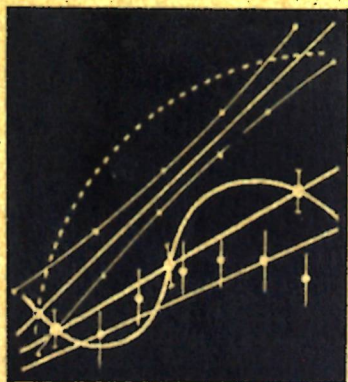


п-161
97

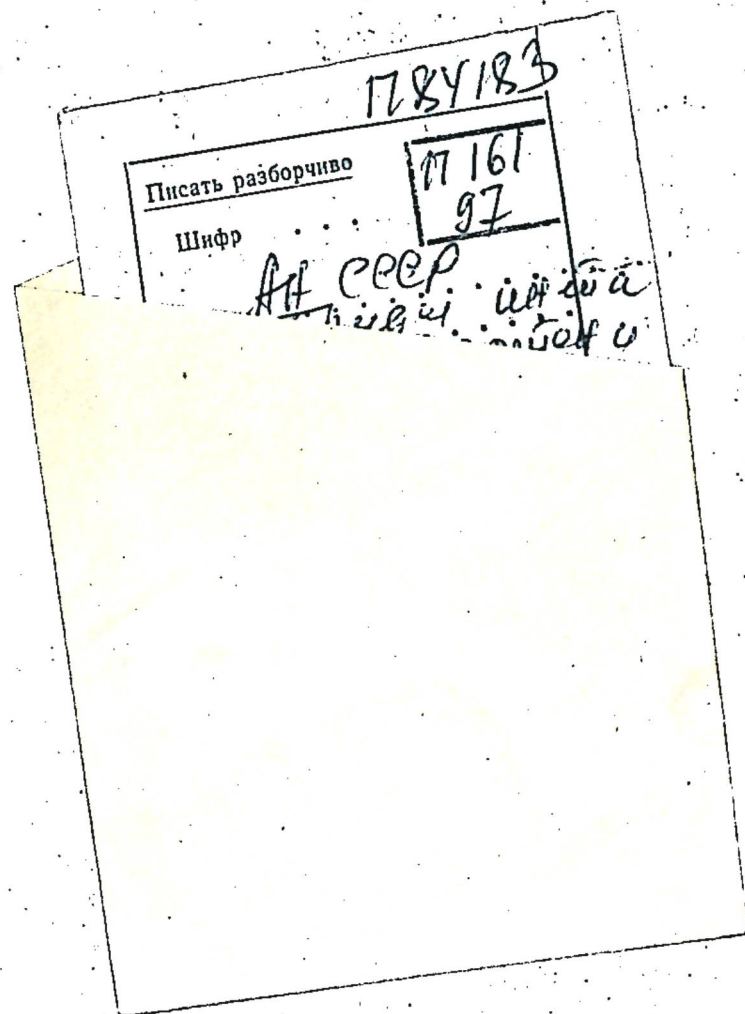
АКАДЕМИЯ НАУК СССР
УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

**МАТЕМАТИЧЕСКОЕ
ПЛАНИРОВАНИЕ
ЭКСПЕРИМЕНТА
В БИОЛОГИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЯХ**



СВЕРДЛОВСК • 1975

95



МАТЕМАТИЧЕСКОЕ
ПЛАНИРОВАНИЕ
ЭКСПЕРИМЕНТА
В БИОЛОГИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЯХ

СВЕРДЛОВСК

П-1335
П-161

57X.081(06)

УДК 571.1:51+591.5

Математическое планирование эксперимента в биологических исследованиях. Сб. статей. Свердловск, 1975 (УНЦ АН СССР).

На примере изучения ряда актуальных проблем популяционной экологии показаны явные преимущества практического использования отдельных методов математического планирования эксперимента в эколого-физиологическом и эколого-биохимическом исследовании перед пассивным. В результате применения полного и дробного факторного эксперимента, а также планирования по типу латинского квадрата получен ряд моделей, позволяющих предвидеть тип метаболической реакции при воздействии некоторых экологических факторов на нескольких изученных уровнях интеграции, включая вид, подвид, генетические варианты, отдельный организм, гомогенаты, гиалоплазму и изоэнзимы, связанные с молекулярной структурой фермента.

Сборник рассчитан на биохимиков, экологов, физиологов, радиобиологов и биологов, интересующихся прикладной стороной современной теории эксперимента.

Ответственный редактор С. С. ШВАРЦ.

П 84183



© УНЦ АН СССР, 1975.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ ПЛАНИРОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА
В БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ, 1975

УДК 571.1:51+591.5

В. Н. МАКСИМОВ

ПОЛИНОМИАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ ПРИ РЕШЕНИИ ЗАДАЧ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ

При решении задач оптимизации процессов, интенсивность которых зависит от многих факторов, все чаще применяют методы планирования эксперимента (Налимов, Чернова, 1965; Адлер и др., 1971). Их эффективность связывают прежде всего с возможностью варьировать совокупность факторов и с последующим учетом влияния каждого из них во взаимодействии с остальными. Основой большинства используемых методов активного эксперимента следует считать регрессионный анализ, результатом которого является полином некоторой наперед заданной степени, называемый часто уравнением регрессии.

В тех случаях, когда единственная цель исследования — поиск оптимальной комбинации изучаемых факторов, уравнение регрессии используется сугубо формально, как своего рода эквивалент графика, сглаживающего экспериментальные данные (Максимов, Федоров, 1969а). Существует представление о том, что полином как функция, аппроксимирующая данные опыта, вообще не может считаться моделью. Он отражает только индивидуальные особенности той системы, которая экспериментально исследовалась, и не характеризует как-либо фундаментальные стороны механизма изучаемого процесса. В подтверждение этого приводят обычно то соображение, что уравнение регрессии, полученное, например, для зависимости роста культуры микроорганизмов определенного вида от состава культуральной среды, не пригодно для описания такой же зависимости другого вида.

Ранее мы уже пытались продемонстрировать ограниченность такого подхода (Максимов, Федоров, 1969б). В ряде работ было показано, что полином может достаточно успешно применяться как описательная модель, позволяет представить в компактной и обозримой форме весьма сложные зависимости

(Федоров и др., 1970; Максимов, Белоусова, 1971; Карауш, Максимов, 1971; Максимов и др., 1971).

Поскольку материалы данного сборника представляют собой результаты последовательного применения полиномиальных моделей при решении широкого круга эколого-физиологических и биохимических задач, нам кажется уместным еще раз остановиться на вопросе о правомерности использования уравнения регрессии в качестве модели процесса, изучаемого с помощью активного эксперимента.

Рассмотрим самый простой случай — получение полинома первой степени с одной независимой переменной:

$$y = b_0 + b_1 x_1. \quad (1)$$

Задача сводится к отысканию значений коэффициентов b_0 и b_1 , для чего ставят ряд опытов, т. е. задают произвольные значения x_{1u} и измеряют соответствующие им величины y_u . Результаты такого эксперимента можно представить в виде таблицы, в которой против каждого значения x_{1u} , заданного в u -ом опыте, будет стоять полученное значение y_u . Если опыты ставятся в нескольких повторностях, то против каждого значения x_{1u} окажется несколько значений y_{uj} , по которым определяют средние \bar{y}_u .

При условии, что величины x_{1u} задавались в эксперименте без ошибок (или, по крайней мере, с ошибками, значительно меньшими, чем ошибки y_u), можно найти величины b_0 и b_1 с помощью известного метода наименьших квадратов. Для нашего случая расчетные формулы достаточно просты:

$$b_1 = \frac{N \sum x_{1u} \bar{y}_u - \sum x_{1u} \sum \bar{y}_u}{N \sum x_{1u}^2 - (\sum x_{1u})^2}; \quad b_0 = \frac{\sum \bar{y}_u - b_1 \sum x_{1u}}{N}, \quad (2)$$

где N — общее число опытов.

Цель дальнейших расчетов по схеме регрессионного анализа — проверить соответствие между экспериментальными данными \bar{y}_u и значениями \hat{y}_u , рассчитанными по уравнению (1) с коэффициентами b_0 и b_1 , которые найдены по формулам (2). Разница между экспериментальными значениями \bar{y}_u и величинами \hat{y}_u может быть связана как со случайными ошибками в определении \bar{y}_u , так и с систематическим отклонением реальной зависимости $y = f(x)$ от линейной. Для статистического анализа данной ситуации требуется допущение, что ошибка в определении \bar{y}_u распределена нормально с математическим ожиданием, равным нулю, и дисперсией σ^2 . Тогда для проверки гипотезы линейности можно использовать известный критерий Фишера. Дисперсия неадекватности линейной модели

$$s_{ад}^2 = \frac{\sum (\bar{y}_u - \hat{y}_u)^2}{N - 2} \quad (3)$$

должна быть в F_α раз больше, чем дисперсия воспроизводимости $s^2(\bar{y})$, чтобы можно было отвергнуть гипотезу линейности с уверенностью в $(1 - \alpha) \cdot 100\%$. В противоположном случае нет оснований отказываться от линейной модели. В более категоричной форме этот вывод иногда формулируется так: линейная модель $y = b_0 + b_1 x_1$ с удовлетворительной точностью описывает результаты эксперимента.

Возможен и другой вариант, когда экспериментатор уверен в том, что связь между y и x_1 строго линейна. В этом случае причиной отклонений $\bar{y}_u - \hat{y}_u$ следует считать только ошибки в измерении \bar{y}_u , и дисперсия неадекватности $s_{ад}^2$ сама по себе может оценить ошибку воспроизводимости.

Все эти достаточно хорошо известные рассуждения и выкладки приведены, чтобы подчеркнуть некоторые детали, которые редко обсуждаются в специальной литературе, поскольку представляются очевидными для математиков. Отметим прежде всего, что результатом линейного регрессионного анализа оказывается уравнение прямой — уравнение (1), проведенной через совокупность экспериментальных точек некоторым способом, наилучшим в том смысле, что сумма квадратов отклонений экспериментальных точек от расчетной прямой оказывается меньше суммы квадратов отклонений тех же точек от любой другой прямой, проведенной в плоскости yOx_1 .

По логике метода наименьших квадратов, совершенно не обязательно предполагать наличие в действительности линейной зависимости $y = f(x)$. Ход рассуждений можно представить примерно таким: имеем совокупность экспериментальных точек на плоскости yOx_1 . Найдем прямую линию $\hat{y} = b_0 + b_1 x_1$, такую, чтобы оказалась минимальной сумма $\sum (\bar{y}_u - \hat{y}_u)^2$. Если эта сумма, минимальная из всех возможных, окажется несущественно (по критерию Фишера) отличающейся от суммы квадратов, связанной с ошибкой в определении \bar{y}_u , будем считать, что наша прямая в пределах изученных изменений x_1 хорошо описывает зависимость $y = f(x)$.

Чтобы подчеркнуть условность такого вывода, рассмотрим искусственный пример, приведенный на рис. 1. «Экспериментальные точки» нарочито выбраны таким образом, чтобы они оказались точно на кривой второго порядка, т. е. на квадратичной параболе. В то же время из-за того, что ошибка воспроизводимости была достаточно велика, прямая, проведенная через совокупность выбранных точек методом наименьших квадратов, вполне удовлетворяет сформулированному выше требованию адекватности модели: F — отношение для приведенного примера равно 1,55 и не превышает табличного значения даже для 5%-ного уровня значимости. При всей искусственности данного примера вряд ли можно утверждать, что

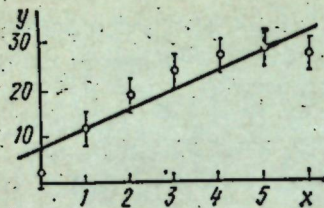


Рис. 1. Прямая $y = 8 + 4x$ проведена «наилучшим образом» через точки, лежащие на параболу $y = 3 + 10x - x^2$. Величина $s(y) = 3,29$ показана с помощью «кусов», проведенных вверх и вниз от экспериментальных точек. Дисперсия неадекватности линейного приближения $s_{ад}^2 = 16,8$.

он совершенно нереален. В нем лишь утрировано то обстоятельство, что при достаточно больших ошибках воспроизводимости эксперимента (а биологические эксперименты, как правило, имеют именно такие ошибки) мы можем не обнаружить отклонения от выбранной модели и принять ее как адекватную для описания изучаемого процесса даже в том случае, если она на самом деле не отражает истинного вида исследуемой зависимости.

Другой гипотетический пример приведен на рис. 2. Выбранные на нем «экспериментальные точки» абсолютно точно расположены на некоторой прямой, не имеющей никакого отношения к истинной кривой.

В общем случае возможность такой ситуации нельзя игнорировать, но это значит, что, если расчетная прямая и «описывает вполне удовлетворительно экспериментальные данные», это не гарантирует отсутствие у реальной функции $y=f(x)$ заметных отклонений от прямой в точках, расположенных между экспериментальными.

Таким образом, представляется вполне правомерным вопрос: если линейная модель (1) адекватна по отношению к точкам, через которые она проведена, то в какой мере ее можно использовать для интерполяции, т. е. для предсказания значения y в любой точке, не совпадающей с точками исходного эксперимента. Речь идет, в сущности, о представительности выборки из точек эксперимента по отношению ко всей совокупности точек (генеральная совокупность), составляющих кривую $y=f(x)$.

Проверка такой представительности может быть проведена после постановки дополнительных экспериментов в промежуточных точках. Если отклонения новых экспериментальных точек от значений y , предсказанных моделью (1), окажутся статистически незначимыми, то мы обретаем несколько большую уверенность в том, что выбранная модель верна. Однако никакие математические ухищрения не помогут оценить степень этой уверенности и ответить на внешне очень простой

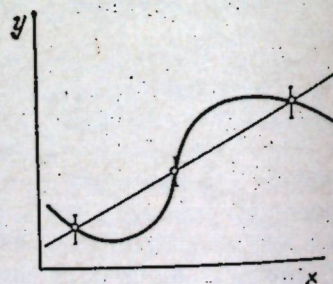


Рис. 2. Три точки, лежащие на прямой, принадлежат в действительности кривой третьего порядка.

вопрос: сколько именно нужно дополнительных опытов, чтобы уменьшить вероятность ошибки в выборе модели до некоторого заданного уровня.

Логический тупик, в котором мы оказались, возник потому, что при описанной выше постановке эксперимента не было оговорено до опыта, какая именно зависимость предполагается между зависимой и независимой переменными. В данном случае мы умышленно имитировали обычный подход экспериментатора, которому трудно понять, как вообще можно обсуждать возможный вид изучаемой зависимости до получения результатов опытов. В этом и заключено, по нашему мнению, основное расхождение в образе мышления у экспериментаторов и специалистов по планированию эксперимента, поскольку последним в принципе непонятно, каким образом можно планировать эксперимент, не имея priori заданного порядка полинома.

Вернемся теперь к задаче о линейной модели. Выше мы уже упоминали о том, что возможна ситуация, когда экспериментатор заранее уверен в существовании линейного закона для изучаемой зависимости. Таков, например, случай построения калибровочного графика для какого-либо колориметрического определения. Приводим типичный случай построения такого графика по шести экспериментальным точкам (рис. 3). Для конкретности укажем, что по оси абсцисс отложена величина биомассы бактериальной культуры в граммах на литр, а по оси ординат — оптическая плотность этой культуры, измеренная на ФЭК-56. Зададимся теперь вопросом, сколько нужно точек для построения калибровочной кривой? Если обратиться к повседневной практике аналитических лабораторий, то ответ будет довольно неопределенным (от 5 до 10), т. е. зависит от дотошности аналитика. Эта неопределенность связана с тем, что отсутствует ясность по поводу другого вопроса: что, собственно, достигается благодаря увеличению числа точек на калибровочной кривой, о которой заранее известно, что она прямая? Существует лишь интуитивное представление о том, что чем больше точек, тем «надежнее» калибровка.

Представляется вполне правомерным оценить степень «надежности» или, если угодно, «качество» калибровки каким-либо

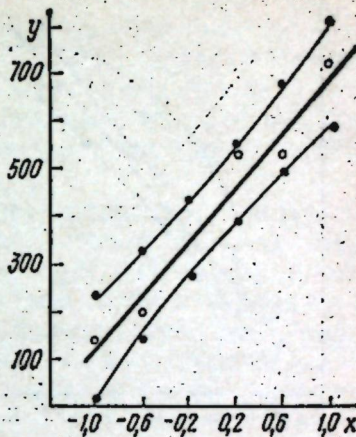


Рис. 3. Калибровочная прямая $y = 411,6 + 290,7x$, проведенная общепринятым способом по шести точкам, с доверительным коридором $t_{0,05}(4) \cdot \sqrt{s^2(y_k)}$. Для дисперсии воспроизводимости принято $s^2(y) = s_{ад}^2 = 2201,5$.

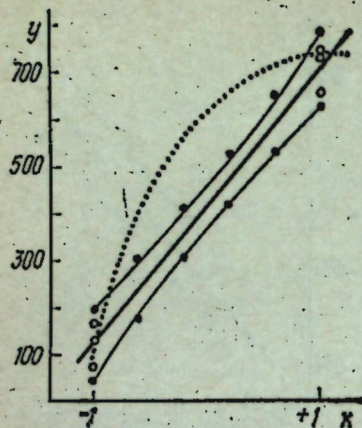


Рис. 4. Прямая $y = 411,5x + 290,5x$, проведенная через две точки, каждая из которых найдена по трем параллельным определениям. $s^2\{y\} = 2201,5$. Доверительный коридор заметно уже, чем на рис. 3.

дисперсия воспроизводимости $s^2\{y\}$ одинакова. Кроме того, для упрощения расчетов примем, что в первом варианте все шесть точек равно расположены на изучаемом отрезке и возможно произвести кодирование переменных, как это принято при планировании эксперимента. Преимущества такого подхода хорошо известны и многократно описаны, и мы не будем на этом останавливаться, а воспользуемся сразу готовыми формулами для дальнейших рассуждений.

Имеем для дисперсии коэффициента регрессии следующую формулу:

$$s^2\{b_1\} = \frac{s^2\{\bar{y}\}}{\sum x_i^2} \quad (4)$$

Если кодирование переменных произвести так, как показано на рис. 3 и 4, то в первом варианте получим значение $\sum x_i^2 = 2,80$, а во втором, где для всех точек значения $x_i = \pm 1$, получим $\sum x_i^2 = 6,0$. Это значит, что в соответствии с формулой (4) мы во втором варианте определяем b_1 с дисперсией в 2,14 раза меньшей, чем в первом, при одном и том же числе опытов и одинаковой точности измерений в каждом отдельном опыте.

Формула для дисперсии предсказанного значения имеет вид

$$s^2\{y_k\} = \frac{s^2\{\bar{y}\}}{\sum x_i^2} (1 + x_k^2) \quad (5)$$

статистическим показателем. Таким показателем может быть либо дисперсия углового коэффициента прямой $s^2\{b_1\}$, т. е. точность в определении угла наклона калибровки, или дисперсия предсказанного значения $s^2\{y_k\}$, которая характеризует погрешность определяемой величины y , связанную с использованием калибровочного графика. Рассмотрим два варианта экспериментов: первый — как на рис. 3, т. е. шесть опытов без повторений в шести различных точках на исследуемой прямой; второй — с тем же количеством опытов, но сосредоточенных в двух крайних точках калибровочной кривой (рис. 4), так что каждому из двух фиксированных значений x_i будут соответствовать по три определения y_{ii} . Предположим, что в обоих случаях

где x_k — заданная точка на оси x ; y_k — рассчитанное по уравнению (1) значение y в этой точке. Ясно, что и для этого критерия качества уравнения (5) второй вариант постановки опытов (см. рис. 4), а иначе говоря, план эксперимента, явно предпочтительнее с точки зрения статистической надежности результатов.

Полученный результат для любого специалиста по теории эксперимента очевиден: прямую всегда можно провести через две точки, и чем дальше они друг от друга, тем точнее прямая проводится. Поэтому и факторные планы первого порядка для любого числа переменных предусматривают всего два уровня для каждого фактора — раз они рассчитаны на получение линейной модели, незачем увеличивать число градаций факторов, неоправданно расширяя объем эксперимента. Мы не стали бы так подробно останавливаться на столь простом вопросе, если бы не одно обстоятельство: по-видимому, никогда и нигде калибровочные кривые, даже в простейших колориметрических анализах, не строятся по «более выгодной» схеме (см. рис. 1), т. е., иначе говоря, по двум точкам, пусть даже дублированным несколько раз. И дело здесь не в статистическом невежестве экспериментаторов, а скорее, в некоторых особенностях их психологии. Суть в том, что даже в том бесспорном случае, когда справедливость закона Бугера — Ламберта — Бера для водных растворов красителей не вызывает сомнений, аналитик, строящий калибровку, предпочитает убедиться в этом на собственном опыте, на своем конкретном примере, хотя бы он и был уже многократно повторен в предыдущих работах. А для этого ему надо иметь на калибровочной кривой самое малое три точки, потому что только тогда можно уловить отклонение реальной зависимости от прямой. Еще лучше, если есть те самые 5—10 точек, которые все «хорошо ложатся на прямую»: тогда можно со спокойной совестью пользоваться калибровкой для дальнейшей работы.

Вот так и возникает понятие о «надежности» линейного приближения, которую никаким количественным показателем измерить, по-видимому, невозможно и которая тем не менее для экспериментатора оказывается важнее любых статистических выгод. И если приведенные рассуждения представляются основательными даже в искусственном примере, где заведомо верна линейная модель, то еще более основательны они для случаев, когда эксперимент ставится для изучения новых явлений и закономерностей, о которых заранее ничего не известно.

В этом одна из причин медленного распространения идей планирования эксперимента среди физиологов и биохимиков. Наиболее простые и экономные двухуровневые планы представляются им слишком примитивными, так как не учитывают возможные отклонения от линейности, а планы более высоких порядков оказываются слишком трудоемкими и сложными как

при обработке результатов, так и при интерпретации полученных уравнений.

Цель дальнейшего изложения — преодоление описанного выше «психологического барьера». Основная идея заключается в том, что степень полинома, используемого для описания изучаемого процесса, определяется не столько его близостью к реальной зависимости, сколько целью, которую ставит перед собой исследователь, проводя эксперимент.

Рассмотрим простейший пример. Предположим, что рис. 4 относится не к задаче построения калибровки, а как раз к тому случаю, когда исследуется неизвестная зависимость некоторого физиологического показателя y (например интенсивности дыхания) от какого-либо внешнего фактора x_1 (например температуры). Легко понять, что в такой ситуации экспериментальные данные, изображенные на рис. 4, можно статистически обработать иным способом. Мы имеем здесь два варианта опытов: первый — при более низкой температуре, второй — при более высокой, и каждый из них повторен три раза. Можно, следовательно, выдвинуть 0-гипотезу о равенстве двух средних \bar{y}_1 и \bar{y}_2 и подвергнуть ее обычной статистической проверке с помощью критерия Стьюдента или любого другого подходящего критерия. Если 0-гипотеза будет отвергнута, мы получим основание с определенной степенью уверенности (в соответствии с выбранным уровнем значимости) утверждать, что $\bar{y}_2 \neq \bar{y}_1$. В нашем конкретном случае это будет равносильно констатации того факта, что с возрастанием температуры в исследованном интервале наблюдается возрастание интенсивности дыхания.

Но этот вывод может быть сделан и на основе результатов регрессионного анализа. Для регрессионной прямой, проведенной через экспериментальные точки (см. рис. 4), необходимо лишь показать, что $b_1 \neq 0$, т. е. и здесь должны отвергнуть 0-гипотезу при заданном уровне значимости. По-видимому, нет никакой необходимости в проверке адекватности линейного приближения. Действительно, какова бы ни была реальная зависимость интенсивности дыхания от температуры (например, как изображено пунктиром на рис. 4), наш вывод о том, что при более высокой температуре дыхание протекает более интенсивно, остается верен для изученного интервала температур.

Особое место в теории эксперимента занимают так называемые задачи с качественными факторами. Если, например, вместо температуры возьмем такой фактор, как видовые различия животных, то, измеряя интенсивность дыхания у двух различных видов и используя в опыте по три особи каждого вида, можем получить данные, которые формально можно изобразить графически в точности так же, как на рис. 4. Но тогда точки x_{12} и x_{11} приобретают чисто условный смысл, поскольку значение \bar{y}_1 будет изображать интенсивность дыха-

ния одного вида животных, а \bar{y}_2 — то же для другого вида. Наличие расстояния между точками x_{11} и x_{12} и их порядок на оси x теряет всякий физический смысл: их следует рассматривать только как графический прием. Однако это ни в коей мере не мешает нам приписать фактору x_1 (видовые различия) для одного вида значение -1 , а для другого — значение $+1$ и провести для полученных данных все тот же регрессионный анализ. Достоверное отличие коэффициента b_1 от нуля будет тогда означать, что изученные виды существенно различаются по интенсивности дыхания, и если, например, $b_1 > 0$, то можно утверждать, что второй вид отличается большей интенсивностью дыхания, чем первый.

В задаче с качественными факторами очевидно, что проверить адекватность линейного приближения вообще бессмысленно, так как значения x_1 , промежуточные между x_{11} и x_{12} , попросту не существуют. Строго говоря, в этом случае не существует непрерывная на изучаемом отрезке функция $y=f(x)$, так что не понятно, что же аппроксимирует линейное уравнение регрессии? Здесь, по нашему мнению, имеет смысл следующий подход: будем рассматривать уравнение (1) как некоторый эквивалент утверждения: величина y при $x_1=+1$ превышает величину y при $x_1=-1$, если $b_1 > 0$. Такое утверждение остается справедливым даже при отсутствии какой-либо реальной функции $y=f(x)$ на выбранном отрезке. В то же время можно представить себе сколько угодно экспериментов, единственной целью которых является получение сведений, в точности совпадающих с указанным утверждением. В частности, в ряде статей настоящего сборника описаны результаты именно такого рода исследований.

