серия).

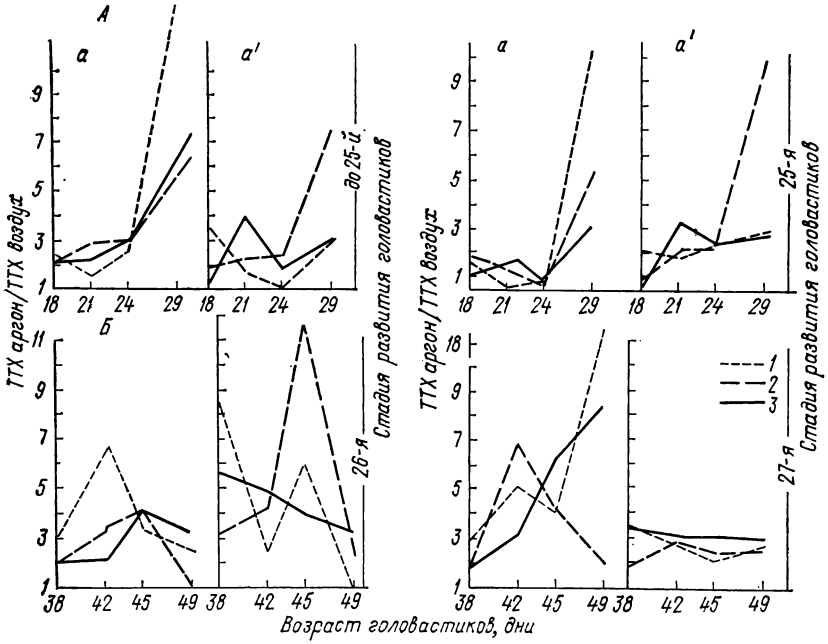
для водной среды в период формирования задних конечностей (вторая серия):

$$y=4,13-0,57x_1+0,39x_2-0,71x_1x_2-0,48x_1x_3+$$
$$+1,18x_2x_3+0,34x_2x_4-0,47x_1x_2x_4+0,42x_3x_4-$$
$$-0,45x_1x_3x_4+0,22x_2x_3x_4-0,40x_4^2-1,03x_1x_4^2+0,76x_3x_4^2+$$
$$+0,46x_2x_4^3+0,41x_3x_4^3-0,90x_2x_3x_4^2;$$
$$S^2_{ад}/S^2\{\bar{y}\}=4,5>F_{0,95\,(14,64)}=1,9;$$

для белков водной среды в периоды формирования околожаберной полости (третья серия):

$$y=2,91+0,50x_2-0,37x_1x_2-0,40x_3-0,40x_2x_3+0,55x_4+$$
$$+0,46x_2x_4+0,88x_4^2-0,76x_1x_4^2+0,83x_2x_4^2;$$
$$S^2_{ад}/S\{\bar{y}\}=2,9>F_{0,95\,(22,64)}=1,7;$$

для белков водной среды в периоды формирования задних конечностей (четвертая серия):



Стадиоспецифичность и специфичность на уровне семьи в действии водной среды из популяций головастиков *R. arvalis* в отдельные периоды формирования околожаберной полости (*А*) и задних конечностей (*Б*).

а — своя, *а*¹ — чужая кладка реципиента.
1 — водная среда без экзометаболитов; *2* — после введения «водной среды»; *3* — после введения белков водной среды.

$$y=4{,}29-0{,}42x_1+0{,}58x_2-0{,}53x_1x_2+0{,}34x_3+1{,}09x_2x_3+$$
$$+0{,}64x_2x_4+0{,}58x_3x_4-0{,}28x_1x_3x_4+0{,}27x_2x_3x_4+0{,}31x_4^2-$$
$$-0{,}31x_3x_4^2-0{,}19x_1x_2x_4^2+0{,}61x_3x_4^2-0{,}48x_1x_3x_4^2+0{,}56x_2x_3x_4^2-$$
$$-0{,}47x_1x_2x_3x_4^2+0{,}25x_2x_4^3-0{,}34x_1x_2x_4^3-0{,}19x_3x_4^3;$$
$$S^2_{\text{ад}}/S^2\{\bar{y}\}=7{,}08>F_{0,95\,(20,64)}=1{,}9.$$

Уравнения регрессии оказались неадэкватными $\left(S^2_{\text{ад}}/S^2\{\bar{y}\}>F_{0,95}\right)$. Поэтому графики (см. рисунок) построены по экспериментальным данным ($\bar{y}$). Анализ значимых коэффициентов регрессии в первую очередь показывает, что эндогенная активность оксидаз в гомогенатах контрольных головастиков (без введения экзометаболитов в виде водной среды или отдельных ее белков), определяется не только морфологической характеристикой их стадии, но и возрастной структурой популяции — периодом, в который личинка исследовалась (среди значимых эффектов обнаружены x_2x_4, x_3, x_4, $x_2x_3x_4$, x_3x_4, $x_2x_4^2$, $x_3x_4^3$, $x_2x_3x_4^2$ — во второй, x_2x_4, $x_2x_4^2$ — в третьей, x_2x_4, $x_2x_3x_4$, $x_3x_4^2$, $x_2x_4^2$, $x_2x_3x_4^2$, $x_3x_4^3$ — в четвертой сериях). Биохимический показатель в наших экспе-

риментах зависит от принадлежности личинки к кладке, а последняя, в свою очередь, от стадии развития по Терентьеву и от времени исследования пробы. Данный вывод хорошо иллюстрируется графически. На рисунке экспериментальные кривые, построенные по соответствующим средним данным для активности оксидаз в гомогенатах головастиков до 25, 25—27-й стадий из популяций обеих кладок (при введении предварительно выдержанной водопроводной воды), не параллельны оси абсцисс. Эндогенный метаболизм личинок до 25-й и на 25-й стадиях развития, взятых через 18 дней с момента формирования популяции (30 мая), резко отличается от эндогенного метаболизма личинок той же кладки и тех же морфологических стадий при исследовании через 29 дней от начала опыта (11 июня). Аналогичная разница в уровне активности оксидаз наблюдается, как видно из рисунка, и в опытах по изучению метаболической регуляции в периоды формирования задних конечностей. Морфологическая характеристика головастика (стадия развития по Терентьеву) не соответствует биохимической.

Анализ значимых коэффициентов регрессии показывает также, что действие экзометаболитов в виде водной среды головастиков и исследованных в сериях экзобелков на эндогенный метаболизм отдельной личинки зависит от кладки реципиента, его морфологической стадии и периода в развитии популяции (среди значимых эффектов обнаружены $x_1x_2x_4$, $x_1x_2x_4^2$, $x_1x_2x_4^3$, $x_1x_3x_4$, $x_1x_3x_4^2$, $x_1x_2x_3x_4^2$).

Регуляторные свойства водной среды, как и ее белков, нестабильны. Кладо- и стадиоспецифичность при влиянии на эндогенный метаболизм личинок то появляются, то исчезают по мере формирования околожаберной полости и задних конечностей.

Водная среда, взятая в опыт через 18 дней с момента формирования популяции (30 мая), не действует на эндогенный метаболизм головастиков своей кладки, но достоверно ингибирует его у личинок чужой кладки (см. рис. 1). Это ингибирование нестадиоспецифично (одинаково у личинок до 25-й и на 25-й стадиях развития). Через 21—24 дня от начала опыта (3 и 6 июня) головастики своей и чужой кладки ведут себя в присутствии экзометаболитов одинаково. Через 29 дней от начала опытов (11 июня) она вновь становится ярко выраженной. Эндогенный метаболизм головастиков своей кладки водная среда резко подавляет, головастиков чужой кладки, напротив, усиливает. При этом описанные экзометаболитические эффекты не зависят от стадии развития личинок ($b_{12}b_{124} > tS\{b_i\}$ *и* $b_{13}b_{134} < tS\{b_i\}$).

На 38-й день опыта (20 июня), когда начинается процесс формирования задних конечностей и появляются особи 26-й и 27-й стадий, как показывают экспериментальные данные (см. рисунок), обнаруживаются и кладо-, и стадиоспецифичность действия экзометаболитов (b_{12} и $b_{13} > tS\{b_i\}$). Ингибирование

Таблица 3

Специфичность действия «лиофилизированной водной среды» головастиков на их выживаемость и скорость метаморфоза

Популяция	*R. arvalis* (из кладки № 1)		*R. arvalis* (из кладки № 2)		*R. camerani*	
	I	II	I	II	I	II
Сеголетки	28/46,7	17/28,3	30/50	32/53,5	6/20	7/23,3
Погибшие головастики	18/30	23/38,3	21/35	20/33,3	11/36,7	13/43,3
Оставшиеся	14/23,3	20/33,3	9/15	8/13,3	13/43,3	10/33,3

Примечания: 1. Популяции сформированы 4.VII 73 г. из головастиков 25, 26 и 27-й стадий развития (по Терентьеву), плотность 10 головастиков на 1 *л*, характеристика сделана 22.VII 73 г.

2. I — белки не вводились, II — в течение первых пяти дней вводилось по 50 *мг* порошка, полученного при лиофильном высушивании 200 *мл* «водной среды» из «загущенной» популяции головастиков *R. arvalis* (кладка № 1); в числителе — количество особей, в знаменателе — то же, %.

больше выражено у головастиков чужой кладки на 26-й стадии развития. Через 42 и 45 дней от начала опыта (24 и 27 июня) кладо- и стадиоспецифичность действия водной среды снова проявляются отчетливо. Происходит ингибирование обмена у своих и сильная активация у чужих личинок на 26-й стадии их развития. Активация обмена у своих и отсутствие изменений у чужих наблюдается в присутствии водной среды на 27-й стадии развития.

Наконец, в последний исследованный нами период (на 49-й день от начала опыта) водная среда из «загущенной» популяции головастиков у своих личинок ингибирует эндогенный метаболизм, у других либо не изменяет (на 27-й стадии), либо слабо активирует (на 26-й стадии). Проверка обнаруженного на 49-й день опыта ингибирующего экзометаболического эффекта в условиях in vivo (табл. 3) показала, что он проявляется и на интактных личинках. Лиофилизат, полученный лиофильным высушиванием водной среды в указанный период и добавленный непосредственно в среду обитания, заметно тормозит выход сеголеток из популяции с генетически более близкими донору личинками. Лиофилизат не изменяет скорость развития и число вышедших сеголеток при добавлении в среду обитания головастиков из чужой кладки.

Результаты анализа кладо- и стадиоспецифичности влияния выделенных нами экзобелков водной среды головастиков на их эндогенный метаболизм в целом свидетельствуют о тех же закономерностях. На ранних стадиях развития популяции (через

18 дней с момента ее формирования) белки, осажденные из водной среды головастиков введением сульфата аммония, также обладают кладоспецифичностью действия по отношению к оксидазам отдельной личинки (см. рисунок). В первый период, не вызывая изменений в обмене головастиков, независимо от их стадии, они резко подавляют активность оксидаз у головастиков чужой кладки. Через 21 и 24 дня с момента формирования популяции (3 и 6 июня) экзобелки активируют обмен у своих и чужих головастиков, причем у чужих значительно сильнее. Через 29 дней от начала опыта (11 июня) выделенные нами экзобелки резко ингибируют активность оксидаз своих головастиков и не действуют на обмен личинок чужой кладки ($b_{12} > tS\{b_i\}$).

Стадиоспецифичность влияния исследованных экзобелков в период формирования околожаберной полости, когда наблюдается переход головастиков к 25-й стадии развития (по Терентьеву), как и стадиоспецифичность действия водной среды, в наших опытах не обнаружена ($b_{13} > tS\{b_i\}$).

В периоды формирования задних конечностей, напротив, аналогично влиянию водной среды, резко выражена и кладо-, и стадиоспецифичность действия выделенных экзобелков (b_{134}, $b_{124} > tS\{b_i\}$. Взятые через 42 и 45 дней от начала опыта (24, 27 июня), экзобелки сильно ингибируют эндогенный метаболизм головастиков своей кладки и активируют обмен у личинок чужой кладки. Через 45 дней от начала опыта (1 июля) эта направленность действия по отношению к своим и чужим особям зависит от стадии развития реципиента и проявляется только на 27-й стадии развития.

В настоящей работе изучалось влияние не всех экзобелков водной среды, так как при выделении белков использовали метод, обычно применяемый при исследовании глобулиновых фракций, и пробы на полноту осаждения не проверялись. Выравнивая концентрацию выделенного экзобелка до исходной[1] (в водной среде до выделения), мы ставили задачу выяснить, связан ли обнаруженный экзометаболический эффект с белками типа глобулинов.

Сравнительный анализ результатов первой и третьей, второй и четвертой серий, в которых проводились параллельные исследования влияния водной среды и выделенных из нее белков, позволяет предполагать, что глобулины — не единственные экзорегуляторы в популяции развивающихся личинок амфибий. Данные белки принимают участие в популяционном механизме метаболической регуляции, но, по-видимому, не на всех стадиях развития. Вероятно, подавление активности эндогенных оксидаз у личинок своей и чужой кладок через 18, 38 и 42 дня с момента

[1] Концентрация белка в водной среде и в белковом растворе, который вводился в гомогенат, в исследованные периоды развития популяции соответственно составляла 0,015; 0,028; 0,034; 0,041; 0,040; 0,042; 0,045; 0,048; 0,050 *мг/мл*.

формирования популяций в нашем эксперименте связано с накоплением белков глобулиновой природы (наблюдается идентичность экспериментальных данных для водной среды головастиков выделенным из нее белкам). Но активация через 49 дней от начала опыта по отношению к обмену личинок чужой кладки, вероятно, не вызвана накоплением экзоглобулинов (водная среда активирует оксидазы личинок чужой кладки, осажденные из нее сульфатом аммония белки не вызывают изменений того же показателя у тех же особей). Факты несовпадения в направленности специфического действия изученных экзобелков и цельной водной среды головастиков имеют место и в отдельные периоды формирования задних конечностей.

Таким образом, изучение экзометаболического эффекта в течение 49 дней развития популяции показало, что стадио- и кладоспецифичность действия «химического фона среды» и некоторых ее экзобелков зависят от времени проведения опыта с момента формирования популяции и определяются природой ее возрастной структуры. Неадэкватность уравнений регрессии, полученных в эксперименте, указывает на сложность характера взаимосвязей между влиянием экзометаболитов и изученных популяционных параметров. Для построения модели, позволяющей прогнозировать выделение экзобелков с заданными свойствами, по-видимому, необходимо расширить число факторов в эксперименте за счет использования исходных биохимических характеристик для головастиков ранних стадий определенного возраста.

ЛИТЕРАТУРА

Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. М., «Высшая школа», 1971.

Максимов В. Н., Федоров В. Д. Применение методов математического планирования эксперимента при отыскании оптимальных условий культивирования микроорганизмов. М., Изд-во МГУ, 1969.

Налимов В. В., Чернова И. А. Статистические методы планирования экстремальных экспериментов. М., «Наука», 1965.

Рункова Г. Г. О влиянии метаболитов земноводных разной степени генетической близости на эндогенный метаболизм головастиков *R. arvalais* в зависимости от стадии их развития и концентрации метаболитов.— Материалы отчетной сессии отдела популяционной экологии животных Ин-та экологии растений и животных УНЦ АН СССР. Свердловск, 1974.

Рункова Г. Г., Рудакова Т. И. О влиянии метаболитов водной среды головастиков *R. arvalis* на гликолитическую активность отдельных особей в популяции.— Материалы отчетной сессии отдела популяционной экологии животных Ин-та экологии растений и животных УНЦ АН СССР. Свердловск, 1974.

Рункова Г. Г., Завада Н. Ф. Сравнительное изучение эндогенной активности оксидаз в тканях с различной степенью адаптации к γ-облучению.— Экология, 1975, № 5.

Рункова Г. Г., Ковальчук Л. А. О влиянии метаболитов водной среды головастиков на их эндогенный метаболизм и чувствительность к гипоксии в зависимости от возраста и условий донора и реципиента.— Докл. АН СССР, 1975, т. 220, № 5.

Рункова Г. Г., Ковальчук Л. А., Степанова З. Л. О механизмах метаболической регуляции в популяциях развивающихся личинок земноводных.— Тезисы докладов симпозиума «Роль факторов внешней среды в онтогенезе». М., 1974а.

Рункова Г. Г., Степанова З. Л., Ковальчук Л. А. Органоспецифичность в действии метаболитов личинок земноводных на их эндогенный метаболизм в условиях повышенной плотности популяции. Роль белка в регулирующем влиянии метаболитов.— Докл. АН СССР, 1974б, т. 217, № 3.

Степанова З. Л. О химической природе выделенных в воду продуктов метаболизма личинок земноводных.— Экология, 1974, № 3.

Шварц С. С., Пястолова О. А., Добринская Л. А., Рункова Г. Г. Эффект группы в популяциях водных животных и химическая экология. М., «Наука», 1976.

Good J. The interaction algorithm and practical fourier analysis.— J. Rog. Statist. Soc., Ser. B, 1958, vol. 20.

Margolin B. H. Sistematic methods for analysing 2^n3^m factoriel experiments with applications.— Technometrics, 1967, Bd 9, N 2.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НЕКОТОРЫХ ПРОБЛЕМ
ПОПУЛЯЦИОННОЙ ЭКОЛОГИИ · 1978

З. Л. СТЕПАНОВА

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ БЕЛКОВО-ПЕПТИДНЫХ ВЕЩЕСТВ ВОДНОЙ СРЕДЫ ИЗ ПОПУЛЯЦИЙ ГОЛОВАСТИКОВ ОСТРОМОРДОЙ ЛЯГУШКИ

Водная среда из «загущенных» популяций головастиков малоазиатской и закавказской лягушек является стадио- и видоспецифичной по аминокислотному составу белково-пептидных веществ (Степанова, 1974, 1975).

В настоящей статье приводятся результаты сравнительного изучения белково-пептидных веществ водной среды головастиков остромордой лягушки из разных пунктов.

Материал и методика

Исследовались головастики остромордой лягушки (*Rana arvalis* Nilss.), добытые в пяти пунктах Свердловской области: 1) в окрестностях оз. Шарташ; 2) в водоеме Ботанического сада; 3) в окрестностях деревни Косулино; 4) в с. Бурматово Ивдельского р-на и 5) на ст. Першино Ивдельского р-на.

Из первых двух пунктов взята икра остромордой лягушки и через 2—3 дня после появления личинок были сформированы аквариумы с плотностью 40 личинок в 4 *л* воды и 60 личинок в 6 *л*. С момента появления почек задних конечностей формировали популяции, состоящие только из таких особей. Ежедневно утром и вечером отсаживали головастиков 27-й стадии, формируя из них популяции. Таким же путем создавали популяции головастиков 28-й стадии. Через несколько дней выдерживания головастиков в чистой воде брали пробы водной среды для определения аминокислот.

Из 3, 4 и 5-го пунктов были привезены головастики 26—27-й стадий, сформированные в популяции 26, 27 и 28-й стадий (плотность та же — 10 личинок в 1 *л*). Объем проб составлял 100 *мл*. Общее количество белково-пептидных веществ в «воде скоплений» определяли по сумме всех аминокислот пробы после кислотного гидролиза с помощью анализатора Nitachi.

