

Г. Г. РУНКОВА, Л. А. КОВАЛЬЧУК, З. Л. СТЕПАНОВА

**О ПЕРСПЕКТИВАХ ВЫДЕЛЕНИЯ РЕГУЛИРУЮЩИХ
ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ С ПОМОЩЬЮ ЛИОФИЛИЗАЦИИ
ВОДНОЙ СРЕДЫ ИЗ «ЗАГУЩЕННЫХ»
ПОПУЛЯЦИЙ ГОЛОВАСТИКОВ**

(Представлено академиком С. С. Шварцем 31 III 1975)

При изучении механизмов метаболической регуляции в популяциях личинок земноводных с помощью морфо-физиологических и биохимических методов обнаружено, что водная среда из популяций головастиков и содержащиеся в ней белки регулируют рост, развитие и обмен отдельной личинки (¹⁻⁸).

Настоящая работа является частью следующего цикла биохимических исследований, связанных с выделением регулирующих метаболитов для их дальнейшего изучения и практического применения.

В качестве способа концентрирования и выделения нами опробовано лиофильное высушивание. Препарат был получен через 1 мес. с момента формирования «загущенных» популяций из водной среды головастиков *Rana arvalis* на промышленной установке типа К-30 фирмы «Frigeга» (ЧССР) по режиму, принятому для высушивания сывороточных белков. Регуляторные свойства препарата (его стадии- и видоспецифичность) проверялись *in vivo* и *in vitro* на головастиках и сеголетках *Rana arvalis* и *Rana cameroni* в опытах по влиянию его на выживаемость и скорость метаморфоза, интенсивность дыхания, свободного и фосфорилирующего окисления у интактных личинок и активность оксидаз в гомогенатах. Дыхание, свободное и фосфорилирующее окисление изучали полярографическим методом (⁹). Соотношение свободного и фосфорилирующего окисления находили, определяя амитадрезистентное и амиталчувствительное дыхание (¹⁰). При этом головастики выдерживались в водной среде из «загущенных» популяций в присутствии препарата (концентрация белка 0,05 мг/мл) и без него в течение 4 час., после чего у них определяли интенсивность дыхания до выдерживания в растворе амитала и после 7-минутного воздействия амталом (2 мг/мл). Эндогенную активность оксидаз находили спектрофотометрически в гомогенатах головастиков по чувствительности тетразоловой реакции к кислороду воздуха (¹¹). Поставлено пять серий опытов по плану полного факторного эксперимента (ПФЭ) типа 2³ и 2² (¹²) и пассивным методом. Результаты статистически обработаны (¹²).

В первой серии «лиофилизированная» водная среда из «загущенной» популяции головастиков *Rana arvalis* ($\bar{X}_1$) вводилась в гомогенаты головастиков того же вида на 26 и 27 стадиях развития ($\bar{X}_2$) из своей и чужой кладки ($\bar{X}_3$). Определялась эндогенная активность оксидаз. Получено уравнение регрессии:

$$y = 2,36 + 0,26X_2 - 0,15X_3 - 0,31X_1X_2 + 0,18X_1X_3 - 0,25X_2X_3 - \\ - 0,28X_1X_2X_3; \quad tS\{b_i\} = 0,11; \quad S^2\sigma\delta < FS^2\{\bar{y}\}.$$

Во второй серии по тому же плану (ПФЭ 2³) изучалось влияние препарата (X_1) на интенсивность дыхания, фосфорилирующего и свободного

Таблица 1

Специфичность действия «лиофилизированной» водной среды из «загушенных» популяций головастиков * *R. arvalis* на их выживаемость и скорость метаморфоза при непосредственном введении ее в водную среду обитания

Популяции	Опыт **	Число сеголеток	%	Число погибших	%	Число оставшихся	%
<i>Rana arvalis</i>	I	28	46,7	18	30	14	23,3
из кладки № 1	II	17	28,3	23	38,3	20	33,3
<i>Rana arvalis</i>	I	30	50	21	35	9	15
из кладки № 2	II	32	53,3	20	33,3	8	13,3
<i>Rana cameroni</i>	I	6	20	11	36,7	13	43,3
	II	7	23,3	13	43,3	10	33,3

* Популяции, сформированные 14 VII 1973 г. из головастиков 25, 26 и 27 стадии развития, плотность 10 г/л. Характеристика снята 22 VII 1973 г.