Если мы согласимся с предлагаемой трактовкой уравнения (1), то приобретает вполне разумный смысл применение так называемых планов первого порядка, и прежде всего двухуровневых факторных планов, даже в тех случаях, когда заранее известно, что изучаемые зависимости по отдельным факторам заведомо нелинейны. Легко представить себе, например, задачу, в которой у двух видов животных нужно сравнить характер изменений интенсивности дыхания в одном и том же температурном интервале. Обозначив, как и ранее, более низкую температуру через « -1 », а более высокую через « $+1$ » и точно так же первый вид через « -1 », а второй через « $+1$ », мы легко получим простейший план эксперимента в виде так называемой матрицы полного факторного эксперимента (ПФЭ) типа 2^2 :

№ опыта	x_1 (температура)	x_2 (вид животных)
1	-1	-1
2	$+1$	-1
3	-1	$+1$
4	$+1$	$+1$

Согласно этому плану, в первых двух опытах измеряют интенсивность дыхания при двух температурах у животных первого вида, а в третьем и четвертом — у животных второго вида. Не обращая внимания на то, что в нашей матрице один фактор «качественный», а другой «количественный», мы можем произвести обычную обработку результатов измерений (в нашем случае — интенсивности дыхания) и найти оценки четырех коэффициентов в уравнении регрессии вида

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_{12} x_1 x_2. \quad (6)$$

Такую запись можно рассматривать и как эквивалент некоторого словесного описания, причем заметно более сложного, чем в рассмотренном ранее случае уравнения (1). Если там имели значение только знак коэффициента b_1 и его статистически достоверное отличие от нуля, то для «перевода на русский язык» информации, заключенной в уравнении (6), нужно учитывать значимость коэффициентов b_1 , b_2 , b_{12} , их знаки и соотношение абсолютных величин. Например, если $b_1 = b_2 = b_{12} > 0$, то это равносильно утверждению: при изменении температуры в изученном интервале наблюдается изменение интенсивности дыхания только второго вида, тогда как у первого интенсивность дыхания практически не меняется. При низкой температуре животные обоих видов не отличаются по интенсивности дыхания, но при высокой температуре последняя значительно выше у животных второго вида. Различные варианты подробного «перевода» рассматривались нами ранее (Максимов, Федоров, 1969а).

Усложнение словесного описания связано с появлением в уравнении (6) члена $b_{12} x_1 x_2$, т. е. взаимодействия факторов x_1 и x_2 . Если в уравнении (6) ограничиться только линейной частью, можно сделать ошибочный вывод о том, что интенсивность дыхания у второго вида всегда выше, чем у первого, и что повышение температуры действует одинаково на оба вида. Ошибки такого рода нередки в работах, сделанных с применением факторных планов. Во избежание их нужно твердо помнить, что в уравнениях регрессии, содержащих взаимодействия, линейные члены теряют самостоятельное значение, и влияние каждого из изученных факторов может обсуждаться только в зависимости от уровня всех остальных независимых переменных, взаимодействующих с ним.

Итак, если признаем, что получение информации, подобной приведенному выше утверждению, представляет собой определенную научную ценность, то должны также признать и целесообразность постановки экспериментов по факторным планам первого порядка, в которых каждый фактор получает только по два уровня даже в тех случаях, когда изучаемая зависимость нелинейна. Таким образом, по крайней мере на первом этапе исследований нет необходимости испытывать каждый

фактор на нескольких уровнях. Экономия опытов за счет применения дробных реплик представляется мало оправданной. Сокращение числа опытов достигается за счет потери информации о взаимодействиях и иногда даже за счет смещения оценок линейных эффектов. Это может быть оправдано при решении задач оптимизации, где ошибки в определении направления градиента, связанные с применением реплик высокой степени дробности, могут быть исправлены так сказать «по ходу дела». Если мы заинтересованы в получении полинома регрессии как описательной модели в указанном выше смысле, то от планов дробного факторного эксперимента приходится отказаться, во всяком случае при числе независимых переменных, не превышающем пяти.

Зато остается другая возможность «экономии усилий», на которой остановимся подробнее. При реализации приведенного выше плана ПФЭ 2^2 каждый из четырех опытов должен, очевидно, проводиться на нескольких животных, причем, естественно, нельзя заранее точно сказать, сколько именно животных необходимо взять для опыта. Можно лишь утверждать, что если в каждом опыте измерим дыхание у четырех животных, то это число не будет чрезмерно большим. На весь опыт в нашем распоряжении должно быть восемь особей первого вида и восемь особей второго, из которых по четыре особи будут содержаться при более низкой температуре, а другие четыре каждого вида — при более высокой. Тогда при определении значимости коэффициентов регрессии мы будем сравнивать их с величиной дисперсии $s^2\{b_i\} = \frac{s^2\{y\}}{N_n}$, где $s^2\{y\}$ — дисперсия единичного значения (рассчитываемая по N построчным дисперсиям); N — общее число опытов в плане; n — число повторностей каждого опыта. Предполагается, что все построчные дисперсии однородны, и число степеней свободы для дисперсии единичного значения $s^2\{y\}$ в этом случае равно $f_s = N(n-1)$. В нашем примере $s^2\{b_i\} = \frac{s^2\{y\}}{16}$; $f_s = 12$, так как $N = n = 4$.

Но если в нашем распоряжении 16 животных, то можно организовать другой эксперимент — по плану ПФЭ 2^4 , в котором как раз предусмотрены 16 опытов, но исследуется влияние на изучаемый показатель сразу четырех факторов. Третий фактор в нашем примере — пол животных. Нужно взять, следовательно, по четыре самки и по четыре самца каждого вида. Выбор четвертого фактора зависит от интересов исследователя. Это может быть, например, содержание кислорода в атмосфере или что-нибудь в этом роде. Финни (1970, стр. 73) совершенно прав, когда говорит: «Только человек, полностью лишенный воображения, затруднился бы в выборе добавочного полезного фактора».

Теперь каждый из 16 опытов будет поставлен на одном животном, но благодаря тому, что все опыты организованы по орто-

гональной схеме, где все эффекты определяются независимо друг от друга, оказывается возможным статистический анализ результатов такого эксперимента. Его лучше всего проводить с помощью 1/2-вероятностного (1/2-нормального) графика, как это было предложено Дэниелом (Daniel, 1959). Величина дисперсии воспроизводимости определяется в этом случае с числом степеней свободы $N - k - 1$, где k — число значимых коэффициентов в уравнении регрессии. При $k > 3$ это число будет меньше 12, как это было в первом варианте эксперимента с двумя факторами, так что надежность оценки $s^2\{y\}$ несколько меньше, но зато величина $s^2\{b_i\}$ будет равна $\frac{s^2\{y\}}{N} = \frac{s^2\{y\}}{16}$ и во втором варианте, т. е.

того же порядка, что и в первом. Таким образом за счет некоторого проигрыша в статистической надежности результатов получаем немалый выигрыш, исследуя сразу четыре фактора вместо двух. Удачный пример такого рода постановки опытов приведен Г. Г. Рунковой, которая исследовала влияние диэтилдитиокарбамата на эндогенный метаболизм селезенки и печени мышей (статья в наст. сборнике).

В заключение остановимся на одном принципиальном затруднении, возникающем при переходе к функциям с числом переменных более двух. Как и ранее, рассмотрим некоторый искусственный пример. В таблице приведены результаты опытов, поставленных по плану ПФЭ 2⁴. Регрессионный анализ этих результатов можно провести разными способами. Нередко можно встретить в литературе рекомендации: провести сначала линейный регрессионный анализ и проверить адекватность линейного приближения. Только в том случае, если линейная модель окажется неадекватной, вводят в модель члены более высокого порядка. Следуя этому, получаем уравнение

$$y = 100 + 35x_1 + 14x_2 + 16x_3 - 10x_4. \quad (7)$$

Величины \hat{y}_u , рассчитанные по уравнению (7), приведены в таблице. Дисперсию неадекватности рассчитывали обычным способом:

$$s_{ад}^2 = \frac{\sum (y_u - \hat{y}_u)^2}{N - k - 1} = \frac{15424}{16 - 5} = 1402,2.$$

Дисперсия воспроизводимости, определенная с 16 степенями свободы, была $s^2\{y\} = 1028,8$ и для найденной линейной модели

$$F = \frac{s_{ад}^2}{s^2\{y\}} = \frac{1402,2}{1028,8} = 1,36,$$

что значительно меньше табличного $F_{0,05}(11,16) = 2,5$. На этом статистический анализ следует считать законченным и далее, казалось бы, можно обсуждать полученные результаты.

Другой способ обработки результатов ПФЭ 2ⁿ основан на том, что в силу ортогональности матрицы планирования все 2ⁿ

Результаты опытов по плану ПФЭ 2⁴

№ опыта	Обозначение строк в плане	Результат опыта y_u	Величина \hat{y}_u , рассчитанная по уравнению (7)	Коэффициенты регрессии b_i	Величина \hat{y}_u , рассчитанная по уравнению (8)
1	«1»	73	45	100	89
2	a	105	115	35	111
3	b	41	73	14	41
4	ab	165	143	24	159
5	c	119	77	16	89
6	ac	135	147	5	111
7	bc	39	105	-4	41
8	abc	203	175	-3	159
9	d	53	25	-10	89
10	ad	33	95	-7	111
11	bd	49	53	12	41
12	abd	153	123	-6	159
13	cd	55	57	2	89
14	acd	115	127	2	111
15	bcd	91	85	1	41
16	abcd	171	155	-10	159

коэффициентов, начиная с линейных и до взаимодействия n -го порядка, определяются независимо с одинаковой дисперсией, равной в нашем примере

$$s^2\{b_i\} = \frac{1028,8}{16} = 64,30.$$

Величины всех 16 коэффициентов рассчитаны по алгоритму Ятса (см. таблицу). Среди них можно считать значимо отличными от нуля только два: $b_1 = 35$ и $b_{12} = 24$, поскольку они превышают величину $t_{0,05}(16) \sqrt{s^2\{b_i\}} = 2,1 \times 8,019 = 16,8$. Мы получаем, таким образом, другое уравнение

$$y = 100 + 35x_1 + 24x_1x_2, \quad (8)$$

для которого дисперсия неадекватности $s_{ад}^2 = \frac{15040}{13} = 1156,9$, так что $F = \frac{1156,9}{1028,8} = 1,12$, т. е. еще меньше, чем для уравнения (7).

Уравнения (7) и (8) сходны только тем, что у них одинаковый свободный член и линейный эффект первого фактора. Из уравнения (7) следует, что фактор x_4 отрицательно влияет на выход процесса, а по уравнению 8 его влияние не обнаруживается. То же относится и к фактору x_3 , который по уравнению (7) положительно влияет на y , а в уравнение (8) вообще не входит. Какое же из двух уравнений предпочесть? Этот вопрос не слишком важен для решения задачи оптимизации, так как можно в конце концов рассчитать два разных пути крутого восхождения, и первые шаги покажут, какой из них ошибочен.

Совсем иначе обстоит дело с использованием уравнения регрессии для описания процесса. Наличие или отсутствие того или иного эффекта оказывается здесь вопросом принципа.

В общем виде задача выбора «наилучшей» регрессионной модели по-видимому, не имеет однозначного решения. Например, Дрейпер и Смит (1973) описывают пять вариантов регрессионного анализа, отличающихся различными способами последовательного включения новых членов в уравнение регрессии. При этом для одного и того же исходного массива данных разные схемы расчета приводят к разным уравнениям регрессии. Еще более впечатляющий пример приведен в табл. 1.4 В. В. Налимовым и Н. А. Черновой (1965), где одни и те же результаты эксперимента одинаково хорошо (или, может быть, одинаково плохо?) описываются одиннадцатью разными уравнениями регрессии! Надо, однако, заметить, что подобная ситуация возникает при обработке данных «пассивного эксперимента», когда между независимыми переменными существуют заметные корреляции. В нашем же примере благодаря ортогональности плана мы получаем возможность однозначного выбора, поскольку уравнение (8), содержащее только значимые эффекты, явно «лучше» уравнения (7), в которое зачем-то включены члены с коэффициентами, незначительно отличными от нуля, и в котором отсутствует заведомо достоверный эффект взаимодействия.

По-видимому, только уравнение (8) можно считать моделью процесса в том смысле, который был подробно обсужден выше. Отсюда делаем вывод, что при решении задач описания, когда получаемую модель предполагается использовать для характеристики совместного влияния на процесс нескольких факторов, следует применять именно ортогональные планы, хотя они и не всегда оптимальны по другим статистическим критериям.

ЛИТЕРАТУРА

- Адлер Ю. П., Маркова Е. В., Грановский Ю. В. Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий. М., «Наука», 1971.
- Дрейпер Н., Смит Г. Прикладной регрессионный анализ. М., «Статистика», 1973.
- Карауш Г. А., Максимов В. Н. Изучение активности смешанных культур водорослей с помощью симплексно-решетчатых планов.— Биологические науки (Научные доклады высшей школы), 1971, № 8.
- Максимов В. Н., Федоров В. Д. Применение методов математического планирования эксперимента при отыскании оптимальных условий культивирования микроорганизмов. М., Изд-во МГУ, 1969а.
- Максимов В. Н., Федоров В. Д. Биологическая интерпретация результатов экспериментов, поставленных по планам первого порядка при решении задач оптимизации.— Инженерные проблемы микробиологического синтеза. М., 1969б (ВНИИА).
- Максимов В. Н., Белоусова А. А. Реляционные диаграммы как способ изображения многофакторных зависимостей.— Вести. МГУ, 1971, № 1, 49.

- Максимов В. Н., Турпаева Е. П., Симкина Р. Г. Интенсивность влияния нескольких факторов при их одновременном воздействии на популяцию усонного рачка *Balanus improvisus* Darwin.— Океанология, 1971, т. 9, № 6.
- Налимов В. В., Чернова Н. А. Статистические методы планирования экстремальных экспериментов. М., «Наука», 1965.
- Рункова Г. Г. Опыт применения некоторых методов математического планирования эксперимента в эколого-биохимических исследованиях.— Статья в наст. сборнике.
- Федоров В. Д., Белая Т. И., Максимов В. Н. Потребление биогенных элементов фитопланктонным сообществом в зависимости от их концентрации в водоеме и условий освещения.— Изв. АН СССР, серия биол., 1970, № 3.
- Финни Д. Введение в теорию планирования экспериментов. М., «Наука», 1970.
- Daniel C. Use of half-normal plots in interpreting factorial two-level experiments.— Technometrics, 1959, vol. 1.



УДК 571.1 : 51 + 591.5

Г. Г. РУНКОВА

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ НЕКОТОРЫХ МЕТОДОВ МАТЕМАТИЧЕСКОГО ПЛАНИРОВАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА В ЭКОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Для эколого-биохимических исследований характерным является изучение биологических взаимодействий, во-первых, и необходимость постановки эксперимента на минимальном количестве животных, во-вторых. Эти две существенные особенности нередко создают непреодолимые трудности при изучении экологической тематики биохимиками на основе классического пассивного эксперимента. Попытаемся объяснить это на конкретных примерах. Изучение биохимических механизмов адаптации к низким температурам не на уровне отдельной особи, а на уровне вида, популяции, отдельных форм, еще более близких, чем подвиды, таких, как полиморфные, требует постановки экспериментов по изучению влияния охлаждения у отдельных особей в зависимости от принадлежности к определенному виду, подвиду, форме, в зависимости от пола, возраста, в зависимости от соотношения полов и возрастов в популяции, от численности особей в популяции. Важно изучить влияние не одного варианта охлаждения, а определенного диапазона температур. Все эти направления исследования по указанной теме не искусственны, ибо в действительности в природе действуют не один и не несколько факторов, а бесчисленное множество. Каждый из них действует в зависимости от характера и степени влияния остальных, которые вместе с животными составляют единую экологическую систему.

Таким образом, в природе главное — это влияние взаимодействий. Получить количественную характеристику влияния биологических взаимодействий в условиях классического пассивного эксперимента невозможно. Изучить влияние низких температур без учета количественных характеристик влияния взаимодействий можно, но для этого требуется значительное количество

во животных. Если учесть, что для биохимических экспериментов в связи с большими индивидуальными колебаниями тестов от животных к животному необходимо использовать для изучения каждого фактора не менее 15 особей, то очевидны колоссальные затраты пассивного эксперимента. Требуя громадное количество животных, он не дает точной количественной характеристики влияния биологических взаимодействий.

Нередко изучение подобных проблем на биохимической основе просто невозможно: дикие животные с трудом поддаются разведению в искусственных, лабораторных, условиях, а сложность биохимических методик не позволяет экспериментировать непосредственно в природе, в поле.

Математические методы планирования эксперимента, которые позволяют на значительно меньшем количестве животных получить наиболее полную информацию в виде точных, вплоть до уравнений, количественных характеристик не только влияния всех перечисленных факторов в экологической системе, но и влияния отдельных биологических взаимодействий в ней, являются единственными методами, благодаря которым становятся реальной мыслью о биохимико-экологических исследованиях, в частности биохимико-популяционно-экологических.

Существуют два препятствия, на наш взгляд, для широкого внедрения методов математического планирования эксперимента в практику биохимико-экологических исследований. Первое состоит в том, что большинство экологов не знакомы с методами математического планирования эксперимента. Отсюда — непроизводительное использование ценнейшего подопытного материала. Например, из 24 выращенных в условиях лаборатории особей леммингов (уникальных, типично северных животных, 12 самцов и столько же самок), как правило, исследуются в опыте самцы, которых забивают в течение трех дней с единственной целью — получить исходную характеристику ряда морфофизиологических показателей (вес органов, длина костей, гистологические данные и т. д.). В то же время при использовании элементарного метода математического планирования по плану ПФЭ (полный факторный эксперимент) типа 2^3 , взяв в опыт всех животных, самок и самцов разного возраста, можно получить полную информацию по ряду не только морфологических, но и биохимических тестов. Причем не только для животных одного пола и возраста на уровне нормы, но одновременно характеристику влияния одного или двух факторов и их взаимодействий в зависимости от возраста и пола, от условий предварительной адаптации к одному из факторов (например, к длительному охлаждению).

Соединив в опыте уникальных животных с менее уникальными, можно, исследуя те же самые 12 или 24 животных, получить информацию по влиянию трех факторов (пола, длительной акклимации и возраста) на морфофизиологические и биохими-

ческие показатели отдельных тканей в зависимости от степени специализации вида, т. е. получить и исходную характеристику показателей, и информацию по влиянию биологических взаимодействий на широкий спектр тестов.

Второе препятствие на пути широкого использования методов математического планирования эксперимента в биохимико-экологических работах, по-видимому, состоит в том, что биохимики, проводящие экологические исследования и знакомые с основными принципами планирования, не имеют достаточно хороших условий для консультаций по математическому планированию в ходе эксперимента.

Биологический эксперимент и сами методы математического планирования в биохимико-экологических исследованиях приобретают особую специфику. Возникают вопросы, ответы на которые не удастся найти в методологических руководствах по планированию, поскольку в большинстве из них экспериментатор имеет дело с промышленным производством небологического профиля. Например, одна из трудностей — невозможность одновременной постановки всех вариантов любого плана — в большинстве руководств рассматривается как основное требование к плану.

Биохимические тесты, как правило, трудоемки. План из вариантов в трех повторностях обычно нельзя осуществить менее чем за две недели, иногда эти сроки увеличиваются до четырех недель. Необходимо рандомизировать опыты, полностью или частично, или разбить план на блоки. В таких случаях возникают определенные трудности. Использование такого средства, как разделение на блоки, имеет свои отрицательные, подчас неприемлемые, стороны для биохимика-эколога. Так, в случае ПФЭ и ДФЭ (дробный факторный эксперимент) оно связано с тем, что оценки влияния ряда взаимодействий оказываются смешанными, а взаимодействие, как уже подчеркивалось, представляет главный интерес для эколога.

Остается второй выход — рандомизация планов. Возникает вопрос, а всегда ли случайная последовательность проведения большого числа опытов в течение длительного времени (порядка месяца) дает возможность игнорировать побочное влияние временного дрейфа (например возраста), поскольку, чем дольше по времени от начала опыта поставлен вариант, тем большее значение может приобрести такой фактор, как увеличивающийся возраст подопытного животного. Далее, что приведет быстрее к истине — рандомизация всех опытов, предусмотренных планом, или рандомизация вариантов с их повторностями?

Какое место должны занимать планы ДФЭ в биохимико-экологических исследованиях? В экологических системах не может иметь место только линейное влияние отдельных факторов и взаимодействия не могут быть сведены к нулю. Казалось бы, и ДФЭ, где лишний фактор вводится за счет взаимодействия,

нецелесообразно использовать в эколого-биохимическом исследовании. В то же время при изучении большого числа факторов план ПФЭ становится громоздким, практически невыполнимым. Таким образом, напрашивается вывод, что в случае эколого-биохимического исследования целесообразнее идти не по линии уменьшения числа вариантов в условиях, когда количество изучаемых факторов возрастает и теряется часть информации по взаимодействиям, т. е. не по линии применения ДФЭ, а по линии использования ПФЭ, но полностью или частично рандомизированного. Какие методы математического планирования возможны в данном случае, помимо рандомизации, пока неясно.

Очень важным и спорным в эколого-биохимических исследованиях является вопрос о числе повторностей в вариантах плана. Дикое животное плохо переносит условия лабораторного существования. Опыт показывает, что в течение месяца, когда ставятся варианты в соответствии с планом, часть животных погибает или в распоряжении экспериментатора остается небольшое количество их и становится невозможной трехкратная повторность в каждом из вариантов. Нередко создается такая ситуация, когда в некоторых вариантах оказываются данные, полученные на двух и даже на одном животном.

Возникает вопрос о методике подсчета дисперсии воспроизводимости результатов в плане, где в каждом из вариантов разное число повторностей. Наконец, важно знать, можно ли считать правомочным расчет, когда в одном из вариантов не оказалось результатов и полностью неудавшийся вариант экспериментатор прогнозирует на основании данных по остальным вариантам плана? Какое число повторностей в каждом из вариантов является минимальным? Можно ли получить одинаковую степень достоверности, взяв четыре повторности в каждом из вариантов ПФЭ типа 2^2 (16 опытов) и по одному животному в каждом из 16 вариантов ПФЭ типа 2^4 ? Очень важен практический вопрос о числе так называемых параллельных проб в каждом из вариантов. Нам кажется, что при изучении биологического материала, где колебания показателя от животного к животному чаще всего велики, целесообразнее в каждом варианте учитывать результаты единичного определения на одном животном, исследуя таким образом ткань каждого из трех или четырех животных без параллельных определений. Что лучше, точнее — определение в каждом из вариантов показателей на трех-четыре животных без параллелей или использование меньшего числа животных, но с соответствующими параллелями на каждом из них?

Наиболее интересны такие планы, которые позволяют изучить влияние нескольких факторов сразу на нескольких уровнях. Такими планами являются латинские квадраты. Недостаток их в том, что изучаются линейные эффекты в системах, где взаимодействия приравнены к нулю. Нами латинский квадрат исполь-

зован в условиях, когда взаимодействия в системе были в действительности. Рассчитывая дисперсии единичного значения в таких планах, можно выявить с достаточной степенью достоверности в условиях действующих взаимодействий в системе линейное, несмешанное влияние отдельных факторов. Количественная характеристика влияния взаимодействий в этих случаях может быть найдена, по-видимому, путем расчета с помощью систем трех уравнений, составленных на основе такого свойства плана, как ортогональность. Однако при этом, как показывает практика, исчезает возможность для количественной оценки влияния факторов в условиях, когда третий фактор (или любой из трех) находится на первом уровне (или на одном из четырех, остальные три могут быть учтены).

Целесообразно ли использовать латинский квадрат в таком направлении? Целесообразно ли сочетание в этом случае дисперсионного и регрессионного анализа (расчет дисперсии единичного значения, дисперсии остаточной и коэффициентов регрессии)?

Наконец, нам кажется, что чрезвычайно перспективными в эколого-биохимических исследованиях могут быть планы совмещенной матрицы ПФЭ и латинского квадрата или прямоугльника. В современных руководствах (Маркова, 1971) они предлагаются для сравнительного изучения влияния отдельных факторов на качественно неоднородном материале. По-видимому, такие планы были бы хороши в случае изучения влияния взаимодействий различных факторов при параллельном исследовании одного вопроса на биологических препаратах разной степени интеграции, например гликолиза, — на кашице, срезах, гомогенатах, гналоплазме, или Р/О в экстрактах, митохондриях и гомогенатах (Р/О — отношение эстерифицированного неорганического фосфата к поглощенному кислороду — по Белицеру, Цыбаковой, 1939).

Такие совмещенные планы интересны при сравнительном изучении влияния отдельных градаций одного фактора (температура, концентрация гормона и т. д.) у двух различных объектов (вида и подвида, двух подвидов, двух биологических препаратов и т. д.).

Для будущего экологии чрезвычайно важен дискуссионный вопрос о формах общения между математиками, специалистами по планированию, и биохимиками, занимающимися изучением проблем современной популяционной экологии. Он тесно связан с другим принципиальным вопросом о характере связи математического планирования как метода с процессом познания механизмов, с теоретической стороной исследования вообще и биохимико-экологического в частности.

Существует мнение, что сферы деятельности математика и экспериментатора в исследованиях должны быть четко разделены. Экспериментатор ставит перед математиком задачу. Мате-

матик в соответствии с этой задачей составляет план и обрабатывает статистически полученные данные, делая выводы в виде математических уравнений, коэффициентов регрессий. На основании математической природы полученных выражений он дает математическую интерпретацию данных. Экспериментатор выполняет исследования по созданному плану и переводит язык математической интерпретации в биохимико-экологический.

Другая форма общения между математиком и экспериментатором сводится к полной самостоятельности последнего в исполнительском отношении, но в планировании, в экспериментировании и интерпретации данных эта самостоятельность должна осуществляться при условии постоянного творческого консультативного контакта с математиком.

Какие недостатки и преимущества, на наш взгляд, имеют эти две формы творческого содружества математика и эколого-биохимика?

Отрицательная сторона в первом случае, как показывает опыт, состоит в следующем. Во-первых, биолог, приступая к планированию опыта, в состоянии поставить перед математиком только узкую задачу. Обычно математика не удовлетворяет такая постановка вопроса. Вооруженный громадным запасом разнообразных вариантов планирования, он ищет большую задачу. Но если в промышленности или в экономике процесс (технологический, экономический) может быть представлен большим количеством различных факторов и цель состоит в выделении и нахождении оптимальных условий их действия, то биохимик, изучающий вопросы популяционной экологии, в первую очередь должен найти факторы, определяющие поведение экологической системы. Он планирует частную задачу, так как на первых этапах исследований не знает общей.

Например, изучая влияние низких температур на метаболизм ткани животного, которое является единицей популяции, биогеоценоза, биосферы, эколог мало знает о механизмах адаптации к этим температурам на высших уровнях интеграции. Если для небиолога постановка эксперимента по любому из методов математического планирования означает выявление значимых влияний безотносительно к механизму процесса, для подбора оптимальных условий выходного параметра, то для биолога, и эколога в особенности, изучение факторов, выявление значимых из них связано в большей степени с вопросом механизма процесса, с вопросом теории.

Возможно, прогнозирование на отдельных первых этапах экологического исследования не имеет достаточно большого практического значения, но правильность прогнозирования отдельных параметров экологической системы для эколога-экспериментатора — путь к принятию или непринятию гипотезы о механизме процесса.

Биолог планирует первые этапы приближенно в силу сложности биохимических явлений популяционного характера, постепенно решая небольшие задачи, идет к открытию закономерностей, к созданию теории. Эти особенности первых этапов планирования, невозможность решения вопроса в одном эксперименте смущают математика и создают для него трудности при планировании первых этапов, поскольку именно они содержат много интуитивного, что в состоянии учесть только специалист — биолог, эколог, биохимик.

