

УДК 577. 112.3: 597. 851: 574.91

## АМИНОКИСЛОТНЫЙ СПЕКТР ПЛАЗМЫ КРОВИ ЭНДЕМИЧНОГО И ИНВАЗИВНОГО ВИДОВ ЗЕМНОВОДНЫХ ФАУНЫ УРАЛА

© 2021 г. Л. А. Ковальчук<sup>1,\*</sup>, Л. В. Черная<sup>1</sup>, В. А. Мищенко<sup>1</sup>,  
Д. Л. Берзин<sup>1</sup>, академик РАН В. Н. Большаков<sup>1</sup>

Поступило 20.05.2021 г.  
После доработки 31.05.2021 г.  
Принято к публикации 31.05.2021 г.

Впервые представлены результаты сравнительного анализа свободных аминокислот в плазме крови земноводных фауны Урала: эндемичного вида – сибирского углозуба (*Salamandrella keyserlingii* Dybovsky, 1870) и инвазивного вида – озерной лягушки (*Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771). Показана видовая разнонаправленность адаптивных стратегий терморезистентных амфибионтов, как к отрицательным, так и к положительным температурам.

**Ключевые слова:** сибирский углозуб, озерная лягушка, аминокислоты, кровь

**DOI:** 10.31857/S2686738921050188

Амфибии, будучи одной из доминирующих групп среди всех классов позвоночных животных, вносят существенный вклад в видовое разнообразие не только водных, но и наземных экосистем. В настоящее время около трети видов этих животных находится под угрозой исчезновения [1, 2]. Представители фауны земноводных Урала из отряда Caudata – сибирский углозуб (*Salamandrella keyserlingii* Dybovsky, 1870) и из отряда Anura – озерная лягушка (*Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771) вызывают повышенный интерес, поскольку обладают разнонаправленностью адаптивных стратегий как пойкилотермные амфибионты, обитающие в диапазоне экстремально положительных и отрицательных температур [3, 4]. Исследователи отмечают повышенную холодоустойчивость самцов и самок сибирского углозуба и их способность переносить отрицательные температуры до  $-35...-40^{\circ}\text{C}$ , не теряя активности при  $0...+2^{\circ}\text{C}$  [5, 6]. Стратегия существования сибирского углозуба в условиях низких положительных и даже отрицательных температур способствует возможности расширения его ареала, северная граница которого проходит за Полярным кругом. Животные не переносят длительное пребывание на солнце и при температуре в тени около  $+27^{\circ}\text{C}$  погибают. В это же время инвазив-

ный для Урала вид – озерная лягушка толерантна к высоким положительным температурам. На Урале данный вид первоначально заселил термальные водоемы антропогенного происхождения (водоемы-охладители Верхнетагильской и Рефтинской ГРЭС, Свердловская область). Известно его обитание в горячих источниках, где температура воды достигает  $+30^{\circ}\text{C}$ , а иногда и выше [4, 7]. Аминокислоты и их производные, как универсальные биологические модификаторы и регуляторы важнейших метаболических реакций, ответственны за поддержание биологической целостности организма [3]. Известна регуляторная роль свободных АК в формировании адаптивной стратегии животных, обеспечивающая устойчивость популяционного гомеостаза в условиях как водного, так и наземного микроклимата [8–11]. Однако в имеющейся литературе информация о метаболизме свободных аминокислот в плазме крови амфибий фауны Урала не представлена. Впервые нами исследовано содержание свободных аминокислот (АК) в плазме крови половозрелых самцов земноводных ( $n = 11$ ), обитающих в нерестовых водоемах и в прибрежных наземных укрытиях при среднесуточной температуре воздуха  $+23^{\circ}\text{C}$  на территории Свердловской области ( $58^{\circ}0'0''$  с.ш.,  $62^{\circ}0'0''$  в.д.). Климат района исследования континентальный с продолжительной холодной зимой и сравнительно теплым коротким летом. Типичный инвазивный вид – озерная лягушка отловлена в неглубоких заводях реки Тагил. Летом температура воды составляет в среднем  $27.5 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$ . В период отлова углозубов в прибрежной зоне водоема – Калиновский пруд на