Аминокислотный состав белково-пептидных веществ в «воде скоплений» головастиков остромордой лягушки из разных мест обитания (1—5), % к сумме аминокислот

Аминокислоты	26-я стадия				
	1	2	3	4	$M \pm m$
	$n=180$	$n=140$	$n=100$	$n=60$	
Лизин	4,8—6,5	4,8—6,5	4,9—6,1	6,1—6,3	5,6±0,2
Гистидин	1,7—2,5	1,5—2,4	1,6—2,5	2,0—2,5	2,0±0,1
Аргинин	5,0—7,1	5,9—6,3	5,5—7,3	5,2—5,3	5,9±0,2
Аспарагиновая	9,7—11,8	10,2—11,7	9,8—11,8	8,3—12,6	10,7±0,3
Треонин	5,0—7,8	6,5—8,6	6,5—8,0	4,8—9,5	7,2±0,4
Серин	5,1—6,5	5,1—6,8	5,5—6,5	4,2—6,5	5,9±0,2
Глутаминовая	12,4—13,7	11,9—14,4	12,1—14,2	13,0—13,4	13,2±0,2
Пролин	4,5—5,2	4,1—5,7	4,3—5,8	4,4—5,1	4,9±0,2
Глицин	6,7—7,3	6,4—7,8	6,8—7,1	7,0—7,7	7,1±0,1
Аланин	7,0—9,7	6,7—9,5	7,0—8,2	6,7—9,3	7,9±0,4
Валин	5,7—6,7	6,1—6,3	6,0—6,8	5,8—6,4	6,2±0,1
Изолейцин	4,0—5,7	4,0—5,7	4,2—5,5	4,7—5,1	4,7±0,2
Лейцин	7,2—9,0	7,9—8,0	6,9—7,9	6,4—9,4	7,7±0,2
Тирозин	2,5—3,6	2,4—5,0	2,9—3,3	2,7—3,7	3,1±0,2
Фенилаланин	4,5—7,1	4,7—5,7	4,3—6,8	4,9—7,9	5,6±0,4
Сумма, *мг/л* в день	0,9—1,1 (4)	1,0—1,2 (3)	5,7—8,9 (3)	7,6—8,3 (2)	—

Аминокислоты	27-я стадия					
	1	2	3	4	5	$M \pm m$
	$n=240$	$n=210$	$n=80$	$n=80$	$n=80$	
Лизин	7,1—9,6	7,2—8,6	7,2—7,8	8,0—8,1	6,8—9,0	7,9±0,2
Гистидин	1,8—3,2	2,2—3,0	1,8—3,6	2,0—2,5	1,8—2,3	2,4±0,2
Аргинин	5,6—6,9	6,8—8,4	3,8—6,9	5,2—7,0	6,1—6,5	6,4±0,3
Аспарагиновая	8,8—12,3	8,9—11,7	10,0—11,7	9,6—11,7	9,9—12,3	10,6±0,3
Треонин	6,8—9,6	6,7—7,2	6,8—7,7	6,7—8,6	6,7—8,7	7,4±0,2
Серин	5,0—7,3	5,0—5,9	5,5—6,7	5,2—6,7	5,1—7,3	5,8±0,2
Глутаминовая	9,9—13,3	10,3—13,8	10,4—14,0	10,7—12,7	11,5—11,9	11,9±0,4
Пролин	4,3—8,6	4,8—6,6	4,6—5,5	4,8—5,9	4,8—5,3	5,5±0,3
Глицин	6,6—7,8	6,1—7,0	6,3—7,5	6,2—9,4	7,0—8,1	7,1±0,2
Аланин	7,1—8,1	6,8—8,7	6,9—8,8	7,2—8,3	6,9—9,0	7,8±0,2
Валин	4,8—6,5	5,3—6,5	5,5—6,5	6,0—6,1	5,1—6,0	5,7±0,1
Изолейцин	3,9—5,1	3,9—5,1	4,2—4,5	4,0—4,5	4,0—4,7	4,4±0,1
Лейцин	6,4—8,3	6,7—8,5	6,5—7,6	6,4—8,2	6,9—7,8	7,3±0,2
Тирозин	2,6—4,1	2,8—3,7	2,2—4,0	2,4—3,9	2,8—3,4	3,2±0,2
Фенилаланин	4,4—7,3	4,0—6,3	4,6—7,1	4,7—6,3	3,3—6,4	5,7±0,3
Сумма, *мг/л* в день	2,8—3,6 (5)	3,3—3,9 (4)	7,2—12,1 (3)	9,0—13,4 (2)	9,7—11,6 (2)	—

Аминокислоты	28-я стадия					
	1	2	3	4	5	$M \pm m$
	$n=120$	$n=120$	$n=80$	$n=80$	$n=40$	
Лизин	3,7—6,6	4,3—5,5	3,9—6,6	4,7—5,9	6,7	5,2±0,3
Гистидин . . .	1,4—1,8	1,4—2,0	1,4—2,0	1,2—1,7	1,8	1,6±0,1
Аргинин . . .	4,2—4,9	4,7—6,2	4,2—6,2	4,5—5,8	4,6	5,1±0,2
Аспарагиновая	11,1—12,3	10,8—12,1	10,9—12,1	11,5—11,5	11,4	11,6±0,1
Треонин . . .	9,8—10,3	7,2—10,4	7,0—10,8	7,6—9,4	9,7	9,2±0,4
Серин	6,0—7,3	5,5—6,1	5,6—7,3	5,5—6,2	6,5	6,2±0,2
Глутаминовая .	12,6—14,0	14,3—15,1	12,7—14,9	13,2—14,6	13,3	13,9±0,3
Пролин	4,7—6,1	4,1—6,1	4,1—6,6	4,5—5,7	5,7	5,2±0,2
Глицин . .	6,3—7,3	6,8—7,3	6,3—7,2	6,5—6,9	7,2	6,8±0,1
Аланин	6,8—7,2	5,9—7,4	6,4—7,4	7,1—7,2	7,4	7,0±0,1
Валин	5,5—6,2	5,7—6,0	5,5—6,2	5,8—5,9	5,6	5,8±0,1
Изолейцин . .	4,1—4,7	4,3—4,5	4,1—4,7	4,5—4,6	4,4	4,4±0,1
Лейцин	6,3—7,8	6,5—7,5	6,3—7,5	6,5—6,8	7,2	6,9±0,2
Тирозин . . .	2,3—3,4	2,3—5,4	2,2—3,6	2,7—3,7	3,0	3,2±0,3
Фенилаланин .	4,9—9,8	5,6—7,1	4,9—7,1	4,7—8,4	4,6	6,2±0,5
Сумма, *мг/л* в день . . .	1,9—2,1 (3)	1,9—2,1 (3)	3,1—4,0 (3)	3,8—4,7 (2)	5,1 (1)	—

Примечания: 1. n — количество животных в аквариумах.
2. В скобках — количество аквариумов.

Результаты и их обсуждение

Общее количество белково-пептидных веществ, выделяемых за день у изученных нами популяций, значительно различалось. Так, головастики 26-й стадии двух первых популяций за один день выделяли в окружающую среду ~1 *мг* белково-пептидных веществ, а за это же время головастики третьей и четвертой популяций (взятые из природных водоемов на 26-й стадии) — 6—9 *мг* (см. таблицу).

В «воде скоплений» головастиков 27-й стадии первой и второй популяций накапливалось за день около 3, а третьей, четвертой и пятой — 7—13 *мг* белково-пептидных веществ; у головастиков 28-й стадии первой и второй популяций — приблизительно 2, а третьей, четвертой и пятой — 3,5 *мг* этих же веществ. То есть, на всех изученных стадиях количество пептидных веществ в водной среде головастиков из природных водоемов было значительно выше, чем в водной среде головастиков, выросших в лаборатории. Очевидно, это связано с большой разницей в весе животных, взятых из природных водоемов и выросших в лаборатории. По данным Н. Л. Ивановой (1975), вес головастиков, содержащихся в условиях оптимальной и повышенной плотности, может отличаться в 5—6 раз.

При сравнении аминокислотного состава белково-пептидных веществ водной среды из популяций головастиков из разных

мест обитания достоверных различий не обнаружено. Таким образом, общее количество белково-пептидных веществ, выделяемых в воду, зависит от размеров головастиков. Аминокислотный состав их при этом остается без изменения.

Зависимость количества белково-пептидных веществ от стадии развития головастиков имеет одновершинный характер с максимумом на 27-й стадии. Во всех пяти популяциях максимальное выделение белково-пептидных веществ происходит на 27-й стадии развития, а на 28-й стадии начинается спад, соответствующий началу метаморфоза и связанной с ним потере веса.

Изменения в общем количестве белково-пептидных веществ на разных стадиях развития головастиков сопровождаются колебаниями их аминокислотного состава. Так, водная среда из популяций головастиков 26-й и 27-й стадий различалась по процентному содержанию лизина ($t=8{,}2$; $t_{st}=2{,}05$), гистидина ($t=2{,}11$), глутаминовой кислоты ($t=2{,}89$), пролина ($t=2{,}05$) и валина ($t=2{,}63$); водная среда из популяций головастиков 27 и 28-й стадий — по количеству лизина ($t=7{,}7$; $t_{st}=2{,}05$), гистидина ($t=4{,}7$), аргинина ($t=3{,}94$), аспарагиновой кислоты ($t=2{,}86$), треонина ($t=4{,}19$), глутаминовой кислоты ($t=4{,}35$) и аланина ($t=3{,}2$). Наконец, аминокислотный состав водной среды головастиков 26 и 28-й стадий отличался по процентному содержанию гистидина ($t=3{,}08$; $t_{st}=2{,}07$), агринина ($t=2{,}5$), аспарагиновой кислоты ($t=2{,}43$), треонина ($t=3{,}57$), аланина ($t=2{,}65$), валина ($t=3{,}33$) и лейцина ($t=2{,}76$).

Таким образом, результаты эксперимента на пяти популяциях головастиков остромордой лягушки подтвердили стадиоспецифичность водной среды из «загущенных» популяций головастиков по общему количеству белково-пептидных веществ и их аминокислотному составу.

ЛИТЕРАТУРА

Иванова Н. Л. Сравнительное изучение роста и развития личинок некоторых видов амфибий в контролируемых условиях. Автореф. канд. дисс. Свердловск, 1975.

Степанова З. Л. О химической природе выделяемых в воду продуктов метаболизма личинок земноводных.— Экология, 1974, № 3.

Степанова З. Л. Аминокислотный состав белковых веществ «воды скоплений» личинок земноводных.— Докл. АН СССР, 1975, т. 225, № 6.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НЕКОТОРЫХ ПРОБЛЕМ
ПОПУЛЯЦИОННОЙ ЭКОЛОГИИ · 1978

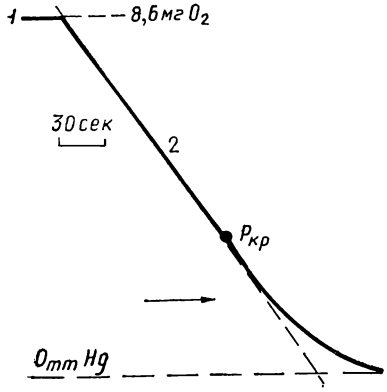
Л. А. КОВАЛЬЧУК, А. П. ЯСТРЕБОВ

О ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА ПОЛЯРОГРАФИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ОБМЕНА ЗЕМНОВОДНЫХ

Изучение процессов биологического окисления в организме в условиях нормы и патологии — важная практическая и теоретическая задача. В настоящее время трудно назвать область биологии, в которой не ощущалась бы необходимость в достоверной информации о параметрах кислородного обмена той или иной системы, органов, тканей или клеток организма. Не является исключением и информация о кислородном обмене земноводных.

Исследование окислительного обмена у амфибий сводится обычно к измерению интенсивности газообмена у взрослых особей в условиях относительного покоя. Для этого используются оптико-акустические газоанализаторы, позволяющие измерять малые концентрации CO_2 в газовых смесях, камеры Н. И. Калабухова. Изучение потребления кислорода у животных по разнице давлений в приборе основано на методике Почопко. Определение интенсивности дыхания у личинок земноводных проводится также in vitro, на тканевых срезах, гомогенатах манометрическим методом (Madhu и др., 1959; Вержбинская, 1960; Locker, Weich, 1969; Smith, 1973). Однако все эти методы несовершенны. Так, методы, в которых используются различные газоанализаторы для определения потребления кислорода, мало эффективны в условиях исследования газообмена у амфибий. Это связано с невозможностью строгого учета условий мышечной активности. Кроме того, исследования по этим методикам должны выполняться на группе животных, что также может привести к ошибочным результатам. Исследования на гомогенатах и тканевых срезах с применением манометрических методов не всегда соответствуют реально протекающим окислительным процессам в условиях in vivo.

Важнейшим источником энергии у животных являются процессы биологического окисления и образования макроэргических



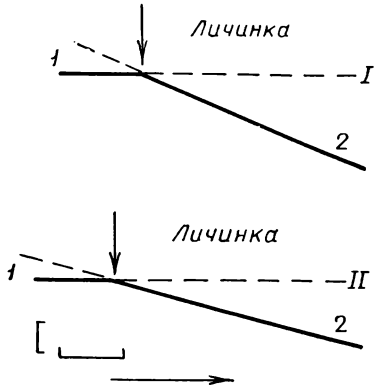


Рис. 1. Запись падения величины диффузионного тока в процессе инкубации личинки амфибии.

1 — содержание кислорода в водной среде; *2* — потребление кислорода личинкой; $P_{кр}$ — критическое давление кислорода в среде.

Рис. 2. Полярографическая запись дыхания личинки (25-я стадия развития, вес 0,06 *г*). Масштаб: по горизонтали 30 *сек*, по вертикали 0,008 *мг/мл* O_2.

1 — дрейф электрода; *2* — дыхание личинки; *I* — потребление кислорода личинкой до инкубации с амиталом; *II* — амиталрезистентное дыхание головастика.

соединений в дыхательной цепи. В настоящее время получено значительное число доказательств, свидетельствующих о том, что в интактном организме осуществляется регулируемое динамическое равновесие между фосфорилирующим и свободным дыханием. В связи с этим вопрос о качественной стороне дыхания может быть решен лишь с учетом сопряженного с дыханием процесса окислительного фосфорилирования. Следует, однако, отметить, что в работах, в которых приводятся данные о потреблении кислорода пойкилотермными животными, практически отсутствуют сведения о степени сопряженности дыхания с фосфорилированием.

Неполно освещен в литературе вопрос о динамике дыхания, о процессах окисления и фосфорилирования в развивающемся организме пойкилотермных животных. Не отражены в экологической литературе и такие вопросы, как особенности энергетического обмена и роль свободного окисления в процессах роста пойкилотермных. Между тем, в настоящее время изучать интенсивность обмена с целью выявления экологических и видовых различий обмена у животных без его энергетической оценки недостаточно. Мы считаем, что медленное накопление результатов по этим важным вопросам объясняется методическими трудностями, вызванными созданием разнообразных респирометров, необходимых для проведения экспериментов на водных животных.

Таблица 1

Потребление кислорода бесхвостыми амфибиями

Вид	Вес, *г*	Средняя температура опыта, °С	Количество потребленного O_2, *мл* на 1 *г* сырого веса в час	Метод определения дыхания	Источник
Rana esculenta	16	—	0,07	Модифицированная методика Почопко	Северцов, Соколов, 1972
Pelobates fuscus	16	—	0,176	То же	То же
Bufo viridis	24	—	0,18	»	»
Rana ridibunda	2,4	25	0,11	Респирационная камера	Бескровный, 1952
То же	13,0	—	0,18	То же	То же
Rana pipiens	—	20	0,07	—	Shield, Bentley, 1973
R. temporaria . . .	—	24	0,24	Респирационная камера	Чугунов, Киспоев, 1968
R. ridibunda	—	21	0,12	То же	Чугунов, Киспоев, 1973
Bufo viridis	—	14	0,23	Респирационная камера	»
Rana arvalis	0,16	24	0,14	Полярографическая ячейка	Наши данные
R. camerani	0,38	—	0,15	То же	То же
Bombina orientalis . . .	0,09	—	0,28	»	»

Наш способ изучения окислительного метаболизма земноводных основан на использовании полярографического метода определения кислорода в водной среде. В конструкцию полярографической ячейки, с помощью которой осуществляется инкубация митохондрий или гомогенатов (Chance, Williams, 1956), были внесены некоторые изменения, позволяющие проводить измерения потребления кислорода у интактных животных. Ячейка, в которую помещается личинка земноводных, была сконструирована таким образом, чтобы ограничить до минимума произвольную подвижность испытуемого животного. Подвижная пробка, пришлифованная к входному отверстию в ячейке и создающая надежную герметизацию, регулирует объем инкубационной среды в ячейке и служит одновременно проводником для индика-

Вид животных	1*	2	3	4
Rana arvalis (г. Свердловск)	41±2,9	24±3,1	24±2,8	25±0,7
R. temporaria (п-ов Ямал)	42±2,7	33±2,9	25±4,2	25±4,0
R. camerani	49±0,9	35±2,1	30±1,1	25±1,0
Bombina orientalis . . .	36±4,1	33±2,0	32±2,0	32±1,0

* 1—7 — стадии развития: 25-я (1), 26-я (2), 27-я (3), 28-я (4), 29-я (5), 30-я (6)

торного электрода сравнения, в качестве которого мы использовали вращающийся открытый платиновый электрод, осуществляющий равномерное перемешивание инкубационной среды. Предельный ток диффузии в ячейке до помещения животного и падение тока в результате потребления O_2 личинкой амфибии в инкубационной среде регистрировали на полярографе ОН-102. По падению диффузионного тока производили расчет потребления кислорода личинкой амфибии за единицу времени (рис. 1).

С помощью предлагаемой нами методики исследован окислительный метаболизм личинок различных видов амфибий. Величины потребления O_2 личинками получены на основании изучения дыхания не менее 20 амфибий каждого вида (табл. 1). Они близки к величинам, полученным другими исследователями. Следует подчеркнуть, что в наших опытах определялось потребление кислорода только сеголетками амфибий, другие же исследователи экспериментировали на взрослых особях (см. табл. 1).

При расшифровке полярограмм, полученных при исследовании дыхания личинок амфибий, выявляется важное обстоятельство. Линейное падение величины диффузионного тока наблюдается лишь до определенных величин, после чего запись приобретает вид экспоненты. Последнее связано с изменением характера потребления кислорода личинкой. Уровень pO_2, регистрируемый в точке перехода прямой в экспоненту, соответствует критическому давлению кислорода ($P_{кр}$), ниже которого потребление кислорода падает.

Регистрация величины критического давления при изучении обмена земноводных имеет самостоятельный интерес. На значения $P_{кр}$ влияют многие внешние и внутренние факторы, в связи с чем эта величина даже при изучении только одного вида не является постоянной. Так, $P_{кр}$ одного и того же вида изменяется в условиях различной плотности содержания популяции, а также зависит от концентрации кислорода в среде обитания. Установлено, что животные, находившиеся длительное время в среде

Таблица 2

в онтогенезе у бесхвостых амфибий, %

5	6	7	Критерий достоверности различий между стадиями (t)					
			1—2	2—3	3—4	4—5	5—6	6—7
36±4,0	37±3,3	52±4,6	5,9	0,0	0,3	2,7	0,2	2,6
40±3,0	42±2,2	45±3,1	2,3	1,6	0,0	3,0	0,5	0,8
38±2,1	43±1,1	43±1,1	6,4	2,2	3,4	5,6	2,1	0,0
43±4,0	49±6,0	50±6,0	0,7	0,4	0,8	2,7	0,8	0,1

и 31-я (7).

с высоким содержанием кислорода, поглощают его в бо́льшем объеме и имеют более высокие значения $P_{кр}$, чем животные, адаптированные к условиям гипоксии (Walshe, 1948). Поскольку предлагаемый нами метод позволяет получить достоверную величину $P_{кр}$ у амфибий, то анализ этих величин дает ценную информацию об условиях обитания животных, о механизмах адаптации разных видов к низкому содержанию кислорода в среде.

Нам не известны исследования, пытающиеся сопоставить данные, полученные на пойкилотермных in vitro, с условиями протекания окислительных процессов in vivo. Хотя известно, что на ход биохимических процессов в ткани оказывает существенное влияние целостность гистологических структур, а также действие регулирующих эти процессы факторов.

Исследование амиталрезистентного и амиталчувствительного дыхания позволяет в известной мере оценить соотношение двух путей дыхания — свободного и фосфорилирующего. Амитал блокирует значительную часть фосфорилирующего дыхания, в то время как свободное дыхание оказывается резистентным к его действию. Последнее связано с избирательной способностью амитала ингибировать окисление НАД-Н внутри митохондрий, где сосредоточен основной объем фосфорилирующего окисления (Ernster и др., 1955; Ernster, 1956; Ивашкина, 1964). О возможности изучения свободного и фосфорилирующего дыхания с помощью амитала на теплокровных животных in vivo говорится в работе С. П. Маслова и И. Н. Ивашкиной (1964). Получены данные о величинах амиталрезистентного и амиталчувствительного дыхания на отдельных тканях в условиях in vivo (Ястребов, 1972). Мы полагаем, что исследование амиталчувствительного и амиталрезистентного дыхания может быть вполне применимо для изучения состояния свободного и фосфорилирующего дыхания у пойкилотермных животных. Техника выполнения этих исследований простая, что дает возможность за короткое время

получить важную информацию о состоянии окислительного метаболизма. Определение амиталрезистентного и амиталчувствительного дыхания проводится на одном и том же животном без повреждения его гистологических структур. Предварительно замеряется величина потребления кислорода личинкой амфибии в исходной водной среде. Затем личинка в течение 6 *мин* инкубируется в этой же среде, куда добавляется 0,2 *мг/мл* амитала. Разность между величинами дыхания амфибии, полученными до инкубации и после инкубации с амиталом, является амиталчувствительным дыханием, которое можно рассматривать как фосфорилирующее дыхание (рис. 2). Высокая устойчивость дыхания животного к тормозящему действию амитала свидетельствует о преимущественной активности свободного дыхания.

Нами проведены исследования амиталчувствительного дыхания у личинок амфибий на разных этапах их развития. Анализ полученных результатов (табл. 2) свидетельствует о том, что величина амиталчувствительного дыхания изменяется в процессе развития каждого из исследуемых видов амфибий. На первых этапах развития (26—28-я стадии) уровень амиталрезистентного дыхания выше, чем амиталчувствительного. Возможно, что в этот период высокий уровень свободного окисления необходим для поддержания восстановительных синтезов в клетках развивающегося организма за счет субстратов, образующихся в процессе окисления (Ernster, 1957; Ernster, Lindberg, 1957; Glerici и др., 1960; Скулачев, 1962). На более поздних этапах развития амфибий сильно возрастает объем амиталчувствительного дыхания, что, видимо, связано с потребностью амфибий в этот период иметь количество энергии, необходимое для поддержания их возрастающей физиологической активности.

Применение предлагаемой методики позволило нам получить точные данные о потреблении O_2 амфибиями на разных этапах их индивидуального развития, а также подойти к оценке энергетической эффективности дыхания.

Исследование дыхания личинок земноводных данным методом имеет несомненные преимущества, так как является высокочувствительным и позволяет оценить изменение дыхания животного в условиях, близких к физиологическим. Метод дает возможность определить потребление кислорода личинками амфибий при различных исходных уровнях pO_2 в водной среде, что наиболее соответствует истинным параметрам содержания личинок в естественных условиях.

Использование амитала натрия для обнаружения амиталрезистентного дыхания дает возможность исследовать соотношение фосфорилирующего и свободного окисления в условиях in vivo у личинок амфибий. Апробированный на личинках амфибий метод, по-видимому, найдет широкое применение в эколого-биохимических исследованиях при изучении метаболизма различных мелких водных животных.

ЛИТЕРАТУРА

Бескровный М. А. Зависимость некоторых эколого-физиологических особенностей лягушки озерной (*Rana ridibunda*) от температуры и света.— Зоол. ж., 1952, т. 31, № 3.

Вержбинская Н. А. Окислительное фосфорилирование в мозгу позвоночных *in vivo*.— Фосфорилирование и функция. Л., ИЭМ, 1960.

Ивашкина И. Н. Метод изучения активности свободного дыхания на интактных животных с помощью амитала.— Теплообразование в организме. Материалы научн. конф. по проблеме «Биоэнергетика». Киев, «Наукова думка», 1964.