Во втором случае общения биохимик, осведомленный в области основных принципов планирования, сам выбирает планы для первых этапов большой работы, зная специфику темы, учитывая практические возможности (количество животных, их возрастной состав, пол, возраст, воздействия в природе и в лаборатории), и постепенно интерпретирует результаты опытов. При этом для экспериментатора важны не столько консультации по схемам расчетов (хотя и это очень необходимо), сколько оценка математиком тех новых, неповторимых планов, которые рождаются в процессе работы биолога-исследователя в соответствии с особенностями частных задач.

В настоящей работе представлены первые шаги в области биохимической экологии, сделанные небольшим коллективом биохимической группы Института экологии растений и животных УНЦ АН СССР. Это первый опыт и в отношении биохимико-экологической тематики, и в отношении использования методов математического планирования эксперимента. При решении частных задач мы стремились применить определенные планы, которые в некоторых случаях использовались нами необычно в связи с особенностями выбранных направлений.

Цель настоящей работы — получить критическую оценку методических подходов и со стороны математиков, и со стороны экологов. Какие проблемы популяционной экологии могут быть решены с помощью биохимических методов?

Насколько удачно были применены нами отдельные варианты математического планирования эксперимента? Какие рекомендации относительно конкретных вопросов из области планирования могли бы дать нам, биохимикам и экологам, специалисты в этой новой области математической статистики?

Данная работа выполнена в отделе, руководимом С. С. Шварцем, которому автор приносит свою глубокую благодарность за руководство и ценные советы при планировании и выполнении экологической части исследования. За ценные и систематические консультации в области применения отдельных методов математического планирования эксперимента автор выражает признательность В. Н. Максимова и В. Д. Барскому, а также зоологам отдела за предоставление материала, который был использован в качестве объекта исследования.

ПОЛНЫЙ ФАКТОРНЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТ ТИПА 2² ПРИ ИЗУЧЕНИИ ВОЗМОЖНОСТЕЙ БИОХИМИЧЕСКОГО ЭКСПРЕСС-ПРОГНОЗА ЭФФЕКТИВНОСТИ РАДИОЗАЩИТЫ

Изучение биохимической природы радиорезистентности, по-видимому, можно рассматривать как один из возможных перспективных путей научно обоснованного поиска экспресс-методов определения эффективности радиозащиты. Поэтому естествен интерес биохимиков, работающих над радиобиологическими проблемами в экологическом плане, к изучению особенностей метаболической реакции на γ -облучение у радиорезистентных тканей. Особенно привлекает исследование интенсивности анаэробного и аэробного эндогенного метаболизма, поскольку при облучении окисление на уровне цитохромов подавлено и пониженная чувствительность к радиации может быть связана с усилением анаэробного обмена или с повышением активности оксидазных ферментных систем в момент облучения.

Получены результаты сравнительного определения активности эндогенных оксидаз в радиочувствительной селезенке и радиорезистентной печени в условиях γ -облучения животного малыми и летальными дозами (Рункова, Завада, 1971).

Цель исследования — найти достаточно простой метод определения выбранного биохимического показателя и путем сравнительного изучения его в норме и облучении в тканях, по-разному реагирующих на γ -радиацию, выяснить вопрос о корреляции данного теста с радиорезистентностью и вопрос о возможности его практического использования в целях экспресс-прогноза радиозащиты.

Методика

Опыты поставлены на 129 белых мышах — самках, линии БАЛБ, двух-трехмесячного возраста. Для определения активности эндогенных оксидаз использован 2, 3, 5-трифенилтетразолхлорид.

Соли тетразолия успешно применяют для определения функциональной активности тканей и отдельных клеток макроорганизма (легочная ткань и сперматозоиды), жизнеспособности микроорганизмов (Levine, Garber, 1950; Drimmelen, 1955; Varpes, 1956; Eidus и др., 1958; Иванова, Курнакова, 1960; Семанков, 1961; Сагатовский, 1961; Кушнарев, Благовещенский, 1961; Попова, 1963; Lenard, 1965).

Представляло интерес изучить возможность применения данного акцептора и для определения жизнеспособности отдельных тканей при γ -облучении животного. Многие исследователи определяют активность «тетразоловой пробы» в атмосфере воздуха (Гусев, Федоров, 1962; Gupta, Kambo, 1962). В целях усиления интенсивности восстановления тетразолия

иногда применяют такой прием, как ингибирование оксидаз с помощью введения в пробу цианистого калия или проведения реакции в вакууме, в анаэробных условиях (Black и др., 1950; Agonson, Pharmakis, 1962).

В некоторых тканях при разных функциональных состояниях животного чувствительность реакции восстановления тетразола к цианидам и кислороду воздуха неодинакова. Существует предположение, что отсутствие изменений в скорости данной реакции у ткани в присутствии цианида свидетельствует о слабости цитохромоксидаз и о наличии обходных, цианрезистентных, путей дыхания (Торчинский, 1958, 1959).

Одновременное определение интенсивности восстановления 2, 3, 5-трифенилтетразолхлорида при инкубации пробы в атмосфере аргона и в атмосфере воздуха нами впервые использовано как достаточно простой, новый, экспресс-биохимический тест, характеризующий степень ингибирования тетразоловой реакции кислородом воздуха, а следовательно, и активность эндогенных оксидаз. Данный прием позволил освободиться от обязательного в обычных условиях изучения активности ферментов параллельного определения содержания белка, азота или сухого остатка в пробе. Результаты определения активности эндогенных оксидаз представлены в виде относительной величины — коэффициента $ТТХ_a/ТТХ_b$ ($ТТХ_a$ — интенсивность восстановления 2, 3, 5-трифенилтетразолхлорида в гомогенатах ткани при инкубации в атмосфере аргона, $г/мл$; $ТТХ_b$ — то же, в атмосфере воздуха).

Высокая реактивность 2, 3, 5-трифенилтетразолхлорида как акцептора позволила использовать при определении активности оксидаз микроколичества ткани (15—30 мг) и сделала доступным для изучения селезенку, вес которой у лабораторных мышей порядка 60 мг.

Ход определения: животное декапитировали, нужную ткань извлекали, обмывали охлажденным трис-буфером, содержащим 0,005 М КСl, 0,001 М MgCl₂, и гомогенизировали в том же растворе при pH 7,4 и температуре 0, +2° С. Затем гомогенат разводили до нужного содержания ткани (15 мг/мл для печени и 30 мг/мл для селезенки) и переносили в пробирки типа сосуда Варбурга с двумя отростками, кранами на шлифах и стеклянной, хорошо пришлифованной пробкой. Предварительно в пробирки в основное пространство вводили по 1,0 мл трис-буфера 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 тетразола из боковых отростков переносили в пробы и все пробирки с аргоном и воздухом ставили в воздушный термостат (на 24 ч при 37° С). Образовавшийся в резуль-

тате восстановления формазан последовательно экстрагировали при непрерывном встряхивании с 2 мл ацетона, 2 мл толуола и 2 мл бутанола. Окрашенный верхний слой содержимого пробирок спектрофотометрировали при длине волны 494 мк в кювете толщиной 1 см, используя в качестве эталона контрольную пробу, которая содержала все реактивы, указанные выше, кроме гомогената, вместо которого добавляли равный объем дистиллированной воды. Коэффициент $ТТХ_a/ТТХ_b$ рассчитывали, взяв отношение тетразолвосстанавливающей активности гомогената, выраженной в экстинкциях на миллилитр, в условиях инкубации в атмосфере аргона и в атмосфере воздуха.

В качестве источника при тотальном внешнем облучении использовали ГУТ-400 Со⁶⁰. Представляем результаты трех серий опытов.

В первой серии изучали влияние различных возрастающих доз γ -радиации на активность эндогенных оксидаз в селезенке и печени белых мышей. Коэффициент $ТТХ_a/ТТХ_b$ определяли в гомогенатах через сутки после облучения. Опыты ставили методом классического пассивного эксперимента. Данные обработки с помощью известных приемов математической статистики (Рокицкий, 1961; Урбах, 1963).

Во второй серии опытов изучали влияние малой и летальной дозы γ -радиации на активность эндогенных оксидаз в печени и селезенке животных через сутки после облучения в зависимости от исходного уровня активности оксидаз у тех же животных в тех же тканях до облучения. Животные исследовались в этой серии осенью и весной. В каждый сезон брали две группы мышей: контрольную, не подвергавшуюся облучению, для определения исходного уровня теста, и опытную, которую облучали, и в тканях животных определяли коэффициент $ТТХ_a/ТТХ_b$. Опыты ставили по плану ПФЭ типа 2², т. е. изучали влияние двух факторов: исходного уровня теста (x_1) и дозы γ -радиации (x_2) на активность эндогенных оксидаз через сутки после облучения (y). В процессе регрессионного анализа данных использовали два разных метода (Грановский и др., 1963; Максимов, Федоров, 1969).

В третьей серии опытов изучали влияние ряда известных радиопротекторов на активность эндогенных оксидаз в селезенке тех же животных. Радиопротекторы вводили в дозах, которые дают определенный радиозащитный эффект. Активность ферментов определяли через разные промежутки времени после введения радиопротектора. Опыты ставили методом пассивного эксперимента, соответственно статистически обрабатывали, аналогично первой серии.

Результаты и их обсуждение

Из данных первой серии опытов (табл. 1, рис. 1) видно, что у необлученных животных в исследованный сезон (октябрь)

Активность эндогенных оксидаз в гомогенатах селезенки и

Доза, p	№ опыта	Колич. животных	Селезенка		
			$\frac{ТТХ_a}{ТТХ_b}$ через 24 ч после облучения ($\bar{X} \pm m$)	% к контролю	Достоверность
0	1	8	1,58 ± 0,12	100	—
200	2	7	2,88 ± 0,12	182	$t_{1,2}=6,9$
200	3	10	2,78 ± 0,11	175	$t_{1,3}=6,8$
200	4	15	3,30 ± 0,25	171	$t_{1,4}=4,7$
200	5	12	3,53 ± 0,26	223	$t_{1,5}=4,2$

Примечание — критерий Стьюдента.

достоверных различий по исходному уровню активности эндогенных оксидаз в селезенке и печени не обнаружено ($p > 0,05$).

В условиях действия сублетальных и летальных доз γ -радиации, когда смертность животных¹ составляет 100, 86, 67% и приспособительные механизмы, по-видимому, сведены к минимуму, наблюдается активация эндогенных оксидаз. Увеличение активности в селезенке выражено значительно сильнее и в тканях обоих органов достоверно ($p < 0,05$).

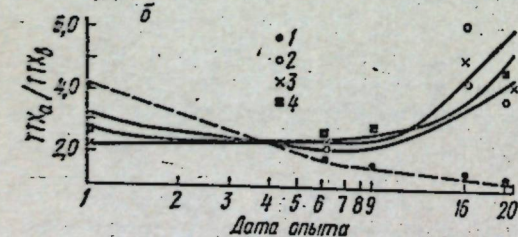
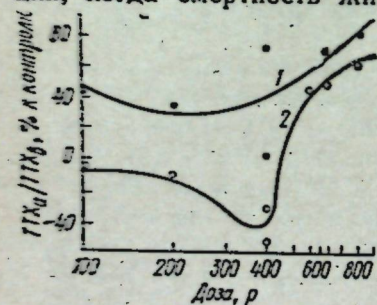


Рис. 1. Изменения эндогенной активности оксидаз в гомогенатах селезенки и печени белых мышей линии БАЛБ в условиях γ -облучения (октябрьская серия опытов). а — динамика изменений в относительных единицах (обобщенные данные): 1 — селезенка; 2 — печень; б — динамика абсолютных значений коэффициента $\frac{ТТХ_a}{ТТХ_b}$ в гомогенатах селезенки белых мышей в соответствии с датами опытов в течение месяца: 1 — контроль; 2—4 — доза облучения (2 — 575, 3 — 625, 4 — 800 p).

¹ Работа по определению процента выживаемости выполнена сотрудником лаборатории радиобиологии Э. А. Тарахтий.

Таблица II

печени мышей в норме и при γ -облучении (первая серия опытов)

№ опыта	Колич. животных	Печень		
		$\frac{ТТХ_a}{ТТХ_b}$ через 24 ч после облучения ($\bar{X} \pm m$)	% к контролю	Достоверность
6	12	1,53 ± 0,15	100	—
7	9	1,14 ± 0,07	75	$t_{6,7}=2,05, t_{2,7}=3,9$
8	18	2,23 ± 0,21	145	$t_{6,8}=2,31, t_{3,8}=1,7$
9	14	2,30 ± 0,21	150	$t_{6,9}=2,76, t_{4,9}=3,0$
10	14	2,37 ± 0,12	154	$t_{6,10}=4,09, t_{5,10}=3,2$

ных оксидаз и в печени, и в селезенке облученных животных отсутствуют ($p > 0,05$).

Создается впечатление, что увеличение коэффициента $\frac{ТТХ_a}{ТТХ_b}$ через сутки после облучения в исследованных тканях, проявление патологии в их обмене и, напротив, понижение данного теста при облучении — одна из полезных приспособительных реакций организма. Она свойственна радиорезистентной печени, не типична для радиочувствительной селезенки и не наблюдается при действии малых доз радиации (когда в опытах 100%-ная выживаемость животных).

Возникает мысль о возможности радиозащиты путем такого воздействия на селезенку, при котором реакция ее на облучение становится аналогичной реакции печени. Следовательно, необходимо заставить селезенку реагировать на облучение либо менее резким повышением коэффициента $\frac{ТТХ_a}{ТТХ_b}$, либо его снижением, подобно тому, как это происходит в печени при действии малых доз. Анализ обобщенных и статистически обработанных данных, полученных в течение октября (см. табл. I) по группам, соответственно, дням опытов (см. рис. 1, б), показывает, что у селезенки не всегда повышается активность эндогенных оксидаз при облучении. В определенных условиях она приобретает черты, характерные для радиорезистентной ткани. В тех случаях, когда контрольные животные в опытах имели высокий исходный уровень исследуемого теста, селезенка реагировала на облучение понижением активности оксидаз. При снижении исходного уровня $\frac{ТТХ_a}{ТТХ_b}$ в контрольных пробах наблюдались изменения реакции, не свойственные печени и типичные для селезенки. В печени подобных явлений не наблюдалось. Такой «перекрестный эффект», по мнению статистиков (Урбах, 1963), как правило, связан с «взаимодействием» факторов.

Результаты второй серии опытов, в которых количественно учитывали влияние исходного уровня теста в селезенке животных на эффект активации его при облучении, подтверждают правильность предположения о взаимодействии между дозой

Таблица 2

Независимые переменные x_1 , x_2 и их уровни (вторая серия опытов)

Уровень	Печень		Селезенка	
	ТТХ _а ТТХ _в в гомогенатах контрольных необлученных животных (исходный уровень) \bar{x}_1	Доза радиации, р x_2	ТТХ _а ТТХ _в в гомогенатах контрольных необлученных животных (исходный уровень) \bar{x}_1	Доза радиации, р x_2
Основной	2,33	500	2,30	687
Интервал варьирования	0,81	100	0,72	113
Верхний	3,14 (май)	600	3,02 (май)	800
Нижний	1,53 (октябрь)	400	1,58 (октябрь)	575

Таблица 3

Оценка основных эффектов в опытах на печени и селезенке (вторая серия)

B ⁺		B ⁻	
A ⁺	A ⁻	A ⁺	A ⁻

Печень

$$\bar{X}_1=1,86 (12) \quad \bar{X}_2=2,3 (14) \quad \bar{X}_3=1,17 (3) \quad \bar{X}_4=1,14 (9)$$

$$(\bar{X}-X)^2=6,3347 \quad (\bar{X}-X)^2=8,6167 \quad (\bar{X}-X)^2=0,0546 \quad (\bar{X}-X)^2=0,3934$$

Селезенка

$$\bar{X}_1=3,17 (15) \quad \bar{X}_2=3,53 (12) \quad \bar{X}_3=1,67 (5) \quad \bar{X}_4=3,08 (13)$$

$$(\bar{X}-X)^2=25,4927 \quad (\bar{X}-X)^2=17,9072 \quad (\bar{X}-X)^2=1,1278 \quad (\bar{X}-X)^2=13,7266$$

Примечание. В скобках — число наблюдений.

Таблица 4

Оценка взаимодействия в опытах на печени и селезенке (вторая серия)

AB ⁺	AB ⁺	AB ⁻	AB ⁻
-----------------	-----------------	-----------------	-----------------

Печень

$$\bar{X}_1=1,14 (9) \quad \bar{X}_2=1,86 (12) \quad \bar{X}_3=1,17 (3) \quad \bar{X}_4=2,30 (14)$$

$$(\bar{X}-X)^2=9,3347 \quad (\bar{X}-X)^2=6,3347 \quad (\bar{X}-X)^2=0,0546 \quad (\bar{X}-X)^2=8,6167$$

Селезенка

$$\bar{X}_1=3,08 (13) \quad \bar{X}_2=3,17 (15) \quad \bar{X}_3=1,67 (5) \quad \bar{X}_4=3,53 (12)$$

$$(\bar{X}-X)^2=13,7266 \quad (\bar{X}-X)^2=26,4927 \quad (\bar{X}-X)^2=1,1278 \quad (\bar{X}-X)^2=17,9072$$

Примечание. В скобках — число наблюдений.

Таблица 5

Матрица планирования ПФЭ типа 2² и результаты экспериментов (вторая серия)

№ варианта	Независимые кодированные переменные		Количество животных	ТТХ _а ТТХ _в в гомогенатах селезенки животных через 24 ч после облучения	
	x_1	x_2		$\bar{y}_{ит}$	\hat{y}
1	-	-	13	3,08	3,01
2	+	-	5	1,67	2,13
3	-	+	12	3,53	3,99
4	+	+	15	3,17	3,10

Примечание. Статистические показатели: $b_0=3,062$; $b_1=-0,442$; $b_2=0,487$; $b_{12}=-0,262$; $s^2(\bar{y})=1,445$; $t_s(b_i)=0,363$; $y=3,062-0,442x_1+0,487x_2$; $F_{0,95}(1,41)=4,1$; $s_{ад}^2=0,443 < F_{s^2}(\bar{y})=5,9$ (F — критерий Фишера).

облучения и активностью оксидаз до облучения. Условия опытов представлены в табл. 2, матрица планирования, результаты эксперимента и данные регрессионного анализа — в табл. 3—5.

Для количественной оценки значимости влияния исследуемых факторов (исходного уровня и дозы радиации) и их взаимодействия на определенный параметр (активность эндогенных оксидаз при облучении) были рассчитаны основные эффекты и коэффициенты регрессии. В первом варианте регрессионного анализа были составлены табл. 3, 4 с двумя входами и основные эффекты рассчитаны по следующим формулам:

$$A = \frac{\bar{X}_1 + \bar{X}_3}{2} - \frac{\bar{X}_2 + \bar{X}_4}{2} = \frac{3,17 + 1,67}{2} - \frac{3,53 + 3,08}{2} = -0,885,$$

$$B = \frac{\bar{X}_1 + \bar{X}_2}{2} - \frac{\bar{X}_3 + \bar{X}_4}{2} = \frac{3,17 + 3,53}{2} - \frac{1,67 + 3,08}{2} = +0,98,$$

$$AB = \frac{\bar{X}_1 + \bar{X}_2}{2} - \frac{\bar{X}_3 + \bar{X}_4}{2} = \frac{3,08 + 3,17}{2} - \frac{1,67 + 3,53}{2} = +0,52;$$

печень

$$A = \frac{1,86 + 1,17}{2} - \frac{2,3 + 1,14}{2} = -0,21,$$

$$B = \frac{1,86 + 2,3}{2} - \frac{1,17 + 1,14}{2} = +0,93.$$

$$AB = \frac{1,14 + 1,86}{2} - \frac{1,17 + 2,3}{2} = -0,23.$$

Статистическую значимость этих эффектов проверяли с помощью t -критерия: $t_A=2A/s_p$; $t_B=2B/s_p$ и $t_{AB}=2AB/s_p$, где

$s_p = s\{y\} \sqrt{\sum \frac{1}{n}}$ и n — число наблюдений в каждом варианте дана. (Остаточную дисперсию $s^2\{y\}$ подсчитывали по рассеянию результатов наблюдений относительно средних по клеткам табл. 3 и 4 (Грановский и др., 1963): селезенка

$$s\{y\} = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n-2}} = \sqrt{\frac{26,4927 + 17,9072 + 1,1278 + 13,7266}{45-2}} = 1,17;$$

$$s_p = 1,17 \sqrt{\frac{1}{15} + \frac{1}{12} + \frac{1}{5} + \frac{1}{13}} = 0,76;$$

печень

$$s\{y\} = \sqrt{\frac{6,3347 + 8,6167 + 0,0546 + 0,3934}{28-2}} = 0,65;$$

$$s_p = 0,65 \sqrt{\frac{1}{12} + \frac{1}{14} + \frac{1}{3} + \frac{1}{9}} = 0,51.$$

Тогда величины t -критериев будут следующие:

	t_A	t_B	t_{AB}
Селезенка	2,32	2,57	1,36
Печень	0,82	3,64	0,90

$t_{0,05(41)} = 2,02$ $t_{0,05(34)} = 2,04$
 $t_{0,1(41)} = 1,68$ $t_{0,1(34)} = 1,70$

Примечание. В скобках — количество наблюдений (без числа вариантов).

Анализ полученных абсолютных величин t -критериев для всех эффектов показывает, что с большой степенью достоверности влияют на активность эндогенных оксидаз после облучения доза радиации и исходный уровень теста в селезенке животных и доза радиации в печени.

В печени эффект активации эндогенных оксидаз при облучении явно не связан с уровнем активности этих ферментов в момент исследования ($r_{12} = 0,06$ и $r_{13} = 0,01$). В селезенке, напротив, наблюдается явная тенденция к положительному взаимодействию между исходным уровнем теста и его уровнем через сутки после облучения ($r_{12} = 0,16$ и $r_{13} = 0,11$).

Приводим результаты второго варианта (см. табл. 5) регрессионного анализа по тем же данным (Максимов, Федоров, 1969). Коэффициенты регрессии в этом варианте рассчитывали по формуле

$$b_i = \frac{\sum_{u=1}^4 x_{iu} \bar{y}_u}{N}$$

Значимость коэффициентов определяли, проверяя неравенство

$$b_i > ts\{b_i\}, \text{ где } s\{b_i\} = \sqrt{\frac{s^2\{y\}}{N}}$$

Регрессионный анализ данных по типу второго варианта расчетов приводит к аналогичному выводу: достоверно влияние исходного уровня оксидаз, дозы радиации в селезенке (b_1 и $b_2 > ts\{b_i\}$) и дозы радиации в печени ($b_2 > ts\{b_i\}$). Влияние исходного уровня оксидаз в селезенке животных на эффект активации того же теста при облучении носит характер тенденции ($b_{12} \approx ts\{b_i\}$).

Проведение эксперимента по плану ПФЭ типа 2^2 позволяет представить зависимость между величинами в исследованных пределах для селезенки белых мышей — самок, линии БАЛБ, 2—3-месячного возраста в виде математической модели

$$y = 3,062 - 0,44x_1 + 0,487x_2,$$

где $x_1 = \frac{\tilde{x}_1 - 2,30}{0,72}$ и $x_2 = \frac{\tilde{x}_2 - 687}{113}$.

Адекватность данной модели (см. табл. 5) дает основание приближенно прогнозировать защитный исходный уровень коэффициента $TТХ_a/TТХ_b$ в селезенке животных данного пола, возраста и линии, гарантирующий при действии летальных доз γ -радиации сохранение нормального, свойственного необлученным животным, уровня исследуемого теста (порядка 3,5—4 единиц в условиях γ -облучения дозой 700 p).

Прогнозирование эффективности радиопротекторов, по-видимому, может быть осуществлено путем определения способности создавать защитный уровень активности эндогенных оксидаз в селезенке стандартных мышей в соответствии с дозой γ -радиации.

В третьей серии опытов предлагаемый нами экспресс-биохимический метод определения эффективности радиозащиты апробирован на ряде известных радиопротекторов (табл. 6). По-видимому, существует определенная корреляция между способностью данных радиопротекторов создавать защитный уровень активности эндогенных оксидаз в селезенке стандартных мышей и способностью их к радиозащите в условиях действия летальных доз радиации.

Таким образом, в результате сравнительного изучения биохимических особенностей адаптации к γ -радиации у радиочувствительной селезенки и радиорезистентной печени выявлены изменения в обмене, коррелирующие с радиорезистентностью, и показана принципиальная возможность экспресс-прогноза эффективности радиозащиты с помощью нового метода опреде-

Таблица 6

Результаты биохимического и биологического действия некоторых средств радиозащиты (третья серия)

Радиопротектор, доза и время определения теста после введения	Колич. животных	$\frac{ТГХ_a}{ТГХ_b}$ в гомогенате селезенки стандартных мышей ($\bar{X} \pm m$)	Выживаемость, %, эффективность радиозащиты по различным данным
Осень (октябрь)	10	1,58 ± 0,12	10,6 (Рогозкин, 1960)
Меркамин, 150 мг/кг, 60 мин	15	2,26 ± 0,25	Не защищает (Бак, 1968)
Весна (апрель)	12	3,02 ± 0,36	21,6 (Рогозкин, 1960)
Меркамин, 150 мг/кг, 15 мин	9	3,20 ± 0,56	50—60 (Разоренова, 1960)
Янтарная кислота, 250 мг/кг, 5 мин	4	3,54 ± 0,28	Умеренный защитный эффект (Alexander и др., 1955)
Тиомочевина, 1,28 г/кг, 5 мин	10	3,84 ± 0,54	Умеренный защитный эффект (Limperos, Mosher, 1950)
Меркамин, 150 мг/кг, 5 мин	12	4,49 ± 0,55	90—92 (Bacq, Herve, 1952)

ления активности эндогенных оксидаз. Непосредственная разработка экспресс-метода на основе полученных данных — предмет будущих наших исследований.

Методическая особенность настоящей работы в одновременном использовании при решении одной задачи двух разных методов исследования: классического (пассивного) эксперимента (см. табл. 1) и активного, включающего два фактора, из которых каждый имел в опыте два уровня (см. табл. 2). Последний метод планирования (ПФЭ типа 2²) является простейшим факторным экспериментом. Применение его параллельно с классическим экспериментом позволяет использовать полученные результаты для иллюстрации эффективности применения математической статистики не только при обработке данных, но и на первых этапах эксперимента — при его планировании.