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт экологии растений и животных Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

\*e-mail: kovalchuk@ipae.uran.ru

**Таблица 1.** Содержание свободных аминокислот (мкмоль/л) в плазме крови самцов *S. keyserlingii* и *P. ridibundus*. Средние значения (m), стандартная ошибка (SE) и доверительный интервал [95%CI]

АК	Сибирский углозуб	Озерная лягушка
Histidine	188.9 ± 5.1 [174.9–203.1]*	80.2 ± 5.9 [65.1–95.3]
Threonine	35.4 ± 0.8 [33.3–37.6]	70.3 ± 6.0 [54.9–85.7]*
Arginine	78.6 ± 4.0 [67.5–89.8]*	38.6 ± 1.6 [34.5–42.6]
Valine	31.9 ± 0.9 [29.6–34.3]	81.9 ± 3.9 [71.6–92.1]*
Methionine	72.4 ± 2.3 [66.3–78.6]*	18.4 ± 2.8 [11.3–25.5]
Phenylalanine	27.4 ± 0.9 [24.9–29.8]	49.1 ± 3.0 [41.3–56.9]*
Isoleucine	7.7 ± 0.2 [7.2–8.2]	61.5 ± 2.6 [54.7–68.2]*
Leucine	33.8 ± 1.1 [30.9–36.8]	221.2 ± 12.4 [189.3–253.0]*
Lysine	103.3 ± 1.2 [99.9–106.6]	195.3 ± 7.3 [176.7–213.9]*
НАК	579.6 ± 5.8 [563.4–595.7]	816.4 ± 19.5 [766.3–866.4]*
Фонд свободных АК	1086.1 ± 15.4 [1043.2–1128.9]	1470.4 ± 49.0 [1344.0–1596.3]*

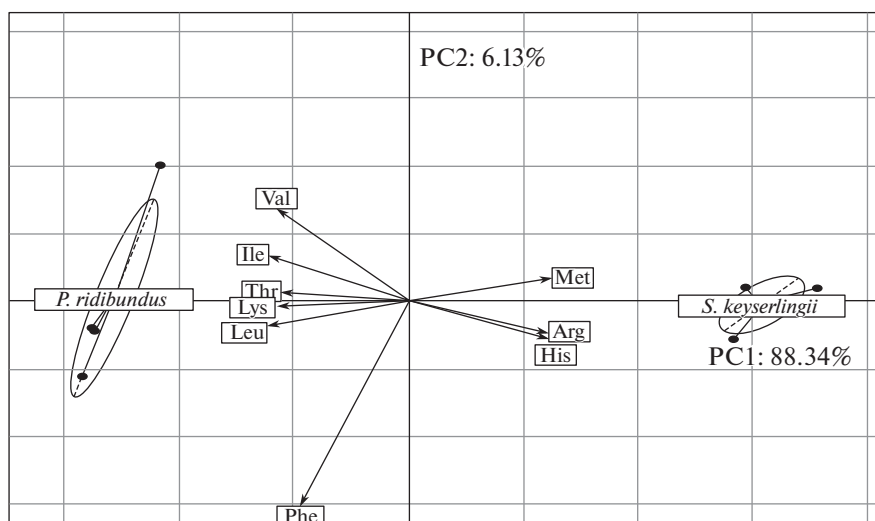
Примечание: \* – статистически значимые различия между группами, тест Тьюки (ANOVA),  $p < 0.0001$ ; НАК – незаменимые аминокислоты.