** I — белки не вводились; II — в течение первых пяти дней вводилось по 50 мг порошка, полученного при лиофильном высушивании 200 мл «воды скоплений» из «загушенной» популяции головастиков (кладки № 1).

Таблица 2

Эндогенная активность оксидаз, дыхание и интенсивность фосфорилирующего окисления у сеголеток, подвергнутых действию своих и чужих экзометаболитов на 27 стадии личиночного развития

Кодированные переменные			Потребление кислорода								ТТХ _{аргон} /ТТХ _{воздух}				
			до введения амитала, в микроатомах на 100 мг сырого веса в мин.					амиталчувствительное дыхание, % к исходному							
№ варианта	X ₁	X ₂	y ₁	y ₂	y ₃	$\bar{y}$	$\bar{y}$	y ₁	y ₂	y ₃	$\bar{y}$	y ₁	y ₂	y ₃	$\bar{y}$
1	—	—	36,4	32,0	34,0	34,1	36,0	45,0	41,0	50,0	45,3	2,9	2,7	3,2	2,9
2	+	—	29,0	20,1	—	24,6	23,9	38,0	65,0	—	51,5	5,0	8,57	7,5	7,0
3	—	+	22,2	19,0	29,0	23,4	23,9	43,0	30,0	42,0	38,3	1,86	1,98	1,86	1,9
4	+	+	44,5	45,0	24,4	38,0	36,0	52,0	58,0	45,0	51,7	3,2	2,17	2,16	2,5

Примечание. Статистические показатели: $b_0 = 30$; $b_1 = 1,3$; $b_2 = 0,7$; $b_{12} = 6,03$; $S^2\{\bar{y}\} = 18$; $tS\{b_i\} = 5$; $y = 30 + 6,03 X_1 X_2$; $S^2 a \delta = 4,2 < FS^2\{\bar{y}\} = 6,9$ (дыхание до введения амитала); $b_0 = 46,7$; $b_1 = 4,9$; $b_2 = -1,7$; $b_{12} = 1,8$; $S^2\{\bar{y}\} = 28,3$; $tS\{b_i\} = 6,3$ (после введения амитала); $b_0 = 3,6$; $b_1 = 1,2$; $b_2 = -1,4$; $b_{12} = -0,9$; $S^2\{\bar{y}\} = 0,3$; $tS\{b_i\} = 0,6$; $y = 3,6 + 1,2 X_1 - 1,4 - 0,9 X_1 X_2$ (ТТХ_{аргон}/ТТХ_{воздух}).

$x_1(+)$ — вводилась лиофилизированная водная среда из загушенной популяции *R. arvalis*, $x_1(-)$ — лиофилизат не вводился; $x_2(+)$ — в качестве реципиента использованы сеголетки *R. arvalis*, кладка донора; $x_2(-)$ — как реципиент использованы сеголетки *R. cameroni*.

ТТХ_{аргон} — интенсивность восстановления тетразолхлорида при инкубации гомогената в атмосфере аргона; ТТХ_{воздух} — то же в атмосфере воздуха.