Так, в первой серии опытов, где исследовали влияние дозы γ -радиации на активность оксидаз через сутки после облучения проведено 52 определения на селезенке и, следовательно, израсходовано 52 животных. В каждом из вариантов (см. табл. 1) в среднем использовано десять животных, и точность в изучении влияния дозы соответственно равна²

$$\frac{s^2\{y\}}{2 \cdot 10} = \frac{s^2\{y\}}{20}$$

где $s^2\{y\}$ — дисперсия воспроизводимости результатов.

² В пассивном эксперименте каждый из коэффициентов регрессии определяется только по двум точкам (сопоставляются опыт и контроль). Дисперсия в оценке коэффициентов регрессии оказывается вдвое меньше дисперсии для ошибки опыта $s^2\{b_i\} = s^2\{y\}/2n$ (n — число параллельных определений).

При изучении того же вопроса о степени и характере влияния дозы радиации на активность оксидаз во второй серии опытов (см. табл. 2) проведено 45 определений и, следовательно, израсходовано 45 животных. Точность определения коэффициентов регрессии по каждому фактору оказалась в два раза выше и соответственно равна³

$$\frac{s^2\{y\}}{4 \cdot 11} = \frac{s^2\{y\}}{44}$$

Последовательный регрессионный анализ данных пассивного эксперимента связан с проведением большого количества трудоемких вычислительных операций. Как правило, применение его к обработке результатов многофакторного, в том числе и двухфакторного, пассивного эксперимента приводит к разочарованию (Налимов, Чернова, 1965). В связи с этим в первой серии опытов мы отказались от вычисления коэффициентов парной корреляции и ограничились изучением характера и значимости влияния дозы радиации на активность ферментов.

Во второй серии на основе результатов, которые по объему меньше, были выявлены влияние дозы радиации и зависимость влияния этой дозы от исходного уровня оксидаз.

Если результаты первой серии, поставленной методом пассивного эксперимента, позволили только предполагать о существовании фактора, снимающего патологический эффект радиации на метаболизм селезенки, то применение во второй серии полного факторного эксперимента типа 2² дало возможность достоверно установить существование противодействующего радиации фактора и представить взаимовлияние радиации и исходного уровня метаболизма в виде адекватной математической модели.

Последнее обеспечивает выход в практику сразу двух направлений. С одной стороны, полученные результаты указывают на конкретные пути использования обнаруженных взаимовлияний в целях экспресс-прогноза эффективности радиозащиты. Для этого необходимо поставить заключительную серию по плану ПФЭ типа 2², в которой исследовать влияние двух уровней исходной активности оксидаз в селезенке стандартных мышей (x_1) и двух доз γ -радиации (x_2) непосредственно на выживаемость животных (y), определяемую обычным биологическим методом. Составив уравнение по данным этой серии, можно по степени влияния на x_1 за два дня вместо обычных тридцати определить выживаемость животных y в условиях действия летальных и сублетальных доз радиации.

Второе направление выхода в практику полученных в работе данных дает возможность целенаправленного поиска новых эффективных средств радиозащиты с помощью метода плани-

³ В активном эксперименте одновременно варьируются все факторы, каждый из коэффициентов регрессии определяется по результатам всех опытов $s^2\{b_i\} = s^2\{y\}/N \cdot n$ (N — число вариантов, по Налимову, Черновой, 1965).

рования оптимального эксперимента. Можно экспериментальным путем найти такое сочетание разных факторов, которое даст оптимальное увеличение активности оксидаз в селезенке стандартных мышей (3—5 единиц и выше).

Таким образом, сравнительный анализ общих затрат труда, точности результатов, объема научной информации и объема практических рекомендаций показал, что использование простейшего метода математического планирования эксперимента позволило в условиях пониженных затрат труда получить вдвое больше научной информации с точностью, превышающей таковую в пассивном эксперименте в два раза. При этом получен непосредственный выход в практику, экспериментальным путем найдена математическая модель радиобиологического эффекта, позволяющая определять эффективность радиозащиты и целенаправленно искать новые радиопротекторы.

**ДРОБНЫЙ ФАКТОРНЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТ ТИПА 2^{4-1}
ПРИ ИЗУЧЕНИИ ВЛИЯНИЯ
УСЛОВИЙ ВВЕДЕНИЯ РАДИОПРОТЕКТОРА
НА ЕГО РАДИОЗАЩИТНЫЙ ЭФФЕКТ**

В процессе изучения биохимической природы радиорезистентности нами была показана принципиальная возможность экспресс-прогноза радиозащиты по способности радиопротектора создавать определенный повышенный уровень активности эндогенных оксидаз в селезенке стандартных мышей.

На следующем этапе работы были получены результаты апробации данного метода на диэтилдитиокарбамате для возможного усиления его радиозащитного действия с помощью использования влияния низких температур (Рункова, Завада, в печати). Диэтилдитиокарбамат — радиопротектор, для которого характерен значительный защитный эффект (Веккут, 1956).

Акклимация к холоду и глубокая гипотермия известны как достаточно мощные средства защиты от γ -радиации (Hornsey, 1957; Ghys, 1963).

Методика

Опыты поставлены на лабораторных мышах двух разных линий и двух разных возрастов. При планировании эксперимента использован план ДФЭ $^{4-1}$ с определяющим контрастом $1-x_1x_2x_3$ (Максимов, Федоров, 1969). Независимые переменные и их уровни представлены в табл. 7, матрица планирования и результаты эксперимента — в табл. 8.

Приготовление гомогената селезенки животных и определение активности эндогенных оксидаз в виде коэффициента $ТТХ_a/ТТХ_b$

Таблица 7

Независимые переменные и их уровни

Натуральные независимые переменные	Код	Уровень	
		верхний	нижний
Линия	x_1	Белые	Серые
Возраст, месяцев	x_2	3	9
Температура, при которой вводился радиопротектор, град.	x_3	+20	-15
Концентрация диэтилдитиокарбамата, г/кг	x_4	0,6	0,1

Таблица 8

Матрица планирования ДФЭ типа 2^{4-1} и результаты эксперимента

№ варианта	x_1 x_1x_4	x_2 x_2x_4	x_3 x_3	x_1x_3 x_4	x_1x_3 x_1x_3	x_2x_3 x_2x_3	$x_1x_2x_3$ x_1x_4	ТТХ _a /ТТХ _b в гомогенате селезенки мышей			
								y_1	y_2	\bar{y}_{ul}	Δy
1	+	+	+	+	+	+	+	6,6	3,6	5,10	5,09
2	+	-	+	-	+	-	-	3,5	2,9	3,20	3,61
3	-	-	+	+	-	-	+	4,9	5,2	5,05	5,09
4	-	+	+	-	-	+	-	4,0	4,1	4,05	3,61
5	+	+	-	+	-	-	-	2,0	2,1	2,05	2,33
6	+	-	-	-	-	+	+	3,9	5,8	4,85	3,81
7	-	-	-	+	+	+	-	2,5	2,7	2,60	2,33
8	-	+	-	-	+	-	+	3,0	2,6	2,80	3,81

Примечание. Статистические показатели: $b_1=0,087$; $b_2=-0,210$; $b_3=0,637$; $b_4=-0,012$; $b_{12}=-0,288$; $b_{23}=0,438$; $b_{34}=0,738$; $s^2(\bar{y})=0,415$; $ts(b_i)=0,523$; $y=3,71+0,64x_1+0,74x_2x_4$; $s_{ад}^2=0,523 < F_{s^2}(\bar{y})=1,53$; $F_{0,05}(5,8)=3,69$; $s^2(\bar{y})$ рассчитывали по данным 16-ти вариантов плана, используя формулу $s^2(\bar{y})=\Sigma d^2/2n$.

проводились так, как описано в предыдущих наших исследованиях (Рункова, Завада, 1971).

Результаты и их обсуждение

В плане, который использован в настоящей работе, эффекты факторов x_1 и x_2 (линия и возраст животного) смешаны с парными взаимодействиями. Поэтому эффект влияния таких факторов и их взаимодействий с температурой и возрастом животных на изучаемый биохимический показатель нами не обсуждается. Эти факторы мы использовали для получения точной

информации о влиянии радиопротектора, температуры и их взаимодействия в условиях, когда в распоряжении исследователя нет достаточного количества стандартных животных и возникает необходимость поиска на нестандартном материале. Эффекты x_3 и x_4 , так же как эффекты их взаимодействий, в матрице ДФЭ 2^{4-1} не смешаны, и следовательно, используя четырех животных интересующего нас возраста и линии, мы получим информацию относительно этих стандартных животных, статистически обработав данные всех восьми вариантов на 16 животных, включая нестандартных (серые и белые, трех- и девятимесячные).

Анализ несмешанных эффектов и их парных взаимодействий b_{13} , b_{23} , b_{34}) показывает, что эффект влияния температуры на активность оксидаз зависит от дозы вводимого радиопротектора ($b_{34} > ts\{b_i\}$) и не зависит от линии животного и его возраста (b_{14} и $b_{23} < ts\{b_i\}$).

Таким образом, регрессионный анализ полученных данных показывает, что общее 15-минутное охлаждение лабораторных мышей достоверно снижает активность эндогенных оксидаз в селезенке животных, если одновременно вводится диэтилдитиокарбамат в концентрации 0,6 г/кг. И, напротив, выдерживание животных в течение 15 мин до введения той же дозы радиопротектора в условиях комнатных температур ($+20^\circ\text{C}$) увеличивает активность эндогенных оксидаз. Результаты, полученные непосредственно в опыте y , и расчетные y , показывают, что высокий защитный уровень активности этих ферментов в селезенке достигается при введении диэтилдитиокарбамата в условиях положительных температур (опыты 1—4).

При введении тех же доз радиопротектора в условиях предварительной глубокой гипотермии возникает низкий уровень активности оксидаз, не характерный для радиорезистентного органа. Зависимость между температурными условиями введения диэтилдитиокарбамата, его дозой и уровнем активности оксидаз в селезенке мышей может быть представлена в виде уравнения

$$y = 3,71 + 0,64x_3 + 0,74x_3x_4.$$

Адекватность этого уравнения позволяет использовать его для прогноза степени радиозащитных свойств диэтилдитиокарбамата в зависимости от температурных условий введения.

Если по нашим данным защитный уровень коэффициента $\text{ТТХ}_a/\text{ТТХ}_b$ в селезенке стандартных мышей составляет величину порядка 4 единиц, то, по-видимому, данный радиопротектор обладает сильным радиозащитным эффектом при введении 0,6 г/кг в условиях $+20^\circ\text{C}$, и, напротив, радиозащитный его эффект исчезает, когда введению радиопротектора предшествует экстремальное охлаждение животных.

ПОЛНЫЙ ФАКТОРНЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТ ТИПА 2^3 В УСЛОВИЯХ КОМПЛЕКСНОГО БИОХИМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ВНУТРИВИДОВОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ

Сравнительный анализ метаболизма, и в особенности изменений в метаболизме, при действии определенных экологических факторов у близких форм представляет интерес в связи с вопросами внутривидовой дифференциации и имеет прямое отношение к такой проблеме эволюционной экологии, как изучение биохимических механизмов микроэволюционного процесса, предшествующего макроэволюции.

Были получены результаты комплексного изучения изменений в метаболической реакции на температуру у двух модельных популяций полевки-экономки *Microtus oeconomus oeconomus*, *M. oeconomus chachlovi* (Завада, Павлов 1973; Рункова, Завада, Купцова, 1974).

При выборе биохимических тестов мы акцентировали внимание на показателях, характеризующих энергетический обмен, так как новое в подходе к вопросу видообразования с точки зрения биохимико-экологической гипотезы (Шварц, 1969) предполагает не только активную роль экологических факторов в процессе становления вида, но требует новой, энергетической, оценки приспособлений, участвующих в этом становлении.

В качестве теста, дающего общую характеристику эндогенного аэробного и анаэробного метаболизма, использован коэффициент $\text{ТТХ}_a/\text{ТТХ}_b$, полученный путем параллельного определения тетразолвосстанавливающей активности гомогенатов при инкубации проб в атмосфере воздуха и аргона и указывающий на степень ингибирования тетразоловой реакции кислородом воздуха. В качестве других показателей обмена использованы содержание молочной кислоты в мышце, скорость аэробного и анаэробного гликолиза, активность лактатдегидрогеназы (1.1.1.27) и ее изоэнзимный спектр. Для характеристики аэробного метаболизма определяли также активность малатдегидрогеназы (1.1.1.39).

В опытах по изучению влияния 9-дневной акклимации находили общий вес животного и вес селезенки. Указанные биохимические и морфофизиологические показатели изучались в мышце и селезенке *M. oeconomus oeconomus* и *M. oeconomus chachlovi*, поскольку многие исследователи связывают терморегуляционные механизмы животных с обменом именно в мышечной ткани (Hannon, Vaughen, 1960; Мишукова, 1966), а изменения обмена веществ в селезенке как лимфоидном органе считают индикатором общей напряженности энергетического обмена (Selye, 1956).

Поставлено две серии опытов. В первой (ноябрь, декабрь, март 1971—1972 гг.) использованы самцы двухмесячного возраста 5, 6-го поколения, полученные при разведении в условиях

Таблица 9

Независимые переменные и их уровни

Уровень	Натуральные независимые переменные		
	Подвид x_1	Условия акклиматизации (температура содержания животных до опыта), °С x_2	Температура 20-минутного воздействия в опыте, °С x_3
Основной	—	+9	+1,5
Интервал варьирования	—	+6	+16,5
Верхний	<i>M. oecopotus oecopotus</i>	+15	+18
Нижний	<i>M. oecopotus chachlovi</i>	+3	-15

лабораторного вивария. Во второй серии (декабрь 1972 г.) взяты самцы 3—4-месячного возраста 7—10-го поколений, также полученные при разведении в условиях вивария. Основатели модельных популяций привезены из районов Среднего Урала (*M. oecopotus oecopotus*) и с п-ва Ямал (*M. oecopotus chachlovi*).

Исследование проводилось по плану ПФЭ типа 2^3 (Налимов, Чернова, 1965) и изучалось влияние 20-минутного общего охлаждения температурой -15°C , 9-дневное общее охлаждение в условиях от 0 до $+3^{\circ}\text{C}$ и указанное экстремальное охлаждение животных, предварительно акклиматизированных к холоду при температуре от 0 до $+6^{\circ}\text{C}$. Независимые переменные (перечисленные выше факторы) и их уровни представлены в общей для всех опытов раздела табл. 9.

Тетразолвосстанавливающую активность определяли в гомогенатах тканей последовательной экстракцией формазана ацетоном, толуолом и бутанолом после инкубации проб в течение 24 ч при 37°C с 2, 3, 5-трифенилтетразолхлоридом в концентрации 1,6%.

Интенсивность гликолиза измеряли в гялоплазме тканей, используя при определении инкубационную среду следующего состава, моль/л: неорганический фосфат $5 \cdot 10^{-2}$, MgCl_2 $7 \cdot 10^{-3}$, НАД $2 \cdot 10^{-3}$, никотинамид $8 \cdot 10^{-3}$, фруктозо-1,6-дифосфат $5 \cdot 10^{-2}$. Гялоплазму получали центрифугированием гомогената (20 мл 0,15 М КСl на 1 г) в течение 10—15 мин при 8000 г. Все операции до момента инкубации проб (в атмосфере воздуха или аргона в аппарате Варбурга) при определении интенсивности аэробного и анаэробного гликолиза проводили на холоде (от 0 до $+3^{\circ}\text{C}$).

Накопление молочной кислоты находили спектрофотометрически, по Баркеру и Саммерсон. При определении лактата в мышце в условиях опыта in vivo ткань, извлеченную после декапитации животного, замораживали в жидком азоте.

Активность лактат- и малатдегидрогеназы определяли в первой серии опытов — по Севелу и Товареку (Асатгани, 1965), во второй — по убыли НАД·Н₂ (Кретович, 1967; Кочетов, 1971) в центрифугатах, полученных после экстракции водорастворимых белков из соответствующих гомогенатов тканей. Для идентификации изоферментов лактатдегидрогеназы применяли электрофорез в полиакриламидном геле (Ларский, 1971; Dietz, Lubrano, 1967). Для измерения непосредственно активности изоэнзима использовали микрофотометр ИФ-2 с записывающей приставкой.

Регрессионный анализ результатов проводили в четыре последовательных этапа; расчет коэффициентов регрессии, статистическая проверка значимости коэффициентов регрессии, составление соответствующего уравнения и проверка адекватности уравнения процессу (Максимов, Федоров, 1969). Были использованы следующие математические формулы:

в сериях с неодинаковым числом животных в каждом из вариантов плана

$$b_1 = \frac{\sum_{u=1}^8 x_{1u} \bar{y}_u}{8},$$

$$s^2\{y\} = \frac{\sum_{u=1}^8 \sum_{j=1}^8 y_{uj}^2 - \sum_{u=1}^8 \frac{y_u^2}{n_u}}{\sum_{u=1}^8 n_u - 8},$$

$$s^2\{\bar{y}\} = \frac{s^2\{y\}}{n},$$

$$s^2\{b_1\} = \frac{s^2\{\bar{y}\}}{8},$$

$$s^2_{ад} = \frac{\sum_{u=1}^8 (\bar{y}_u - \hat{y}_u)^2}{N - N_1};$$

в сериях с равным числом животных в каждом из вариантов плана

$$s^2\{y_{ul}\} = \frac{\sum y_{ul}^2 - \frac{(\sum y_{ul})^2}{n}}{n-1},$$

$$s^2\{y\} = \frac{\sum s^2\{y_{ul}\}}{N},$$

$$s^2\{\bar{y}\} = \frac{s^2\{y\}}{N},$$

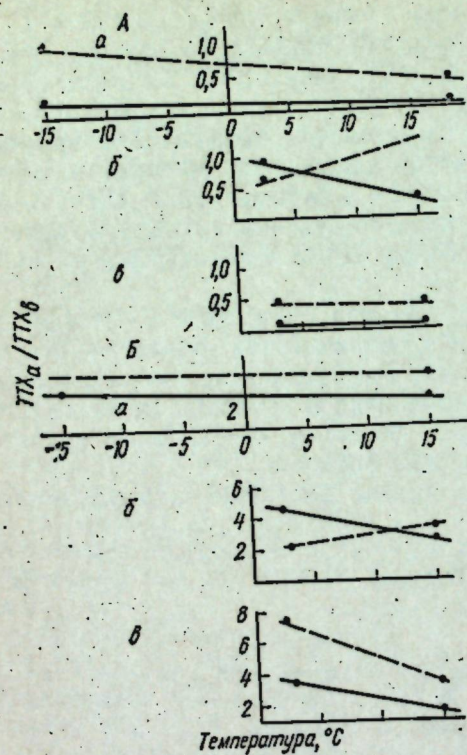


Рис. 2. Изменения эндогенной активности оксидаз в гомогенатах скелетных мышц двух подвидов полевки-экономки.

Поколение: А — 5, 6-е, Б — 7—10-е.
Условия: а — экстремальное охлаждение; б — экстремальное охлаждение после предварительной акклимации; в — после 9-дневной акклимации к температуре 0—+3° С.
Вид полевки: штриховая линия — северный, сплошная — южный.

N — общее число строк в матрице планирования;

N_1 — число коэффициентов в уравнении регрессии.

При построении графиков использованы результаты, рассчитанные по уравнениям, адекватно описывающим процесс воздействия исследованных условий охлаждения на выбранные биохимические и морфофизиологические показатели. Экспериментальные данные представлены во всех таблицах вместе с соответствующими матрицами планирования и результатами регрессионного анализа.

Результаты и их обсуждение

Эндогенный метаболизм. В первой серии опытов получены данные при параллельном определении тетразолвосстанавли-

$$s^2\{b_i\} \frac{s^2\{\bar{y}\}}{8},$$

где b_i — экспериментальная оценка коэффициента регрессии;

x_{iu} — независимое переменное (фактор), измеренное в кодированных единицах;

u — номер строки в матрице планирования;

j — номера факторов (номера столбцов в матрице планирования);

$s^2\{y_{uj}\}$ — построчная дисперсия;

$s^2\{y\}$ — дисперсия воспроизводимости единичного значения;

$s^2\{\bar{y}\}$ — дисперсия воспроизводимости среднего значения;

n — общее число повторностей u -го опыта;

$s^2\{b_i\}$ — дисперсия коэффициентов регрессии;

$s^2_{ад}$ — дисперсия неадекватности;

\bar{y}_u — средний результат u -го опыта;

\hat{y} — значение функции отклика, рассчитанное по уравнению регрессии;

вающей активности в гомогенатах мышц и селезенки животных двух популяций *M. oeconomus* в атмосфере воздуха и аргона, в разных условиях охлаждения и в разные сезоны года (табл. 10—13; рис. 2).

Анализ результатов в первую очередь показывает, что соотношение активностей эндогенных дегидрогеназ и оксидаз в мышце и селезенке животных обеих популяций зависит от сезона. В декабрьской серии опытов тетразолвосстанавливающая активность гомогенатов мышц и селезенки в атмосфере воздуха и в атмосфере аргона низка и находится за пределами чувствительности метода у контрольных животных. Охлаждение активирует тетразолвосстанавливающую способность, но оксидазные системы в гомогенатах мышц и селезенки животных обеих популяций в декабре, по-видимому, слабее дегидрогеназ, так как восстановление солей тетразолия в атмосфере воздуха, как правило, выше, чем в атмосфере аргона. Коэффициент $ТТХ_а/ТТХ_б \leq 1$.

В мартовской серии тетразолвосстанавливающая активность резко повышена, коэффициент $ТТХ_а/ТТХ_б$ в гомогенатах мышц и селезенки контрольных животных в обеих популяциях увеличивается от нуля до 2—3 единиц. Анализ показывает, что северные и южные популяции достоверно отличаются по исходному уровню $ТТХ_а/ТТХ_б$ в мышце ($b_1 = -0,15; -0,049 > ts\{b_i\}$). Исключение составляют результаты по данному тесту для селезенки в декабрьской серии опытов и мышцы в мартовской, где не обнаружено различий между популяциями ни в одном из вариантов.

На экстремальное охлаждение *M. oeconomus* реагируют увеличением коэффициента $ТТХ_а/ТТХ_б$ ($b_3 > ts\{b_i\}$), но степень увеличения не зависит от принадлежности животного к северному или южному подвиду ($b_{13} < ts\{b_i\}$).

В условиях акклимации, когда воздействие холода адекватно физиологическому (от 0 до +3° С), у северной популяции наблюдается активация эндогенных оксидаз. Коэффициент $ТТХ_а/ТТХ_б$ в гомогенатах мышц *M. oeconomus chachlovi* в декабрьской серии опытов достоверно увеличивается, в то время

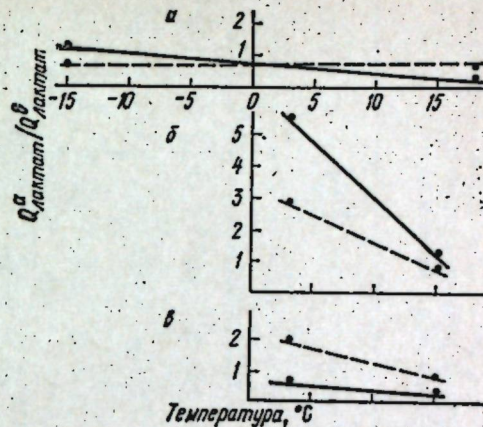


Рис. 3. Изменения в соотношениях активностей анаэробного и аэробного гликолиза в гомогенатах скелетных мышц двух подвидов полевки-экономки.

Обозначения те же, что на рис. 2.

Активность эндогенных оксидаз в гомогенатах скелетных мышц двух подвидов полвки-экономки при экстремальном охлаждении и акклимации в условиях от 0 до +3°С (декабрь, первая серия, 5, 6-е поколения)

№ варианта	Кодированные независимые переменные			Тетразоловостанавливающая активность гомогената, $\epsilon/\text{мл}$ в атмосфере						ТТХ ₃ ТТХ ₆						
	x ₁	x ₂	x ₃	аргона			воздуха			$\bar{y}_{\text{пл}}$	y ₁	y ₂	y ₃	y ₄		
				$\bar{y}_{\text{пл}}$	y ₁	y ₂	y ₃	y ₄	y ₁						y ₂	y ₃
1	-	-	-	0,152	0,20	0,105	-	0,190	0,22	0,160	-	0,77	0,90	0,65	-	0,53
2	+	-	-	0,110	0,10	0,12	-	0,112	0,120	0,105	-	0,98	0,83	1,14	-	0,89
3	-	+	-	0,179	0,195	0,08	0,165	0,152	0,135	0,135	0,175	1,15	1,44	0,59	1,66	1,19
4	+	+	-	0,0	0,0	0,0	0,0	0,138	0,130	0,155	0,132	0,0	0,0	0,0	0,0	0,23
5	-	-	+	0,045	0,08	0,01	-	0,135	0,170	0,100	-	0,280	0,47	0,10	-	0,49
6	+	-	+	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
7	-	+	+	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,35
8	+	+	+	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Примечание. Статистические показатели: $b_0=0,06$; $b_1=-0,033$; $b_2=-0,016$; $b_3=-0,049$; $b_{12}=-0,011$; $b_{13}=0,022$; $b_{23}=0,004$; $b_{123}=-0,022$; $s^2\{y\}=0,0019$; $ts\{b_1\}=0,023$ (аргон); $b_0=0,09$; $b_1=-0,028$; $b_2=-0,018$; $b_3=-0,057$; $b_{12}=0,025$; $b_{13}=0,005$; $b_{23}=-0,15$; $b_{123}=-0,009$; $s^2\{y\}=0,01$; $ts\{b_1\}=0,05$ (воздух); $b_0=0,39$; $b_1=-0,15$; $b_2=-0,11$; $b_3=-0,32$; $b_{12}=-0,13$; $b_{13}=0,08$; $b_{23}=-0,04$; $b_{123}=0,20$; $s^2\{y\}=0,061$; $ts\{b_1\}=0,132$; $y=0,39-0,15x_1-0,32x_2-0,13x_1x_2+0,2x_1x_3$; $F_{0,99}(3,14)=5,6$; $s^2_{\text{д}}=0,077 < F_{0,99}(3,14)=5,6$; $s^2_{\text{д}}=0,12$ (ТТХ₃/ТТХ₆).