территории лесопарка городской агломерации Екатеринбургa, температура воды составляла в среднем  $21 \pm 0.3^\circ\text{C}$ . Животных доставляли в лабораторию в день отлова в июле–августе 2019 г. Образцы крови животных брали из миокарда. Плазму получали центрифугированием крови в рефрижераторной ультрацентрифуге K-23D (Германия) в вакутайнерах “Bekton Dickinson BP” (Великобритания) с ЭДТА в течение 15 мин при 3000 об/мин. Содержание свободных аминокислот (АК) в плазме крови животных определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на анализаторе Agilent 1260 Infinity II (Германия). Концентрацию АК выражали в мкмоль/л и в процентах от суммарного содержания. Выполнен анализ 187 аминокислотных проб. Результаты обработаны с использованием пакета лицензионных прикладных программ “Statistica v. 10.0”. Метод главных компонент (РСА) реализован посредством статистической среды R (R 3.1.2, пакеты “Vegan” и “Ade4”) [12].

Аминокислотный спектр плазмы крови амфибий представлен 17 АК: аспартат, глутамат, серин, гистидин, глицин, треонин, аргинин, аланин, тирозин, цистеин, валин, метионин, фенилаланин, изолейцин, лейцин, лизин, пролин. Сравнительный анализ показал значимые межвидовые различия по фонду свободных АК в плазме крови: у озерной лягушки  $1470.4 \pm 49.0$  мкмоль/л и сибирского углозуба  $1086.1 \pm 15.4$  мкмоль/л ( $p < 0.0001$ ). У исследованных амфибий, как и у теплокровных животных, присутствует полный спектр функционально значимых незаменимых АК: треонин, валин, лизин, лейцин, изолейцин, метионин, фенилаланин, аргинин, гистидин (табл. 1). Следует отметить, что незаменимые АК не могут быть по-

лучены в процессе биосинтеза и должны поступать в организм в виде пищевых белков извне, а отсутствие НАК ведет к угрожающим жизни явлениям [9]. Заслуживает внимание высокое процентное содержание НАК в крови сибирского углозуба – 53.4% и у озерной лягушки – 55.6% от общего фонда АК. По данным исследователей на равновесие азотистого и белкового обмена в организме амфибий указывает коэффициент отношения метаболических групп: незаменимых АК к заменимым АК [8–10]. Отмечен стабильно высокий аминокислотный баланс в плазме крови как у сибирского углозуба:  $K_{\text{НАК/ЗАК}} = 1.15$ , так и у озерной лягушки  $K_{\text{НАК/ЗАК}} = 1.25$ .

Аминокислотный спектр плазмы крови амфибионтов отражает не только энергетический метаболизм, участие в синтезе белка, но и его адаптивную роль в эволюционно закрепленных процессах при изменчивости широкого диапазона температур среды обитания. Доминирующими АК плазмы крови сибирского углозуба являются аспартат, цистеин, аргинин и гистидин: их суммарное содержание – 48% от общего пула, что в 3.6 раза выше, чем у озерной лягушки. Высокая концентрация гликогенного аспартата в плазме крови сибирского углозуба свидетельствует также и о его роли в качестве низкотемпературного адаптогена для этого вида [14]. Наибольший вклад в фонд незаменимых АК углозуба вносят аминокислоты, кратность превышения которых в сравнении с озерной лягушкой составила для гистидина – 2.4; аргинина – 2.0; метионина – 3.9. Следует отметить и высокое суммарное содержание метионина и цистеина, как иммуномодуляторов в плазме крови углозубов ( $177.6$  мкмоль/л),



**Рис. 1.** Содержание незаменимых аминокислот (% от фонда АК) плазмы крови самцов сибирского углозуба *S. keyserlingii* и озерной лягушки *P. ridibundus* в пространстве главных компонент. PC1, PC2 – оси главных компонент, % – процент дисперсии данных, объясненной главной компонентой; стрелки отражают корреляцию главных компонент с исходными показателями (аминокислоты); эллипсы представляют собой 95% доверительные области.

что на порядок превышает содержание этих АК (16.3 мкмоль/л) у озерной лягушки.