Маслов С. П., Ивашкина И. Н. Исследование соотношения свободного и фосфорилирующего дыхания *in vivo* с помощью амитала.— Вопросы мед. химии, 1964, т. 10, вып. 1.

Северцов А. С., Соколов Е. В. Дыхание бесхвостых амфибий и его роль в эволюции низших наземных позвоночных.— Зоол. ж., 1972, т. 51, вып. 9.

Скулачев В. П. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. М., Изд-во АН СССР, 1962.

Франк Г. М., Кондрашова М. Н. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. М., «Наука», 1973.

Чугунов Ю. Д., Киспоев К. А. Суточный ритм потребления кислорода у травяной лягушки (*R. temporaria*).— Зоол. ж., 1968, т. 47, вып. 12.

Чугунов Ю. Д., Киспоев К. А. Дыхание земноводных. Новосибирск, «Наука», 1973.

Ястребов А. П. О роли гипоксии в механизме регенерации крови. Автореф. докт. дисс. Свердловск, 1972.

Chance B., Williams G. R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation.— Adv. Enzymol., 1956, vol. 17.

Clerici E. E., Guidotti G., Sambo G., Bazzano E. Oxidative phosphorilation and amino acid incorporation into protein in regeneration rat liver.— Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1960, vol. 105.

Ernster L. Organization of mitochondrial DPN-linked systems. 11 Reculation of alternative electron transfer patways.— Exp. Cell. Res., 1956.

Ernster L. Distribution and interaction of enzymes within animal cells.— Biochem. j., 1957, vol. 65.

Ernster L., Lindberg O. Animal mitochondria.— Physiol. Rev., 1958, vol. 20.

Ernster L., Low H., Lindberg O. The action of 5—ethyl—5 isoamilbarbiturate (amital) on the oxidation of reduced diphosphopyridine nucleotide (DPNH—) in rat liver mitochondria.— Acta chem. scand., 1955, vol. 9.

Locker A., Weich P. Beziehungen zwischen Sauerstoffverbrauch wachstum und Körpergröße wahrend der Larvenentwicklung und Metamorphose von *Rana temporaria*.— Biologisches zentralblatt, 1969, vol. 88.

Madhu S., Kanugo C., Ladd Prosser. Physiological and Biochemical adaptation of Goldish to cold and warm temperatures.— J. cellular comparative physiol., 1959, vol. 54.

Shield J. W., Bentley P. J. Respiration of some urodele and anuran amphibia in water, role of skin and gills.— Comp. Biochem. Physiol., 1973, vol. A 46, N 1.

Smith C. L. The temperature dependence of oxidative phosphorylation and of the activity of various enzyme systems in liver mitochondria from cold and warm blooded animals.— Comp. Biochem. Physiol., 1973, vol. 46, N 3.

Walshe B. M. The Oxygen reguirements and thermal resistance of chironomid larvae from flowing and from still waters.— J. Exper. Biol., 1948, vol. 25.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НЕКОТОРЫХ ПРОБЛЕМ
ПОПУЛЯЦИОННОЙ ЭКОЛОГИИ · 1978

Л. А. КОВАЛЬЧУК

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ ГОЛОВАСТИКОВ ПРИ ХРАНЕНИИ В ВИДЕ ЛИОФИЛИЗАТА ВОДНОЙ СРЕДЫ

В поисках методов концентрирования и выделения регулирующих экзометаболитов был получен лиофилизат водной среды и установлена специфичность его действия на обмен и скорость метаморфоза головастиков в зависимости от стадии развития личинки, степени генетического родства ее с донором и плотности популяции (Рункова и др., 1975; Ковальчук, Рункова, 1976).

В настоящей статье представлены результаты изучения регуляторных свойств лиофилизата водной среды головастиков при хранении его в условиях низких температур.

Материал и методика

В качестве объекта исследования мы использовали три вида амфибий: остромордую лягушку (*R. arvalis*), закавказскую лягушку (*R. camerani* Boul.) и дальневосточную квакшу (*Hyla japonica* Boul.). Через месяц, с момента формирования популяции, получали лиофилизат с помощью промышленной установки KS-30 фирмы Frigera (ЧССР) из водной среды «загущенной» популяции головастиков. Поставлено четыре серии опытов (табл. 1 и 2) по плану ПФЭ типа 2^2 и 2^3 (Максимов, Федоров, 1969).

В первой серии (после семи дней хранения препарата при температуре 0+3° С) изучали общее потребление кислорода и фосфорилирующее окисление головастиков *R. arvalis* на 26-й и 27-й стадиях развития из своей (x_2) и чужой кладки (x_3) при выдерживании личинок в растворе лиофилизата и отстойной водопроводной воде (x_1). Во второй серии (после тридцати восьми дней хранения лиофилизата) определяли те же показатели у головастиков своего и чужого (x_2) вида при выдерживании личинок в растворе лиофилизата и отстойной водопровод-

Таблица 1

Независимые переменные и их уровни

Уровень	Инкубационная среда в ячейке $\tilde{x}_1$	Вид реципиента и стадия его развития $\tilde{x}_2$	Кладка и стадия развития реципиента $\tilde{x}_3$
	Первая серия		
Верхний (+)	Лиофилизат (0,05 *мг* белка в 1 *мл*)	*R. arvalis*, 26-я	Своя
Нижний (—)	Отстойная водопроводная вода	*R. arvalis*, 27-я	Чужая
	Вторая серия		
Верхний (+)	Лиофилизат (0,05 *мг* белка в 1 *мл*)	*R. arvalis*, 28-я	Чужая
Нижний (—)	Отстойная водопроводная вода	*R. camerani*, 28-я	—
	Третья серия		
Верхний (+)	Лиофилизат (0,05 *мг* белка в 1 *мл*)	*R. arvalis*	Чужая, 27-я
Нижний (—)	Отстойная водопроводная вода	*H. japonica*	29-я

ной воде (x_1). В третьей серии (после шестидесяти дней хранения препарата) исследовали дыхание и фосфорилирующее окисление головастиков 27-й и 29-й стадий развития (x_3) своего и чужого вида (x_2) при выдерживании личинок в растворе лиофилизата и водопроводной отстойной воде (x_1). Во всех трех сериях лиофилизат содержал 0,05 *мг* белка и 1 *мл* водной среды.

В четвертой серии видоспецифичность действия лиофилизата изучалась при выдерживании головастиков в растворе с повышенной концентрацией экзобелка (0,2 *мг* в 1 *мл* водной среды). Общее потребление кислорода и фосфорилирующее окисление регистрировались полярографическим методом (см. статью Л. А. Ковальчук и А. П. Ястребова в наст. сборнике).

Расчетные (y) данные, полученные на основе экспериментальных уравнений регрессии для всех поставленных серий, представлены на рис. 1 и 2. Все исследования проводились на личинках амфибий in vivo в условиях, близких к физиологическим. Стадии развития головастиков определялись по упрощенной классификации П. В. Терентьева (1950).

Результаты опытов и их обсуждение

При изучении регулирующих свойств лиофилизата после семи дней хранения при температуре 0+3° С получены следующие уравнения регрессии:

Таблица 2

Дыхание и объем фосфорилирующего окисления (амиталчувствительное дыхание) у личинок *R. arvalis* и *R. camerani*, подвергнутых воздействию лиофилизата с повышенной концентрацией белка

Натуральные независимые переменные			Инкубационная среда в полярографической ячейке $\hat{x}_1$				Вид реципиента $\hat{x}_2$			
Верхний уровень (+)			Лиофилизированная водная среда (0,2 *мг/мл* белка)				*R. arvalis*			
Нижний уровень (—)			Отстойная водопроводная вода				*R. camerani*			
Кодированные переменные			Потребление кислорода							
			до введения амитала в Н *г-атомах* на 100 *мг* сырого веса в *мин*				амиталчувствительное дыхание, % к исходному			
№ варианта	x_1	x_2	y_1	y_2	y_3	$\bar{y}$	y_1	y_2	y_3	$\hat{y}$
1	—	—	22,0	24,0	19,0	21,7	39,2	34,0	43,5	38,9
2	+	—	22,1	26,2	24,0	24,1	29,5	32,0	29,0	30,2
3	—	+	18,0	20,0	23,0	20,3	10,5	11,0	10,2	10,6
4	+	+	18,5	22,1	20,0	20,2	38,0	34,2	35,0	35,7

Примечание. Статистические показатели: $b_0=21,6$; $b_1=0,6$; $b_2=-1,3$; $b_{1,2}=0,6$; $S^2\{y\}=1,7$; $tS\{b_i\}=1,38$ (общее потребление кислорода); $b_0=28,9$; $b_1=4,1$; $b_2=-5,7$; $b_{1,2}=8,5$; $S^2\{y\}=2,4$; $tS\{b_i\}=1,8$ $y=28,9+4,1x_1-5,7x_2+8,5x_1x_2$ (амиталчувствительное дыхание), где b — коэффициент регрессии; $S^2\{y\}$ — дисперсия воспроизводимости среднего значения; t — критерий достоверности (Стьюдента); $S\{b_i\}$ — ошибка определения.

$y=62,3+11,0x_1x_2-7,3x_1x_3$, $tS\{b_i\}=4,5$; $S^2_{ад}=51<FS^2\{\bar{y}\}=99,8$ (общее потребление кислорода); $y=40,0-9,1x_3+4,9x_2x_3-3,1x_1x_2x_3$, $tS\{b_i\}=4,3$; $S^2_{ад}=69<FS^2\{\bar{y}\}=98$ (амиталчувствительное или фосфорилирующее дыхание).

Анализ уравнений показывает, что действие лиофилизата после таких условий хранения стадиоспецифично и специфично на уровне семьи по отношению и к общему потреблению кислорода, и к амиталчувствительному дыханию (b_{12}, b_{13}, b_{23} и $b_{123}>tS\{b_i\}$). Лиофилизированная водная среда из «загущенной» популяции головастиков *R. arvalis* слабо ингибирует дыхание интактной личинки из своей кладки на 27-й стадии развития и резко подавляет на той же стадии дыхание головастика из чужой кладки (см. рис. 1, *I*). Обратное влияние оказывает тот же лиофилизат по отношению к тому же показателю на 26-й стадии развития (см. рис. 1, *I*).

Амиталчувствительное дыхание данным лиофилизатом незначительно ингибируется у личинок своей кладки и активируется — у личинок чужой кладки на 27-й стадии развития (см. рис. 2, *I*). Обратные отношения, а также отношения, по-разному

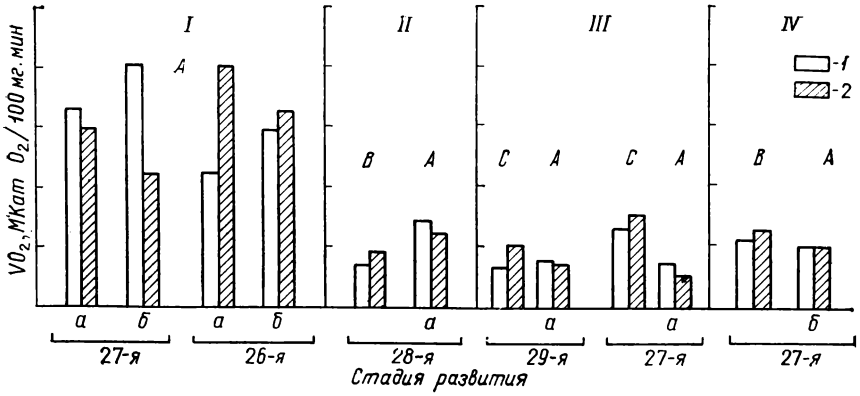


Рис. 1. Общее потребление кислорода у головастиков *R. arvalis* (*A*), *R. camerani* (*B*) и *Hyla japonica* (*C*) после четырехчасового выдерживания в водной среде из «загущенных» популяций без лиофилизата (*1*) и с добавлением его (*2*).

I — 7 дней хранения препарата при 0+3° С, концентрация белка 0,05 *мг/мл*; *II* — 38 дней хранения лиофилизата, концентрация та же; *III* — 60 дней со дня выделения лиофилизата из водной среды личинок *R. arvalis*, концентрация та же; *IV* — 40 дней хранения лиофилизата, концентрация белка 0,2 *мг/мл*; *б* — своя кладка, *а* — чужая кладка.

выраженные в зависимости от принадлежности к кладке (см. рис. 2, *I*), наблюдаются, как показывают данные, на 26-й стадии развития.

При изучении регулирующих свойств лиофилизата водной среды после 38 дней хранения получены следующие уравнения:

$y=21{,}4+5{,}9x_2-1{,}9x_1x_2$, $tS\{b_i\}=0{,}7$; $S^2_{ад}=0{,}38<FS^2\{\bar{y}\}=2{,}1$ (общее потребление кислорода);

$y=38{,}6-2{,}5x_1-2{,}3x_2-8{,}0x_1x_2$ (амиталчувствительное дыхание).

Из этих уравнений видно, что лиофилизат, взятый на исследование через 38 дней хранения, сохраняет видоспецифичность своего действия по отношению к энергетическому обмену головастика ($b_{12}>tS\{b_i\}$). Общее потребление кислорода и объем фосфорилирующего окисления у личинок своего вида ингибируется, у личинок чужого вида, наоборот, активируется (см. рис. 1; 2, *II*).

В третьей серии опытов, проведенной 30 августа, при изучении лиофилизата после 60 дней хранения, получены уравнения:

$y=17{,}4+1{,}1x_1-4{,}5x_2+2{,}2x_3-2{,}3x_1x_2-0{,}6x_1x_2-3{,}1x_2x_3$, $tS\{b_i\}=0{,}6$; $S^2_{ад}=0{,}5<FS^2\{\bar{y}\}=2{,}2$ (общее потребление кислорода);

$y=35{,}3-11{,}5x_1+7{,}5x_3+8{,}1x_1x_2-8{,}1x_2x_3-0{,}7x_1x_2x_3$, $tS\{b_i\}=0{,}4$; $S^2_{ад}=0{,}11<FS^2\{\bar{y}\}=1{,}8$ (амиталчувствительное дыхание).

Анализ этих уравнений показывает, что разная направленность в действии лиофилизата по отношению к общему потреблению кислорода в зависимости от степени генетического род-

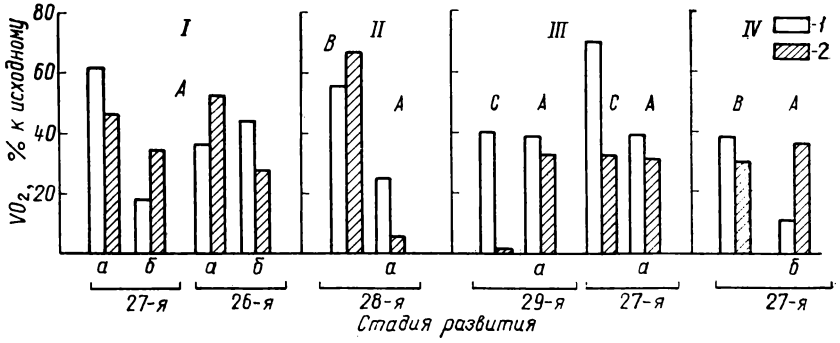


Рис. 2. Амиталчувствительное дыхание у личинок *R. arvalis*, *R. camerani* и *H. japonica* после четырехчасового выдерживания их в водной среде из «загущенных» популяций с добавлением лиофилизата и без него.

Обозначения те же, что на рис. 1.

ства между донором и реципиентом сохраняется и через 60 дней с момента лиофилизации. Стадио- и видоспецифичность влияния наблюдается по отношению к действию на фосфорилирующее окисление ($b_{12} > tS\{b_i\}$ для исходного дыхания, b_{12}, $b_{123} > tS\{b_i\}$ для амиталчувствительного). Лиофилизат увеличивает общее потребление кислорода у личинок чужого вида и не изменяет его у личинок своего вида (см. рис. 1; 2, *III*). При этом он ингибирует амиталчувствительное окисление у головастиков чужого вида и почти не изменяет его у особей своего вида. Эффект ингибирования сильнее выражен на 29-й стадии развития и слабее — на 27-й (см. рис. 2, *III*).

Наконец, в четвертой серии опытов при исследовании видоспецифичности действия лиофилизата с повышенной концентрацией (0,2 *мг/мл*) белка (см. рис. 1; 2, *IV*; табл. 2) также обнаружена разная направленность влияния препарата в зависимости от принадлежности реципиента к своему или чужому виду.

Таким образом, экзометаболиты из «загущенной» популяции головастиков *R. arvalis*, полученные в виде лиофилизата водной среды, сохраняют стадио-, видо- и кладоспецифичность действия по отношению к общему потреблению кислорода и амиталчувствительному дыханию интактной личинки в исследованные нами сроки хранения (через 7, 38 и 60 дней с момента лиофилизации).

Для экспериментального изучения стабильности в направленности специфического действия лиофилизата необходимо использовать стандартный реципиент. Лиофилизат, полученный 1 июля из популяции лифинок *R. arvalis*, испытывался в указанные нами сроки на головастиках разных стадий из модельных

популяций с неодинаковой возрастной структурой, в связи с чем направленность действия препарата не могла быть строго постоянной. Постановка исследований на стандартном реципиенте требует дополнительного поиска.

ЛИТЕРАТУРА

Ковальчук Л. А., Рункова Г. Г. К вопросу о регуляторных свойствах «лиофилизированной водной среды» из «загущенной» популяции головастиков *R. arvalis*.— Биологические науки, 1976, № 11.

Максимов В. Н., Федоров В. Д. Применение методов математического планирования экспериментов. М., Изд-во МГУ, 1969.

Рункова Г. Г., Ковальчук Л. А., Степанова З. Л. О перспективах выделения регулирующих экзометаболитов с помощью лиофилизации водной среды из «загущенных» популяций головастиков.— Докл. АН СССР, 1975, т. 223, № 5.

Терентьев П. В. Лягушка. М., «Сов. наука», 1950.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НЕКОТОРЫХ ПРОБЛЕМ
ПОПУЛЯЦИОННОЙ ЭКОЛОГИИ · 1978

Л. М. СЮЗЮМОВА, Н. П. ГЛИНСКИХ

ВОЗДЕЙСТВИЕ МЕТАБОЛИТОВ ЛИЧИНОК АМФИБИЙ НА РОСТ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

Известно, что продукты жизнедеятельности водных организмов являются регуляторами их роста и развития. Метаболический фон среды, включающий и вещества, по-видимому, белково-пептидной природы, оказывает специфическое действие на процессы тканевого метаболизма в организме, а «вода скоплений» в нативном виде или ее растворенный лиофилизат вызывают существенные изменения ферментативных процессов в гомогенатах и гиалоплазме тканей личинок (Рункова, 1974 а, б; Рудакова, 1974; Рункова и др., 1974; Рункова и др., 1975; Шварц и др., 1976). Установлено, что водная среда из «загущенных» популяций ускоряет регенерацию поврежденных тканей у активных животных (Шварц, Пястолова, 1970 а, б, в). На уровне клеток отмечено повышение пролиферативной и митотической активности эпителия роговицы (Амстиславская, 1971; Гатиятуллина, 1973).

Особый интерес представляет изучение непосредственного действия метаболитов личинок амфибий на клеточные культуры. Нами были проведены исследования в двух направлениях.

1. Изучение возможности межвидовых вариаций в действии метаболитов от личинок разных амфибий (остромордой лягушки Rana arvalis Nills., квакши *Hyla japonica Gunh.*, жерлянки *Bombina orientalis* Boul.;). В опыты были взяты пробы «воды скоплений» из аквариумов, где развивались личинки без смены среды в условиях относительно высокой групповой плотности («загущенности») — 10 животных на 1 *л*.

2. Изучение внутривидовых различий в эффекте действия метаболитов от животных разного происхождения (из разных кладок) и при разной концентрации метаболитов в среде. В этих экспериментах были испытаны метаболиты от личинок остромордой лягушки из двух кладок в следующих пробах: а) от «загущенных» животных в возрасте 16 дней, на 26—27-й стадиях развития при pH=7,2; б) от «загущенных» животных в возра-

Таблица 1

Рост клеточных культур (RH и HEp-2) в присутствии метаболитов личинок разных видов амфибий, %

Дата опыта	Продуцент метаболитов	Среда	RH			HEp-2		
			1*	2		1	2	
				первый день	третий день		первый день	третий день
3.VII 1974 г.	Остромордая лягушка	«Вода скоплений»	75	100	50	100	100	100
	То же	Контроль воды	100	100	50	100	100	100
	»	Контроль клеток	100	100	75	100	100	100
12.VII 1974 г.	Остромордая лягушка	«Вода скоплений»	—	75	50	—	100	50
	Жерлянка	То же	—	75	75	—	100	100
	Квакша	»	—	50	50	—	100	0 (полная дегенерация)
	То же	Контроль воды	—	75	75	—	100	100
	»	Контроль клеток	—	100	100	—	100	100

* 1 — образование монослоя на второй — третий день роста клеток; 2 — сохранение монослоя при нанесении материала на трехсуточную культуру.

сте 31 день на 26—28-й стадиях при pH=7,4; в) от «незагущенных» животных (одна личинка на 1 *л* среды) в возрасте 30 дней с еженедельной сменой среды на 27—28-й стадиях развития при pH=7,3. В контролях использованы пробы отстойной водопроводной воды, выдержанной в сосудах пять-шесть дней при pH=7,0—7,6.

Исследования проводили на культурах перевиваемых клеток: почки человека RH, опухоли HEp-2 и культуры фибробластов эмбриона человека на втором пассаже ФЭЧ.