Интенсивность восстановления тетразола в гомогенатах скелетных мышц двух подвидов полвки-экономки при экстремальном охлаждении и акклимации в условиях от 0 до +3°С (март, первая серия, 5, 6-е поколения)

№ варианта	Кодированные независимые переменные			Тетразоловостанавливающая активность гомогената, $\epsilon/\text{мл}$, в атмосфере воздуха										
	x ₁	x ₂	x ₃	аргона			воздуха			$\bar{y}_{\text{пл}}$	y ₁	y ₂	y ₃	y ₄
				$\bar{y}_{\text{пл}}$	y ₁	y ₂	y ₃	y ₄	y ₁					
1	-	-	-	0,295	0,395	0,260	0,230	0,303	0,230	0,143	0,200	0,105	0,125	
2	+	-	-	0,055	0,050	0,057	0,060	0,205	0,060	0,0	0,0	0,0	0,0	
3	-	+	-	0,326	0,320	0,310	0,350	0,303	0,350	0,081	0,09	0,09	0,065	
4	+	+	-	0,281	0,375	0,260	0,21	0,205	0,260	0,085	0,105	0,075	0,075	
5	-	-	+	0,306	0,200	0,315	0,405	0,303	0,315	0,053	0,050	0,055	0,053	
6	+	-	+	0,211	0,290	0,20	0,145	0,205	0,20	0,053	0,060	0,050	0,050	
7	-	+	+	0,290	0,150	0,395	0,325	0,303	0,395	0,088	0,080	0,115	0,070	
8	+	+	+	0,271	0,280	0,420	0,115	0,205	0,420	0,095	0,075	0,165	0,015	

Примечание. Статистические показатели: $b_0=0,254$; $b_1=-0,049$; $b_2=0,038$; $b_3=0,015$; $b_{12}=0,034$; $b_{13}=0,021$; $b_{23}=-0,027$; $b_{123}=-0,015$; $s^2\{y\}=0,0089$; $ts\{b_1\}=0,047$; $y=0,254-0,049x_1+0,095(6,16)x_2-2,7s^2_{\text{д}}=0,0067 < 0,0084$ (аргон); $b_0=0,075$; $b_1=-0,016$; $b_2=-0,012$; $b_3=-0,002$; $b_{12}=0,019$; $b_{13}=0,018$; $b_{23}=0,007$; $s^2\{y\}=0,007$; $ts\{b_1\}=0,043$ (воздух).

Таблица 12

Активность эндогенных оксидаз в гомогенатах селезенки двух подвидов полевки-экономки при экстремальном охлаждении и акклимации в условиях от 0 до +3° С (декабрь, первая серия, 5, 6-е поколения)

№ варианта	Кодированные независимые переменные			Тетразолвосстанавливающая активность гомогената, е/мл, в атмосфере						$\frac{ТТХ_a}{ТТХ_b}$		
				аргона			воздуха					
	x_1	x_2	x_3	\bar{y}_{ul}	y_1	y_2	\bar{y}_{ul}	y_1	y_2	\bar{y}_{ul}	y_1	y_2
1	-	-	-	0,130	0,130	0,130	0,135	0,135	0,135	0,96	0,96	0,96
2	+	-	-	0,127	0,140	0,115	0,132	0,130	0,135	0,96	1,07	0,85
3	-	+	-	0,040	0,080	0,0	0,165	0,165	0,195	0,29	0,59	0,0
4	+	+	-	0,102	0,0	0,205	0,154	0,143	0,160	0,64	0,0	1,28
5	-	-	+	0,08	0,105	0,065	0,340	0,320	0,350	0,24	0,32	0,17
6	+	-	+	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
7	-	+	+	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
8	+	+	+	0,142	0,085	0,200	0,185	0,175	0,195	0,75	0,48	1,02

Примечание. Коэффициент регрессии по тесту $ТТХ_a/ТТХ_b$: $b_0=0,48$; $b_1=0,10$; $b_2=-0,06$; $b_3=-0,23$; $b_{12}=0,16$; $b_{13}=0,02$; $b_{23}=0,17$; $b_{123}=0,08$; $t_s\{b_i\}=0,22$; $s^2\{y\}=0,14$.

как в гомогенатах мышц *M. oesopotus oesopotus* активность дегидрогеназ и оксидаз резко подавляется и выходит за пределы чувствительности метода.

Предварительная акклимация к холоду обеих популяций изменяет их реакцию на экстремальное охлаждение. В декабре северная популяция, реагирующая на охлаждение в условиях -15° С увеличением $ТТХ_a/ТТХ_b$, после 9-дневного выдерживания в вольере при температуре от 0 до +3° С, помещенная в условиях -15° С, достоверно снижает этот коэффициент. Животные южной популяции подобной способностью не обладают, и после акклимации к холоду они реагируют на экстремальное охлаждение увеличением данного теста.

Данные, полученные при изучении интенсивности эндогенного метаболизма и его чувствительности к тироксину во второй серии опытов, представлены в табл. 14 и 15. Несмотря на высокий уровень исходной активности оксидаз (3—2 единицы) у животных другой генерации (7—10-е поколения), направленность изменений данного показателя в тех же вариантах охлаждения аналогична результатам первой серии. В условиях экстремального охлаждения, после 10-дневной акклимации к температуре от 0 до +1° С и в условиях экстремального охлаждения предварительно адаптированных к холоду животных в мышцах южного подвида наблюдается активация эндогенных оксидаз (коэффициент $ТТХ_a/ТТХ_b$ увеличивается). В мышцах северного подвида эта интенсификация обмена выражена слабее при экстремальном охлаждении и совсем не наблюдается в условиях экстремального охлаждения предварительно адап-

Таблица 13

Интенсивность восстановления тетразолхлорида в гомогенатах селезенки двух подвидов полевки-экономки при экстремальном охлаждении и акклимации в условиях от 0 до +3° С (март, первая серия, 5, 6-е поколения)

№ варианта	Кодированные независимые переменные			Тетразолвосстанавливающая активность гомогената, е/мл, в атмосфере								
				аргона			воздуха					
	x_1	x_2	x_3	\bar{y}_{ul}	y_1	y_2	\hat{y}	\bar{y}_{ul}	y_1	y_2	\hat{y}	
1	-	-	-	0,49	0,54	0,49	0,43	0,38	0,270	0,33	0,235	0,267
2	+	-	-	0,23	0,225	0,245	0,215	0,26	0,058	0,01	0,05	0,133
3	-	+	-	0,37	0,365	0,470	0,260	0,36	0,137	0,15	0,15	0,039
4	+	+	-	0,49	0,460	0,570	0,395	0,50	0,131	0,15	0,145	0,173
5	-	-	+	0,24	0,37	0,095	0,245	0,26	0,0	0,0	0,0	0,039
6	+	+	-	0,33	0,345	0,225	0,42	0,38	0,156	0,135	0,10	0,173
7	-	-	+	0,43	0,495	0,27	0,53	0,50	0,325	0,075	0,50	0,267
8	+	+	+	0,44	0,445	0,355	0,53	0,38	0,148	0,18	0,105	0,133

Примечание. Статистические показатели: $b_0=0,38$; $b_1=-0,005$; $b_2=0,060$; $b_3=-0,020$; $b_{12}=0,040$; $b_{13}=0,03$; $b_{23}=0,02$; $b_{123}=-0,06$; $t_s\{y\}=0,009$; $t_s\{b_i\}=0,047$; $y=0,38+0,6x_1-0,06x_2x_3$; $s_{ад}^2=0,0049$; $b_0=0,153$; $b_1=-0,03$; $b_2=0,03$; $b_3=0,004$; $b_{12}=-0,016$; $b_{13}=0,0246$; $b_{23}=0,047$; $b_{123}=-0,067$; $t_s\{y\}=0,0075$; $t_s\{b_i\}=0,043$; $y=0,153+0,047x_1-0,06x_2x_3$; $s_{ад}^2=0,0045$; $b_{123} < 0,0073$ (воздух).

Активность эндогенных оксидаз и их реакция на тиоксин в гомогенатах скелетных мышц двух подвигов полевки-экономки при экстремальном охлаждении и акклимации в условиях от 0 до +1°C (декабрь, вторая серия, 7—10-е поколения)

№ варианта	Независимые переменные				Тетразольстабилизирующая активность гомогената, е/мл. в атмосфере				ТТХ _а /ТТХ _в				Чувствительность эндогенного метаболизма в гомогенатах мышц к тиоксину, % к исходному уровню			
	аргона		воздуха		аргона		воздуха		ТТХ _а /ТТХ _в		ТТХ _а /ТТХ _в		Чувствительность эндогенного метаболизма в гомогенатах мышц к тиоксину, % к исходному уровню			
	x ₁	x ₂	у ₁	у ₂	у ₁	у ₂	у ₁	у ₂	у ₁	у ₂	у ₁	у ₂	у ₁	у ₂		
1	—	—	0,362	0,360	0,365	—	0,177	2,2	1,39	3,80	—	2,60	108,4	156,8	60,0	—
2	—	—	0,360	0,405	0,215	0,460	0,090	4,8	3,10	6,10	4,30	4,50	389,4	464,5	340,9	362,8
3	+	+	0,319	0,276	0,280	0,400	0,106	3,89	4,45	4,00	2,10	3,50	130,4	89,9	156,3	144,8
4	+	+	0,253	0,230	0,290	0,240	0,078	2,8	2,70	3,60	3,40	3,20	129,2	88,9	169,4	—
5	—	+	0,240	0,167	0,345	0,210	0,025	7,4	9,20	10,50	9,1	9,6	131,1	141,3	102,4	149,5
6	+	+	0,253	0,030	0,240	0,490	0,070	3,8	3,00	2,40	4,90	3,4	276,0	500	416,6	212,2
7	+	+	0,575	—	0,660	0,490	0,177	3,6	—	3,50	2,8	3,2	54,3	65,7	42,9	—
8	+	+	0,242	—	0,175	0,310	0,135	1,9	—	3,2	1,4	2,3	548,6	312,5	7,84	—

Примечание. Статистические показатели: $b_0=0,325$; $b_1=-0,048$; $b_2=0,002$; $b_3=0,002$; $b_4=0,031$; $b_5=-0,031$; $b_6=0,031$; $b_7=0,031$; $b_8=-0,035$; $b_9=0,0067$; $b_{10}=0,0339$; $b_{11}=0,0325$; $b_{12}=0,048x_1-0,031x_2+0,031x_3-0,035x_4x_5$ (аргон); $b_{13}=0,107$; $b_{14}=0,014$; $b_{15}=0,017$; $b_{16}=0,005$; $b_{17}=0,0035$; $b_{18}=0,0147$; $b_{19}=-0,0185$; $b_{20}=0,0063$; $b_{21}=\{y\}=0,0341$ (воздух); $b_{22}=4,03$; $b_{23}=-0,7$; $b_{24}=-0,99$; $b_{25}=0,60$; $b_{26}=0,40$; $b_{27}=1,08$; $b_{28}=-0,89$; $b_{29}=-0,93$; $b_{30}=\{y\}=0,41$; $b_{31}=\{y\}=0,41$; $b_{32}=-0,89$; $b_{33}=-0,93$; $b_{34}=-0,89x_1x_2+0,6x_3-1,08x_4x_5+0,93x_1x_2x_3$; $b_{35}=5,87 < F_{0,5}(1,13)=4,7$ (ТТХ_а/ТТХ_в); $b_{36}=233,4$; $b_{37}=127,4$; $b_{38}=-17,9$; $b_{39}=44,1$; $b_{40}=-4,09$; $b_{41}=57,4$; $b_{42}=41,8$; $b_{43}=66,45$; $b_{44}=\{y\}=7333,8$; $b_{45}=\{b_i\}=66$ (чувствительность эндогенного метаболизма к тиоксину).

Активность эндогенных оксидаз в гомогенатах скелетных мышц двух подвигов полевки-экономки при экстремальном охлаждении и акклимации в условиях от 0 до +1°C (декабрь, вторая серия, 7—10-е поколения)

Уровень	Натуральные независимые переменные				№ варианта	Кодированные независимые переменные				ТТХ _а /ТТХ _в			
	Подвид x ₁	Условия акклимации (температура в течение 9 дней до опыта), °C x ₂	Температура 20-минутного воздействия в опыте, °C x ₃	Концентрация тиоксина в гомогенате, мг/кг x ₄		x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	у ₁	у ₂	у ₃	у ₄
Верхний	М. о. oregonus	+18	+18	30,0	1	—	—	—	—	2,6	1,39	3,80	—
Нижний	М. о. chachot	0	-15	0,0		2	+	—	—	—	4,5	3,10	6,10
					3	+	+	—	—	3,5	4,45	4,0	2,10
					4	+	+	—	—	3,2	2,70	3,60	3,40
					5	—	—	+	—	9,6	9,20	10,5	9,10
					6	+	+	+	—	3,4	3,00	2,40	4,90
					7	+	+	+	—	3,2	—	3,50	2,80
					8	+	+	+	—	2,3	—	3,20	1,44
					9	—	—	+	+	2,2	2,18	2,28	—
					10	+	—	—	+	16,9	14,4	20,8	15,6
					11	+	+	—	+	4,4	4,00	6,25	3,04
					12	+	—	—	+	10,5	2,40	6,10	23,0
					13	—	—	+	+	12,4	13,0	10,7	13,6
					14	+	—	—	+	11,8	15,0	10,0	10,4
					15	+	+	+	+	1,7	—	2,30	1,20
					16	+	+	+	+	10,6	—	10,0	11,3

Примечание. Статистические показатели: $b_0=6,42$; $b_1=1,47$; $b_2=-1,50$; $b_3=0,45$; $b_4=2,39$; $b_{11}=0,25$; $b_{12}=-1,32$; $b_{14}=2,16$; $b_{23}=-0,92$; $b_{24}=-0,51$; $b_{25}=-0,14$; $b_{123}=1,60$; $b_{124}=-0,139$; $b_{125}=-0,23$; $b_{234}=-0,04$; $b_{1234}=0,66$; $s^2\{y\}=11,8$; $t\{b_i\}=1,03$; $y=6,42+1,47x_1-1,5x_2+2,39x_3+2,16x_4-1,32x_1x_2+1,6x_1x_2x_3$.

тированных животных. Биохимическая дифференциация по активности эндогенных оксидаз, так же как в первой серии опытов, ярко выражена при экстремальном охлаждении предварительно адаптированных животных (см. рис. 2, б). Различия между южной и северной полевкой-экономкой сохраняется также в норме, в условиях содержания животных при температуре +18°C ($b_1=-0,7$). У животных 7—10-го поколения, как правило, принадлежность к южному подвиду связана с пониженным уровнем активности оксидаз. В мышцах северного подвида коэффициент ТТХ_а/ТТХ_в во всех вариантах охлаждения в исследованных сериях выше, чем у южного. Анализ данных

Таблица 16

Изменение ректальной температуры животных двух подвидов полевки-экономки при экстремальном охлаждении и акклимации в условиях от 0 до +1° С (декабрь, вторая серия, 7—10-е поколения)

№ варианта	Независимые переменные			Ректальная температура животных, ° С				
	x_1	x_2	x_3	y_1	y_2	y_3	$\bar{y}_{ул}$	\hat{y}
1	—	—	—	29,0	26,0	—	27,5	28,2
2	+	—	—	34,0	31,0	27,6	30,9	28,2
3	—	+	—	23,4	25,4	23,0	23,9	25,4
4	+	+	—	22,4	29,6	23,0	25,0	25,4
5	—	—	+	34,3	32,2	—	33,8	31,7
6	+	—	+	30,8	30,4	33,8	31,7	31,7
7	—	+	+	35,3	33,0	35,0	34,4	34,4
8	+	+	+	32,0	31,6	33,7	32,4	34,4

Примечание. Статистические показатели: $b_0=29,95$; $b_1=0,05$; $b_2=-1,02$; $b_3=-3,12$; $b_{12}=-0,27$; $b_{13}=-1,07$; $b_{23}=1,35$; $b_{123}=0,30$; $ts\{b_i\}=1,24$; $s^2\{\bar{y}\}=2,68$; $y=29,9+3,12x_1+1,35x_2$; $s^2_{ад}=3,16 < F_{s^2}\{\bar{y}\}=8,04$; $F_{0,95}(514)=3,0$.

по чувствительности эндогенных оксидаз к тироксину показывает, что разный исходный уровень интенсивности эндогенного аэробного метаболизма сочетается с разной чувствительностью к гормону. Гомогенат мышц южной полевки-экономки, обладающий менее высоким исходным уровнем активности оксидаз, более чувствителен к исследованной дозе тироксина. И, напротив, гомогенат мышц северной полевки-экономки с более высоким уровнем данного показателя менее чувствителен к добавлению тироксина.

В табл. 15 представлены результаты статистической обработки тех же данных второй серии, но в соответствии с планом ПФЭ типа 2^4 (x_4 —концентрация тироксина в пробе), в табл. 16—результаты определения ректальной температуры у охлажденных животных.

Использование данного плана, где результаты рассчитываются по 16 вариантам опыта и где, следовательно, $s^2\{b_i\}$ меньше вдвое в сравнении с вариантом расчета по табл. 14 и статистические свойства плана значительно улучшены, приводит к тем же выводам. Достоверные различия между северным и южным подвидом обнаруживаются отчетливо в условиях экстремального охлаждения неадаптированных и адаптированных к холоду животных (b_{13} и $b_{123} > ts\{b_i\}$). Тироксин в дозе 30 мг/кг увеличивает активность эндогенных оксидаз ($b_4 > ts\{b_i\}$), и эта реакция различна у северного и южного подвида ($b_{14} > ts\{b_i\}$).

Интенсивность анаэробного и аэробного гликолиза. Данные, полученные при параллельном определении интенсивности ана-

Таблица 17

Интенсивность анаэробного и аэробного гликолиза в гиалоплазме скелетных мышц двух подвидов полевки-экономки при экстремальном охлаждении и акклимации к температуре от 0 до +3° С (декабрь, первая серия, 5, 6-е поколения)

№ варианта	Независимые переменные			Скорость накопления лактата, мг/100 мг сырого веса ткани, за 1 ч при 28° С в атмосфере											
	x_1	x_2	x_3	воздуха				аргона							
				$\bar{y}_{ул}$	y_1	y_2	y_3	$\bar{y}_{ул}$	y_1	y_2	y_3				
1	—	—	—	1,70	1,41	2,92	0,78	1,11	1,79	1,81	0,75	1,80	0,78	1,04	2,88
2	+	—	—	1,42	1,47	1,37	—	0,21	0,21	0,22	—	6,61	7,0	—	5,50
3	—	+	—	1,03	0,77	1,30	—	2,03	1,85	2,21	—	0,50	0,41	—	0,76
4	+	+	—	0,69	0,90	0,48	—	1,13	0,32	1,94	—	1,52	2,81	—	1,24
5	—	—	+	0,87	0,96	0,79	—	1,14	1,66	1,18	0,59	0,61	0,57	—	1,95
6	+	—	+	0,85	0,48	1,22	—	1,99	2,12	1,87	—	0,43	0,226	—	0,67
7	—	+	+	0,67	0,74	0,36	0,49	1,26	0,84	1,04	1,44;	0,54	0,88	0,34;	0,79
8	+	+	+	1,21	1,14	1,28	—	2,25	1,63	2,82	1,73	0,57	0,67	0,62	0,316

Примечание. Статистические показатели: $b_0=1,05$; $b_1=-0,012$; $b_2=-0,155$; $b_3=-0,155$; $b_{12}=-0,062$; $b_{13}=0,142$; $b_{23}=0,195$; $b_{123}=-0,077$; $s^2\{y\}=0,290$; $ts\{b_i\}=0,2956$ (аргон); $b_0=1,39$; $b_1=0,005$; $b_2=0,277$; $b_3=0,277$; $b_{12}=-0,152$; $b_{13}=0,455$; $b_{23}=-0,182$; $b_{123}=0,017$; $s^2\{y\}=0,305$; $ts\{b_i\}=0,3259$ (воздух); $b_0=1,57$; $b_1=0,71$; $b_2=-0,79$; $b_3=-1,035$; $b_{12}=-0,447$; $b_{13}=-0,747$; $b_{23}=0,807$; $b_{123}=0,500$; $s^2\{y\}=0,840$; $ts\{b_i\}=0,501$ ($Q^a_{\text{лактат}}/Q^a_{\text{лактат}}$); $y=1,57+0,71x_1-0,79x_2-1,035x_3-0,747x_1x_2+0,807x_1x_3+0,500x_2x_3$; $F_{1,11}=4,8$; $s^2_{ад}=1,636 < F_{s^2}\{\bar{y}\}=2,016$.

Таблица 18

Интенсивность анаэробного гликолиза в гомогенатах селезенки двух подвидов полевки-экономки при экстремальном охлаждении и акклимации в условиях от 0 до +3°С (декабрь, первая серия, 5, 6-е поколения)

№ варианта	Кодированные независимые переменные			Скорость накопления лактата, мг/100 мг сырого веса ткани, за 1 ч при 28°С в атмосфере аргона			
	x_1	x_2	x_3	\bar{y}_{ul}	y_1	y_2	y_3
1	—	—	—	0,456	0,41	0,36	0,60
2	+	—	—	0,695	0,64	0,75	—
3	—	+	—	0,250	0,07	0,43	—
4	+	+	—	1,33	1,38	1,28	—
5	—	—	+	0,316	0,36	0,36	0,23
6	+	—	+	0,730	0,72	0,74	—
7	—	+	+	0,346	0,170	0,36	0,51
8	+	+	+	0,555	0,0	1,11	—

Примечание. Статистические показатели: $b_0=0,584$; $b_1=0,24$; $b_2=0,035$; $b_3=-0,098$; $b_{12}=0,079$; $b_{13}=-0,087$; $b_{23}=-0,074$; $b_{123}=-0,131$; $s^2\{y\}=0,217$; $ts\{b_i\}=0,1459$.

Таблица 19

Интенсивность анаэробного и аэробного гликолиза в гиалоплазме скелетных мышц двух подвидов полевки-экономки при экстремальном охлаждении и акклимации в условиях от 0 до +1°С (декабрь, вторая серия, 7—10-е поколения)

№ варианта	Независимые переменные			Скорость накопления лактата, мг/100 мг сырого веса ткани, в процессе инкубации гиалоплазмы в течение 1 ч при 37°С в атмосфере								
				аргона					воздуха			
	x_1	x_2	x_3	\bar{y}_{ul}	y_1	y_2	y_3	\hat{y}	\bar{y}_{ul}	y_1	y_2	y_3
1	—	—	—	2,40	2,09	2,72	—	2,02	1,85	2,59	1,12	—
2	+	—	—	1,46	1,27	1,99	1,11	0,94	0,82	—	—	0,82
3	—	+	—	1,80	—	0,27	3,34	0,94	0,57	—	0,63	0,51
4	+	+	—	1,70	—	1,96	1,44	2,02	0,27	0,14	0,62	0,04
5	—	—	+	0,54	0,18	0,91	—	2,02	0,69	0,65	0,73	—
6	+	—	+	1,85	1,59	1,94	2,03	0,94	0,97	0,83	0,97	1,12
7	—	+	+	0,97	1,13	0,58	1,21	0,94	1,00	1,51	0,49	—
8	+	+	+	1,15	0,70	1,68	0,97	2,02	0,66	0,60	0,13	1,25

Примечание. Статистические показатели: $b_0=1,48$; $b_1=0,057$; $b_2=-0,079$; $b_3=-0,346$; $b_{12}=0,54$; $b_{13}=0,319$; $b_{23}=-0,110$; $b_{123}=0,216$; $s^2\{y\}=0,780$; $ts\{b_i\}=0,39$; $y=1,48+0,54x_1+x_2$; $s^2_{ад}=0,838 < F_{5,2}\{y\}=1,17$; $F_{0,95}(6,12)=3,0$ (аргон); $b_0=0,85$; $b_1=-0,173$; $b_2=-0,229$; $b_3=-0,0238$; $b_{12}=0,013$; $b_{13}=0,159$; $b_{23}=0,229$; $b_{123}=-0,168$; $s^2\{y\}=0,247$; $ts\{b_i\}=0,276$ (воздух).

аэробного и аэробного гликолиза в гиалоплазме скелетных мышц и селезенки *M. oeconomus* при экстремальном охлаждении и акклимации, представлены в табл. 17—19 и на рис. 3.

Результаты первой серии опытов показывают, что в исследованный сезон (ноябрь — декабрь) в гиалоплазме мышц животных обеих популяций наблюдаются не обычные, но аналогичные данным по эндогенному метаболизму, соотношения между анаэробным и аэробным гликолизом. В пробах от контрольных животных полностью подавлен Пастеровский эффект: образование молочной кислоты на воздухе в процессе инкубации гиалоплазмы идет не с меньшей, а даже с большей скоростью, чем в атмосфере аргона.

Охлаждение нормализует отношения между анаэробным и аэробным гликолизом: коэффициент, характеризующий сдвиги в образовании молочной кислоты в атмосфере воздуха и аргона, достоверно увеличивается во всех вариантах опытов ($b_2, b_3, b_{23} > ts\{b_i\}$).

Северная и южная популяции достоверно отличаются по реакции на экстремальную температуру (—15°С) в опытах с предварительной и без предварительной акклимации (b_{13} и $b_{123} > ts\{b_i\}$).

При экстремальном охлаждении в обоих случаях наблюдается сдвиг в сторону активации анаэробного гликолиза и подавления аэробного — коэффициент $Q_{\text{лактат}}^{\text{аэроб}}/Q_{\text{лактат}}^{\text{анаэроб}}$ увеличивается; у южной популяции это выражено сильнее. Анализ коэффициентов регрессии (см. табл. 17) показывает, что коэффициент $Q_{\text{лактат}}^{\text{аэроб}}/Q_{\text{лактат}}^{\text{анаэроб}}$ возрастает за счет подавления аэробного гликолиза, который снижается у южной популяции в большей степени, чем у северной ($b_{13} = \pm 0,45 > ts\{b_i\}$).

Интенсивность анаэробного гликолиза в гиалоплазме селезенки обеих популяций при экстремальном охлаждении, в условиях акклимации к температуре от 0 до +3°С и при экстремальном охлаждении на фоне предварительной акклимации не изменяется.

Обнаружены достоверные различия между северной и южной формами у контрольных неохлажденных животных: способность к анаэробному гликолизу в гиалоплазме селезенки южной популяции выше в сравнении с гиалоплазмой северной ($b_1 > ts\{b_i\}$).

Результаты изучения интенсивности анаэробного и аэробного гликолиза в гиалоплазме мышц полевок-экономок 7—10 поколений (вторая серия опытов) представлены в табл. 19. Анализ данных показывает, что в соответствии с повышенной активностью эндогенных оксидаз (см. табл. 14, 15) в этой серии был обнаружен менее активный аэробный гликолиз в мышцах. Пастеровский эффект в гиалоплазме северных полевок частично, у южных — полностью нормализован (накопление молочной кислоты в пробах, инкубированных в воздухе, меньше, чем в условиях анаэробной инкубации, как и восстановление тетраэтилхлорида в гомогенатах в атмосфере воздуха меньше, чем в атмосфере аргона).