Полученные нами, а также литературные данные, позволяют считать, что значительная аккумуляция представленных аминокислот в плазме крови сибирского углозуба способствует защите клеточных мембран от функциональной дестаби-

лизации и, возможно, предполагает их протекторную роль в условиях низких температур [10, 13–15].

У теплоустойчивой озерной лягушки суммарное содержание основных гликогенных АК: аланина (16.5%), глутамата (6.2%), глицина (9.3%) от общего фонда АК составляет 32%, что в 2.0 раза выше, чем у углозуба. Особенностью АК фонда

**Таблица 2.** Результаты компонентного анализа незаменимых аминокислот (% от фонда АК) в плазме крови самцов сибирского углозуба и озерной лягушки (коэффициенты корреляции между 9 аминокислотами плазмы крови и основными компонентами PC1 и PC2 [пакет “Ade4”])

АК, % ( $i = 9$ )	Нагрузки (loadings, $a_{ij}$ )		Вклад в главную компоненту (Contribution = $(a_{ij}^2 * 100) / \lambda_j$ , %)	
	Главные компоненты (Principal Components – PC), $j = 1, 2$			
	1	2	1	2
Histidine	0.98***	–0.12	12.17	2.52
Threonine	–0.89**	0.03	10.04	0.14
Arginine	0.98***	–0.10	12.12	1.82
Valine	–0.92***	0.29	10.71	15.25
Methionine	0.99***	0.07	12.22	0.84
Phenylalanine	–0.76*	–0.64	7.24	74.71
Isoleucine	–0.98***	0.14	12.04	3.62
Leucine	–0.99***	–0.08	12.27	1.04
Lysine	–0.94***	–0.02	11.19	0.06
	Собственные значения (eigenvalues, $\lambda_j$ ) PC		Дисперсия, объясненная PC (%)	
	7.95	0.55	88.34	6.13

Примечание: статистически значимые коэффициенты корреляции \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , \*\*\* –  $p < 0.001$ .

лягушки, согласно нашим результатам, являются значительные концентрации лейцина до 15.1% и лизина до 13.3% от общего пула. Доминирующая аккумуляция этих АК дает основание полагать, что их высокое содержание, обусловленное участием в энергообменных процессах, предполагает и особую резервную роль в обеспечении устойчивости и толерантности лягушек к околонулевым температурам [11, 14, 15].

Методом главных компонент визуализирована видовая специфика незаменимых аминокислот плазмы крови сибирского углозуба *S. keyserlingii* и озерной лягушки *P. ridibundus*. По первой главной компоненте (PC1), на которую приходится 88.34% общей дисперсии данных, показана существенная пространственная дифференциация особей озерной лягушки и сибирского углозуба согласно процентному содержанию незаменимых АК в плазме крови (рис. 1). Наиболее высокие корреляции с PC1 отмечены для гистидина (0.98), аргинина (0.98), метионина (0.99), особенно высокое содержание которых в крови характерно для особей углозуба, а также изолейцина (−0.98) и лейцина (−0.99) — для лягушек ( $p < 0.001$ ). Вклад каждой из этих эссенциальных аминокислот в межвидовые различия превышает 12.03% (табл. 2).

Наименьший вклад в общую дисперсию данных вносит фенилаланин (7.24%), его корреляция с PC1 составила −0.76 ( $p < 0.05$ ). Для процентного содержания этой ароматической аминокислоты в крови исследуемых групп амфибий были отмечены наименьшие, но статистически значимые, межвидовые различия ( $p < 0.01$ ).