Каждую пробу водной среды предварительно очищали от возможных механических примесей фильтрованием через обеззоленный бумажный фильтр и испытывали в двух вариантах опытов. В первом варианте 1 *мл* пробы вносили в 3 *мл* среды с соответствующей концентрацией клеток (RH — 140, HEp-2—110, ФЭЧ — 400 тыс. *мл*) и антибиотиков (пенициллин и стрептомицин по 500 *ед/мл*). Затем клеточную суспензию разливали по 1 *мл* в четыре пробирки. Во втором варианте опытов приготовленную клеточную суспензию в том же составе, как и в первом варианте, наносили на монослой трехсуточной клеточной культуры в объеме 1 *мл*. Оба варианта проводили с двумя контролями: контролем воды, где вместо воды скоплений в среду вно-

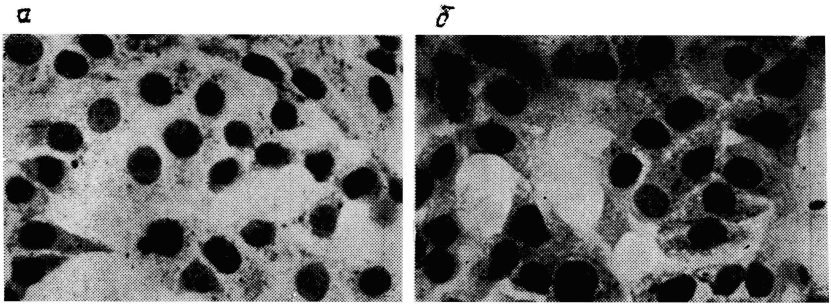


Рис. 1. Клетки HEp-2 на третий день после внесения испытуемой пробы (окраска гематоксилин-эозином); ×240.
а — контроль клеток; *б* — опыт с добавлением 25% «воды скоплений» остромордой лягушки.

сили отстойную воду, и контролем клеток, рост которых проходил в полной среде. Рост культур и, следовательно, действие привнесенных в среду компонентов учитывались по состоянию клеток и слоя в целом на второй, пятый и восьмой день экспериментов. Оценка давалась в процентах сохранения или образования монослоя и в конце опыта — прямым подсчетом клеток.

Результаты этих исследований показали, что существенных межвидовых отличий в действии метаболитов на рост культур клеток не наблюдается (табл. 1, рис. 1, *а, б*). Разные сроки сохранения монослоя в присутствии метаболитов от личинок жерлянки и квакши определялись только днями наступления дегенеративных изменений, которые к концу недели культивирования в этих средах были выражены практически во всех опытных пробах. Различия в росте клеток в опыте и в контроле в целом выражены достаточно убедительно. Сопоставление их показывает, что в появлении дегенеративных изменений клеток монослоя имеет значение не столько обеднение состава питательной среды, сколько действие самих метаболитов или тех веществ, которые имеются в «воде скоплений» и отсутствуют в отстойной воде. Устанавливаются и некоторые различия в чувствительности разных типов клеток. Опухолевые клетки HEp-2 оказались почти во всех опытах более стойкими к изменению состава среды, чем нормальные, хотя культура RH росла несколько хуже даже в контроле, видимо, за счет меньшего посевного материала.

Некоторые особенности воздействия метаболитов на уровне клетки выявляются при исследовании проб водной среды от личинок остромордой лягушки (табл. 2). Они свидетельствуют о том, что присутствие в среде роста метаболитов в первые сутки культивирования существенно не влияет на процесс формирования монослоя. Фаза прикрепления клеток к стеклу проходит в сроки, соизмеримые с контролями. Некоторое отставание в

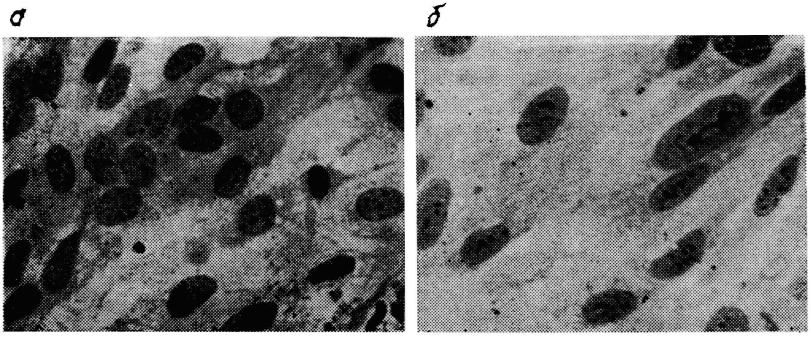


Рис. 2. Клетки ФЭЧ на пятый день после внесения испытуемой пробы (окраска гематоксилин-эозином); ×320.

а — контроль клеток; *б* — опыт с добавлением 25% «воды скоплений» от головастиков остромордой лягушки из кладки 5.

образовании монослоя в сравнении со временем появления его в полной среде, вероятно, связано с адаптацией клеток к изменившемуся составу питательной среды. Это отставание наблюдалось и в опытах, и в контрольных пробах с отстойной водой, т. е. там, где было разведение среды.

Можно считать, что воздействие собственно метаболитов начало проявляться в этих опытах только на третий — пятый день культивирования клеток (см. табл. 2, рис. 2, *а, б*). При этом введенная в среду «вода скоплений» от личинок ранних стадий и возраста действовала на клетки мягче, чем среда от животных той же кладки, но взятая в более поздние сроки. Так, вода скоплений от «загущенных» животных в конце мая вызывала дегенеративные изменения в клетках раньше, чем вода, взятая в начале мая (см. табл. 2). Ускоренное отмирание клеток проходило в присутствии проб, взятых в июле (см. табл. 1). Метаболиты личинок ранних стадий развития не препятствовали образованию и сохранению монослоя. В течение пяти-восьми суток без смены среды сохранялось хорошее состояние клеток.

Однако именно в этих пробах были отмечены различия в действии метаболитов животных из разных кладок. Метаболиты личинок из кладки 1 не вызывали разрушения монослоя, тогда как присутствующие в среде метаболитов личинки из кладки 5 способствовали развитию дегенеративных изменений в его клетках (см. табл. 2, опыт 1). Таким образом, отмечалась разная направленность действия метаболитов на клетки. «Вода скоплений» от «загущенных» личинок», вышедших из кладки 1, не только не проявляла угнетающего или токсического действия, но даже вызывала усиление роста культуры клеток в сравнении с контролем при оптимальной для этих клеток питательной среде. При этом повышение пролиферативной активности наблюдалось в

Таблица 2

Биологическое действие метаболитов личинок остромордой лягушки при их различной концентрации в среде на клеточные культуры, %

Характеристика материала	Первичная культура ФЭЧ				Перевиваемые клетки НЕр-2		Кратность прироста клеток (раз)
	Образование монослоя		Сохранение монослоя при внесении материала на трехсуточную культуру		Образование монослоя		
	пятый день	восьмой день	пятый день	восьмой день	пятый день	восьмой день	
Опыт 1 (7.V 1975 г.)							
«Вода скоплений» от «загущенных» личинок разных кладок							
Кладка 1 . . .	100	100	100 (повышенная пролиферация клеток)		100 (повышенная пролиферация клеток)	100 (усиление метаболизма клеток)	—
Кладка 5 . . .	75	100 (с явлениями дегенерации)	75	0	10 (дегенерация клеток)		—
Контроль воды	100		100		100		—
Контроль клеток	100		100		100		—
Опыт 2 (22.VII 1975 г.)							
«Вода скоплений» от личинок разных кладок и групповой плотности							
Кладка 1 («незагущенные») .	100		100		100 (повышенный метаболизм)		6,75
Кладка 5 («незагущенные») .	100		100		»		6,75
Кладка 1 («загущенные») . .	50 (дегенерация)		0 (выраженное цитотоксическое действие)		50 (дегенерация)		2,25
Кладка 5 («загущенные») . .	»		»		»		1,80
Контроль воды	100		100		100		4,50
Контроль клеток	100		100		100		5,40

обоих испытанных типах клеток — HEp-2 и ФЭЧ. Характерно, что при повторном исследовании в конце мая среды из этих же аквариумов эффект стимуляции роста полностью исчез.

Активирующий эффект метаболитов отмечен и в среде, взятой от «незагущенных» животных. Присутствие метаболитов здесь заметно стимулирует формирование монослоя и пролиферацию клеток (см. табл. 2, опыт 2). Эта активация убедительно выражена при сравнении с ростом клеток в контролях и особенно в опыте с «водой скопления» от родственных им «загущенных» (той же кладки).

Сопоставляя реакцию клеток разных типов на метаболиты, можно заметить, что пролиферативный эффект у клеток HEp-2 выражен резче, а явления ингибирования и дегенерации несколько слабее, чем у нормальных клеток RH и ФЭЧ.

Результаты исследований дают основание полагать, что эффект действия метаболитов на культуры клеток определяется концентрацией их в среде, с одной стороны, и периодом развития личинок, с другой. В больших концентрациях метаболиты оказывают токсический эффект, в малых — действуют как стимуляторы клеточной пролиферации. При этом цитотоксический эффект в определенной мере зависит от вида клеток. В наших опытах клетки RH, ФЭЧ и HEp-2 проявляли разную чувствительность к воздействию метаболитов. На поздних стадиях развития личинок в среде их обитания накапливаются метаболиты, где, по-видимому, имеются более токсичные для клеток вещества; повреждающее воздействие их может сохраняться и в низких концентрациях. Метаболиты в «воде скоплений» представлены в сложном комплексе, и расчленение его требует больших специальных исследований. Необходимость дальнейшего развития этих работ подчеркивается определением в настоящих исследованиях наличия в «воде скоплений» активных веществ, стимулирующих рост клеток.

ЛИТЕРАТУРА

Амстиславская Т. С. Влияние регуляторов роста и развития личинок земноводных на тканевый рост.— Экология, 1971, № 6.

Гатиятуллина Э. З. Явление гипертрофии и гиперплазии в процессе морфогенеза амфибий.— Вопросы герпетологии. Л., «Наука», 1973.

Рункова Г. Г. О влиянии метаболитов земноводных разной степени генетической близости на эндогенный метаболизм головастиков *Rana arvalis* в зависимости от стадии их развития и концентрации метаболитов.— Информ. материалы Ин-та экологии растений и животных УНЦ АН СССР, ч. 1. Свердловск, 1974а.

Рункова Г. Г. Экзо- и эндорегуляторы белково-пептидной природы в популяциях личинок земноводных и их функции.— Там же, 1974б.

Рункова Г. Г., Рудакова Т. И. О влиянии метаболитов водной среды головастиков *R. arvalis* на гликолитическую активность отдельных особей в популяции.— Там же, 1974.

Рункова Г. Г., Степанова З. Л., Ковальчук Л. А. Органоспецифичность в действии метаболитов личинок земноводных на их эндо-

генный метаболизм в условиях повышенной плотности популяций. Роль белка в регулирующем влиянии метаболитов.— Докл. АН СССР, 1974, т. 217, № 3.

Рункова Г. Г., Ковальчук Л. А., Степанова З. Л. О перспективах выделения регулирующих экзометаболитов с помощью лиофилизации водной среды из «загущенных» популяций головастиков.— Там же, 1975, т. 223, № 5.

Шварц С. С., Пястолова О. А. Результаты роста и развития личинок земноводных. Сообщ. 1. Специфичность действия.— Экология, 1970а, № 1.

Шварц С. С., Пястолова О. А. Регуляторы роста и развития личинок земноводных. Сообщ. 2. Разнообразие действия.— Экология, 1970б, № 2.

Шварц С. С., Пястолова О. А. Влияние метаболитов головастиков на скорость регенерации.— Докл. АН СССР, 1970в, т. 195, № 5.

Шварц С. С., Пястолова О. А., Добринская Л. А., Рункова Г. Г. Эффект группы в популяциях водных животных и химическая экология. М., «Наука», 1976.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НЕКОТОРЫХ ПРОБЛЕМ
ПОПУЛЯЦИОННОЙ ЭКОЛОГИИ · 1978

Н. Ф. ЗАВАДА

ОБЩАЯ АКТИВНОСТЬ, ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТЬ И КОЭФФИЦИЕНТ ВАНТ-ГОФФА СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В НЕКОТОРЫХ ТКАНЯХ ПОЛЕВОК С РАЗНОЙ СТЕПЕНЬЮ СПЕЦИАЛИЗАЦИИ

Адаптация к неблагоприятным условиям среды тесно связана с изменениями энергетического обмена (Калабухов, 1946; Шварц, 1963, 1969; Меерсон, 1973). Наглядно эта закономерность, детально изученная А. Д. Слонимом (1952) и другими исследователями, проявляется при исследовании адаптаций гомотермных животных к низкой температуре. Установлено, что длительное выдерживание животных в условиях охлаждения приводит к стойкому повышению газообмена или к появлению химической терморегуляции. Функция последней состоит в рефлекторном увеличении теплопродукции в ответ на усиливающийся процесс теплоотдачи организма. В общих чертах известны и биохимические основы химической терморегуляции. Наряду с увеличением скорости окислительных процессов наблюдается качественная перестройка метаболизма: происходит смена предпочитаемых субстратов окисления, уменьшается сопряженность окисления с фосфорилированием, что приводит к повышению уровня свободного окисления и увеличению процессов теплопродукции. Эти изменения и позволяют организму компенсировать усиленную теплоотдачу в условиях охлаждения, сохранять температуру тела постоянной (Ильин, Нейфах, 1956; Скулачев, 1958; Potter, 1958).

Существенную роль в регуляции окислительных процессов при понижении температур играет сукцинатдегидрогеназа (1.3.99.1), которая занимает ключевое положение в цикле Кребса. Это положение обусловлено главным образом двумя моментами: во-первых, относительно низкой концентрацией сукцината в клетках, вследствие чего скорость его окисления при определенных условиях может лимитировать скорость окисления во всем цикле Кребса (Gutfreund, Jones, 1964); во-вторых, высоким

сродством сукцинатдегидрогеназы к субстрату. Сукцинат окисляется значительно быстрее других НАД-зависимых субстратов (Кондрашова, 1969, 1970). Возникновение химической терморегуляции в условиях длительной акклимации к холоду сопровождается увеличением активности сукцинатдегидрогеназы (Hannon, 1960; Дерибас и др., 1969), что также свидетельствует о важной роли этого фермента в регуляции дыхания при пониженных температурах.

Однако вопрос о природе увеличения активности сукцинатдегидрогеназы при адаптации к холоду недостаточно изучен. По-видимому в процессе адаптации происходит изменение скорости синтеза фермента, так как повышение активности сукцинатдегидрогеназы сопровождается увеличением активности и других компонентов сукцинатооксидазного комплекса: убихинона, цитохромов *C* и *A* (Aithal, Joshi, 1968; Маслова и др., 1970). Такая сопряженность в изменении активности ферментов, принадлежащих к одной полиферментной системе, напоминает явление индуцированного синтеза ферментов.

О возможности ускорения синтеза сукцинатдегидрогеназы в условиях охлаждения животных свидетельствует и усиление биогенеза митохондрий (Меерсон, 1973), где локализован данный фермент. Однако при адаптации к холоду изменяется не только концентрация фермента, но и его свойства. У многих холоднокровных животных были отмечены изменения теплоустойчивости сукцинатдегидрогеназы (Серавин и др., 1965; Ирлина, 1967; Smith, 1973). Помимо теплоустойчивости, в процессе адаптации изменяется и сродство данного фермента к субстрату, что находит свое выражение в изменении коэффициента Вант-Гоффа и энергии активации (Woodhard, Zimny, 1973; Хаскин, 1975). Благодаря этим изменениям достигается более совершенная регуляция активности фермента в клетке.

В настоящей работе представлены результаты сравнительного изучения активности, теплоустойчивости и коэффициента Вант-Гоффа сукцинатдегидрогеназы печени и мышц близких форм полевок с разной степенью экологической специализации. Цель исследования — расширить имеющиеся данные об энергетическом обмене и биохимических путях адаптации этих форм животных к условиям Субарктики.

Материал и методика

В качестве объекта изучения использовали самок и самцов двух-, трехмесячного возраста седьмого-десятого поколений из модельных популяций, основатели которых были привезены из районов Среднего Урала (южные формы) и с п-ова Ямал (северные формы). Исследовали экономок (*Microtus oeconomus oeconomus* Pall., *Microtus oeconomus Chachlovi* Scalon), узко-

Таблица 1

Активность сукцинатдегидрогеназы в гомогенатах скелетных мышц южных и северных подвидов экономки при их экстремальном охлаждении после предварительной акклимации и без нее

Уровень	Независимые натуральные переменные				
	Подвид $\tilde{x}_1$			Температура в течение 9 дней до опыта $\tilde{x}_2$	Температура 20-минутного воздействия в опыте, ° С $\tilde{x}_3$
Верхний (+)	*M. oeconomus oeconomus*			+18	+18
Нижний (—)	*M. oeconomus Chachlovi*			0	—15
№ варианта	Кодированные переменные			ε/г сырого веса ткани	
	x_1	x_2	x_3	$\bar{y}$	$\bar{y}$
1	—	—	—	7,3	7,7
2	+	—	—	8,5	7,7
3	—	+	—	7,6	7,7
4	+	+	—	7,2	7,7
5	—	—	+	12,5	10,8
6	+	—	+	9,3	10,8
7	—	+	+	10,1	10,8
8	+	+	+	11,5	10,8

Примечание. Статистические показатели: $b_0=9,25$; $b_1=-0,12$; $b_2=-0,15$; $b_3=1,6$; $b_{12}=0,4$; $b_{13}=-0,3$; $b_{23}=0,1$; $b_{123}=-0,8$; $S^2\{y\}=8,21$; $tS\{b_i\}=1,52$; $y=9,25+1,6x_3$; $S^2_{ад}=0,12<FS^2\{\bar{y}\}=0,9$, где b — коэффициент регрессии; $S^2\{y\}$ — дисперсия; t—критерий достоверности; $S\{b_i\}$—ошибка определения b_i (для всех таблиц).

Таблица 2

Активность сукцинатдегидрогеназы в гомогенатах скелетных мышц южных и северных подвидов узкочерепной полевки в условиях нормы и экстремального охлаждения

Уровень	Натуральные независимые переменные				
	Пол $\tilde{x}_1$			Подвид $\tilde{x}_2$	Температура 20-минутного воздействия, $\tilde{x}_3$
Верхний (+)	Самка			*M. gregalis gregalis*	+18
Нижний (—)	Самец			*M. gregalis major*	—15
№ варианта	Кодированные переменные			ε/г сырого веса ткани	
	x_1	x_2	x_3	$\bar{y}$	$\bar{y}$
1	—	—	—	9,4	9,1
2	+	—	—	9,4	9,1
3	—	+	—	12,2	12,2
4	+	+	—	16,6	12,2
5	—	—	+	11,2	12,2
6	+	—	+	9,3	12,2
7	—	+	+	9,2	9,1
8	+	+	+	8,6	9,1

Примечание. Статистические показатели: $b_0=10,7$; $b_1=0,24$; $b_2=0,91$; $b_3=-1,16$; $b_{12}=0,71$; $b_{13}=-0,86$; $b_{23}=-1,58$; $b_{123}=-0,39$; $S^2\{\bar{y}\}=7,48$; $tS\{b_i\}=1,49$; $y=10,7-1,58x_2x_3$; $S^2_{ад}=3,86<FS^2\{\bar{y}\}=11,2$.

черепных полевок (*Microtus gregalis gregalis* Pall., *Microtus gregalis major* Ognev) и полевок Миддендорфа (*Microtus Middendorfi,* Poljakov). Поставлено пять серий опытов. В первой серии использовали план полного факторного эксперимента (ПФЭ) типа 2^3 (Максимов, Федоров, 1969). Изучали активность сукцинатдегидрогеназы (y) в гомогенатах скелетных мышц южных и северных (x_1) самцов экономки в условиях экстремального охлаждения ($\tilde{x}_3$) и длительной акклимации к холоду ($\tilde{x}_2$). Эксперимент ставился трижды. Независимые переменные и их уровни для первой серии приведены в табл. 1.

Вторая серия проведена с использованием этого же плана. Исследовали активность сукцинатдегидрогеназы в гомогенатах скелетных мышц у самок и самцов ($\tilde{x}_1$) южных и северных ($\tilde{x}_2$) узкочерепных полевок в условиях экстремального охлаждения ($\tilde{x}_3$). Независимые переменные и их уровни для второй серии представлены в табл. 2 (эксперимент ставился трижды).

В третьей серии использовали план ПФЭ типа 2^2. Исследовали влияние экстремального охлаждения ($\tilde{x}_2$) на активность сукцинатдегидрогеназы у самцов и самок ($\tilde{x}_1$) полевок Миддендорфа (табл. 3) в пятикратной повторности.

Четвертая серия проводилась по плану ПФЭ типа 2^2. Исследовалось влияние 30-минутной предынкубации ($\tilde{x}_2$) при температуре 56 и 37° С на активность сукцинатдегидрогеназы северных и южных ($\tilde{x}_1$) самцов узкочерепной полевки. Теплоустойчивость сукцинатдегидрогеназы характеризуется отношением активности фермента после 30-минутной предынкубации при температуре 56° С к его активности, определенной после 30-минутной предынкубации при температуре 37° С (табл. 4).

В пятой серии определяли коэффициент Вант-Гоффа (косвенный показатель энергии активации фермента) в гомогенатах печени южных и северных самцов узкочерепной полевки, а также в печени самцов полевки Миддендорфа в условиях физиологической нормы и экстремального охлаждения. Опыты ставили по плану классического, пассивного эксперимента (табл. 5).

Результаты всех серий статистически обработаны в соответствии с использованными планами (Урбах, 1963; Налимов, Чернова, 1965; Максимов, Федоров, 1969; Рункова, 1975). Активность сукцинатдегидрогеназы определялась тетразоловым методом по Куну и Абуда (Kun, Abood, 1949).