окисления у интактных головастиков 26 и 27 стадий развития (X_2) также из своей и чужой кладки (X_3). Получены уравнения регрессии:

$$y = 6,23 + 11,0X_1X_2 - 7,3X_1X_3, \quad tS\{b_i\} = 4,5, \quad S^2 a \delta < FS^2\{\bar{y}\} \\ \text{(до введения амитала);}$$

$$y = 40,0 - 9,1X_3 + 4,9X_2X_3 - 8,1X_1X_2X_3, \quad tS\{b_i\} = 4,3, \quad S^2 a \delta < FS^2\{\bar{y}\} \\ \text{(после введения амитала).}$$

В третьей серии исследовалось влияние «лиофилизированной» водной среды из «загушенной» популяции головастиков *Rana arvalis* (X_1) на интенсивность дыхания, свободное и фосфорилирующее окисление (y) у интактных личинок своего (*R. arvalis*) и чужого (*Rana cameroni*) вида (X_2). Изменений в потреблении кислорода в данной серии не обнаружено ($b < tS\{b_i\}$). Для фосфорилирующего окисления получено уравнение регрессии:

$$y = 28,9 + 4,1X_1 - 5,1X_2 + 8,5X_1X_2, \quad tS\{b_i\} = 1,8, \quad S^2 a \delta < FS^2\{\bar{y}\}.$$

В пятой серии изучалось влияние «лиофилизированной» водной среды из «загущенных» популяций головастика *R. arvalis* при ее непосредственном введении в среду обитания личинок своего и чужого вида из своей и чужой кладки (табл. 1). При этом препарат в количестве 50 мл вводился ежедневно в течение первых пяти дней с момента формирования популяции из головастика 25, 26 и 27 стадий развития. Через три дня с момента прекращения добавления лиофилизата определялись выживаемость и скорость метаморфоза головастика. Одновременно исследовались сеголетки, подвергавшиеся и не подвергавшиеся действию своих и чужих экзосметаболитов на 27 стадии личиночного развития (табл. 2, 4-я серия).

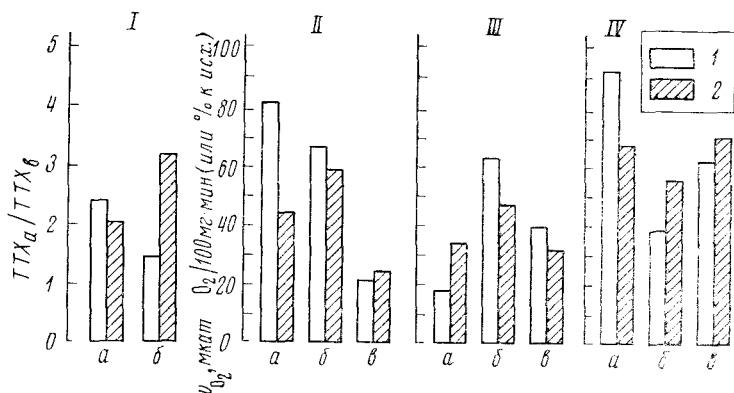


Рис. 1. Эндогенная активность оксидаз (I), общее потребление кислорода (II), фосфорилирующее (III) и свободное (IV) окисление у головастика *Rana arvalis* (а, б) и *Rana cammerani* (в) после 4-часового выдерживания в водной среде из «загущенных» популяций с добавлением лиофилизата (2) и без него (1). а, б — головастики 27 стадии развития, из своей и чужой кладки соответственно. Леофилизат растворялся в дистиллированной воде (50 мг/200 мл). Концентрация белка 0,05 мг/мл. Используются расчетные данные (y)