Таким образом, впервые исследовано содержание свободных аминокислот в плазме крови земноводных фауны Урала: эндемичного вида — сибирского углозуба и инвазивного вида — озерной лягушки. Полученные результаты позволяют оценить видовую специфику аминокислотного спектра, обеспечивающего выживание и эврибионтность исследованных видов в широком температурном диапазоне.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках государственного задания Института экологии растений и животных УрО РАН.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Отлов и содержание животных в лаборатории осуществляли в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и научных целей (European convention..., 1986).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы не имеют конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stuart S.N., Chanson J.S., Cox N.A., et al. Status and trends of amphibian decline and extinction worldwide // Science. 2004. V. 306. № 5702. P. 1783–1786.
2. Global amphibian assessment. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. 2008. Cambridge, UK. Available from: <http://www.globalamphibians.org>
3. Hochachka P.W., Somero G.N. Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. Oxford University Press. New York; 2002.
4. Большаков В.Н., Вершинин В.Л. Амфибии и рептилии Среднего Урала. Екатеринбург; 2005.
5. Куницын А.А. Материалы по распространению и экологии сибирского углозуба (*Hynobius keyserlingii*, Dybovsky, 1870) // Байкальский зоологический журнал. № 3. С. 31–34.
6. Берман Д.И., Мещерякова Е.Н., Булахова Н.А. Экстремальные отрицательные температуры и потери массы сибирским углозубом (*Salamandrella keyserlingii*, Amphibia, Hynobiidae) // Доклады Академии Наук. 2016. Т. 468. № 5. С. 590–593.
7. Лада Г.А., Тепляков А.А. Особенности биологии озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) в условиях теплового загрязнения // Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. 2014. Т. 19. № 1. С. 194–196.
8. Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition // Amino Acids. 2009. V. 37. № 1. P. 1–17.
9. Mishchenko V.A., Kovalchuk L.A., Bolshakov V.N., et al. Comparative Analysis of the Amino Acid Spectrum of Blood Plasma in Chiroptera (*Vespertilio murinus* L., 1758 and *Myotis dasycneme* B., 1825) in the Fauna of the Ural Mountains // Doklady Biological Sciences. 2018. V. 481. № 6. P. 157–159.
10. Kovalchuk L.A., Mishchenko V.A., Mikshevich N.V., et al. Free amino acids profile in blood plasma of bats (*Myotis dasycneme* Boie, 1825) exposed to low positive and near-zero temperatures // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 2018. V. 54. № 4. P. 281–291.
11. Каранова М.В. Влияние острого холодового шока на пулы свободных аминокислот прудовой рыбы ротана *Percottus glehni* (Eleotridae, Perciformes) // Известия РАН. Серия биологическая. 2011. № 2. С. 153–161.
12. Chessel D., Dufour A.B., Thioulouse J. The ade 4 package-I: One-table methods // R News. 2004. № 4. P. 5–10.
13. Озернюк Н.Д. Температурные адаптации. М.: изд-во Московского ун-та. 2000.
14. Каранова М.В. Вторичные метаболиты и аспарагиновая кислота в мозге амфибий *R. temporaria* как низкотемпературные адаптогены // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2020. Т. 56. № 3. С. 207–212.
15. Li N.G. Relationships between cold hardiness, and ice nucleating activity, glycerol and protein contents in the hemolymph of caterpillars, *Aporia crataegi* L. // Cryo Letters. 2012. V. 33. № 2. P. 134–142.

## AMINO ACID SPECTRUM IN THE BLOOD OF THE ENDEMIC AND INVASIVE AMPHIBIAN SPECIES IN THE FAUNA OF THE URAL

L. A. Kovalchuk<sup>a, #</sup>, L. V. Chernaya<sup>a</sup>, V. A. Mishchenko<sup>a</sup>, D. L. Berzin<sup>a</sup>,  
and academician of the RAS V. N. Bolshakov<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Federal State Budgetary Institution of Science Institute of Plant and Animal Ecology  
of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

<sup>#</sup>e-mail: kovalchuk@ipae.uran.ru

For the first time, the results of a comparative analysis of free amino acids in the blood plasma of amphibians of the Ural fauna are presented: an endemic species - the Siberian salamander (*Salamandrella keyserlingii* Dybovsky, 1870) and an invasive species – the lake frog (*Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771). The species diversity of adaptive strategies of thermoresistant amphibions, both to negative and positive temperatures, is shown.

*Keywords:* Siberian salamander, lake frog, amino acids, blood