Животных обезглавливали, извлекали бедренную мышцу, взвешивали и гомогенизировали с 0,05 *М*-фосфатным буфером при pH=7,5. Гомогенат центрифугировали 30 *мин* при 10000 *q*, к осадку добавляли тот же буфер до получения 7,5%-ного гомогената. Инкубация 1 *мл* гомогената в присутствии 0,1 *мл* 0,3 *М* сукцината натрия, 0,1 *мл* 3%-ного 2, 3, 5-трифенилтетразолхлорида проводилась в течение двух часов при 37° С. Обра-

Таблица 3

Активность сукцинатдегидрогеназы в гомогенатах скелетных мышц полевки Миддендорфа в условиях нормы и экстремального охлаждения

Уровень	Натуральные независимые переменные			
	Пол $\tilde{x}_1$		Температура 20-минутного воздействия, °С $\tilde{x}_2$	
Верхний (+)	Самка		18	
Нижний (—)	Самец		—15	
№ варианта	Кодированные переменные		ε/г сырого веса	
	x_1	x_2	$\bar{y}$	$\bar{y}$
1	—	—	9,6	10,3
2	+	—	11,2	10,3
3	—	+	9,5	10,3
4	+	+	11,0	10,3

Примечание. Статистические показатели: $b_0=10,3$; $b_1=0,77$; $b_2=-0,07$; $b_{12}=-0,02$; $S^2\{y\}=6,5$; $tS\{b_i\}=1,24$.

Таблица 4

Реакция мышечной сукцинатдегидрогеназы узкочерепной полевки на тепловое воздействие

Уровень	Натуральные независимые переменные								
	Подвид $\tilde{x}_1$						Температура 30-минутной преинкубации гомогената, °С $\tilde{x}_2$		
Верхний (+)	*M. gregalis gregalis*						56		
Нижний (—)	*M. gregalis major*						37		
№ варианта	Кодированные переменные		Активность фермента, ε/г сырого веса ткани						
	x_1	x_2	y_1	y_2	y_3	y_4	y_5	$\bar{y}$	$\hat{y}$
1	—	—	12,9	12,2	12,7	12,7	11,5	12,0	11,6
2	+	—	10,4	16,3	9,6	9,2	10,6	11,2	11,6
3	—	+	7,5	5,6	6,2	6,4	6,8	6,5	6,5
4	+	+	6,4	9,5	5,8	5,5	5,3	6,5	6,5

Примечание. Статистические показатели: $b_0=9,05$; $b_1=-0,2$; $b_2=-2,55$; $b_{12}=0,2$; $S^2\{y\}=3,05$; $tS\{b_i\}=0,85$; $y=9,05-2,55x_2$.

зовавшийся формазан экстрагировали 96%-ным этанолом (3 *мл* на пробу). Спиртовый центрифугат формазана отделяли путем 15-минутного центрифугирования при 1500 *q* и спектрофотометрировали при длине волн 494 *нм*. Активность сукцинатдегидрогеназы выражена в экстинкциях на 1 *г* сырого веса ткани. Все операции при получении гомогенатов, в которых определялась активность сукцинатдегидрогеназы, проводили при температуре 0—2° С.

Таблица 5

Коэффициент Вант-Гоффа для сукцинатдегидрогеназы печени серых полевок при экстремальном охлаждении животных и в условиях физиологической нормы

№ варианта	Объект исследования	Температура 20-минутного воздействия, °С	n	$\bar{y} \pm m$	t	
1	*M. gregalis major*	—15	10	2,79±0,118	$t_{1,2}=1,66$	$t_{2,3}=4,98$
2	*M. gregalis gregalis*	—15	10	3,10±0,132	$t_{1,4}=2,38$	$t_{3,4}=4,36$
3	*M. Middendorfi*	—15	6	1,87±0,220	$t_{2,5}=0,04$	$t_{3,5}=3,74$
4	*M. gregalis major*	18	8	3,44±0,231	$t_{1,3}=3,96$	—
5	*M. gregalis gregalis*	18	8	3,11±0,207	$t_{4,5}=1,01$	—

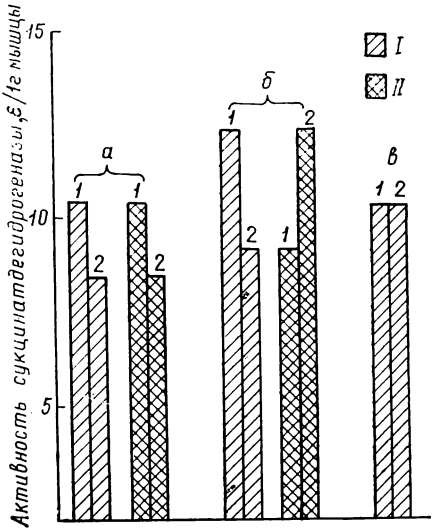
Коэффициент Вант-Гоффа находили по формуле: $Q_{10}=\frac{A_{10}}{A_{30}}$, где A_{40} — активность сукцинатдегидрогеназы при температуре инкубации 40° С, A_{30} — то же, после инкубации гомогената при 30° С. В первой и второй сериях параллельно с определением активности сукцинатдегидрогеназы измерялась ректальная температура полевок с помощью электротермометра ТЭМП-6.

Результаты опытов и их обсуждение

Резких различий в активности сукцинатдегидрогеназы у сравниваемых форм полевок не наблюдается, что, по-видимому, связано с генетической близостью изучаемых объектов (см. табл. 1). Среди трех исследованных нами видов (см. рисунок) лишь узкочерепная полевка незначительно отличалась от двух остальных по активности сукцинатдегидрогеназы. У северного подвида узкочерепной полевки она была выше, чем у двух других, а у южного подвида — ниже. Из этих данных следует, что внутривидовая изменчивость по сукцинатдегидрогеназе у узкочерепных полевок оказывается выше видовой. Несоответствие между степенью различий по тому или иному тесту и таксономическим положениям исследуемых видов нередко возникает при изучении близких форм животных и в ряде случаев хорошо объясняется экологическими особенностями сравниваемых форм (Шварц, 1963, 1969). Аналогичный эффект был обнаружен ранее М. В. Михалевым (1966), по данным которого электрофоретическая подвижность белков сыворотки существенно различалась не только у резко дифференцированных подвидов узкочерепной полевки, но и у морфологически очень близких подвидов полевки-экономки. В связи с этим для правильной оценки выявляемых различий необходимо комплексное изучение биохимических, морфологических и других особенностей у сравниваемых форм.

Поскольку сукцинатдегидрогеназа является одним из глав-

ных ферментов в цикле Кребса, то при анализе различий по ее активности первостепенное значение имеют аналогичные данные по дыханию. Исследованиями А. Д. Слонима (1952, 1964), С. О. Руттенбург (1953), А. И. Щегловой и др. (1969) показано, что виды с хорошо развитой химической терморегуляцией обладают большей способностью адаптироваться к перепадам температур окружающей среды. Таким образом, адаптация к низким температурам у них осуществляется за счет интенсификации обмена. Многочисленные экологические исследования, проведенные с использованием метода морфофизиологических показателей (Шварц, 1963, 1969), также позволили выявить более высокую степень интенсификации обмена у северных подвидов по сравнению с южными. Однако обнаруженная закономерность не распространялась на полярных животных. Химическая терморегуляция у них, по данным А. Д. Слонима (1952), развита незначительно.



Изменения активности сукцинатдегидрогеназы у полевок-экономок (*а*), узкочерепных полевок (*б*) и полевок Миддендорфа (*в*) после экстремального охлаждения.

1 — контрольные животные, *2* — после экстремального охлаждения; *I* — северные, *II* — южные формы животных.

Сравнительное изучение дыхания у близких форм полевок также показало, что его уровень у северных видов не выше, чем у южных. В частности, опытами Г. Б. Ливчак (1960, 1975) установлено отсутствие различий в интенсивности дыхания между северными и южными видами полевок близкого происхождения; в отдельных случаях уровень дыхания у северных форм был даже ниже, чем у южных. Снижение интенсивности потребления кислорода при действии низких температур трактуется Г. Б. Ливчак как направление адаптации полярных животных, идущее по пути экономии энергетических ресурсов организма. Эти данные согласуются с выводом С. С. Шварца (1963) о путях адаптации млекопитающих к условиям Субарктики.

Можно предположить, что внутривидовая изменчивость по сукцинатдегидрогеназе, выявленная у узкочерепной полевки, также имеет адаптивный характер и отражает более высокую степень интенсификации обмена у северного подвида. Однако общий уровень газообмена у него заметно не отличается от уровня газообмена у близких видов южного происхождения

(Ливчак, 1969). Поэтому различия по сукцинатдегидрогеназе, обнаруженные между двумя подвидами узкочерепной полевки, скорее всего связаны не с общим уровнем дыхания, а с его ферментативной регуляцией. Отчетливые видовые различия по активности сукцинатдегидрогеназы проявляются лишь при экстремальном охлаждении (см. рисунок). Активность этого фермента в мышцах экономок, независимо от принадлежности полевки к северному или южному подвиду, при экстремальном охлаждении падает ($b_3 > t \cdot Sb_i$), в мышцах южного подвида узкочерепной полевки увеличивается, северного подвида — снижается ($b_{23} > t \cdot Sb_i$), а в мышцах полевки Миддендорфа остается на уровне нормы ($b_3 < t \cdot Sb_i$).

Для трактовки полученных нами данных, вероятно, следует рассмотреть известные результаты исследований по изменению общего метаболизма в тканях при воздействии холодом.

Установлено, что экстремальное охлаждение организма приводит либо к наступлению адаптации, либо к развитию прогрессирующей гипотермии и смерти. Глемзером (цит. по Слониму, 1952) было показано, что при глубокой гипотермии у человека наблюдается снижение общего газообмена. По данным А. Д. Слонима (1952), у полевок, у которых сильно снижается температура тела при охлаждении, также не удается выявить химическую терморегуляцию. В наших опытах резкое снижение (примерно на 9°) ректальной температуры после экстремального охлаждения наблюдалось у полевки-экономки. Это дает основание считать изменения в активности сукцинатдегидрогеназы у нее следствием снижения тканевого метаболизма. При высокой интенсивности дыхания и дефиците энергии наблюдается резкое снижение уровня восстановленных пиридиннуклеотидов, увеличение активности деацилазы и торможение реакций ацилирования жирных кислот (Кондрашова, 1969, 1970). В такой ситуации быстрое окисление субстратов цикла Кребса может привести к субстратному истощению митохондрий и появлению щавелевоуксусного ингибирования сукцинатдегидрогеназы. Таким образом, причиной обнаруженного нами ослабления активности сукцинатдегидрогеназы у полевок-экономок могут быть конформационные изменения ее структуры за счет взаимодействия с метаболитами, накапливающимися в клетке при охлаждении. Одним из таких метаболитов может являться щавелевоуксусная кислота — сильнейший ингибитор сукцинатдегидрогеназы.

При экстремальном охлаждении узкочерепной полевки наблюдалось незначительное снижение ректальной температуры (приблизительно на 4°), что свидетельствовало о меньшей степени гипотермии и более высоких адаптивных возможностях этого вида по сравнению с предыдущим. Этот вывод подтверждается результатами экологических исследований (Шварц, 1963) условий их расселения. Так, если северная область распростра-

нения полевки-экономки ограничена в основном южными районами Субарктики, то узкочерепную полевку находят, как правило, значительно севернее. Однако при расселении узкочерепная полевка обнаруживает отчетливую приуроченность к определенным биотопам. Это свидетельствует о том, что в адаптации данного вида к условиям Субарктики, помимо приспособительных изменений организма, большое значение имеет выбор подходящих микроклиматических условий.

При относительно невысокой степени гипотермии обмен веществ не изменяется до того момента, как ректальная температура и соответственно температура в исследуемых тканях снизятся до определенного уровня. Выше этого уровня наблюдается развитие обычных реакций химической терморегуляции. По всей вероятности, аналогичное явление имеет место в наших опытах на узкочерепной полевке после экстремального охлаждения. В связи с этим увеличение активности сукцинатдегидрогеназы у южного подвида можно рассматривать как адаптационную меру, направленную на активацию дыхания в мышце. Кроме того, исследованиями М. Ю. Тайца (1970) показано, что увеличение активности дегидрогеназ, в том числе сукцинатдегидрогеназы, при стрессовых реакциях является важным механизмом, обеспечивающим энергетическую сторону компенсаторных процессов за счет не связанного с окислительным фосфорилированием использования субстратов цикла Кребса, например, в реакциях восстановительного синтеза глутаминовой кислоты. Таким образом, наши данные об увеличении активности сукцинатдегидрогеназы у южного подвида узкочерепной полевки соответствуют литературным данным о ее роли в условиях стрессового воздействия.

У северного подвида узкочерепной полевки реакция на экстремальное охлаждение оказалось иной. Активность сукцинатдегидрогеназы у него в отличие от южного подвида не только не увеличилась, но даже снизилась. Не было обнаружено активации сукцинатдегидрогеназы и у полевки Миддендорфа. Как показали проведенные исследования, активность этого фермента, а также ректальная температура у этого вида при охлаждении не изменялись. Обнаруженное нами отсутствие активации сукцинатдегидрогеназы в мышцах северного подвида узкочерепной полевки и полевки Миддендорфа при охлаждении могло быть связано с изменением свойств фермента.

Основанием для проведения третьей и четвертой серий опытов послужило появление литературных данных о корреляции между теплоустойчивостью некоторых белков и температурой обитания отдельных видов (Ирлина, 1967; Серавин и др., 1965; Ушаков, 1965; Схолль, 1967а, б). Указанные исследователи рассматривают обнаруженные ими факты различий по теплоустойчивости отдельных ферментов и белков как проявление различий в конформационной структуре этих белков.

Как видно из табл. 4, в наших опытах выявить внутривидовую изменчивость по теплоустойчивости сукцинатдегидрогеназы у узкочерепной полевки не удалось ($b_{12} < t \cdot Sb_i$). Однако эти результаты не исключают наличия других различий у двух подвидов узкочерепной полевки по сукцинатдегидрогеназе.

Некоторые исследователи (Hochachka, Somero, 1968; Prosser, 1969) считают, что изменения общей активности и теплоустойчивости ферментов не имеют большого значения в адаптации их к условиям низкой температуры. Истинная адаптация, по их мнению, связана с изменением энергии активации ферментов.

Она показывает, какое количество энергии необходимо для перевода всех молекул в активное состояние. Сдвиги в энергии активации обусловлены конформационными перестройками в ферментсубстратном комплексе, в структуре фермента. Приспособительные изменения фермента проявляются в наибольшей каталитической эффективности его (т. е. наименьшей энергии активации) при той температуре, к которой данный вид был адаптирован.

Данные по исследованию коэффициентов Вант-Гоффа (Q_{10}) для сукцинатдегидрогеназы у полевки Миддендорфа, а также у северных и южных подвидов узкочерепной полевки приведены в табл. 5. Как показывают результаты, у неохлажденных узкочерепных полевок отсутствуют достоверные внутривидовые различия по коэффициенту Вант-Гоффа. Это свидетельствует о том, что сукцинатдегидрогеназа у обоих подвидов узкочерепной полевки обладает при 37° С одинаковыми каталитическими свойствами. Однако экстремальное охлаждение влияет на коэффициент Q_{10} у этих подвидов. У южного подвида он не изменяется, в то время как у северного — достоверно уменьшается. Снижение Q_{10} означает уменьшение энергии активации. Следовательно, при понижении температуры в тканях до 30° С сукцинатдегидрогеназа у полевок исследованного северного подвида, по-видимому, обладает более высокими каталитическими свойствами, чем у южного подвида.

Наши результаты получены на сукцинатдегидрогеназе, выделенной из печени полевок. Если закономерности, обнаруженные при изучении Q_{10} для сукцинатдегидрогеназы, проявляются и в мышце, то можно легко объяснить различную реакцию со стороны сукцинатдегидрогеназы мышц при экстремальном охлаждении полевок. У южного подвида при снижении температуры не наблюдается изменений каталитических свойств сукцинатдегидрогеназы. Поэтому увеличение газообмена, которое должно происходить в этих условиях, могло быть достигнуто лишь за счет усиления активности фермента. У северного подвида в аналогичных условиях возрастает эффективность сукцинатдегидрогеназы, в силу чего подъем газообмена мог не сопровождаться изменениями общей активности фермента.

Как видно из табл. 5, наименьшим Q_{10} для сукцинатдегидрогеназы из всех исследованных форм полевок обладала полевка Миддендорфа, что говорит о высокой эффективности у нее этого фермента. Коэффициент Q_{10} в печени полевок Миддендорфа достоверно отличается от соответствующего ему показателя во всех вариантах. Эти данные согласуются с результатами исследования В. В. Хаскина (1975), который обнаружил, что при 27—37° дыхание мышечной ткани лемминга при использовании сукцината почти не зависит от температуры ($Q_{10}=1{,}06$), что свидетельствует о высокой эффективности дыхания субарктических видов в широком диапазоне физиологических температур.

Таким образом, при сравнительном изучении активности, теплоустойчивости и коэффициента Вант-Гоффа сукцинатдегидрогеназы мышц и печени трех видов серых полевок нами установлено, что в адаптации полевки Миддендорфа существенную роль играет повышение эффективности данного фермента, которое в эксперименте проявляется в понижении коэффициента Вант-Гоффа.

У узкочерепной полевки адаптация к условиям Субарктики сопровождалась изменением свойств фермента. Особенно отчетливо это проявлялось при экстремальном охлаждении. У северного подвида оно приводило к уменьшению коэффициента Q_{10} для сукцинатдегидрогеназы, у южного подвида он не изменялся. У полевки-экономки не обнаружено внутривидовых различий по активности сукцинатдегидрогеназы. Полученные ранее данные (Рункова и др., 1975) показали, что среди тканевых приспособлений, играющих важную роль в адаптации видов к условиям Субарктики, имеет место увеличение скорости фосфорилирования и эффективности окисления сукцината. Можно предположить, что ослабление зависимости метаболизма от температуры за счет снижения температурных коэффициентов для ключевых реакций обмена является еще одним приспособлением, обеспечивающим возможность обитания организма при низких температурах среды.

ЛИТЕРАТУРА

Дерибас В. И., Ливчак Г. Б., Филипченко Р. Е., Игошенко К. А. Физиологическое и гистохимическое исследование скелетных мышц белых крыс в процессе холодовой адаптации.— Физиологические адаптации к теплу и холоду. Л., 1969.

Ильин В. С., Нейфах С. А. О регуляции энергетического обмена и его механизмах.— Ежегодник Ин-та экспериментальной медицины, 1956.

Ирлина И. С. О соотношениях теплоустойчивости *Paramecium Caudatum* и активности сукцинатдегидрогеназы у инфузорий, адаптированных к разным температурам.— Изменчивость теплоустойчивости клеток животных в онто- и филогенезе. Л., «Наука», 1967.

Калабухов Н. И. Сохранение энергетического баланса как основа процесса адаптации.— Ж. общ. биол., 1946, т. 7, № 6.

Кондрашова М. Н. Возможное биологическое значение ограничения окисления сукцината щавелевоуксусной кислотой.— Митохондрии. Биохимические функции в системе клеточных органелл. М., «Наука», 1969.
Кондрашова М. Н. Регуляция дыхания митохондрий при усиливающемся воздействии на клетку.— Биофизика, 1970, т. 15, № 2.
Ливчак Г. Б. Материалы к эколого-физиологической характеристике млекопитающих Заполярья.— Проблемы флоры и фауны Урала. Труды Ин-та биологии Урал. фил. АН СССР, 1960, вып. 14.
Ливчак Г. Б. О физиологических механизмах холодовой акклиматизации полевок.— Физиологические адаптации к холоду, условиям гор и Субарктики. Новосибирск, «Наука», 1975.
Максимов В. Н., Федоров В. Д. Применение методов математического планирования эксперимента при отыскании оптимальных условий культивирования микроорганизмов. М., Изд-во МГУ, 1969.
Маслова Г. М., Еланцев А. Б., Корниенко И. А. Содержание цитохромов *a* и *c* в печени и некоторые особенности энергетического обмена в постнатальном онтогенезе кроликов.— Ж. эвол. биохим. и физиол., 1970, т. 6, № 3.
Меерсон Ф. З. Общий механизм адаптации и профилактики. М., «Медицина», 1973.
Михалев М. В. Различия в подвижности белковых фракций у близких форм грызунов.— Экспериментальное изучение внутривидовой изменчивости позвоночных животных. Труды Ин-та биологии Урал. фил. АН СССР, 1966, вып. 51.
Налимов В. В., Чернова Н. А. Статистические методы планирования экстремальных экспериментов. М., «Наука», 1965.
Рункова Г. Г. Опыт применения некоторых методов математического планирования экспериментов в эколого-биохимических исследованиях.— Математическое планирование эксперимента в биологических исследованиях. Труды Ин-та экологии растений и животных УНЦ АН СССР, 1975, вып. 97.
Рункова Г. Г., Ковальчук Л. А., Ястребов А. М. Дыхание и окислительное фосфорилирование в митохондриях печени полевок с разной степенью специализации в условиях экстремального охлаждения и акклимации.— Докл. АН СССР, 1975, т. 223, № 3.
Руттенбург С. О. Химическая терморегуляция у некоторых видов крыс в связи с их географическим распространением.— Опыт изучения регуляций физиологических функций в естественных условиях существования организмов, т. 2. М.— Л., Изд-во АН СССР, 1953.
Серавин Л. Н., Скобло И. И., Осипов Д. В. Влияние температурной адаптации на теплоустойчивость ферментов инфузорий *Paramecium caudatum*.— Теплоустойчивость клеток животных. М., «Наука», 1965.
Скулачев В. П. Новое в изучении окислительного фосфорилирования на митохондриях.— Успехи совр. биологии, 1958, т. 46.
Слоним А. Д. Животная теплота и ее регуляция в организме млекопитающих. М.— Л., 1952.
Слоним А. Д. О физиологических механизмах природных адаптаций и человека. М.— Л., «Наука», 1964.
Схолль Е. Д. Сравнительное исследование теплоустойчивости мускулатуры грызунов.— Изменчивость теплоустойчивости клеток животных в онто- и филогенезе. Л., «Наука», 1967а.
Схолль Е. Д. Теплоустойчивость мышц и некоторых белковых препаратов двух подвидов обыкновенной полевки (*Microtus arvalis Pall.*).— Изменчивость теплоустойчивости клеток животных в онто- и филогенезе. М., «Наука», 1967б.
Тайц М. Ю. К механизму компенсации метаболических сдвигов в центральной нервной системе при стрессе.— Докл. АН Белорус. ССР, 1970, т. 14, № 10.
Урбах В. Ю. Математическая статистика для биологов и медиков. М., Изд-во АН СССР, 1963.