Анализ полученных уравнений и непосредственных величин, исследованных показателей (рис. 1, табл. 1, 2) показывает, что опробованный метод выделения — лиофилизация по режиму, принятому для сывороточных белков, позволяет получать препарат, сохраняющий регулирующие свойства водной среды головастика в условиях опыта *in vitro* и *in vivo*. «Леофилизированная» водная среда обладает хорошо выраженной специфичностью в действии на энергетический обмен отдельных личинок популяции, изменяя его в зависимости от стадии развития и степени генетического родства с донором ($b_{123} > tS\{b_i\}$ в первой и второй сериях; $b_{12} > tS\{b_i\}$ в третьей серии). Леофилизат, полученный через 1 мес. с момента формирования популяции донора, подавляет эндогенную активность оксидаз, общее потребление кислорода и ту часть дыхания, которая связана со свободным окислением у головастика 27 стадии своего вида и своей кладки (рис. 1а, I, II и IV). Те же показатели у головастика чужой кладки или чужого вида (рис. 1б, в, I, II и IV), напротив, в присутствии препарата увеличиваются или остаются на уровне нормы. Способность к фосфорилирующему окислению у личинок, генетически более близких донору, при этом возрастает (рис. 1а, III), у головастика чужой кладки и чужого вида — подавляется (рис. 1б, в, III). Аналогичные результаты получены в пятой серии опытов (табл. 1), из которых хорошо видно, что специфичность на уровне семьи и вида отчетливо проявляется и по отношению к биологическим характеристикам: выживаемости и скорости метаморфоза. При этом сеголетки, подвергавшиеся действию введенных экзосметаболитов (табл. 2), несмотря на развитие в условиях ингибирования свободного окисления, имеют неизменившийся (в сравнении с контролем) уровень фосфорилирующего окисления и эндогенной активности оксидаз ($b_{12} > tS\{b_i\}$ для амьтал-

чувствительного дыхания и $b_{12} > tS\{b_i\}$ для эндогенной активности оксидаз). Сеголетки, выросшие из головастика чужой кладки, и сеголетки *Rana сапегани*, подвергавшиеся в период личиночного развития действию лиофилизата от донора, генетически менее близкого (табл. 2), несмотря на одинаковую с контролем скорость метаморфоза, обладают более высоким уровнем энергетического обмена. При этом количество погибших головастиков в популяциях, обработанных и не обработанных лиофилизатом, одинаково. Полученные данные показывают, что ингибирование, вызванное введением регулирующих экзометаболитов, не является патологией для личинок популяции. Избирательно действуя на свободное окисление головастиков, которое, как известно (¹³), связано с интенсивностью роста в организме, регулирующие метаболиты задерживают метаморфоз отдельных личинок популяции, увеличивая одновременно их жизнеспособность за счет активации той части дыхания, которая ответственна за накопление макроэргических фосфорных соединений.

Институт экологии растений и животных
Уральского научного центра Академии наук СССР
Свердловск

Поступило
21 III 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ С. С. Шварц, О. А. Пястолова, Экология, № 1 (1970). ² С. С. Шварц, О. А. Пястолова, ДАН, т. 195, № 5 (1970). ³ Л. А. Ковальчук, Г. Г. Рункова, Тез. докл. Уральск. конфер. молодых ученых: Человек и биосфера, Свердловск, 1973. ⁴ Г. Г. Рункова, З. Л. Степанова, Л. А. Ковальчук, Тез. докл. симпозиума: Роль факторов внешней среды в онтогенезе, М., 1974. ⁵ Г. Г. Рункова, З. Л. Степанова, Л. А. Ковальчук, ДАН, т. 217, № 3 (1974). ⁶ З. Л. Степанова, Экология, в. 3 (1974). ⁷ Г. Г. Рункова, Матер. отчетной сессии. Ин-т экол. раст. и животн. Уральского научного центра АН СССР, 1974. ⁸ Г. Г. Рункова, Матер. II Всесоюзн. конфер. Биологическая и медицинская кибернетика, т. 5, Прикладные вопросы биол. и мед. кибернетики, М.—Л., 1974. ⁹ Г. М. Франк, М. Н. Кондрашова, Руководство по изучению биохимического окисления полирографическим методом, «Наука», 1973. ¹⁰ С. Н. Маслов, И. Н. Ивашкина, Вопр. мед. хим., т. 10, в. 1, «Медицина», 1964. ¹¹ Г. Г. Рункова, Н. Ф. Завада, В. И. Купцова, Экология, № 3 (1974). ¹² В. Н. Максимов, В. Д. Федоров, Применение методов матем. планирования экспериментов, М., 1969. ¹³ В. П. Скулачев, Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи, М., 1962. ¹⁴ Г. Хогебум, В. Шнейдер, Цитоплазма, Сб.: Нуклеиновые кислоты, М., ИЛ, 1957.