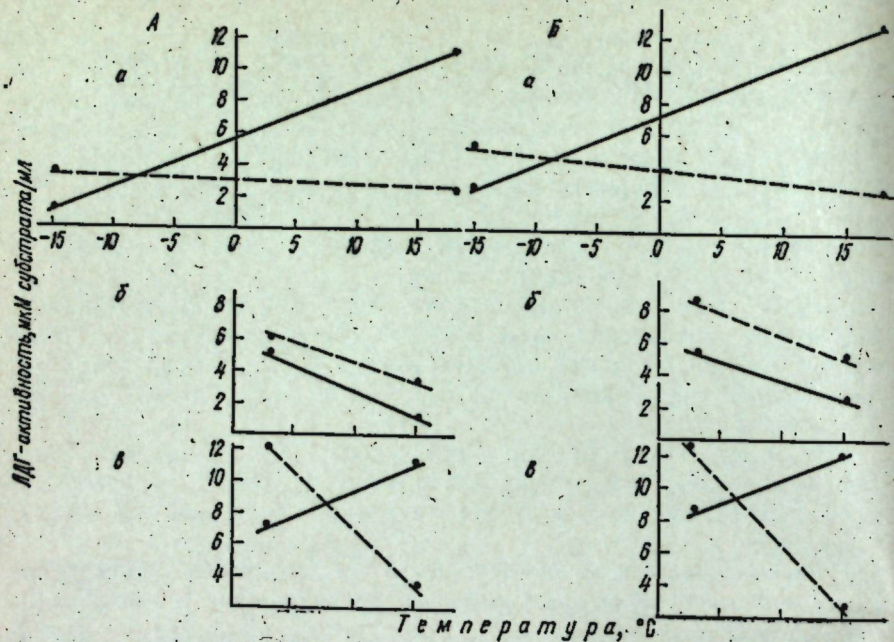


Рис. 4. Изменения активности лактатдегидрогеназы в гиалоплазме скелетных (А) и сердечных (Б), мышц двух подвидов полевки-экономки (5,6 поколения).

Обозначения те же, что на рис. 2.

Аналогично данным первой серии, во второй наблюдается подавление интенсивности аэробного гликолиза при -15°C (при экстремальном охлаждении животных активация не достоверна), и это больше выражено в мышце южного подвида. Параллельно подавлению аэробного гликолиза в условиях экстремального охлаждения обнаруживается тенденция к активации анаэробного.

При акклимации к температуре от 0 до $+1^{\circ}\text{C}$ повышение анаэробного гликолиза у южной полевки-экономки достигает уровня достоверных сдвигов ($b_{12} > ts\{b_i\}$). Различия между северной и южной полевками-экономками отчетливо обнаруживаются по анаэробному и аэробному гликолизу в условиях акклимации неадаптированных к холоду животных ($b_{12} > ts\{b_i\}$) и адаптированных при экстремальном охлаждении ($b_{23} \approx ts\{b_i\}$). У южного подвида в большей степени проявляются сдвиги в сторону активации анаэробного и аэробного гликолиза, а у северной эта активация не всегда наблюдается.

Лактат- и малатдегидрогеназная активность. Результаты, полученные при определении лактатдегидрогеназной активности в скелетной и сердечной мышцах двух популяций полевок-экономок, представлены в табл. 20—22 и на рис. 4.

Сравнительный анализ данных первой серии показывает, что обе популяции достоверно отличаются друг от друга по изменениям в активности лактатдегидрогеназы во всех декабрьских вариантах опытов с охлаждением ($b_{12}, b_{13}, b_{123} > ts\{b_i\}$) (см. табл. 20).

Интересно, что изменения в активности этого фермента в декабре носят противоположный характер у животных при экстремальном охлаждении и акклимации от 0 до $+3^{\circ}\text{C}$. Южная популяция реагирует на холод в том и другом случае подавлением лактатдегидрогеназной активности. Северная популяция при экстремальном охлаждении не изменяет лактатдегидрогеназной активности скелетных мышц, а при мягком и длительном — увеличивает ее.

Предварительная акклимация сохраняет различие между северной и южной популяциями ($b_{123} > ts\{b_i\}$), но направленность реакции на холод по лактатдегидрогеназе скелетных мышц становится одинаковой, хотя у северной популяции общий уровень активности данного фермента выше (см. рис. 4, б).

Анализ данных табл. 21 показывает: общая активность фермента достоверно увеличивается в мышцах животных, подвергнутых экстремальному охлаждению ($b_3 > ts\{b_i\}$). В условиях акклимации к менее низким температурам в мышцах северной полевки-экономки эта реакция усиления активности гликолитического фермента исчезает ($b_2 < ts\{b_i\}$ и $b_{12} = ts\{b_i\}$).

Лактатдегидрогеназа сердечной мышцы (см. табл. 22) в декабрьской первой серии опытов при экстремальном охлаждении и в условиях акклимации изменяется у обеих популяций аналогично лактатдегидрогеназе скелетных мышц. Для северной популяции характерно увеличение активности, ярче выраженное при мягком охлаждении. Южная популяция реагирует на охлаждение снижением активности лактатдегидрогеназы сердечных мышц.

Предварительная акклимация меняет направленность реакции по сердечной лактатдегидрогеназе при экстремальном охлаждении у северной популяции на противоположную: лактатдегидрогеназа сердечной мышцы обеих популяций при сильном общем охлаждении акклиматизированного к холоду животного увеличивает активность.

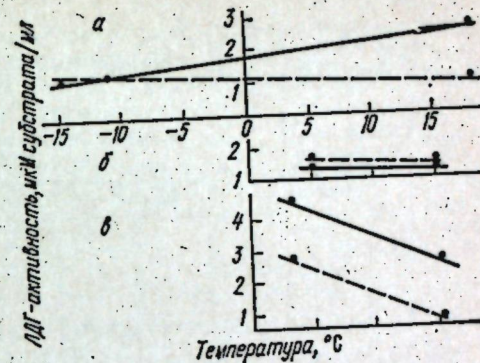


Рис. 5. Изменения активности лактатдегидрогеназы в гиалоплазме селезенки двух подвидов полевки-экономки в условиях экстремального охлаждения и акклимации (5, 6-е поколения).

Обозначения те же, что на рис. 2.

Таблица 20

Лактатдегидрогеназная активность в гиалоплазме скелетных мышц двух подвидов полевки-экономки при экстремальном охлаждении и акклимации в условиях от 0 до +3° С (первая серия, 5, 6-е поколения)

№ варианта	Кодированные независимые переменные			Активность гиалоплазмы при инкубации в течение 1 ч при 37° С, мкмоль субстрата/мл								
				Ноябрь — декабрь				Март				
	x ₁	x ₂	x ₃	$\bar{y}_{ил}$	y ₁	y ₂	y ₃	Λ у	$\bar{y}_{ил}$	y ₁	y ₂	y ₃
1	—	—	—	5,90	7,17	6,04	4,51	6,14	8,3	9,0	8,00	8,00
2	+	—	—	5,66	7,25	5,43	4,30	5,00	8,8	9,0	9,00	8,5
3	—	+	—	2,81	3,48	2,15	—	3,47	12,6	12,5	12,5	13,0
4	+	+	—	1,34	0,92	1,10	2,02	1,15	11,6	11,0	—	12,0
5	—	—	+	12,40	12,30	11,2	13,7	12,9	12,3	n=10		
6	+	—	+	8,16	8,30	9,6	6,6	7,82	11,7	n=12		
7	—	+	+	2,54	1,83	1,22	4,57	2,79	12,8	n=17		
8	+	+	+	12,06	14,3	13,3	8,6	11,44	13,0	n=17		

Примечание. Статистические показатели: $b_0=6,36$; $b_1=0,446$; $b_2=-1,67$; $b_3=-2,40$; $b_{11}=1,56$; $b_{22}=0,873$; $b_{33}=0,181$; $b_{12}=1,87$; $ts\{b_i\}=0,720$; $s^2\{y\}=2,8096$; $y=6,36-1,67x_1+2,4x_2+1,56x_1x_2+0,873x_1x_3+1,87x_1x_2x_3$; $F_{0,95(2,15)}=3,7$; $s^2_{ад}=0,92 < 3,5$ (ноябрь — декабрь); $b_0=11,4$; $b_1=-0,110$; $b_2=1,11$; $b_3=1,06$; $b_{11}=-0,08$; $b_{22}=-0,01$; $b_{33}=-0,06$; $b_{12}=0,30$; $ts\{b_i\}=0,430$; $s^2\{y\}=2,89$; $y=11,4+1,11x_1+1,06x_2-0,66x_1x_3$; $s^2_{ад}=1,3 > F_{0,95(4,60)}=3,6$ (март).

Таблица 22

Лактатдегидрогеназная активность в гиалоплазме сердечных мышц двух подвидов полевки-экономки при экстремальном охлаждении и акклимации в условиях от 0 до +3° С (первая серия, 5, 6-е поколения)

№ варианта	Кодированные независимые переменные			Активность гиалоплазмы в процессе инкубации в течение 1 ч при 37° С, мкмоль субстрата/мл									
				Ноябрь — декабрь				Март					
	x ₁	x ₂	x ₃	$\bar{y}_{ил}$	y ₁	y ₂	y ₃	Λ у	$\bar{y}_{ил}$	y ₁	y ₂	y ₃	Λ у
1	—	—	—	8,49	9,75	9,12	6,61	8,45	9,16	9,5	9,0	9,06	6,76
2	+	—	—	5,58	6,40	5,60	4,75	5,57	8,66	9,0	8,0	9,0	4,41
3	—	+	—	5,21	6,06	4,37	—	5,23	11,83	12,5	11,5	11,5	4,45
4	+	+	—	2,55	2,67	2,19	2,80	2,59	12,33	12,5	12,5	12,0	9,67
5	—	—	+	12,7	11,1	13,4	13,7	12,71	13,09	n=11			6,30
6	+	—	+	8,81	9,25	11,1	6,1	8,83	12,8	n=12			4,92
7	—	+	+	3,00	1,83	2,13	5,06	2,97	13,4	n=17			6,86
8	+	+	+	12,4	13,1	12,7	11,5	12,37	12,8	n=17			4,49

Примечание. Статистические показатели: $b_0=7,34$; $b_1=0,01$; $b_2=-1,55$; $b_3=1,88$; $b_{11}=1,69$; $b_{22}=1,38$; $b_{33}=0,02$; $b_{12}=1,63$; $ts\{b_i\}=0,64$; $s^2\{y\}=2,21$; $y=7,34-1,55x_2+1,88x_3+1,69x_1x_2+1,38x_1x_3+1,63x_1x_2x_3$; $F_{0,95(2,15)}=3,7$; $s^2_{ад}=0,003 < 2,7$ (ноябрь — декабрь); $b_0=9,41$; $b_1=-0,09$; $b_2=0,84$; $b_3=1,27$; $b_{11}=0,10$; $b_{22}=-0,08$; $b_{33}=-0,74$; $b_{12}=-0,16$; $ts\{b_i\}=0,460$; $s^2\{y\}=3,37$; $y=9,41+0,84x_1-1,27x_2-0,74x_3$; $F_{0,95(4,61)}=2,5$; $s^2_{ад}=11,3 > 1,05$ (март).

Таблица 23

Лактат- и малатдегидрогеназная активность в гиалоплазме селезенки двух подвидов полевки-экономки при экстремальном охлаждении и акклимации в условиях от 0 до +3° С (декабрь, 5, 6-е поколения)

№ варианта	Кодированные независимые переменные			Активность гиалоплазмы в процессе инкубации в течение 1 ч при 37° С, мкмоль субстрата/мл									
				Лактатдегидрогеназа				Малатдегидрогеназа					
	x ₁	x ₂	x ₃	$\bar{y}_{ил}$	y ₁	y ₂	y ₃	Λ у	$\bar{y}_{ил}$	y ₁	y ₂	y ₃	Λ у
1	—	—	—	1,42	1,78	1,53	0,97	1,48	2,39	2,78	2,44	1,95	2,40
2	+	—	—	1,84	2,01	3,10	0,42	1,32	7,08	7,10	7,11	7,03	6,97
3	—	+	—	1,46	1,46	1,46	—	1,42	2,11	2,19	2,03	—	2,16
4	+	+	—	1,18	1,23	1,13	—	1,16	2,16	2,28	2,02	2,20	2,16
5	—	—	+	2,32	2,09	2,51	2,51	2,64	8,87	9,29	8,29	9,03	9,06
6	+	—	+	4,60	4,10	4,80	4,80	4,61	7,43	9,10	7,70	5,50	6,94
7	—	+	+	1,29	0,39	0,76	2,62	0,97	8,25	7,33	9,26	8,16	8,23
8	+	+	+	2,27	2,01	2,93	1,89	2,61	8,46	8,04	8,26	9,09	8,44

Примечание. Статистические показатели: $b_0=2,05$; $b_1=0,42$; $b_2=-0,50$; $b_3=0,58$; $b_{11}=-0,26$; $b_{22}=0,40$; $b_{33}=-0,33$; $b_{12}=-0,06$; $ts\{b_i\}=0,265$; $s^2\{y\}=0,568$; $y=2,05+0,42x_1-0,50x_2+0,58x_3+0,40x_1x_2-0,33x_1x_3$; $s^2_{ад}=0,28 < F_{0,95(2,14)}=3,7$ (лактатдегидрогеназа); $b_0=5,84$; $b_1=0,43$; $b_2=-0,59$; $b_3=2,40$; $b_{11}=-0,37$; $b_{22}=-0,74$; $b_{33}=0,70$; $b_{12}=0,78$; $ts\{b_i\}=0,28$; $s^2\{y\}=0,66$; $y=5,84+0,43x_1-0,59x_2+2,4x_3-0,37x_1x_2-0,74x_1x_3+0,70x_1x_2+0,78x_1x_3$ (малатдегидрогеназа).

Таблица 21

Лактатдегидрогеназная активность в гиалоплазме скелетных мышц двух подвидов полевки-экономки при экстремальном охлаждении и акклимации в условиях от 0 до +1° С (декабрь, вторая серия, 7—10-е поколения)

№ варианта	Кодированные независимые переменные			Активность гиалоплазмы, мкмоль НАДН ₂ /мл·10 ⁴				
				y ₁	y ₂	y ₃	$\bar{y}_{ил}$	Λ у
	x ₁	x ₂	x ₃	y ₁	y ₂	y ₃	$\bar{y}_{ил}$	Λ у
1	—	—	—	5,44	5,47	—	5,45	5,28
2	+	—	—	6,75	6,59	—	6,38	6,40
3	—	+	—	5,63	4,98	5,79	5,55	5,62
4	+	+	—	6,35	6,35	5,79	6,16	6,05
5	—	—	+	4,90	4,66	—	4,78	4,74
6	+	—	+	6,51	5,71	6,03	6,08	5,86
7	—	+	+	4,58	5,47	5,31	5,12	5,08
8	+	+	+	5,79	5,06	4,82	5,22	5,52

Примечание. Статистические показатели: $b_0=5,57$; $b_1=0,39$; $b_2=-0,10$; $b_3=-0,27$; $b_{11}=-0,17$; $b_{22}=-0,04$; $b_{33}=-0,03$; $b_{12}=-0,13$; $ts\{b_i\}=0,17$; $y=5,57+0,39x_1-0,27x_2-0,17x_3$; $s^2_{ад}=0,062 < F_{0,95(4,14)}=3,1$.

Сравнительный анализ по сезонам показывает, что различия между северной и южной популяцией по данному тесту, обнаруженные при первичном охлаждении в декабре, не наблюдаются в марте (b_{12} , b_{13} и $b_{123} < ts\{b_i\}$ в мартовских сериях опытов). Исчезает в мартовских сериях опытов и противоположность в направленности изменений лактатдегидрогеназной активности при экстремальном охлаждении и акклимации ($b_2 = +1,11$; $+0,84$ и $b_3 = +1,06$; $+1,27$). Лактатдегидрогеназная активность скелетных и сердечных мышц обеих популяций в марте в том и другом случае снижается. Предварительная акклимация к холоду усиливает эффект снижения в активности при действии экстремальной температуры ($b_{23} = -0,66$; $-0,74$).

Изменения активности лактатдегидрогеназы в селезенке *M. o. oesopotus* в декабрьской серии опытов при экстремальном охлаждении и акклимации имеют противоположную направленность (табл. 23, рис. 5). В селезенке южной популяции при охлаждении в пределах от $+18$ до -15°C наблюдается подавление активности лактатдегидрогеназы, при акклимации к температуре от 0 до $+6^\circ\text{C}$ — увеличение.

Различия между популяциями появляются при действии экстремальной температуры ($b_{13} > ts\{b_i\}$). В условиях 9-дневной акклимации обе популяции по данному тесту в селезенке реагируют на охлаждение одинаково ($b_{12} < ts\{b_i\}$). Не наблюдается различий между ними и при сильном охлаждении на фоне предварительной акклимации.

В табл. 24 представлены результаты определения изоэнзимной активности лактатдегидрогеназы и распределения *H*- и *M*-субъединиц фермента в скелетных мышцах полевки-экономки в тех же вариантах охлаждения (вторая серия опытов). Анализ этих данных показывает, что биохимическая дифференциация внутри вида *M. oesopotus* наблюдается и по линии изменения свойств лактатдегидрогеназы. В условиях экстремального охлаждения активность ЛДГ-5, которая, как предполагается, типична для анаэробного метаболизма, достоверно увеличивается (см. табл. 24), и это более выражено у северного подвида ($b_3 > ts\{b_i\}$ и $b_{13} > ts\{b_i\}$). Активность ЛДГ-1, характеризующая напряженность аэробного метаболизма, напротив, достоверно уменьшается при экстремальном охлаждении животного, и это более заметно также у северной полевки-экономки (b_3 и $b_{13} > ts\{b_i\}$). В условиях экстремального охлаждения предварительно адаптированного к холоду животного направленность этих изменений в сторону активации анаэробного метаболизма и ингибирования аэробного сохраняется у северного подвида и исчезает у южного ($b_{123} > ts\{b_i\}$).

Анализ тех же данных, представленных в виде коэффициента *H/M*, характеризующего распределение *H*- и *M*-субъединиц и указывающего на изменения в соотношениях активности аэробного и анаэробного обмена, приводит к аналогичному

Таблица 24

Активность изоэнзимов, % к общей активности ЛДГ, и соотношение активности *H*- и *M*-субъединиц изоферментов лактатдегидрогеназы в гиаололазме скелетных мышц двух подвидов полевки-экономки при экстремальном охлаждении и акклимации в условиях от 0 до $+1^\circ\text{C}$ (декабрь, вторая серия, 7—10-е поколения)

№ варианта	Кодированные независимые переменные		ЛДГ-1		ЛДГ-2		ЛДГ-3		ЛДГ-4		ЛДГ-5		Коэффициент <i>H/M</i>							
	x_1	x_2	x_3	\bar{y}_{ul}	\hat{y}	\bar{y}_{ul}	\hat{y}	\bar{y}_{ul}	\hat{y}	\bar{y}_{ul}	\hat{y}	\bar{y}_{ul}	\hat{y}	y_1	y_2	y_3	y_4	y_5	y_{ul}	\hat{y}
1	+	+	+	4,4	1,6	6,9	11,9	12,5	5,6	72,7	67,3	0,19	0,19	0,82	0,53	—	—	—	0,19	0,22
2	+	+	+	9,2	9,4	19,1	29,6	28,9	Сл.	40,6	45,9	0,63	0,63	0	0	—	—	—	0,66	0,63
3	+	+	+	0,0	1,8	—1,3	0	0,7	0	100,0	101,7	0	0	0	0	—	—	—	0	—0,02
4	+	+	+	Сл.	0,8	4,1	14,8	15,7	Сл.	81,9	80,3	0,11	0,11	0,10	—	—	—	0,10	0,10	
5	+	+	+	13,5	10,8	20,1	18,1	20,5	2,3	47,4	46,3	0,52	0,52	0,67	—	—	—	—	0,59	0,62
6	+	+	+	2,7	3,0	7,9	19,7	17,3	1,5	66,6	67,7	0,32	0,32	0,18	—	—	—	—	0,25	0,22
7	+	+	+	8,8	10,6	17,1	26,7	24,1	2,4	43,9	41,1	0,32	0,32	0,76	0,63	0,44	0,82	0,59	0,59	0,57
8	+	+	+	11,0	11,6	11,4	18,5	20,9	Сл.	59,8	62,5	0,46	0,46	0,30	0,55	0,33	0,35	0,40	0,40	0,42

Примечание. Статистические показатели характеризуются следующими цифрами:

	ЛДГ-1	ЛДГ-2	ЛДГ-3	ЛДГ-4	ЛДГ-5	Коэффициент <i>H/M</i>
b_0	6,2	10,7	17,4	1,47	64,1	0,347
b_1	—0,47	0,17	3,26	—1,1	—1,89	0,005
b_2	—1,25	—2,27	—2,44	—0,87	—7,29	—0,075
b_3	2,8	3,5	3,31	0,75	—9,69	0,11
b_{12}	1,02	—1,35	—1,56	0,5	1,34	—0,027
b_{13}	—1,67	—4,42	—4,86	0,30	10,66	—0,137
b_{23}	2,15	2,97	4,24	—0,52	—9,86	0,112
b_{123}	2,22	1,75	—0,84	—0,9	—2,16	0,065
$s^2\{y\}$	15,03	12,38	25,66	2,91	42,92	0,0168
$ts\{b_i\}$	1,65	1,48	2,12	0,72	2,76	0,061
$s_{HD}^2 = 0,0026 < F_{s^2}\{y\} = 0,02$; $y = 0,347 - 0,075x_1 + 0,11x_2 - 0,137x_3 + 0,112x_4 + 0,065x_5$; $F_{0,95}(2,17) = 3,6$.						

Малатдегидрогеназная активность в гиалоплазме мышц двух подвидов полевков-экономок при экстремальном охлаждении и акклимации в условиях от 0 до +3° С (первая серия, 5, 6-е поколения)

№ варианта	Кодированные независимые переменные			Активность гиалоплазмы при инкубации в течение 1 ч при 37° С, мкмоль субстрата/мл									
	x ₁	x ₂	x ₃	Ноябрь — декабрь					Март				
				\bar{y}_{11}	y ₁	y ₂	y ₃	\bar{A}_y	\bar{y}_{11}	y ₁	y ₂	y ₃	\bar{A}_y
1	—	—	—	7,86	8,14	8,32	7,14	7,27	6,5	6,5	6,5	6,5	5,32
2	+	—	—	5,45	6,49	5,37	4,50	—	6,6	7,0	6,5	6,5	—
				12,3	12,3	12,7	12,0	7,27	6,6	7,0	6,5	6,5	5,32
3	—	+	—	12,2	12,4	12,5	11,8	—	6,8	7,0	7,0	6,5	—
				5,01	4,50	5,52	—	7,27	7,8	8,5	7,5	7,5	5,32
4	+	+	—	3,77	4,19	3,35	—	—	8,5	8,5	8,5	—	—
				3,85	3,41	4,39	3,77	7,27	7,3	7,5	7,5	7,0	5,32
5	—	—	+	3,90	4,46	3,53	4,71	—	8,0	7,5	8,0	8,5	—
				12,1	12,1	12,4	12,0	12,52	11,1	n=7			8,52
6	+	—	+	11,9	12,1	11,5	12,3	—	11,0	n=8			—
				12,6	12,2	13,4	11,4	12,52	9,1	n=8			8,52
7	—	+	+	11,16	11,6	11,9	10,0	—	10,1	n=13			—
				13,29	13,4	13,27	13,2	12,52	10,8	n=13			8,52
8	+	+	+	12,77	12,73	13,07	12,5	—	10,5	n=13			—
				12,1	12,0	12,1	12,3	12,52	10,0	n=13			8,52
				11,96	12,4	10,8	12,7	—	10,3				—

Примечания. 1. Числитель — сердечная мышца, знаменатель — скелетная мышца.
 2. Статистические показатели, соответственно, по сердечной и скелетной мышцам: $b_0=9,85$; $9,14$; $b_1=0,28$; $0,66$; $b_2=-1,29$; $-1,04$; $b_3=2,55$; $2,8$; $b_{11}=-0,87$; $-0,84$; $b_{12}=-0,53$; $-1,05$; $b_{22}=1,53$; $1,45$; $b_{112}=0,53$; $0,85$; $t_s\{b_1\}=0,25$; $0,32$; $s^2\{y\}=0,33$; $0,55$ (ноябрь — декабрь); $b_0=6,92$; $0,98$; $b_1=-0,40$; $-0,18$; $b_2=0,32$; $0,35$; $b_3=1,6$; $2,8$; $b_{11}=0,07$; 0 ; $b_{12}=-0,3$; $-0,1$; $b_{22}=-0,17$; $-0,43$; $b_{112}=0,22$; $0,18$; $t_s\{b_1\}=0,34$; $0,44$; $s^2\{y\}=1,72$; $2,26$ (март);
 $y=9,85+0,28x_1-1,29x_2+2,59x_3-0,87x_1x_2-0,53x_1x_3+1,53x_2x_3+0,53x_1x_2x_3$;
 $y=9,14+0,66x_1-1,04x_2+2,8x_3-0,84x_1x_2+1,45x_1x_3-0,84x_2x_3+0,28x_1x_2x_3$; $y=6,92-$
 $-0,40x_1+1,6x_2$; $s^2=1,37 > F_{s^2}(\bar{y})=1,00$; $F_{0,99}(5,45)=3,5$; $y=8,98+1,5x_2$; $s^2=$
 $=0,5 < F_{s^2}(\bar{y})=0,9$; $F_{0,95}(6,44)=2,3$.

Данные по определению веса селезенки *M. oesopotus* при экстремальном охлаждении и акклимации представлены в табл. 28. Достоверные изменения в весе данного органа в изученных вариантах охлаждения отсутствуют ($b < ts\{b_i\}$). Исключение составляют контрольные животные в мартовской серии опытов: у южного подвида экономок вес селезенки больше ($b_1 > ts\{b_i\}$).

В обобщенном анализе данных по всем тестам в первую очередь представляет интерес выявление типичных черт в реак-

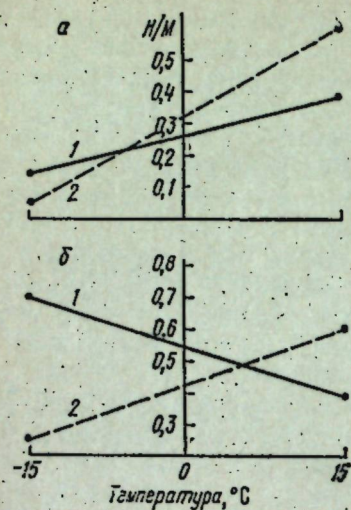


Рис. 6. Изменения в распределении N- и M-субъединиц изоферментов лактатдегидрогеназы в гиалоплазме скелетных мышц двух подвидов полевки-экономки в условиях экстремального охлаждения неадаптированных (а) и адаптированных к холоду животных (б). Подвид: 1 — южный; 2 — северный.