Ушаков Б. П. Теплоустойчивость клеточных белков холоднокровных животных в связи с видовым приспособлением к температурным условиям существования.— Ж. общ. биол., 1965, т. 17, № 2.
Хаскин В. В. Энергетика теплообразования и адаптации к холоду. Новосибирск, «Наука», 1975.
Шварц С. С. Пути приспособления позвоночных животных к условиям существования в Субарктике, т. 1. Млекопитающие. Труды Ин-та биологии Урал. фил. АН СССР, 1963, вып 33.
Шварц С. С. Эволюционная экология животных. Экологические механизмы эволюционного процесса. Труды Ин-та экологии растений и животных Урал. фил. АН СССР, 1969, вып. 65.
Щеглова А. И., Исаакян Л. А., Трубицина Г. А. Дыхательная активность тканей у белых и пластинчатозубых крыс, адаптированных к теплу и холоду.— Физиологические адаптации к теплу и холоду. Л., «Наука» 1969.
Aithal H., Joshi V. Effect of cold exposure on the matabolism of ubiquinone in the rat.— Biochem. biophys. acta, 1968, vol. 78, N 4.
Gutfreund H., Jones E. A. The kinetic behavouer of enzymes in organized systems. Mitochondrial succinate oxidase and fumarase.— Biochim. J., 1964, vol. 90, N 1.
Hannon J. P. Intermediary glucose metabolism in the cold — acclimatized rat.— Federat. Proc., 1960, p. 2, vol. 19.
Hochachka P. W., Somero G. N. The adaptation of enzymes to temperature.— Compar. Biochem. Physiol., 1968, vol. 27.
Kun E., Abood L. G. Science, 1949, vol. 109, N 2820.
Potter V. R. Possible biochemical mechanisms underluing adaptation to cold.— Feder. Proc. (Amer. soc. exptl. biol.), 1958, vol. 17.
Prosser C. L. Principles and generalconcepts of adaptation.— Environmental Res., 1969, vol. 2.
Smith C. L. The temperature dependense of oxidative phosphorylation and of the activity of various enzymes Systems in liver mitochondria from cold — and warm — blooded animals.— Compar. Biochem. Physiol., 1973, vol. 46.
Woodhard Charles B., Marilyn Zimmy L. Energy of activation of succinic dehydrogese in a hibernator.— Amer. J. Physiol., 1973, vol. 25, N 2.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НЕКОТОРЫХ ПРОБЛЕМ ПОПУЛЯЦИОННОЙ ЭКОЛОГИИ · 1978

Н. Ф. ЗАВАДА, Г. П. ПАВЛОВ

ИЗОФЕРМЕНТНЫЙ СПЕКТР ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ У ПОЛЕВКИ МИДДЕНДОРФА В УСЛОВИЯХ ЭКСТРЕМАЛЬНОГО ОХЛАЖДЕНИЯ

При изучении географической изменчивости северных и южных подвидов некоторых широкораспространенных видов полевок были обнаружены различия в активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) (1.1.1.27) и ее изоферментном составе (Завада, Павлов, 1973, 1975). Эти различия наиболее отчетливо проявляются при экстремальном охлаждении животных и направлены в сторону увеличения в изоферментном спектре доли анаэробных энзимов. Характер изменчивости указанных биохимических показателей, а также данные по гликолизу и соотношению эндогенной активности аэробных и анаэробных дегидрогеназ у этих же видов полевок (Рункова и др., 1974) позволили предположить, что одним из путей их приспособления к условиям обитания в Субарктике может быть интенсификация анаэробного метаболизма.

Переход от окислительного обмена к анаэробному является энергетически менее выгодным, так как выход энергии на единицу потребленного субстрата резко снижается. Однако, возможно, что при высокой функциональной нагрузке, когда резко усиленно расходование аденозинтрифосфата (АТФ), или при охлаждении, когда наблюдается активация нефосфорилирующего окисления, одного окислительного механизма образования АТФ может оказаться недостаточно для его полного ресинтеза. В этих условиях усиление гликолиза может быть одним из компенсаторных механизмов ресинтеза макроэргов, включающимся в результате интенсификации функциональной активности организма. Это предположение согласуется с общим выводом экологических исследований о том, что адаптация широкораспространенных видов к неблагоприятным условиям среды идет по линии интенсификации метаболизма (Шварц, 1963, 1969).

Вместе с тем известно, что типичные субаркты в условиях охлаждения, как правило, обнаруживают меньшую степень ин-

Таблица 1

Независимые переменные и их уровни в двух сериях опытов

Уровень	Первая серия		Вторая серия	
	Пол $\tilde{x}_1$	Температура 20-минутного воздействия, ° С $\tilde{x}_2$	Возраст, месяцы $\tilde{x}_1$	Температура 20-минутного воздействия, ° С $\tilde{x}_2$
Верхний (+)	Самка	+18	8	+18
Нижний (—)	Самец	—15	4	—15

Таблица 2

Изоферментный спектр ЛДГ скелетной мышцы полевки Миддендорфа в условиях экстремального охлаждения (февраль 1973 г., первая серия)

№ варианта	Уровень натуральных независимых переменных		Активность изоэнзимов, % к общей активности				Н/М
	x_1	x_2	ЛДГ-1	ЛДГ-2	ЛДГ-3	ЛДГ-5	
1	—	—	14,5	21,4	29,7	34,3	0,92
2	+	—	2,05	17,4	31,7	47,0	0,51
3	—	+	6,67	25,9	32,7	34,6	0,78
4	+	+	5,75	24,0	35,1	35,0	0,70

Примечание. Статистические показатели: $b_0 = 7{,}24$; $b_1 = -3{,}34$; $b_2 = -1{,}03$; $b_{12} = 2{,}88$; $S^2\{y\} = 29{,}6$; $tS\{b_i\} = 3{,}39$ (ЛДГ-1); $b_0 = 22{,}2$; $b_1 = -1{,}47$; $b_2 = 2{,}77$; $b_{12} = 0{,}52$; $S^2\{y\} = 20{,}67$; $tS\{b_i\} = 2{,}83$ (ЛДГ-2); $b_0 = 32{,}3$; $b_1 = 1{,}1$; $b_2 = 1{,}6$; $b_{12} = -0{,}1$; $S^2\{y\} = 24{,}58$; $tS\{b_i\} = 3{,}09$ (ЛДГ-3); $b_0 = 37{,}7$; $b_1 = 3{,}27$; $b_2 = -2{,}92$; $b_{12} = -3{,}07$; $S^2\{y = 77{,}1$; $tS\{b_i\} = 5{,}46$ (ЛДГ-5); $b_0 = 0{,}72$; $b_1 = -0{,}12$; $b_2 = 0{,}01$; $b_{12} = 0{,}08$; $S^2\{y\} = 0{,}13$; $tS\{b_i\} = 0{,}21$ (Н/М), где b — коэффициент регрессии; $S^2\{y\}$ — дисперсия воспроизводимости среднего значения; $S\{b_i\}$—ошибка определения; e_i t — критерий достоверности.

Таблица 3

Активность лактатдегидрогеназы и ее изоэнзимов в скелетных мышцах полевок Миддендорфа в условиях нормы и экстремального охлаждения (декабрь 1973 г., серия 2), % к общей активности

№ варианта	Натуральные независимые переменные		ЛДГ-1	ЛДГ-2	ЛДГ-3	ЛДГ-5	Н/М
	x_1	x_2					
1	—	—	0	0	17,4	82,5	0,10
2	+	—	12,4	10,2	22,7	47,6	0,57
3	—	+	8,8	6,6	14,2	70,2	0,26
4	+	+	12,6	15,5	28,3	32,9	0,74

Примечание. Статистические показатели: $b_0 = 8{,}45$; $b_1 = 4{,}05$; $b_2 = 2{,}25$; $b_{12} = 2{,}12$; $S^2\{y\} = 94{,}2$; $tS\{b_i\} = 5{,}39$ (ЛДГ-1); $b_0 = 8{,}07$; $b_1 = 4{,}77$; $b_2 = 2{,}97$; $b_{12} = 0{,}32$; $S^2\{y\} = 75{,}3$; $tS\{b_i\} = 4{,}62$ (ЛДГ-2); $b_0 = 20{,}6$; $b_1 = 4{,}85$; $b_2 = 0{,}6$; $b_{12} = 2{,}2$; $S^2\{y\} = 56{,}38$; $tS\{b_i\} = 3{,}39$ (ЛДГ-3); $b_0 = 58{,}3$; $b_1 = -18{,}0$; $b_2 = -6{,}75$; $b_{12} = -0{,}6$; $S^2\{y\} = 353{,}7$; $tS\{b_i\} = 10{,}01$ (ЛДГ-5); $b_0 = 0{,}417$; $b_1 = 0{,}237$; $b_2 = 0{,}082$; $b_{12} = 0{,}002$; $S^2\{y\} = 0{,}168$; $tS\{b_i\} = 0{,}213$ (Н/М).

тенсификации обмена, чем широкораспространенные виды, или же не обнаруживают ее вообще. В связи с этим интересно сопоставить изменения в изоферментном спектре ЛДГ, наблюдаемые при охлаждении широкораспространенных видов, с аналогичными данными, выполненными на типичных субарктических видах. Таким видом является полевка Миддендорфа — один из многочисленных грызунов Ямала.

Материал и методика

Было проведено две серии опытов по плану полного факторного эксперимента типа 2^2 (Налимов, Чернова, 1965). Независимые переменные и их уровни для обеих серий приведены в табл. 1. В первой серии опытов (февраль 1973 г.) определялись общая активность и изоферментный состав ЛДГ у шестимесячных самцов и самок полевок Миддендорфа в условиях нормы и экстремального охлаждения (20-минутное выдерживание при температуре —15° С). Во второй серии опытов (декабрь 1973 г.) изучались возрастные различия в активности и изоферментном составе ЛДГ у самцов полевок Миддендорфа в норме и при тех же условиях охлаждения. Кроме того, во второй серии опытов у полевок измерялась ректальная температура.

Основатели модельных популяций полевок доставлены с п-ова Ямал в 1972 г. В опытах использовали первое и второе поколения полевок, полученные при разведении в виварии. Активность и изоферментный состав ЛДГ в бедренной мышце животных исследовались с помощью методики, описанной ранее (Завада, Павлов, 1975). На основании данных по изоферментному составу рассчитывалось соотношение субъединиц ЛДГ (Н/М).

Результаты опытов и их обсуждение

Регрессионный анализ данных показывает отсутствие явно выраженного полового деморфизма у полевок Миддендорфа по изучаемым тестам ($b_1 \leqslant tS\{b_i\}$). Не обнаружены также достоверные изменения в соотношении активностей аэробных и анаэробных изоферментов ЛДГ ($b_2 < tS\{b_i\}$) у полевок в условиях охлаждения. Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что полевка Миддендорфа в условиях охлаждения не проявляет признаков интенсификации анаэробного метаболизма в отличие от других широкораспространенных видов. Эти данные хорошо согласуются с результатами других исследований об отсутствии у полярных животных интенсификации обмена, в частности, с выводами А. Д. Слонима (1952) о том, что у них слабо развита или отсутствует химическая терморегуляция — один из эффективных механизмов, с по-

мощью которых у животных средних широт осуществляется дополнительная выработка энергии, необходимая для поддержания температурного гомеостазиса в условиях охлаждения. Об этом же свидетельствуют данные по изучению морфологических показателей (Шварц, 1969). Так, индексы сердца и печени — показатели интенсификации метаболизма, у полярных животных часто не выше, чем у тропических животных. Таким образом, можно предполагать, что типичные субаркты обладают повышенной устойчивостью к низкой температуре не за счет интенсификации обмена, а за счет других механизмов. Согласно одной из наиболее распространенных точек зрения способность полярных животных противостоять низким температурам обусловлена высокими теплоизоляционными свойствами покровов. Как показано опытами Г. Б. Ливчак (1960), полевка Миддендорфа действительно обладает более высокими теплоизоляционными свойствами меха по сравнению с полевками южного происхождения. Следовательно, отсутствие сдвигов в анаэробном метаболизме может быть результатом высоких теплоизоляционных свойств меха полевок. В наших опытах ректальная температура у полевки Миддендорфа под действием экстремального охлаждения достоверно уменьшалась. Это свидетельствует о том, что высокие теплоизоляционные свойства меха не могут полностью защитить ее от указанного воздействия. Тем не менее, при этом же температурном воздействии не наблюдалось достоверных изменений в изоферментном спектре ЛДГ у полевок Миддендорфа независимо от пола и возраста (табл. 2 и 3). В то же время, по данным С. С. Шварца и О. А. Пястоловой (1971), в осенний период в естественной среде обитания они испытывают воздействия низких температур (до —15° С) и переносят их без заметной смертности в поселениях. Вероятно, можно допустить, что в термоустойчивости данного вида полевок, помимо теплоизоляционных свойств, имеют значение и другие механизмы.

ЛИТЕРАТУРА

Завада Н. Ф., Павлов Г. П. Активность лактатдегидрогеназы и ее изоферментный спектр в гиалоплазме скелетных мышц двух подвидов полевки-экономки в условиях экстремального охлаждения и акклимации.— Тезисы докладов Уральской конференции молодых ученых «Человек и биосфера». Свердловск, 1973.

Завада Н. Ф., Павлов Г. П. Географическая изменчивость лактатдегидрогеназы и ее изоферментов у узкочерепной полевки в условиях экстремального охлаждения.— Математическое планирование эксперимента в биологических исследованиях. Труды Ин-та экологии растений и животных УНЦ АН СССР, 1975, вып. 97.

Ливчак Г. Б. Материалы к эколого-физиологической характеристике млекопитающих Заполярья.— Проблемы флоры и фауны Урала. Труды Ин-та биологии Урал. фил. АН СССР, 1960, вып. 14.

Налимов В. В., Чернова Н. А. Статистические методы планирования экстремальных экспериментов. М., «Наука», 1965.

Рункова Г. Г., Завада Н. Ф., Купцова В. В. Особенности аэробного и анаэробного метаболизма в тканях двух подвидов полевки-экономки в условиях экстремального охлаждения и акклимации.— Экология, 1974, № 3.

Слоним А. Д. Животная теплота и ее регуляция в организме млекопитающих. М.— Л., Изд-во АН СССР, 1952.

Слоним А. Д. Экологическая физиология животных. М., «Высшая школа», 1971.

Шварц С. С. Пути приспособления наземных позвоночных животных к условиям существования в Субарктике, т. 1. Труды Ин-та биологии Урал. фил. АН СССР, вып. 33.

Шварц С. С. Эволюционная экология животных. Экологические механизмы эволюционного процесса. Труды Ин-та экологии растений и животных УНЦ АН СССР, 1969, вып. 65.

Шварц С. С., Пястолова О. А. Полевка Миддендорфа.— Млекопитающие Ямала и Полярного Урала, т. 1. Труды Ин-та экологии растений и животных УНЦ АН СССР, 1971, вып. 80.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НЕКОТОРЫХ ПРОБЛЕМ
ПОПУЛЯЦИОННОЙ ЭКОЛОГИИ · 1978

Г. Г. РУНКОВА, Н. Ф. БАБУШКИНА

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ СЕРЫХ ПОЛЕВОК НА ОХЛАЖДЕНИЕ В УСЛОВИЯХ ЛАБОРАТОРНОГО РАЗВЕДЕНИЯ

Активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и ее изоэнзимов у близких форм животных при температуре 18° С и экстремальном охлаждении исследовалась нами на особях из лабораторных колоний. Изучалось 7—10 поколение животных (Завада, Павлов, 1973, 1975; Рункова, 1975). В настоящей статье описаны аналогичные эксперименты, проводимые на полевках 20-го поколения.

Цель данного исследования — изучить вопрос о роли экологических факторов в возникновении тех особенностей адаптации близких форм, которые связаны с активностью ЛДГ и ее свойствами.

Материал и методика

В качестве объекта исследования использовали самцов и самок южных и северных подвидов экономки (*Microtus oeconomus oeconomus*, *M. oeconomus Chachlovi*) и узкочерепной полевки (*Microtus gregalis gregalis, M. gregalis major*). Основатели модельных популяций были привезены из районов Южного Урала (южные подвиды) и с п-ва Ямал (северные подвиды). Опыты ставили по плану полного факторного эксперимента (ПФЭ) типа 2^4 (Максимов, Федоров, 1969; Рункова, 1975).

Определяли активность лактатдегидрогеназы и ее изоэнзимов, а также соотношение Н/М-субъединиц в гиалоплазме скелетных мышц южных и северных подвидов ($\widetilde{x}_1$) экономок и узкочерепных полевок ($\widetilde{x}_2$) после девятидневной акклимации к температурам 18 и 0—3° С ($\widetilde{x}_3$) и после 20-минутного выдерживания при температурах 18 и —15° С ($\widetilde{x}_4$). Одновременно изучали экстремальное охлаждение после девятидневной акклимации к указанным температурам.

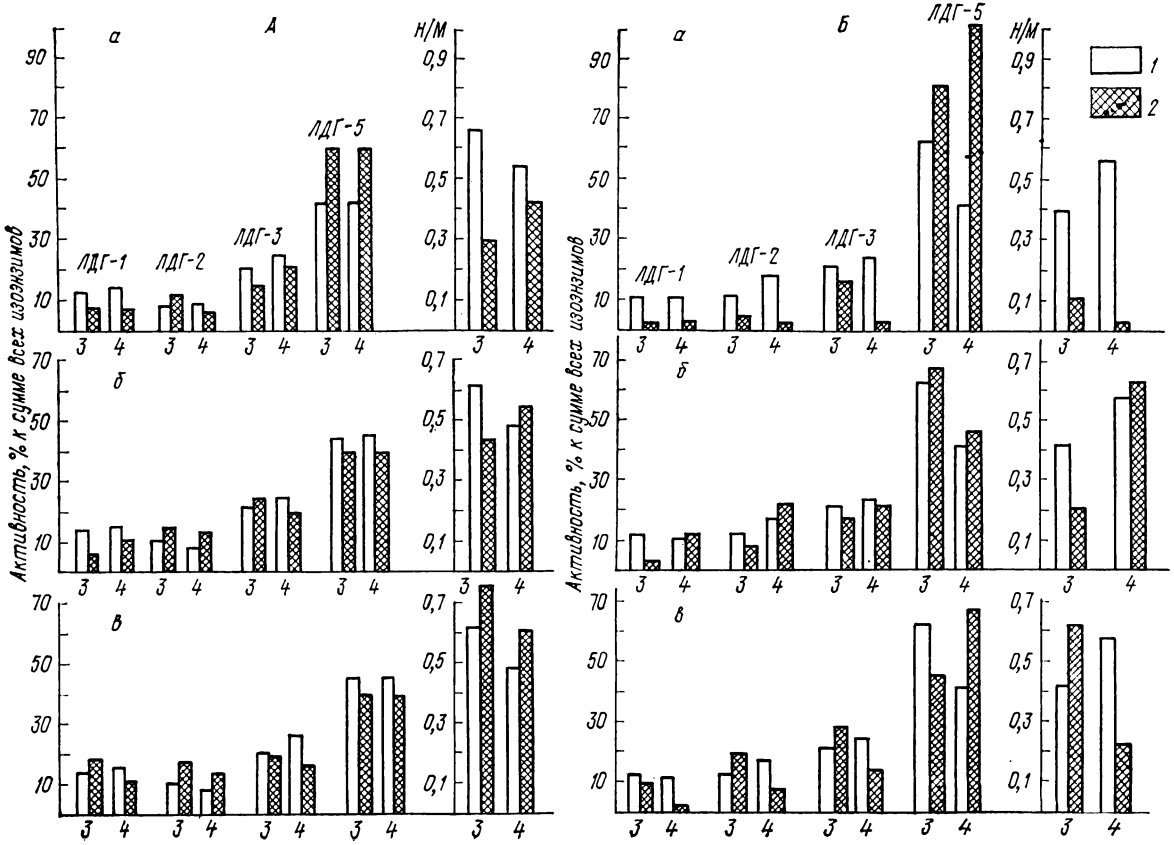
Активность ЛДГ и ее изоэнзимов в гиалоплазме скелетных мышц экономки и узкочерепной полевки в различных условиях