выводу (см. табл. 24 и рис. 6): Индекс N/M при экстремальном охлаждении неадаптированных и адаптированных к холоду животных достоверно снижается у северных полевков-экономок. В условиях охлаждения адаптированных к низким температурам животных наблюдаются достоверные различия между южным и северным подвидом. Первый реагирует на охлаждение активацией аэробного метаболизма и подавлением анаэробного, второй сохраняет свою способность адаптироваться за счет перестройки обмена в сторону переключения на менее эффективный в энергетическом отношении путь (активируется анаэробный гликолиз, усиливается активность анаэробных изоэнзимов лактатдегидрогеназы).

Данные по малатдегидрогеназной активности в сердечной и скелетной мышце, а также в селезенке представлены в табл. 23 и 25. Активность малатдегидрогеназы достоверно изменяется во всех изученных вариантах охлаждения ($b > ts\{b_i\}$). Явно выражены достоверные различия по данному тесту между се-

верным и южным подвидами полевков в условиях акклимации и экстремального охлаждения животных.

Содержание молочной кислоты. Данные по содержанию молочной кислоты в скелетной мышце и селезенке двух популяций при экстремальном охлаждении и акклимации представлены в табл. 26. Регрессионный анализ результатов обнаруживает отсутствие достоверных изменений в содержании данного метаболита в мышце и селезенке обеих популяций в исследуемых условиях охлаждения.

Изменения в морфофизиологических показателях. Данные по определению общего веса животных в контроле и после 9-дневной акклимации к температуре от 0 до +6° С представлены в табл. 27. Достоверных сдвигов по данному морфофизиологическому показателю не обнаружено: вес контрольных и акклиматизированных к холоду животных в декабрьской серии опытов обеих популяций одинаков ($b_1 < ts\{b_i\}$). В весенний период общий вес контрольных животных больше у южной популяции (в марте: $b_1 > ts\{b_i\}$).

Содержание молочной кислоты в скелетной мышце и селезенке двух подвидов полевок-экономок при экстремальном охлаждении и акклимации в условиях от 0 до +3°С (декабрь, первая серия, 5, 6-е поколения)

№ варианта	Кодированные независимые переменные			Содержание лактата, мг на 1 г сырого веса ткани							
				Скелетная мышца				Селезенка			
	x_1	x_2	x_3	\bar{y}_{ul}	y_1	y_2	y_3	y_4	\bar{y}_{ul}	y_1	y_2
1	—	—	—	0,252	0,203	0,221	0,461	0,123	0,213	0,213	0,212
2	+	—	—	0,233	0,208	0,304	0,181	0,240	0,265	0,265	—
3	—	+	—	0,281	0,407	0,288	0,218	0,210	0,227	0,140	0,314
4	+	+	—	0,338	0,277	0,369	0,300	0,406	0,139	0,162	0,117
5	—	—	+	0,302	0,282	0,322	—	—	0,185	0,205	0,166
6	+	—	+	0,277	0,342	0,354	0,205	0,209	0,248	0,310	0,187
7	—	+	+	0,547	0,401	0,477	0,803	0,506	0,080	0,075	0,085
8	+	+	+	0,213	0,143	0,109	0,434	0,165	0,245		$n=9$

Примечание. Статистические показатели, соответственно, по скелетной мышце и селезенке: $b_0=0,305$; $0,200$; $b_1=-0,040$; $0,024$; $b_2=0,039$; $-0,027$; $b_3=0,034$; $-0,010$; $b_{12}=-0,029$; $-0,004$; $b_{13}=-0,049$; $0,033$; $b_{23}=0,005$; $-0,00$; $b_{123}=-0,048$; $0,00$; $ts\{b_i\}=0,068$; $0,048$; $s^2\{y\}=0,035$; $0,013$.

ции на температуру для *M. oeconomus* как вида независимо от принадлежности животного к южной или северной внутривидовой форме. С другой стороны, важно выявить те исключения в общей направленности реакции на охлаждение, которые связаны с происхождением животного от северной или южной популяции, т. е. попытаться найти признаки зарождения в метаболизме данного вида нового типа обмена, прообраза более эффективных тканевых приспособлений.

Таблица 27

Вес тела полевок-экономок северного и южного подвидов после 9-дневной акклимации в условиях от 0 до +3°С (вторая серия, 5, 6-е поколения), г

№ варианта	Кодированные независимые переменные		Ноябрь — декабрь		Март	
	x_1	x_2	\bar{y}_{ul}	n	\bar{y}_{ul}	n
1	—	—	26,1	36	24,8	12
2	+	—	29,3	29	34,8	12
3	—	+	31,0	19	30,2	10
4	+	+	29,6	13	36,3	8

Примечание. Статистические показатели: $b_0=29,0$; $b_1=0,45$; $b_2=1,30$; $b_3=-1,15$; $ts\{b_i\}=1,67$; $s^2\{y\}=68,225$ (ноябрь — декабрь); $b_0=31,5$; $b_1=4,02$; $b_2=1,72$; $b_3=-0,97$; $ts\{b_i\}=3,37$; $s^2\{y\}=12,61$ (март).

Вес селезенки полевок-экономок северного и южного подвидов при экстремальном охлаждении и акклимации в условиях от 0 до +3°С (вторая серия, 5, 6-е поколения), г

№ варианта	Кодированные независимые переменные			Ноябрь — декабрь					Март			
				\bar{y}_{ul}	y_1	y_2	y_3	$\wedge y$	\bar{y}_{ul}	y_1	y_2	y_3
	x_1	x_2	x_3	\bar{y}_{ul}	y_1	y_2	y_3	$\wedge y$	\bar{y}_{ul}	y_1	y_2	y_3
1	—	—	—	24,4	27,0	31,1	15,1	17,7	21,8	20,5	21,1	23,9
2	+	—	—	37,6	51,1	36,4	25,5	29,5	35,1	43,5	38,2	23,6
3	—	+	—	55,4	23,2	87,6	—	50,1	23,2	19,0	31,5	19,2
4	+	+	—	24,2	24,0	25,5	—	38,3	28,9	25,2	35,0	26,7
5	—	—	+	15,3	14,5	16,2	—	38,7	20,9	21,5	20,0	21,3
6	+	—	+	33,2	31,7	25,3	42,7	27,3	30,7	40,9	22,0	29,4
7	—	+	+	30,8	25,3	32,1	35,1	28,7	27,6	26,2	36,0	20,5
8	+	+	+	47,6	60,6	52,7	29,7	40,5	34,7	43,2	28,5	32,4

Примечание. Статистические показатели: $b_0=33,6$; $b_1=2,15$; $b_2=6,00$; $b_3=-1,90$; $b_{12}=-5,62$; $b_{13}=6,52$; $b_{23}=1,47$; $b_{123}=5,35$; $ts\{b_i\}=6,87$; $s^2\{y\}=251,03$ (ноябрь — декабрь); $b_0=27,8$; $b_1=-4,5$; $b_2=0,74$; $b_3=0,61$; $b_{12}=-1,3$; $b_{13}=-0,26$; $b_{23}=1,93$; $b_{123}=0,61$; $ts\{b_i\}=3,06$; $s^2\{y\}=49,93$ (март).

Следовательно, *M. oeconomus* как вид реагирует на экстремальное охлаждение активацией эндогенного аэробного метаболизма и, по-видимому, в первую очередь активацией оксидазных ферментных систем, так как коэффициент TTX_a/TTX_b при охлаждении увеличивается. Вероятно, это увеличение не имеет отношения к малатдегидрогеназе, поскольку результаты показывают, что активность данного фермента при экстремальном охлаждении у южного подвида подавляется, а у северного остается на уровне нормы.

Типичная реакция вида *M. oeconomus* на продолжительное и менее резкое охлаждение (от 0 до +3°С, 9 дней) — подавление аэробного гликолиза и тенденция к активации анаэробного в скелетной мышце: коэффициент $Q_{лактат}^a/Q_{лактат}^b$ в данных условиях охлаждения в гиалоплазме обеих форм увеличивается одинаково. В равной степени возрастает и активность лактатдегидрогеназы в селезенке северного и южного подвида.

По-видимому, типичным следует считать и отсутствие изменений в общем весе животных при выдерживании южной и северной форм *M. oeconomus* в течение 9 дней при температуре от 0 до +3°С, что, вероятно, указывает на сравнительно быструю адаптацию вида к охлаждению в диапазоне данных температур.

Наконец, характерна для вида и реакция на естественные колебания температуры в течение года. Осенние животные, пред-

Таблица 29

Значимые коэффициенты регрессии в опытах по изучению метаболизма в мышце и селезенке полевков-экономок в условиях экстремального охлаждения и акклимации

Тест	Орган	b_1	b_2	b_3	b_{12}	b_{13}	b_{23}	b_{123}
Ноябрь — декабрь								
TTX_a	Мышца	-0,15	—	-0,32	-0,13	—	—	+0,20
TTX_b	скелетная	—	—	—	—	—	—	—
	Селезенка	—	—	-0,23	—	—	—	—
$Q_{\text{лактат}}^a$	Мышца	0,71	-0,79	-1,035	—	-0,747	+0,807	+0,50
$Q_{\text{лактат}}^b$	скелетная	—	—	—	—	—	—	—
	Селезенка	0,24	—	—	—	—	—	—
ЛДГ	Мышца	—	-1,67	2,4	1,56	+0,87	—	+1,87
	скелетная	—	—	—	—	—	—	—
	Мышца	—	-1,55	1,88	1,69	+1,38	—	+1,63
	сердечная	—	—	—	—	—	—	—
	Селезенка	0,42	-0,50	0,58	—	+0,401	-0,33	—
H/M	Мышца	—	-0,075	0,11	—	-0,137	0,112	+0,065
	скелетная	—	—	—	—	—	—	—
МДГ	Мышца	0,66	-1,04	2,8	-0,84	-1,05	1,45	+0,82
	скелетная	—	—	—	—	—	—	—
	Мышца	0,28	-1,29	2,59	-0,87	-0,53	1,53	+0,53
	сердечная	—	—	—	—	—	—	—
	Селезенка	0,43	-0,59	2,40	-0,32	-0,74	0,70	+0,78
Вес	Селезенка	—	—	—	—	6,52	—	—
Март								
ЛДГ	Мышца	—	1,11	1,06	—	—	-0,66	—
	скелетная	—	—	—	—	—	—	—
	Мышца	—	0,84	1,27	—	—	-0,74	—
	сердечная	—	—	—	—	—	—	—
МДГ	Мышца	—	—	1,5	—	—	—	—
	скелетная	—	—	—	—	—	—	—
	Мышца	-0,40	—	1,6	—	—	—	—
	сердечная	—	—	—	—	—	—	—
Вес	Селезенка	4,5	—	—	—	—	—	—

ки которых в этот период года еще не были адаптированы к низким зимним температурам, имеют относительно низкую активность аэробных дегидрогеназ: коэффициент $TTX_a/TTX_b \leq 1$, и соли тетразолия на воздухе восстанавливаются лучше, чем в аргоне.

Мартовские животные, полученные от модельной популяции, которая зимние холода переносила в утепленном виварии, напротив, адаптированы в этот период к холоду, имеют высокий коэффициент TTX_a/TTX_b , в мышце и селезенке активированы процессы, связанные с аэробными реакциями обмена.

Таким образом, для *M. oeconomus*, как вида, характерна интенсификация обмена при охлаждении: активация, по-видимому, оксидазных систем и анаэробного гликолиза в мышцах, активация лактатдегидрогеназы в селезенке. Этот вывод согласуется с данными по изучению энергетического обмена при экстремальном охлаждении на уровне особи, когда наблюдалась активация свободного окисления (Скулачев, Маслов, 1960; Скулачев, 1962), активация гликолиза и резкое снижение в содержании гликогена (Мишукова, 1966) в мышцах теплокровных животных при охлаждении.

Анализ данных с целью выявления исключений из обнаруженного правила, т. е. поиск изменений в обмене, типичных для каждой из исследованных внутривидовых форм, показывает, что в определенных условиях *M. oeconomus*, сохраняя способность реагировать на охлаждение усилением энергетического обмена, в то же время обладает иными, не характерными для интенсификации, механизмами. Эти механизмы нестойки, но они достоверно обнаруживаются (b_{12}, b_{13} и $b_{123} > ts\{b_i\}$) и свидетельствуют о существовании внутри вида *M. oeconomus* определенной биохимической дифференциации.

Так, оксидазные системы при экстремальном охлаждении в обеих популяциях *M. oeconomus* усиливают свою активность. Однако северная популяция, предварительно акклиматизированная к холоду, в декабрьской первой и второй сериях опытов меняет реакцию по данному тесту при экстремальном охлаждении в мышце и селезенке на противоположную (см. рис. 2). При этом степень адаптации животных к охлаждению, несмотря на достоверные различия в уровне активности оксидаз, одинакова (см. табл. 16 — b_{12} и b_{123} по ректальной температуре меньше $ts\{b_i\}$).

По данным В. П. Скулачева (1962), различие в интенсивности свободного окисления при первом и повторном охлаждении голубей в тех же условиях (20 мин., -15°C) сопровождается резким различием в степени адаптации к низким температурам. Животное, не способное к активации свободного окисления, снижает ректальную температуру до 29°C и находится на грани гибели, в то время как голуби, повторно охлажденные, снижают P/O до 0,3 и поддерживают ректальную температуру на уровне нормы. По-видимому, северная форма полевки-экономки обладает принципиально иным тканевым механизмом адаптации к холоду, не связанным с активацией свободного окисления.

При мягком охлаждении для *M. oeconomus* характерно увеличение коэффициента $Q_{\text{лактат}}^a/Q_{\text{лактат}}^b$, подавление аэробного глико-

лиза и активация анаэробного. Эта реакция ослабевает у северной популяции в декабрьской первой серии опытов с предварительным охлаждением и полностью исчезает у северной формы в первой серии при экстремальном охлаждении (см. рис. 3).

Интересно, что при охлаждении лактатдегидрогеназа мышц и селезенки *M. o. oesopotus* чаще подавляется. Активация наблюдается в вариантах с предварительной акклимацией (см. рис. 4, 5).

Лактатдегидрогеназа мышц и селезенки северной популяции чаще увеличивается: при экстремальном охлаждении активность фермента устойчива, при сильном охлаждении на фоне предварительной акклимации и при слабом охлаждении возрастает.

В мартовской серии опытов лактатдегидрогеназная активность мышц и селезенки при экстремальном и мягком охлаждении подавляется, и реакция не зависит от принадлежности животных к южной или северной форме.

Данные по общей лактатдегидрогеназной активности мышц соответствуют результатам наших опытов по определению гликолиза. В мышце южной популяции *M. oesopotus* при экстремальном охлаждении мы наблюдали подавление аэробного гликолиза и подавление лактатдегидрогеназной активности (см. рис. 3, а; 4, а и табл. 17 и 20). В мышце северной популяции, которую можно, по-видимому, рассматривать как более адаптированную к холоду форму, эти изменения исчезали. На охлаждение она не реагировала подавлением лактатдегидрогеназы, и скорость аэробного гликолиза также не изменялась.

Обнаруженные нами отклонения по изученным тестам от обычной, свойственной виду, биохимической реакции на охлаждение подтверждаются результатами работ по изучению обмена в условиях акклимации к низким температурам. Известно, что изменения, возникшие при быстрой холодовой адаптации в скорости свободного окисления, например, исчезают по мере акклимации к низким температурам (Papagos и др., 1958; Papagos, Beyer, 1960; Hannon, 1958; 1959; Hannon, Vaughen, 1960; Masoro, Felts, 1959; Patkin, Masoro, 1960; Скулачев, 1962).

Лактатдегидрогеназа представлена в организме в виде изоферментных форм (Atkinson, 1966). Именно благодаря этой особенности многие исследователи отводят ей особое место в механизме адаптации к низким температурам (Hochachka, Hayes, 1962; Hochachka, Somero, 1968). Повышенная устойчивость менее подвижных изоэнзимных фракций лактатдегидрогеназы (ЛДГ=5 и ЛДГ=4) по отношению к увеличенным концентрациям продуктов анаэробного обмена (пирувата, лактата) в условиях проведения опыта *in vitro* при нефизиологических, пониженных, температурах дает основание рассматривать изоэнзимные формы лактатдегидрогеназы как индикаторы сдвигов в энергетическом обмене в сторону анаэробного метаболизма (Elliot, Peter, 1966).

Изучение устойчивости лактатдегидрогеназы к повышенным температурам у близких внутривидовых форм дает неоднозначные результаты: в одних случаях северные формы обладают менее устойчивыми к нагреванию лактатдегидрогеназами, в других — разницу между северной и южной формами по данному тесту не обнаруживают (Виноградова, 1970).

В первой серии наших опытов не изучался изоэнзимный спектр лактатдегидрогеназы, но в качестве объекта исследования были взяты скелетная и сердечная мышцы *M. oesopotus*. По мнению некоторых исследователей, общая активность лактатдегидрогеназы скелетных мышц связана с преобладанием в данном органе ЛДГ-5 и ЛДГ-4, а в сердечной — ЛДГ-1 (Elliot, 1964; Jacobson и др., 1969).

Коэффициенты регрессии показывают, что контрольные животные северных и южных популяций *M. oesopotus* не отличаются друг от друга по лактатдегидрогеназе сердца и скелетной мускулатуры (см. табл. 29). Это соответствует отсутствию разницы по термостабильности данного фермента, а следовательно, и по изоэнзимному спектру между северными и южными родственными формами.

Этот вывод нашел подтверждение во второй серии опытов, где при изучении непосредственно активности пяти изоэнзимов лактатдегидрогеназы в тех же вариантах охлаждения (в норме и в условиях от 18 до -15°C) не было обнаружено достоверных различий в изоэнзимном спектре данного фермента ($b_1 < t\{b_i\}$) между северным и южным подвидом неохлажденных животных.

Лактатдегидрогеназа животных, подвергнутых охлаждению, в наших опытах изменяется соответственно внутривидовым отношениям, аналогично имеющимся в литературе случаям различий по термостабильности лактатдегидрогеназы у южных и северных популяций.

Так, при экстремальном охлаждении северная популяция более устойчива по лактатдегидрогеназе, а в условиях мягкого охлаждения различия между южной и северной формами усиливаются и переходят от количественных к качественным — меняется направленность сдвигов.

К интересным предположениям приводит сравнительный совместный анализ данных по изменениям в гликолизе и лактатдегидрогеназной активности в опытах с предварительной акклимацией и экстремальным охлаждением (см. рис. 3 и 4).

Коэффициент $Q_{\text{лактат}}^a / Q_{\text{лактат}}^b$ в этом варианте в скелетной мышце обеих популяций увеличивается, подавляется аэробный гликолиз и усиливается анаэробный. Общая лактатдегидрогеназная активность усиливается.

Такое сочетание изменений указывает на активацию в лактатдегидрогеназе изоэнзима ЛДГ-5, характерного для анаэробного обмена, и подавление ЛДГ-1, катализирующего образование молочной кислоты в аэробных условиях.

Это предположение подтверждается результатами второй серии опытов, где во всех вариантах охлаждения происходили достоверные изменения в активности аэробных и анаэробных изоэнзимов (см. табл. 24). Для южной полевки-экономки характерны не только изменения по типу активации анаэробного и инактивации аэробного гликолиза. В некоторых вариантах охлаждения наблюдается в мышцах южного подвида увеличение интенсивности аэробных путей обмена (H/M увеличивается). Для северного подвида животных (см. рис. 6) типичны сдвиги в сторону активации анаэробных изоэнзимов (H/M снижается).

По-видимому, изменения в активности изоэнзимов у южного подвида, как правило, сопровождаются явным сдвигом в общей активности фермента. У северной формы не всегда адаптация к холоду, по нашим данным, связана с изменениями и общей активности катализатора, и активности его отдельных изоэнзимов. В некоторых вариантах охлаждения (см. рис. 6) северная полевка-экономка увеличивает активность анаэробной лактатдегидрогеназы, снижая активность аэробной и не изменяя существенным образом активность фермента в целом. По-видимому, для северного подвида *M. oesonotus* в большей степени характерна адаптация по линии изменения обмена на молекулярном уровне.

Возможно, что многозначность реакций по лактатдегидрогеназе на уровне подвида в норме и охлаждении связана с наклоном данного фермента к фенотипическим изменениям. Известно, что именно лактатдегидрогеназа в паре с глицерофосфатдегидрогеназой, так же как дегидрогеназа изолимонной кислоты, глутамикодегидрогеназа и митохондриальная глицерофосфатдегидрогеназа, составляют группы, где в соответствии с функциональной нагрузкой органа и условиями среды резко меняются не только абсолютная активность ферментов, но и соотношения в их активностях от вида к виду, от одного гомологичного органа к другому (Bücher, Pette, 1961).

Отсутствие достоверных сдвигов в содержании молочной кислоты в условиях опыта *in vivo* (см. табл. 26), по-видимому, связано с тем, что процессы усиленного образования лактата при охлаждении сочетаются с усилением процессов его окисления (активирование $Q_{\text{лактат}}^a$, $Q_{\text{лактат}}^b$, $ТТХ_a/(ТТХ_b)$, и напротив, ослабление у северных форм (или, точнее, исчезновение) сдвигов в сторону увеличения интенсивности анаэробного метаболизма сопровождается подавлением оксидаз.

Вероятно, представляют интерес обнаруженные в настоящем исследовании различия между северными и южными формами полевки по исходному уровню аэробного эндогенного метаболизма в гомогенатах скелетных мышц и чувствительности его к тироксину. Результаты опытов, поставленных на животных разных поколений (см. табл. 10, 11, 14 и 15), показывают, что

для северных полевок характерен повышенный уровень активности оксидаз и пониженная чувствительность к действию гормона. Для южного подвида *M. oesonotus* характерен пониженный уровень активности эндогенных оксидаз и повышенная чувствительность к тироксину.

Таким образом, внутри вида *M. oesonotus* обнаружена явная биохимическая дифференциация, которая, по-видимому, идет по линии замены менее эффективных, связанных с интенсификацией обмена, приспособлений на более эффективные, в меньшей степени связанные с этой интенсификацией (активация в ответ на охлаждение оксидаз, анаэробного гликолиза, общей активности лактатдегидрогеназы и отсутствие активации у северных форм в отдельных изученных вариантах охлаждения, где сохраняются, по нашим данным, изменения по линии свойств ферментов, связанные с молекулярной структурой их белка — активность изоэнзимов, чувствительность к гормональному воздействию).

Методическая особенность настоящей работы — использование одного плана при изучении на одном объекте нескольких биохимических показателей.

Необходимым условием регрессионного анализа является обязательность самостоятельности и независимости друг от друга тех переменных, которые в эксперименте используются как аргументы (действующие факторы или независимые переменные). В процессе изучения биохимических механизмов адаптации к низким температурам, казалось бы, самым перспективным было исследование, в котором в качестве функции, или выходного параметра, принимается степень адаптации к охлаждению (изменение ректальной температуры), а в качестве аргументов — различные многочисленные биохимические показатели (скорость гликолиза, интенсивность эндогенного метаболизма, активность ферментов, содержание метаболитов). Но все эти тесты взаимосвязаны, поскольку служат внешним проявлением изменений в обмене веществ целого организма. Поэтому план, где исследуется влияние отдельных сторон метаболизма непосредственно на степень адаптации к охлаждению, нереален. Практический интерес для исследования представляет план, где в качестве аргументов, т. е. независимых переменных, используются разные по абсолютной величине и продолжительности действия температуры и в качестве функции, или выходного параметра, определяются различные биохимические показатели.

В настоящем исследовании за независимые переменные были взяты действительно независимые, полностью самостоятельные факторы: принадлежность животного к подвиду, 9-дневная акклимация к температуре от 0 до +3°С (или от 0 до +1°) и кратковременное охлаждение при —15°С.

В качестве выходного параметра в каждом отдельном случае (см. табл. 10—28) использовали тесты, характеризующие один биохимический процесс с разных сторон. Так, интенсив-

ность гликолиза изучали по общему показателю — скорости гликолиза (*in vitro*), накоплению лактата в тканях (скорость гликолиза *in vivo*), по активности одного из ферментов гликолиза — лактатдегидрогеназы и по активности изоэнзимов данного фермента.

Следовательно, комплекс исследуемых показателей характеризует гликолический процесс на уровне ткани (скорость гликолиза в гиалоплазме) на уровне целого организма (накопление в тканях лактата) и на уровне молекулярном (изучение изоэнзимов, изменений в структуре апофермента).

Использование планирования по типу ПФЭ 2³ значительно сократило объем трудоемких работ, связанных с биохимическим определением указанных показателей.

Так, достоверные результаты с точностью, равной $s^2\{y\}/16$, максимум $s^2\{y\}/24$, были получены по каждому тесту на 16, максимум 24 животных. При этом представлена научная информация по влиянию не только трех факторов, но и их взаимодействий, что очень важно для достижения основной цели: обнаружения признаков биохимической дифференциации внутри исследованного вида полевки-экономки.

В условиях решения тех же задач с помощью пассивного, классического, эксперимента с той же степенью точности $s^2\{y\}/16$ или $s^2\{y\}/24$ необходимо было бы в каждом из восьми вариантов (см. табл. 10—28) вместо двух-трех животных использовать не менее восьми. Таким образом, классический эксперимент для решения тех же вопросов обнаружения признаков внутривидовой биохимической дифференциации потребовал бы проведения определений по каждому из тестов на 64 или 96 животных.

Следовательно, объем труда за счет применения одного из простейших методов планирования эксперимента в данной работе оказался уменьшенным более чем в 4 раза, а расчет коэффициентов регрессии для взаимодействий b_{12} , b_{13} , b_{123} позволил получить четкий ответ на вопрос о существовании достоверных различий при охлаждении между южной и северной экономками. Возможность получения результатов в виде свернутой информации (см. табл. 29) позволяет в свою очередь получить отчетливое представление об особенностях адаптации к низким температурам у каждого из подвидов, наметить дальнейшие пути изучения экологических механизмов образования субарктических и арктических форм.

ПРИМЕНЕНИЕ ПЛАНА ЛАТИНСКОГО КВАДРАТА ПРИ ИЗУЧЕНИИ БИОХИМИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ ЧИСЛЕННОСТИ В ПОПУЛЯЦИЯХ

При изучении продуктов жизнедеятельности личинок амфибий в процессе их развития в условиях повышенной плотности (Шварц, Пястолова, 1970а, б) обнаружено, что данные мета-

болиты являются не только ингибиторами по отношению к родственным формам, но обладают более сложным и разнообразным действием.

В то время как метаболиты головастика поздних стадий развития тормозят рост генетически близких мелких особей, мелкие головастики не изменяют или ускоряют рост крупных, те и другие метаболиты оказывают стимулирующее действие на скорость регенерации в области хвостового плавника у головастика своей и чужой кладки на 27-й стадии развития.