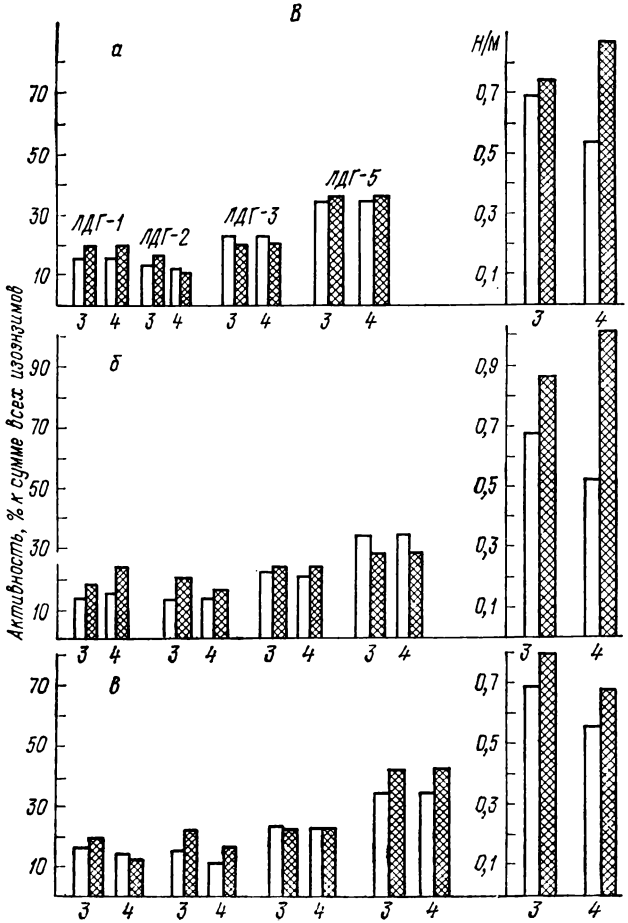
Натуральные независимые переменные и их уровни					Подвид	Вид	Температура при девятидневном содержании в виварии, ° С	Температура при 20-минутном содержании в опыте, ° С
					$\tilde{x}_1$	$\tilde{x}_2$	$\tilde{x}_3$	$\tilde{x}_4$
Верхний (+) Нижний (—)					Южный Северный	*M. oecomomus* *M. gregalis*	18 0, +3	18 —15
Кодированные независимые переменные					Биохимический показатель ($\hat{y}$)						
№ варианта	x_1	x_2	x_3	x_4	ЛДГ$_{общ}$ (59)*	ЛДГ-1 (95)	ЛДГ-2 (95)	ЛДГ-3 (95)	ЛДГ-4 (95)	ЛДГ-5 (95)	Н/М (91)
1	—	—	—	—	6,0	11,3	14,5	18,4	11,1	43,4	0,68
2	+	—	—	—	6,0	17,7	20,5	18,2	11,1	43,4	0,81
3	—	—	—	—	6,0	10,1	11,1	18,2	11,1	39,8	0,62
4	+	+	—	—	6,0	16,5	17,1	23,2	11,1	39,8	0,76
5	—	—	+	—	5,6	19,5	9,7	20,6	11,1	35,8	0,86
6	+	—	+	—	5,6	19,5	15,7	20,8	11,1	35,8	0,72

7	—	+	+	—	5,6	8,3	6,3	20,8	11,1	61,0	0,42
8	+	+	+	—	5,6	8,3	12,3	15,9	11,1	61,0	0,29
9	—	—	—	+	5,6	22,7	17,3	21,2	11,1	26,8	1,01
10	+	—	—	+	5,6	16,3	17,7	21,0	11,1	26,8	0,87
11	—	+	—	+	5,6	11,5	13,9	20,9	11,1	39,6	0,57
12	+	+	—	+	5,6	5,1	14,3	25,9	11,1	39,6	0,44
13	—	—	+	+	6,0	14,5	12,5	23,3	11,1	35,6	0,54
14	+	—	+	+	6,0	14,5	12,9	23,5	11,1	35,6	0,67
15	—	+	+	+	6,0	13,3	9,1	23,5	11,1	43,6	0,48
16	+	+	+	+	6,0	13,3	9,5	18,6	11,1	43,6	0,61

Примечание. Статистические показатели: $b_0=5{,}76$; $b_1=0{,}16$; $b_2=0{,}14$; $b_{12}=0{,}16$; $b_3=-0{,}12$; $b_{13}=-0{,}06$; $b_{23}=0{,}04$; $b_{123}=0{,}07$; $b_4=-0{,}16$; $b_{14}=-0{,}16$; $b_{24}=0{,}06$; $b_{124}=-0{,}04$; $b_{34}=0{,}17$; $b_{134}=0{,}04$; $b_{234}=-0{,}03$; $b_{1234}=0{,}02$; $S^2\{y\}=0{,}423$; $S^2\{\overline{y}=0{,}114$; $t_{0,95}S\{b_i\}=0{,}17$ (ЛДГ общ.); $b_0=13{,}9$; $b_1=1{,}04$; $b_2=-3{,}09$; $b_{12}=-0{,}36$; $b_3=-0{,}68$; $b_{13}=0{,}71$; $b_{23}=-0{,}28$; $b_{123}=-0{,}89$; $b_4=0{,}39$; $b_{14}=-1{,}57$; $b_{24}=0{,}49$; $b_{124}=0{,}43$; $b_{34}=0{,}61$; $b_{134}=1{,}64$; $b_{234}=2{,}46$; $b_{1234}=-0{,}51$; $S^2\{y\}=39{,}25$; $S^2\{\overline{y}\}=6{,}54$; $t_{0,95}S\{b_i\}=1{,}27$ (ЛДГ-1); $b_0=13{,}4$; $b_1=1{,}61$; $b_2=-1{,}72$; $b_3=-2{,}38$; $b_{13}=-0{,}09$; $b_{23}=-0{,}07$; $b_{123}=-0{,}53$; $b_4=0{,}82$; $b_{14}=-1{,}44$; $b_{24}=-0{,}07$; $b_{124}=0{,}22$; $b_{34}=-0{,}56$; $b_{134}=0{,}93$; $b_{234}=0{,}86$; $b_{1234}=-1{,}106$; $S^2\{y\}=51{,}3$; $S^2\{\overline{y}\}=8{,}56$; $t_{0,95}S\{b_i\}=1{,}45$ (ЛДГ-2); $b_0=20{,}89$; $b_1=-0{,}13$; $b_2=-0{,}46$; $b_{12}=-0{,}63$; $b_3=-1{,}09$; $b_{13}=-1{,}19$; $b_{23}=-1{,}19$; $b_{123}=-1{,}29$; $b_4=1{,}36$; $b_{14}=1{,}03$; $b_{24}=0{,}96$; $b_{124}=0{,}48$; $b_{34}=-0{,}31$; $b_{134}=0{,}79$; $b_{234}=0{,}54$; $b_{1234}=0{,}24$; $S^2\{y\}=31{,}03$; $S^2\{\overline{y}\}=5{,}17$; $t_{0,95}S\{b_i\}=1{,}13$ (ЛДГ-3); $b_0=11{,}12$; $b_1=-0{,}03$; $b_2=0{,}09$; $b_{12}=-0{,}83$; $b_3=0{,}82$; $b_{13}=-0{,}86$; $b_{23}=-1{,}58$; $b_{123}=1{,}02$; $b_4=1{,}41$; $b_{14}=0{,}61$; $b_{24}=0{,}56$; $b_{124}=-0{,}37$; $b_{34}=-0{,}62$; $b_{134}=-0{,}99$; $b_{234}=0{,}26$; $b_{1234}=1{,}31$; $S^2\{y\}=43{,}0$; $S^2\{\overline{y}\}=12{,}17$; $t_{0,95}S\{b_i\}=1{,}73$ (ЛДГ-4); $b_0=40{,}79$; $b_1=-2{,}28$; $b_2=5{,}41$; $b_{12}=1{,}26$; $b_3=3{,}39$; $b_{13}=1{,}47$; $b_{23}=3{,}11$; $b_{123}=1{,}71$; $b_4=-4{,}23$; $b_{14}=1{,}17$; $b_{24}=-2{,}17$; $b_{124}=-0{,}94$; $b_{34}=0{,}84$; $b_{234}=-4{,}14$; $b_{1234}=0{,}031$; $S^2\{y\}=235{,}69$; $S^2\{\overline{y}\}=39{,}28$; $t_{0,95}S\{b_i\}=3{,}12$ (ЛДГ-5); $b_0=0{,}65$; $b_1=0{,}049$; $b_2=-0{,}12$; $b_{12}=-0{,}009$; $b_3=-0{,}072$; $b_{13}=0{,}025$; $b_{23}=-0{,}017$; $b_{123}=-0{,}057$; $b_4=0{,}042$; $b_{14}=-0{,}052$; $b_{24}=0{,}012$; $b_{124}=0{,}025$; $b_{34}=-0{,}014$; $b_{134}=0{,}066$; $b_{234}=0{,}091$; $b_{1234}=-0{,}041$; $S^2\{y\}=0{,}1602$; $S^2\{\overline{y}\}=0{,}0276$; $t_{0,95}S\{b_i\}=0{,}083$ (Н/М), где b — коэффициент регрессии; $S^2\{\overline{y}\}$ — дисперсия воспроизводимости среднего значения; $S\{b_i\}$ — ошибка определения; e_i t — критерий достоверности.

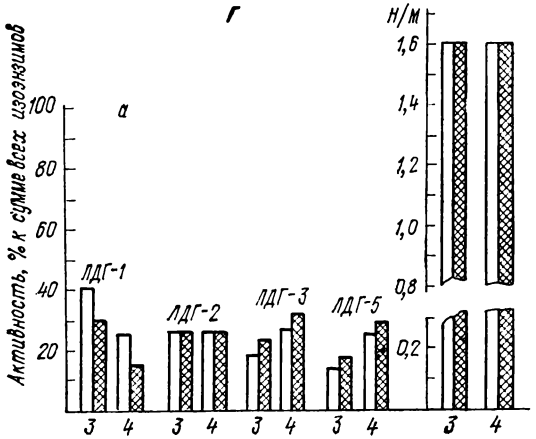
* В скобках — число опытов.


А
Б
а
б
в
Н/М
ЛДГ-1
ЛДГ-2
ЛДГ-3
ЛДГ-5
Активность, % к сумме всех изоэнзимов
1
2



Активность изоэнзимов ЛДГ и соотношение *Н*- и *М*-субъединиц в гиалоплазме скелетных мышц экономок 20-го (*А*) и 7—10-го (*Б*) поколений, узкочерепной полевки 20-го (*В*) и 7—10-го (*Г*) поколений в условиях нормы (*1*) и охлаждения (*2*).

а — выдержка 20 *мин*, $t = -15°$ С; *б* — выдержка 9 дней, $t \approx 0 + 3°$ С; *в* — выдержка 20 *мин*; $t = -15°$ С после девятидневной акклимации к $t = 0 + 3°$ С; *3* — южные, *4* — северные подвиды.



Независимые переменные и их уровни, матрица ПФЭ типа 2^4, результаты регрессионного анализа приведены в таблице. По соответствующим расчетным данным построены номограммы (см. рисунок, *А, Б*).

Гиалоплазму приготовляли по ранее разработанной методике (Завада, Павлов, 1973, 1975). Общую активность ЛДГ определяли с помощью оптического теста Варбурга по методу Генри (Аситиани, 1965).

Разделение изоферментов ЛДГ проводили методом вертикального электрофореза в 5,5%-ном полиакриламидном геле по Дитцу и Любрано (Dietz, Lubrano, 1967). Для количественного определения активности изоэнзимов использовали микрофотометр МФ-2 с записывающей приставкой (Бондаренко и др., 1971). Активность изоэнзима выражали в процентах от общей активности изоэнзимов. В процессе регрессионного анализа результатов применяли стандартные методы статистической обработки в соответствии с планом ПФЭ типа 2^4 (Максимов, Федоров, 1968; Рункова, 1975).

Результаты и их обсуждение

Для общей активности ЛДГ в гиалоплазме скелетных мышц экономок и узкочерепных полевок, подвергнутых экстремальному охлаждению и акклимации, получено следующее уравнение регрессии:

$$y=5{,}80+0{,}17x_3x_4; \quad t_{0,95}\cdot Sb_i=0{,}17;$$
$$S^2_{ад}/S^2y=1{,}56<F_{0,95}(14{,}43).$$

Из уравнения видно, что южные и северные подвиды экономок и узкочерепных полевок 20-го поколения изменяют общую активность ЛДГ в условиях экстремального охлаждения и девятидневной акклимации к температуре 0—3° С ($b_{34}>t\cdot S\{b_i\}$). Направленность изменений при экстремальном охлаждении зависит от температуры предварительной акклимации.

Для изоэнзима ЛДГ-1 уравнение регрессии имеет вид:

$$y=13{,}9-3{,}1x_2-1{,}6x_1x_4+2{,}5x_2x_3x_4+1{,}6x_1x_3x_4; \quad t_{0,59}\cdot Sb_i=1{,}27;$$
$$S^2_{ад}/S^2y=0{,}95, \quad F_{0,95}(11{,}79)=2{,}4.$$

Анализ уравнения показывает, что активность данного изоэнзима достоверно изменяется во всех вариантах охлаждения, и характер изменений зависит от принадлежности животного к виду ($b_{234}>t_{0,95}S\{b_i\}$) и подвиду ($b_{134}>t_{0,95}S\{b_i\}$). Для экономок типично снижение активности ЛДГ-1, для узкочерепных полевок — повышение. Различия между южными и северными подвидами определяются вариантом охлаждения. У южных полевок во всех вариантах, кроме третьего (экстремальное после акклимации), уровень активности ЛДГ-1 ниже по сравнению с северными.

Для изоэнзима ЛДГ-2 получено следующее уравнение:

$$y=13,4+1,6x_1-1,7x_2-2,4x_3-1,4x_1x_4;$$
$$t_{0,95}S\{b_i\}=1,45;\quad S^2_{ад}/S^2\{\bar{y}\}=1,67<F_{0,95\,(11,79)}=2,4.$$

Из уравнения видно, что изоэнзим ЛДГ-2 также достоверно выше (хотя и незначительно) в гиалоплазме скелетных мышц южных подвидов исследованных серых полевок ($b_1>t\cdot S\{b_i\}$). Обнаружены различия в уровне активности ЛДГ-2 между экономками и узкочерепными полевками ($b_2>t\cdot S\{b_i\}$). Узкочерепные полевки, независимо от исследованных вариантов охлаждения, имеют более высокий уровень активности изоэнзима ЛДГ-2, чем экономки. Наблюдается явная активация изоэнзима ЛДГ-2 у обоих видов и подвидов полевок после девятидневной акклимации к температуре 0—3° С ($b_3>t\cdot S\{b_i\}$. При экстремальном охлаждении активность ЛДГ-2 изменяется в зависимости от принадлежности полевки к северному или южному подвиду ($b_{14}>t\cdot S\{b_i\}$).

Для изоэнзима ЛДГ-3 уравнение следующее:

$$y=2,09+1,4x_4-1,2x_1x_3-1,2x_2x_3-1,3x_1x_2x_3;$$
$$t_{0,95}\cdot Sb_i=1,13;\quad S^2_{ад}/S^2\bar{y}=1,81>F_{0,95\,(11,79)}=2,4.$$

Анализ значимых коэффициентов регрессии показывает, что у всех исследованных животных, независимо от таксономического ранга, при экстремальном охлаждении в опыте снижается активность ЛДГ-3 ($b_4>t\cdot Sb_i$). Реакция на девятидневное охлаждение при температуре 0—3° С зависит от принадлежности животного к подвиду и виду ($b_{123}>t_{0,95}\cdot Sb_i$). У северных экономок активность ЛДГ-3 снижается в вариантах с акклимацией, у южных экономок и узкочерепных полевок, напротив, активность данного изоэнзима в этих вариантах не изменяется.

Для изоэнзима ЛДГ-5 уравнение регрессии имеет вид:

$$y=40,8+5,4x_2+3,4x_3-4,2x_4+3,1x_2x_3-4,1x_2x_3x_4;$$
$$t_{0,95}S\cdot b_i=3,12;\quad S^2_{ад}/S^2y=1,04<F_{0,95\,(10,79)}=2,1.$$

Из уравнения следует, что реакция по данному тесту на экстремальное охлаждение зависит от принадлежности животного к виду и предварительной акклимации ($b_{234}>t\cdot S\{b_i\}$). В условиях девятидневного выдерживания животных при температуре 0—3° С активность изоэнзима ЛДГ-5 в гиалоплазме скелетных мышц экономок и узкочерепных полевок уменьшается (см. рис. 1, 2). При экстремальном охлаждении у экономки резко увеличивается активность ЛДГ-5, у узкочерепных она не изменяется.

Для коэффициента Н/М получено уравнение:

$$y=0,65-0,12x_2+0,068x_1x_3x_4-0,07x_3+0,09x_2x_3x_4;$$
$$t_{0,95}\cdot Sb_i=0,059;\quad S^2_{ад}/S^2\{\bar{y}\}=1,39<F_{0,95\,(11,75)}=2,3.$$

Данные регрессионного анализа показывают, что характер изменений величины коэффициента Н/М у охлажденных серых поле-

вок 20-го поколения зависит от принадлежности животных к тому или иному подвиду и виду (b_{134} и $b_{234} > t \cdot Sb_i$). У южных подвидов экономки и узкочерепной полевки уровень коэффициента Н/М ниже, за исключением варианта с экстремальным охлаждением после акклимации, в сравнении с северными подвидами. Узкочерепные полевки 20-го поколения во всех вариантах с охлаждением (см. рисунок) реагируют на него повышением данного показателя. Экономки того же поколения, напротив, в испытанных нами условиях охлаждения, как правило, снижают величину Н/М. Для сравнения на рисунке (Б, Г) представлены ранее полученные нами данные по тем же показателям для тех же видов и внутривидовых форм полевок 7—10-го поколений (Завада, Павлов, 1973, 1975).

Из обобщенного анализа результатов видно, что межвидовые различия по изоэнзимному спектру ЛДГ в скелетных мышцах экономок и узкочерепных полевок, отчетливо выраженные в 7—10-м поколениях, у неохлажденных животных в 20-м поколении стираются. У экономок 7—10-го поколений ЛДГ в скелетных мышцах содержит большое количество анаэробных изоэнзимов ЛДГ-5 (Н/М<1). ЛДГ экономок 7—10-го поколений менее чувствительна к повышенным концентрациям пирувата и хорошо функционирует при недостатке кислорода, когда пирувата в тканях накапливается много. При действии низких температур в качестве дополнительного источника энергии экономка использует анаэробный гликолиз, который активируется после того, как возможности аэробного окисления окажутся исчерпанными.

В мышцах узкочерепной полевки 7—10-го поколений содержится ЛДГ, способная функционировать не только в отсутствие кислорода, но и в условиях активного аэробного окисления (Н/М>1). При действии низких температур дополнительная энергия в скелетной мускулатуре узкочерепной полевки поставляется за счет анаэробного и аэробного гликолиза одновременно, приспособительные возможности животных значительно возрастают, освоение среды происходит более активно. Обнаруженное нами стирание различий в характере изоэнзимного спектра ЛДГ при виварном разведении животных, вероятно, указывает на определенную роль экологических и, в первую очередь, температурных факторов в возникновении описанных биохимических особенностей адаптации экономок и узкочерепных полевок.

Выявленные в 7—10-м и исчезнувшие в 20-м поколениях различия между экономками и узкочерепными полевками вновь отчетливо проявляются при их экспериментальном охлаждении (см. рисунок). Экономки 20-го поколения, так же как и экономки 7—10-го поколений, на действие низких экстремальных температур реагируют снижением коэффициента Н/М и увеличением анаэробности ЛДГ в мышцах. У узкочерепных полевок в тех же условиях увеличивается коэффициент Н/М, ЛДГ мышц

превращается в фермент, который одинаково хорошо действует в анаэробных и аэробных условиях (Н/М достигает единицы или приближается к единице). Следовательно, способность экономки и узкочерепной полевки адаптироваться к холоду за счет разных механизмов (при участии только анаэробного гликолиза у первой, и одновременно аэробного — у второй), как биохимические признаки, генетически закреплена. Вероятно, эти механизмы могут рассматриваться как одна из причин разной общей приспособляемости, выносливости изученных нами животных. Следует подчеркнуть, что при разведении исследованных видов направленность изменений в характере изоэнзимного спектра ЛДГ разная (у экономок Н/М увеличивается, у узкочерепных полевок снижается), что указывает на отсутствие генетической близости исследованных форм. Дивергенция, имеющая место при возникновении данных видов, могла быть связана с внутривидовой биохимической дифференциацией по такому признаку, как изоэнзимный спектр, а следовательно, и свойства ЛДГ скелетных мышц животного. В процессе обособления исследованных нами видов, вероятно, усиливалась способность к одновременному синтезу аэробных и анаэробных изоэнзимов ЛДГ, что проявилось в определенных изменениях свойств данного фермента, в выравнивании его чувствительности к разным концентрациям пирувата.

ЛИТЕРАТУРА

Асатиани В. С. Новые методы биохимической фотометрии. М., «Наука», 1965.

Бондаренко М. В., Венде Э. Ю., Константинов И. Д., Коровников К. А., Покровский А. А., Абрамук И. Ф. К вопросу о денситометрическом анализе изоферментных спектров.— Лабор. дело, 1971, № 1.

Завада Н. Ф., Павлов Г. П. Активность лактатдегидрогеназы и ее изоферментный спектр в гиалоплазме скелетных мышц двух подвидов полевки-экономки в условиях экстремального охлаждения и акклимации.— Тезисы докладов Уральской конференции молодых ученых «Человек и биосфера». Свердловск, 1973.

Завада Н. Ф., Павлов Г. П. Географическая изменчивость лактатдегидрогеназы и ее изоферментов у узкочерепной полевки в условиях экстремального охлаждения.— Математическое планирование эксперимента в биологических исследованиях. Труды Ин-та экологии растений и животных УНЦ АН СССР, 1975, вып. 97.

Максимов В. Н., Федоров В. Д. Применение методов математического планирования эксперимента при отыскании оптимальных условий культивирования микроорганизмов. М., Изд-во МГУ, 1969.

Рункова Г. Г. Опыт применения некоторых методов математического планирования эксперимента в эколого-биохимических исследованиях.— Математическое планирование эксперимента в биологических исследованиях. Труды Ин-та экологии растений и животных УНЦ АН СССР, 1975, вып. 97.

Dietz, Lubrano. Separation and Quantitation of lactic Dehydrogenase Isoenzymes by Disc Electrophoresis.— Anal. Biochem., 1967, vol. 20.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НЕКОТОРЫХ ПРОБЛЕМ
ПОПУЛЯЦИОННОЙ ЭКОЛОГИИ · 1978

И. П. ГУЛЯЕВА

ПОЛУЧЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ СЫВОРОТКИ КРОВИ МЫШЕВИДНЫХ ГРЫЗУНОВ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ПОЛИМОРФИЗМА ТРАНСФЕРРИНОВ В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ

Трансферрины — белки сыворотки крови, которые переносят железо, необходимое для построения молекул гемоглобина. Известно, что их полиморфизм имеет генетический характер. В ряде работ о наследовании трансферринов у разных животных (Manwell, Barker, 1970), в том числе и у полевок (Maurer, 1967; Canham, Cameron, 1972) показано, что синтез трансферринов контролируется серией кодоминантных аллелей в единственном аутосомном локусе. Некоторые исследователи связывают наличие многих генетических вариантов трансферринов с бактерицидными свойствами (Manwell, Barker, 1970).

В связи с тем, что распределение трансферриновых аллелей в популяции имеет вероятностный характер, для изучения генетического полиморфизма по данному белку необходимо накопление достаточного в статистическом отношении материала. Особое значение приобретает разработка методов, позволяющих исследовать максимальное количество животных.

Цель настоящей статьи — отыскать методы получения сыворотки мышевидных грызунов, годные для определения трансферринов у живых и мертвых зверьков, а также исследовать влияние длительного хранения сыворотки тех же животных на содержание в них трансферринов. Последнее связано с необходимостью разделения времени отлова животных и лабораторного исследования их трансферринов.

Материал и методика

Опыты проводили на самцах и самках рыжей полевки *Clethrionomys glareolus* Schreber, 1780 из природной популяции (Ильменский заповедник) и лабораторной колонии.

Типы трансферринов исследовали методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле по методике Орнстейна и Дэвиса (Ornstein, 1964; Davis, 1964). Электрофорез проводили в трис-глициновом буфере при pH 8,6, силе тока 2 *ма* на трубку в течение первых 30 *мин* и 5 *ма* на протяжении последующего часа. Для окраски использовали раствор амидошварца 10 *В* в 7%-ной уксусной кислоте. Типы трансферринов определяли по электрофоретической подвижности, которую рассчитывали, используя формулу

$$Rf_{Tf} = l_1/l_2,$$

где l_1 — расстояние от старта до главной, интенсивно окрашенной (мажорной) полосы трансферрина в гелевой трубке; l_2 — расстояние от старта до полосы бромфенолового синего, который добавляли в катодный буфер до начала электрофореза.

С помощью микрофотометра МФ-2, снабженного самописцем КСП-4, одновременно снимали общую денситограмму белкового спектра. Кровь у полевок брали двумя методами. Пойманных с помощью живоловок живых зверьков анестезировали эфиром и после соответствующей фиксации пипеткой Пастера брали у них кровь из сонной артерии и переносили ее в сухую пробирку. Через несколько часов выдерживания при температуре 18—20° С кровь центрифугировали в течение 5 *мин* (3 тыс. *об/мин*), сыворотку переносили в ампулу, которую запаивали и в полевых условиях помещали в сосуд Дьюара с сухим льдом.

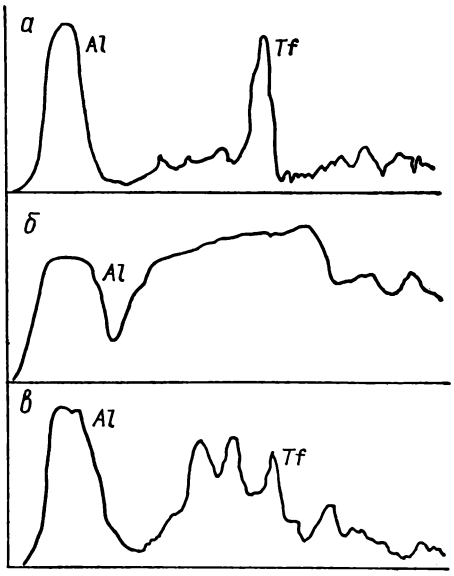
У погибших во время отлова животных кровь брали (вскоре после гибели) из сердца, используя пипетки Пастера, предварительно обработанные гепарином, пробы центрифугировали 15 *мин* при 3 тыс. *об/мин*, плазму переносили в ампулу, которую также запаивали и хранили в сосуде Дьюара с сухим льдом.

В зависимости от размеров животных с помощью описанных методов получали от 0,01 до 0,5 *мл* крови. Для определения трансферринов методом электрофореза брали 2 μл сыворотки. В лаборатории ампулы с сывороткой хранили в низкотемпературном холодильном пульте при —15° С.

Результаты и их обсуждение

Результаты определения электрофоретической подвижности трансферринов в сыворотке десяти живых (опыт 1) и десяти погибших (опыт 2) полевок одного вида при использовании двух разных методов забора крови следующие:

№ опыта	Rf_{TfA} ($\bar{x} \pm m$)	Критерий достоверности t
1	0,400±0,005	1,0
2	0,398±0,004	



Денситограммы белков сыворотки крови полевок.

а — нормальная сыворотка, *б* — сильно гемолизированная, *в* — частично гемолизированная.

Данные показывают, что апробированные нами методы получения сыворотки у живых и мертвых зверьков дают достоверно не отличающиеся результаты по электрофоретической подвижности трансферрина (t=1,0). На рисунке представлены денситограммы, полученные при электрофоретическом исследовании сыворотки живых зверьков и погибших при отлове в холодное время года, т. е. замерзших. Из рисунка отчетливо видно, что взятие крови из сердца замерзших животных не спасает пробы от сильного гемолиза. Электрофоретический анализ показывает, что у замерзших полевок тип трансферрина определить невозможно (вся средняя часть денситограммы занята белками, отсутствующими в негемолизированной плазме).

Однако частично гемолизированная сыворотка крови с небольшим загрязнением белками эритроцитов (главным образом гемоглобином) вполне пригодна для анализа (см. рисунок). Дополнительные белковые полосы появляются на электрофореграмме в области между трансферринами и альбумином, не мешая определению типов трансферринов и не влияя на величину их электрофоретической подвижности.

Результаты электрофоретического определения трансферринов в сыворотке восьми полевок одного вида через семь месяцев хранения при температуре —15° С (опыт 2) и сразу же после отлова животного (опыт 1) следующие:

№ опыта	Rf_{TfA} ($\bar{x} \pm m$)	Критерий достоверности t
1	0,401±0,002	0,7
2	0,400±0,003	

Из результатов видно, что достоверные различия в содержании трансферринов определенного типа в опытах со свежеполученной плазмой и хранившейся семь месяцев не обнаружены.

Таким образом, апробированные нами методы получения сыворотки и плазмы крови исследованных мышевидных грызунов так же, как проверенные условия хранения сыворотки, могут быть рекомендованы для изучения генетического полиморфизма трансферринов в природных популяциях. Использование живых и погибших, но не замерзших зверьков, как и хранение плазмы при температуре —15° С, позволяет разделить во времени проведение исследования по генетическому полиморфизму трансферринов на два этапа: а) отлов животных, включая сбор погибших в живоловках зверьков, и консервирование сыворотки в полевых условиях; б) непосредственное электрофоретическое определение трансферринов в пробах после их хранения в лаборатории при температуре —15° С.

ЛИТЕРАТУРА

Canham R. P., Cameron D. Y. Variation in the Serum Proteins of the Red — backed Mice Clethrionomis rutilus and C. gapperi and its Taxonomic Significance.— Canad. J. Zool., 1972, vol. 50, N 2.

Davis B. Disc electrophoresis — II. Method and application.— Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964, vol. 121.

Maurer J. W. Heritability of the Plasma Transferrin Protein in Three Species.— Heterosis. Protein Polymorphism and Animal Breeding. London, 1970.

Maurer J. W. Heritability of the Plasma Transferrin Protein in Three Species of Microtus.— Nature, 1967, vol. 215.

Ornstein L. Disc electrophoresis — I.— Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964, vol. 121.

СОДЕРЖАНИЕ

Г. Г. Рункова. Об эффективности активного эксперимента в эколого-биохимическом исследовании 3

Г. Г. Рункова, З. Л. Степанова. О зависимости регулирующих свойств экзометаболитов от возрастной структуры популяции 13

З. Л. Степанова. Аминокислотный состав белково-пептидных веществ водной среды из популяций головастиков остромордой лягушки . . . . . , . 27

Л. А. Ковальчук, А. П. Ястребов. О возможности применения метода полярографии для изучения окислительного обмена земноводных 31

Л. А. Ковальчук. Специфичность действия экзометаболитов головастиков при хранении их в виде лиофилизата водной среды 38

Л. М. Сюзюмова, Н. П. Глинских. Воздействие метаболитов личинок амфибий на рост клеточных культур. 44

Н. Ф. Завада. Общая активность, теплоустойчивость и коэффициент Вант-Гоффа сукцинатдегидрогеназы в некоторых тканях полевок с разной степенью специализации. 51

Н. Ф. Завада, Г. П. Павлов. Изоферментный спектр лактатдегидрогеназы у полевки Миддендорфа в условиях экстремального охлаждения 64

Г. Г. Рункова, Н. Ф. Бабушкина. Метаболическая реакция серых полевок на охлаждение в условиях лабораторного разведения 69

И. П. Гуляева. Получение и хранение сыворотки крови мышевидных грызунов при изучении полиморфизма трансферринов в природных популяциях 78

УДК 571.1:51+591.5

Об эффективности активного эксперимента в эколого-биохимическом исследовании. Рункова Г. Г. «Биохимические аспекты некоторых проблем популяционной экологии». Свердловск, 1978 (УНЦ АН СССР).

Специфика дыхания и окислительного фосфорилирования у головастиков *R. arvalis* на 25, 26, 27 и 28-й стадиях развития из популяций с высокой и нормальной плотностью изучена на малом и большом числе животных. Серии опытов поставлены по плану полного факторного эксперимента (ПФЭ) типа 2^2 и однофакторного.

В условиях одинаковой точности и достоверности ($S^2\{b_i\}=S\{y\}/2\cdot 6$ и 5%-ном уровне значимости) в сериях на 48, 96—168 головастиках получены одинаковые выводы: различие в уровне интенсивности и характере окисления у исследованных личинок определяется их стадией развития и плотностью популяции. Тождественность результатов ПФЭ типа 2^2 и соответствующих ему однофакторных экспериментов рассматривается как иллюстрация высокой эффективности математического планирования в эколого-биохимическом исследовании.

Таблиц 2. Иллюстрации 1. Библ. 24 назв.

УДК 571.1:51+591.5

О зависимости регулирующих свойств экзометаболитов от возрастной структуры популяции. Рункова Г. Г., Степанова З. Л. «Биохимические аспекты некоторых проблем популяционной экологии». Свердловск, 1978 (УНЦ АН СССР).

Исследовано влияние водной среды из «загущенной» популяции головастиков *R. arvalis* и некоторых ее белков на эндогенную активность оксидаз отдельной личинки в течение 49 дней развития в зависимости от стадии, степени родства с донором и возрастной структуры популяции.

Опыты поставлены на гомогенатах и интактных личинках по схеме однофакторного эксперимента и по плану полного факторного эксперимента (ПФЭ) типа $2^3\cdot 4$. Показано, что уровень эндогенных оксидаз на каждой из четырех исследованных стадий зависит от времени с момента формирования популяции. Обнаружено, что стадиоспецифичность и специфичность действия на уровне семьи по отношению к эндогенной активности оксидаз головастиков со стороны водной среды их обитания и выделенных из нее белков имеют неодинаковую направленность на протяжении первых 49 дней развития популяции.

Предполагается, что ингибирование эндогенных оксидаз у личинок своей и чужой кладки исследованного вида через 18, 38 и 42 дня с момента формирования популяции связано с накоплением белков глобулиновой природы (наблюдается идентичность экспериментальных данных для водной среды головастиков и белков, выделенных из нее с помощью сульфата аммония). При этом авторы считают, что активация через 29 дней от начала опыта по отношению к обмену личинок чужой кладки не вызвана накоплением экзоглобулинов (водная среда активирует оксидазы личинок чужой кладки, выделенные из нее белки не действуют).

Неадекватность уравнений регрессии, полученных в эксперименте, указывает на сложность характера взаимосвязей между действием экзометаболитов и изученными популяционными параметрами. Для построения модели, позволяющей прогнозировать выделение экзобелков с заданными свойствами, предлагается расширить число факторов в эксперименте за счет использования исходных биохимических характеристик для головастиков ранних стадий и определенного возраста.

Таблиц 3. Иллюстраций 1. Библ. 13 назв.

УДК 571.1:591.5

Аминокислотный состав белково-пептидных веществ водной среды из популяций головастиков остромордой лягушки. Степанова З. Л. «Биохимические аспекты некоторых проблем популяционной экологии». Свердловск, 1978 (УНЦ АН СССР).

Изучено содержание белково-пептидных веществ и их аминокислотный состав в водной среде пяти популяций головастиков остромордой лягушки. Показана стадиоспецифичность водной среды по общему количеству белково-пептидных веществ и их аминокислотному составу.

Таблиц 1. Библ. 3 назв.

УДК 571.1:591.5

О возможности применения метода полярографии для изучения окислительного обмена земноводных. Ковальчук Л. А., Ястребов А. П. «Биохимические аспекты некоторых проблем популяционной экологии». Свердловск, 1978 (УНЦ АН СССР).

В статье предложен новый вариант полярографического метода определения потребления кислорода у личинок амфибий in vivo. Он позволяет изучать интенсивность дыхания личинок земноводных при различных исходных уровнях pO_2 в водной среде, в условиях, максимально адекватных физиологическим. Использование амитала натрия для обнаружения амиталрезистентного дыхания дает возможность исследовать соотношение фосфорилирующего и свободного окисления в условиях in vivo у личинок земноводных.

Таблиц 2. Иллюстраций 2. Библ. 20 назв.

УДК 571.1+591.5

Специфичность действия экзометаболитов головастиков при хранении в виде лиофилизата водной среды. Ковальчук Л. А. «Биохимические аспекты некоторых проблем популяционной экологии». Свердловск, 1978 (УНЦ АН СССР).

Изучены регуляторные свойства лиофилизата водной среды из «загущенной» популяции головастиков *R. arvalis* при хранении его в условиях низких температур (от 0 до +3° С). Поставлено четыре серии опытов по планам ПФЭ типа 2^3 и 2^2: через семь, 38 и 60 дней с момента лиофилизации.

Установлено, что в исследованные сроки лиофилизат водной среды из «загущенной» популяции головастиков обладает стадио-, видо- и кладоспецифичностью действия на окислительный обмен отдельной личинки.

Таблиц 2. Иллюстраций 2. Библ. 6 назв.

УДК 591.393:576.3

Воздействие метаболитов личинок амфибий на рост клеточных культур. Сюзюмова Л. М., Глинских Н. П. «Биохимические аспекты некоторых проблем популяционной экологии». Свердловск, 1978 (УНЦ АН СССР).

Исследовано влияние водной среды из популяций личинок бесхвостых амфибий (*R. arvalis Nills.*, *R. japonica* и *B. orientalis*) на рост клеточных культур РН, НЕр-2, ФЭЧ. Показано, что внесение в питательную среду экзометаболитов (в соотношении 3 : 1) не препятствует образованию монослоя. Водная среда из популяций личинок остромордой лягушки, развивающихся в разных условиях плотности, оказывает разное влияние на рост клеточных культур: стимулирует или ингибирует. Рассмотрен вопрос о роли концентрации метаболитов личинок в их действии на рост и развитие клеток в клеточных культурах.

Таблиц 2. Иллюстраций 2. Библ. 11 назв.

УДК 571.51+591.5

Общая активность, теплоустойчивость и коэффициент Вант-Гоффа сукцинатдегидрогеназы в некоторых тканях полевок с разной степенью специализации. Завада Н. Ф. «Биохимические аспекты некоторых проблем популяционной экологии». Свердловск, 1978 (УНЦ АН СССР).

Представлены результаты изучения общей активности, теплоустойчивости и коэффициента Вант-Гоффа сукцинатдегидрогеназы у северных и южных форм полевок в разных условиях охлаждения. Большинство исследуемых форм полевок незначительно различается по общей активности сукцинатдегидрогеназы в мышцах. Максимальная разница между ними обнаружена в условиях экстремального охлаждения. У обоих подвидов полевки-экономки в этих условиях наблюдается снижение активности сукцинатдегидрогеназы. У узкочерепных полевок реакция на экстремальное охлаждение зависит от принадлежности к подвиду (у северного подвида она снижается, а у южного — увеличивается). Общая активность сукцинатдегидрогеназы у полевки Миддендорфа в условиях экстремального охлаждения не изменяется. Теплоустойчивость сукцинатдегидрогеназы у северного и южного подвида узкочерепной полевки одинакова. Выявлены различия по коэффициенту Вант-Гоффа для сукцинатдегидрогеназы печени полевок. Сделано предположение, что снижение энергии активации у ферментов может являться одним из возможных путей адаптации организма к пониженным температурам окружающей среды.

Таблиц 5. Иллюстраций 1. Библ. 38 назв.

УДК 571.51+591.5

Изоферментный спектр лактатдегидрогеназы у полевки Миддендорфа в условиях экстремального охлаждения. Завада Н. Ф., Павлов Г. П. «Биохимические аспекты некото-

рых проблем популяционной экологии». Свердловск, 1978 (УНЦ АН СССР).

Методом электрофореза в 5,5-процентном полиакриламидном геле обнаружено наличие в гиалоплазме скелетной мышцы полевок Миддендорфа пяти форм лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Изучена зависимость общей активности и изоферментного спектра ЛДГ от пола, возраста и экстремального охлаждения. Показаны различия в изоферментном спектре ЛДГ у полевок двух возрастных групп (у восьмимесячных самцов доля анаэробных изоферментов в спектре ЛДГ ниже, чем у четырехмесячных). В условиях 20-минутного выдерживания полевок при температуре —15° не выявлено изменений в соотношении активностей аэробных и анаэробных изоферментов (Н/М).

Сделан вывод о том, что устойчивость полевок Миддендорфа к экстремальному охлаждению не связана с изменением активности и изоферментного спектра ЛДГ в скелетных мышцах.

Таблиц 3. Библ. 10 назв.

УДК 571.1:51+591.5

Метаболическая реакция серых полевок на охлаждение в условиях лабораторного разведения. Рункова Г. Г., Бабушкина Н. Ф. «Биохимические аспекты некоторых проблем популяционной экологии». Свердловск, 1978 (УНЦ АН СССР).

Изучены общая активность ЛДГ, ее изоэнзимы и соотношение *Н*- и *М*-субъединиц в гиалоплазме скелетных мышц экономок и узкочерепных полевок двадцатого поколения в условиях нормы и охлаждения.

Опыты поставлены по плану ПФЭ типа 2^4. Установлено, что аэробный характер изоэнзимного спектра ЛДГ в скелетных мышцах узкочерепных полевок, обнаруженный у животных седьмого — десятого поколений, в двадцатом поколении исчезает ($Н/М<1$). Различия по данному тесту между двумя исследованными видами в двадцатом поколении стираются, но при охлаждении животных вновь появляются и приобретают характер, выявленный в седьмом — десятом поколениях.

Высказывается предположение, что в процессе обособления узкочерепной полевки, как самостоятельного вида не без влияния низких температур, имело место изменение свойств ЛДГ скелетных мышц в сторону выравнивания ее чувствительности к малым и большим концентрациям пирувата за счет способности к одинаковому синтезу анаэробных и аэробных изоэнзимов данного фермента.

Таблиц 1. Иллюстраций 1. Библ. 7 назв.

УДК 577.1+591.5

Получение и хранение сыворотки крови мышевидных грызунов при изучении полиморфизма трансферринов в природных популяциях. Гуляева И. П. «Биохимические аспекты некоторых проблем популяционной экологии». Свердловск, 1978 (УНЦ АН СССР).

Показано, что описанные автором методы получения сыворотки крови у живых и плазмы у погибших (но не замёрз-

ших) зверьков дают однозначные результаты. Не обнаружено достоверных различий в денситограмме проб, взятых на электрофорез сразу после отлова и после 7 месяцев хранения сыворотки при температуре —15° С.

Установлено, что описанная автором методика получения сыворотки крови и методика электрофоретического определения трансферринов для изучения крови замерзших зверьков не может быть использована (наблюдается интенсивный гемолиз, проявлению трансферрина мешает появление посторонних белков).

Иллюстраций 1. Библ. 5 назв.

БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НЕКОТОРЫХ ПРОБЛЕМ ПОПУЛЯЦИОННОЙ ЭКОЛОГИИ

Труды Института экологии растений и животных УНЦ АН СССР, вып. 112

Утверждено к печати Редакционно-издательским советом Уральского научного центра АН СССР

Редактор *Т. П. Бондарович*
Обложка художника *М. Н. Гарипова*
Техн. редактор *Н. Р. Рабинович*
Корректор *И. М. Мигачёва*

РИСО УНЦ № 857—22(78). Сдано в набор 6/III 1978 г. Подписано к печати 1/XII 1978 г. НС — 19177. Формат 60×90 1/16. Усл.-печ. л. 5,5. Уч.-изд. л. 6,5. Бумага типографская № 1. Тираж 800. Заказ 161. Цена 65 коп.

РИСО УНЦ АН СССР, Свердловск, ГСП-169, Первомайская, 91.

Типография изд-ва «Уральский рабочий», г. Свердловск, просп. Ленина, 49.