С. С. Шварц и О. А. Пястолова (1970а, б) на основании этих данных делают вывод об образовании в процессе развития личинок земноводных особых регуляторов развития и дают экологическую интерпретацию полученных результатов. Обнаруженные закономерности в отношениях между родственными формами на разных стадиях развития они рассматривают как проявление популяционных механизмов регуляции, которые обеспечивают завершение метаморфоза головастика при ухудшении условий существования, одновременно повышая биологическую разнородность популяции.

Вопрос о физиологической интерпретации полученных данных остается открытым.

Коэффициент $ТТХ_a/ТТХ_b$, т. е. одновременное определение тетразолвосстанавливающей активности в гомогенатах тканей в атмосфере аргона и в атмосфере воздуха, был использован нами для изучения сдвигов в аэробном и анаэробном эндогенном метаболизме в условиях действия различных экологических факторов (Рункова, Завада, 1971; Рункова, Завада, Купцова, 1974) и оказался высокочувствительным биохимическим тестом к этим воздействиям.

Широкое использование солей тетразолия в биологических экспериментах с целью изучения функциональной активности тканей, микроорганизмов, биологических препаратов (Huddleston, Baltzer, 1950; Drimmelen, 1955; Gastambide, Smith, 1958; Hirsch и др., 1958; Кушнарев, Благовещенский, 1961; Gupta, Kambo, 1962; Gersiman, 1962; Monis, Beback, 1962; Morrison, Kronheim, 1962) и универсальность реакции восстановления солей тетразолия по отношению к разнообразным объектам биологических исследований дают основание применить коэффициент $ТТХ_a/ТТХ_b$ при изучении описанных выше популяционных механизмов регуляции (Рункова, 1974).

В связи с тем, что соли тетразолия применяют в первую очередь как акцептор водорода при определении активности дегидрогеназ, а кислород воздуха ингибирует реакцию, отвлекая на себя часть водорода, отщепляемого при окислении, с помощью оксидазных ферментных систем, в настоящей работе коэффициент $ТТХ_a/ТТХ_b$ рассматривается как показатель степени ингибирования реакции восстановления тетразола оксидазами, т. е. как косвенный показатель аэробного метаболизма.

В данном исследовании представлены результаты двух серий опытов. В первой серии (32 головастика) эндогенный метаболизм изучали в гомогенатах *Rana macrocnemis* 26-й стадии развития и испытывали влияние 0,6 мл «воды скоплений» от модельной популяции того же вида в различные периоды личиночного развития. Опыт ставили по методу пассивного эксперимента.

Параллельно с изучением влияния «воды скоплений» и ее фракций на эндогенный метаболизм головастика 26-й стадии развития изучали влияние тех же проб на скорость регенерации в области хвостового плавника у головастика 27-й стадии развития на описанной ранее методике (Шварц, Пястолова, 1970б).

Во второй серии (384 головастика) эндогенный метаболизм изучали в гомогенатах головастика *R. macrocnemis* четырех разных стадий развития и испытывали влияние разных объемов «воды скоплений» от модельных популяций четырех видов земноводных: *R. camerani*, *R. macrocnemis*, *R. arvalis*, *R. temporaria*. Опыты ставили по плану латинского квадрата. Гомогенаты в обеих сериях готовили из 7—8 головастика на 0,05 М трисбуфере, дополнительно вводя по 0,001 М $MgSO_4$ и по 0,1 М KCl (рН 7,4). Содержание ткани в гомогенатах 20 мг/мл. Головастики гомогенизировались целиком. Все стадии приготовления гомогената до момента инкубации пробы проводили на холоде (от 0 до +2°С). Тетразолвосстанавливающую активность гомогената определяли спектрофотометрическим методом после последовательной экстракции формазона ацетоном, толуолом и бутанолом. Дисперсионный анализ данных второй серии выполнен по стандартной методике (Налимов, 1960; Маркова, 1968).

Результаты первой серии опытов представлены в табл. 30. Анализ этих данных показывает, что «вода скоплений» из загущенных популяций головастика *R. macrocnemis* активирует эндогенный метаболизм головастика своего вида (тетразолвосстанавливающая активность гомогенатов при инкубации их в атмосфере аргона в присутствии метаболитов увеличивается, и одновременно увеличивается степень ингибирования реакции восстановления ТТХ кислородом воздуха).

Увеличение в скорости регенерации наблюдалось только в тех пробах, которые оказывали активизирующее влияние на эндогенный аэробный и анаэробный метаболизм в гомогенатах.

Эффект активации в гомогенатах уменьшается по мере «старения» проб. Модельная популяция в первой серии опытов была сформирована 21 апреля. «Вода скоплений» через 47 дней с момента формирования популяций обладает значительным

* Работы по определению скорости регенерации выполнены под руководством О. А. Пястоловой.

Таблица 30

Результаты сравнительного изучения влияния метаболитов головастика *R. macrocnemis* на эндогенный метаболизм и скорость регенерации головастика того же вида (первая серия)

№ варианта*	Дата	Метаболиты	Тетразолвосстанавливающая активность гомогената, е/мл, в атмосфере*		ТТХ _а ТТХ _в	Активация скорости регенерации
			аргона	воздуха		
1	6/VI	Контроль (без введения метаболитов)	0,275	0,070	3,92	—
		«Вода скоплений»	0,680	0,041	16,50	+
		«Вода скоплений»**	0,236	0,030	7,86	+
2	13/VI	Контроль	0,272	0,070	3,80	—
		«Вода скоплений»	0,593	0,068	8,70	+
3	15/VI	То же	1,090	0,185	5,90	+
4	20/VI	»	0,332	0,227	1,04	—

* В каждом варианте число наблюдений равно 3.

** «Вода скоплений» взята непосредственно из аквариума, где испытывалось ее влияние на скорость регенерации.

активизирующим эффектом (ТТХ_а/ТТХ_в от 3,9 в контроле увеличивается до 16,5 в опыте). Через 52 дня коэффициент увеличивается до 8,7, через 54 дня — до 5,9, через два месяца тот же объем в 0,6 мл «воды скоплений» не оказывает активизирующего влияния ни на эндогенный метаболизм гомогенатов, ни на скорость регенерации у головастика 27-й стадии развития.

Обнаруженная закономерность уменьшения эффекта активации эндогенного метаболизма и скорости регенерации может, по-видимому, объясняться двумя предположениями: либо образующееся в процессе метаморфоза активное начало постепенно разрушается и его концентрация на последних стадиях уменьшена, в силу чего и эффект влияния ослабевает и исчезает полностью, либо направленность влияния метаболитов в процессе метаморфоза зависит от возраста особей в популяции и эффект активации ослабевает, поскольку объект изучения стареет.

Предположение о зависимости направленности влияния метаболитов от стадии развития животного, его таксономического положения и концентрации метаболитов находит подтверждение в результатах второй серии опытов, где все перечисленные факторы, благодаря использованию математического метода планирования, количественно учтены (табл. 31, 32).

Сравнение абсолютных величин отношений дисперсий по каждому фактору (табл. 33) с использованием и остаточной дисперсии F_1 и дисперсии воспроизводимости результатов

Таблица 31

Независимые переменные и их уровни в опытах по изучению влияния метаболитов головастиков *R. macrocnemis* (вторая серия)

Уровень	Независимые переменные		
	Объем «воды скоплений» (концентрация метаболитов) V, мл	Вид земноводных, чьи метаболиты испытывали T	Стадия развития головастиков, из которых готовили гомогенаты
Первый	0,0	<i>R. camerani</i> (1)	До 26-й стадии (A)
Второй	0,6	<i>R. macrocnemis</i> (2)	26-я стадия (B)
Третий	1,2	<i>R. arvalis</i> (3)	28-я стадия (C)
Четвертый	1,8	<i>R. temporaria</i> (4)	29-я стадия (D)

Таблица 32

Влияние метаболитов разных видов земноводных на эндогенный метаболизм головастиков *R. macrocnemis* в зависимости от стадии их развития и концентрации метаболитов

Концентрация метаболитов V, мл	Вид земноводных T			
	1	2	3	4
0,0	$\bar{y}_1 = 3,00$ A	$\bar{y}_2 = 1,6$ B	$\bar{y}_3 = 2,3$ C	$\bar{y}_4 = 1,6$ D
0,6	$\bar{y}_5 = 2,2$ D	$\bar{y}_6 = 4,5$ A	$\bar{y}_7 = 2,9$ B	$\bar{y}_8 = 3,5$ C
1,2	$\bar{y}_9 = 2,6$ C	$\bar{y}_{10} = 1,7$ D	$\bar{y}_{11} = 2,7$ A	$\bar{y}_{12} = 4,2$ B
1,8	$\bar{y}_{13} = 4,0$ B	$\bar{y}_{14} = 10,1$ C	$\bar{y}_{15} = 6,0$ D	$\bar{y}_{16} = 3,9$ A

Примечание. Эксперимент по данному плану ставился трижды. Результаты вариантов обобщены в виде средней величины \bar{y} .

Таблица 33

Дисперсионный анализ результатов (см. табл. 32)

Рассеяние	s	f	s ²	F		F _{0,05}
				F ₁	F ₂	
По фактору V	34,68	3,0	11,56	1,52	14,3	4,76
По фактору T	51,30	3	17,10	2,25	16,9	4,76
По стадиям	70,10	3	23,36	3,89	21,1	4,76
Остаточное	45,56	6	7,59	—	—	—

Примечание. s²(\bar{y}) = 1,01.

F₂ показывает, что исследуемый в опыте уровень эндогенного метаболизма отдельных особей в популяции зависит от стадии развития этих особей (F₁=3,89 и F₂=23,1), видовой принадлежности доноров «воды скоплений» (F₁=2,25 и F₂=16,9) и концентрации метаболитов (F₁=1,52 и F₂=14,3).

Большая величина остаточной дисперсии во второй серии опытов (см. табл. 33) в сравнении с ошибкой единичного значения показателя эндогенного метаболизма⁵ указывает на наличие взаимодействий в системе. Эффект влияния «воды скоплений» на эндогенный метаболизм особей в популяции, по-видимому, определяется не только концентрацией метаболитов, но и таксономическим положением донора и стадией развития реципиента, т. е. видо- и стадиоспецифичен. Продукты жизнедеятельности личинок являются химическими компонентами среды, которая регулирует скорость роста и развития личинок, характеризует популяционные процессы, и одновременно определяет интенсивность эндогенного метаболизма особей в популяции.

Методическая особенность настоящей работы — в нестандартном использовании латинского квадрата. Латинским квадратом n×n называется квадратная таблица из элементов (букв или чисел), в которой каждый из этих элементов встречается один раз в каждой строке и в каждом столбце (Маркова, 1971).

При планировании эксперимента строки и столбцы квадрата употребляются для обозначений уровней двух факторов, которые образуют факторный эксперимент типа n².

Нами изучалось влияние трех факторов на четырех уровнях (см. табл. 31, 32). Два фактора (вид личинок земноводных и концентрация метаболитов) образуют в нашем плане факторный эксперимент типа 4². Четыре уровня источника неоднородности (стадии развития) расположены по схеме латинского диагонального квадрата (одна из букв находится на диагонали).

Существует структурная связь между латинскими квадратами и факторными экспериментами. Латинские квадраты эквивалентны регулярным дробным репликам от факторного эксперимента типа n^k (Маркова, 1971). В связи с этим латинские квадраты, в которых все факторы имеют одинаковое число уровней, обладают рядом хороших статистических свойств: они симметричны, ортогональны и D-оптимальны (Финни, 1970).

⁵ s²(\bar{y}) рассчитывали по данным 16 вариантов латинского квадрата (см. табл. 32), используя формулы (Налимов, 1960):

$$s^2(\bar{y}) = \frac{\sum_{u=1}^{16} \sum_{j=1}^{16} y_{uj}^2 - \sum_{u=1}^{16} \frac{y_u^2}{3}}{\sum_{u=1}^{16} n_u - 16}; \quad s^2(\bar{y}) = \frac{s^2(y)}{3}$$

Считается, что планирование по типу латинского квадрата — один из удобных практических способов исключения в эксперименте влияния источников неоднородностей (Налимов, 1960; Шеффе, 1963). Е. В. Маркова (1971) отмечает, что латинские планы могут оказаться чрезвычайно полезными на первых этапах исследования, как способ сокращения перебора вариантов, и следовательно, как способ минимизации числа опытов.

Необходимым условием практического использования латинского квадрата в качестве плана считалось полное отсутствие влияния взаимодействий (Шеффе, 1963). Однако появляются работы, в которых указывается на возможность применения планирования по типу латинского квадрата в условиях дополнительной гипотезы о незначимости не всех, а только некоторых взаимодействий (Wipperfurth, 1962; Маркова, 1971).

При изучении влияния «воды скоплений» личинок земноводных в условиях повышенной плотности на эндогенный метаболизм каждой особи в популяции (см. табл. 30) у нас возникла необходимость исключить такой явный источник неоднородностей, как стадия развития. В связи с этим продолжение исследования потребовало применения латинского квадрата, где в качестве фактора, введенного в план в виде латинских букв (А, В, С и D), повторяющихся в каждом столбце и каждой строке, был взят мешающий нам фактор неоднородности — стадии развития головастика. Использование латинского квадрата типа 4·4 позволило значительно сократить объем исследований. Постановка эксперимента классическим пассивным методом по изучению влияния трех факторов на четырех уровнях потребовала бы проведения минимум 192 опытов (на гомогенатах четырех видов головастика четырех разных стадий развития с введением трех разных концентраций метаболитов, включая четыре контроля и минимум три параллельных определения в каждом варианте). Применение плана латинского квадрата ограничилось постановкой лишь 48 опытов (см. табл. 33).

В процессе дисперсионного анализа данных было обнаружено наличие взаимодействий. Следовательно, латинский квадрат использован нами не только для изучения влияния метаболитов в условиях нестандартности объекта (стадийность реципиента), но и в условиях, когда на основной эффект влияет в свою очередь одновременное действие на объект других, посторонних, факторов (вид и стадия развития).

Точность в определении значимости влияния отдельных факторов в опытах составляет, как оказалось, величину, равную $s^2(y)/48$. Получение данных с аналогичной точностью в условиях пассивного эксперимента потребовало бы постановки в каждом из 64 вариантов по 24 опыта (1536 определений).

Следовательно, использование латинского квадрата типа 4·4 при изучении биохимических механизмов регуляции численности в популяции на данном этапе сократило общий объем ра-

боты более чем в 30 раз. Была получена ценная информация не только о влиянии «воды скоплений» на эндогенный метаболизм, но и о зависимости этого влияния от вида и стадии развития донора и реципиента.

ПАССИВНЫЙ И АКТИВНЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТ ПРИ ИЗУЧЕНИИ РОЛИ БЕЛКА В РЕГУЛИРУЮЩЕМ ДЕЙСТВИИ МЕТАБОЛИТОВ

В процессе изучения химической природы метаболитов, которые, выделяясь в воду личинками земноводных, регулируют их рост и развитие, были обнаружены белки и определен их аминокислотный состав (Степанова, 1974). Представляло интерес выяснить отношение данных белков к регулируемому влиянию метаболитов. Обнаруженные ранее (Шварц, Пястолова, 1970а, б; Рункова, 1974) стадийно- и видоспецифичность в действии метаболитов земноводных предполагают специфичность на уровне отдельных органов.

В настоящем разделе представлены результаты изучения стадийно-, видо- и органоспецифичности в действии «цельной воды скоплений» и некоторых белковых фракций этой воды на эндогенный метаболизм отдельных особей в популяции (Рункова, Степанова, Ковальчук, 1974).

Материал и методика

Опыты поставлены на головастиках *Pelobates fuscus*, *Rana arvalis*, *R. camerani* и *R. macrocnemis*, взятых на 26-й и 28-й стадиях развития из модельных популяций повышенной плотности (40 штук в 4 л).

Интенсивность эндогенного метаболизма определяли в гомогенатах и по чувствительности тетразоловой реакции к кислороду воздуха (Рункова, Завада, 1971). Интенсивность восстановления тетразолхлорида при инкубации гомогенатов в атмосфере аргона и воздуха находили спектрофотометрическим методом после последовательной экстракции формаза на ацетоном, толуолом и бутанолом. Данные по интенсивности эндогенного метаболизма представлены в виде коэффициента $ТТХ_а/ТТХ_в$.

Исследованные белковые фракции «воды скоплений» получены гельфильтрацией на сефадексе Г-25. Поставлено 10 серий опытов: вторая — по схеме пассивного эксперимента, остальные — по плану полного факторного эксперимента типа 2² или 2³ (Налимов, Чернова, 1965; Максимов, Федоров, 1969). Статистическая обработка результатов выполнена в соответствии с использованными планами.

Результаты и их обсуждение

В первой серии опытов (табл. 34) исследовали влияние «цельной воды скоплений» из загущенных популяций головастиков *P. fuscus* на эндогенный метаболизм гомогенатов, приготовленных из задних конечностей, печени, и хвоста. Регрессионный анализ показал, что «вода скоплений» неодинаково влияет на эндогенный метаболизм различных органов головастика ($b_{12} > ts\{b_i\}$). Эндогенная активность оксидаз в гомогенатах задних конечностей реагирует на введение метаболитов достоверным повышением, в то время как по отношению к гомогенатам печени и хвоста те же метаболиты являются ингибиторами.

Во второй серии опытов (табл. 35) «воду скоплений» из загущенной популяции головастиков *P. fuscus* вводили в гомогенат головастика того же вида 26-й стадии развития. Параллельно эндогенный метаболизм определяли в гомогенатах

Таблица 34

Влияние метаболитов из загущенной популяции личинок *P. fuscus* на эндогенный метаболизм в зависимости от происхождения гомогената органа

Уровень	Независимые переменные			
	Объем «воды скоплений», мл \bar{x}_1	Органы \bar{x}_2	Объем «воды скоплений», мл \bar{x}_1	Органы \bar{x}_2
Верхний (+)	1,2	Задние конечности	1,2	Задние конечности
Нижний (-)	0,0	Хвост	0,0	Печень

№ варианта	Кодированные независимые переменные		ТТХ ₃ /ТТХ _В						
	x_1	x_2	y_1	y_2	\bar{y}	y_1	y_2	\bar{y}	\hat{y}
			1-я серия			2-я серия			
1	-	-	1,00	1,00	1,00	1,73	1,25	1,49	1,45
2	+	-	1,14	0,13	0,13	0,29	0,14	0,21	0,21
3	-	+	0,19	0,22	0,20	0,19	0,22	0,20	0,21
4	+	+	1,46	1,36	1,41	1,46	1,36	1,41	1,45

Примечание. Статистические показатели: $b_0=0,68$; $b_1=0,08$; $b_2=0,12$; $b_{12}=0,52$; $s^2\{y\}=0,0007$; $ts\{b_i\}=0,032$; $y=0,68+0,08x_1+0,12x_2+0,52x_1x_2$ (1-я серия); $b_0=0,83$; $b_1=-0,02$; $b_2=-0,025$; $b_{12}=0,62$; $s^2\{y\}=0,016$; $ts\{b_i\}=0,19$; $y=0,83+0,62x_1x_2$ (2-я серия); $s^2_{ад}=0,002 < F_{s^2}\{y\}=0,11$ (2-я серия).

Эндогенный метаболизм головастика *R. arvalis* (26-я стадия развития) в присутствии безбелковой и цельной «воды скоплений» из загущенной популяции головастика того же вида

Гомогенат	Тетразольвосстанавливающая активность гомогената в атмосфере				№ опыта	ТТХ ₃ /ТТХ _В	Достоверность
	№ опыта	аргона $\bar{x} \pm m$	№ опыта	воздуха $\bar{x} \pm m$			
3-я серия							
Дистиллированная вода . . .	1	0,267 ± ±0,024	4	0,052 ± ±0,007	7	5,17 ± ±0,68	$t_{12}=1,17$ $t_{13}=1,29$
«Вода скоплений»	2	0,247 ± ±0,002	5	0,025 ± ±0,003	8	10,17 ± ±2,8	$t_{45}=9,0$ $t_{46}=2,33$
«Вода скоплений», обработанная трипсином	3	0,250 ± ±0,016	6	0,045 ± ±0,003	9	5,6 ± 0,46	$t_{78}=3,87$ $t_{79}=1,16$

Примечание. В каждом варианте число наблюдений равно 5.

с дистиллированной водой и «водой скоплений», где предварительно белок разрушался трипсином (1 мг кристаллического фермента добавляли на 500 мл воды, которую инкубировали в течение 24 ч при 25° С). Статистический анализ результатов показывает, что в данной серии «вода скоплений» активировала эндогенный метаболизм отдельной особи, но обнаруженный активирующий эффект исчезал после разрушения белка трипсином. В табл. 36 представлены результаты серий, в которых исследовали влияние некоторых белковых фракций «воды скоплений» из загущенной популяции головастика *R. arvalis*. Параллельно в этих опытах ставили тесты на видоспецифичность в действии полученных фракций, изучали влияние белков «воды скоплений» на эндогенный метаболизм отдельных головастика в зависимости от таксономического положения. Регрессионный анализ данных в сериях 4—8 показал, что из трех изученных нами белковых фракций оказывают достоверное влияние на эндогенный метаболизм особей в популяции две фракции и направленность этого влияния достоверно зависит от генетической близости донора и реципиента. По отношению к особям своего вида (*R. arvalis*) в данный период метаморфоза выделенные белки являются ингибиторами, по отношению к особям чужого вида (*R. camerani* и *R. macrocnemis*) — активаторами ($b_{12} > ts\{b_i\}$).

Таблица 36

Влияние белка «воды скоплений» (мол. вес > 5000) из загущенной популяции головастиков на их эндогенный метаболизм в зависимости от степени генетического родства донора и реципиента

Уровень	Независимые переменные											
	Белковая фракция (из «воды скоплений» головастиков), мА x_1	Вид головастиков, чьи гомогенаты исследовались x_2	Белковая фракция (из «воды скоплений» головастиков), мА x_1	Вид головастиков, чьи гомогенаты исследовались x_2	TTX _a /TTX _B							
Верхний (+) Нижний (-)	1,2 0,0	<i>Rana arvalis</i> <i>R. cameroni</i>	1,2 0,0	<i>R. arvalis</i> <i>R. macrocnemis</i>	x_1	x_2	y_1	y_2	y_3	\bar{y}	\wedge_y	
	4-я серия					5-я серия						
1	-	-	4,1	4,5	4,0	4,2	4,65	2,1	1,7	1,9	1,9	1,9
2	+	-	7,2	6,1	-	6,6	6,19	11,6	7,0	11,3	10,0	10,0
3	-	+	5,8	3,6	3,6	4,3	4,75	5,8	3,6	3,6	4,3	4,3
4	+	+	2,7	4,0	4,0	3,6	3,21	2,7	4,0	4,0	3,6	3,6
	6-я серия					7-я серия						
1	-	-	3,0	4,0	3,5	3,5	3,70	1,7	1,9	1,7	1,76	1,76
2	+	-	6,7	6,7	-	6,7	6,44	8,7	9,3	7,4	8,4	8,4
3	-	+	4,0	6,5	4,8	5,1	5,30	4,0	6,5	4,8	5,1	5,1
4	+	+	2,6	3,1	2,7	2,8	2,56	3,1	2,7	2,6	2,8	2,8
	8-я серия											
1	-	-	1,7	2,1	1,9	1,9	1,80					
2	+	-	1,7	1,7	-	1,7	1,80					
3	-	+	5,8	3,6	3,6	4,3	4,14					
4	+	+	3,8	3,8	4,5	4,0	4,14					

Примечание. Статистические показатели (4-8-я серии):
 $b_0 = 4,7$; $b_1 = 0,42$; $b_2 = -0,72$; $b_{12} = -0,77$; $s^2(\bar{y}) = 0,24$; $t_s(b_1) = 0,59$
 $b_0 = 4,95$; $b_1 = 1,85$; $b_2 = -1,0$; $b_{12} = -2,20$; $s^2(\bar{y}) = 0,74$; $t_s(b_1) = 0,99$
 $b_0 = 4,5$; $b_1 = 0,22$; $b_2 = -0,57$; $b_{12} = -1,37$; $s^2(\bar{y}) = 0,189$; $t_s(b_1) = 0,52$
 $b_0 = 4,51$; $b_1 = 1,08$; $b_2 = -0,56$; $b_{12} = -2,23$; $s^2(\bar{y}) = 0,67$; $t_s(b_1) = 0,54$
 $b_0 = 2,97$; $b_1 = -0,12$; $b_2 = 1,17$; $b_{12} = -0,02$; $s^2(\bar{y}) = 0,17$
 $y = 4,7 - 0,7x_1 - 0,77x_2$ (4-я серия); $y = 4,95 + 1,85x_1 - 1,0x_2 - 2,20x_1x_2$ (5-я серия);
 $y = 4,5 - 0,57x_2 - 1,37x_1x_2$ (6-я серия); $y = 4,5 - 0,56x_2 + 1,08x_1 - 2,23x_1x_2$ (7-я серия);
 $2,97 + 1,17x_2$ (8-я серия). $s_{ад}^2 = 0,73 < F_{s^2}(\bar{y}) = 1,34$ (4-я серия); $0,20 < F_{s^2}(\bar{y}) = 1,06$
(6-я серия); $0,03 < F_{s^2}(\bar{y}) = 0,95$ (8-я серия). Белковая фракция: в 4-й и 5-й сериях
-1, в 6-й и 7-й -2, в 8-й -3.

Таблица 37

Влияние белковых фракций «воды скоплений» из загущенной популяции головастиков на эндогенный метаболизм в зависимости от стадии развития и таксономического положения реципиента

Уровень	Независимые переменные												
	Белковая фракция 1, мА x_1	Стадия развития x_2	Вид x_3	Белковая фракция 2, мА x_1	Стадия развития x_2	Вид x_3							
Верхний (+) Нижний (-)	1,2 0,0	26 28	<i>Rana arvalis</i> <i>R. macrocnemis</i>	1,2 0,0	26 28	<i>R. arvalis</i> <i>R. macrocnemis</i>							
Кодированные независимые переменные	TTX _a /TTX _B												
	x_1	x_2	x_3	y_1	y_2	y_3	\bar{y}	\wedge_y	y_1	y_2	y_3	\bar{y}	\wedge_y
	9-я серия						10-я серия						
1	-	-	-	0,65	0,67	0,72	0,68	0,64	1,25	1,06	0,96	1,09	1,04
2	+	-	-	0,89	0,96	1,00	0,95	1,24	0,96	0,97	0,96	0,96	1,02
3	-	+	-	0,64	0,68	0,78	0,70	0,62	0,95	1,07	0,92	0,98	0,98
4	+	+	-	0,65	0,68	0,80	0,71	0,66	0,85	0,73	0,75	0,77	0,72
5	-	-	+	1,00	1,38	2,3	1,56	1,24	0,55	0,35	0,84	0,58	0,56
6	+	-	+	0,48	0,60	0,75	0,61	0,64	0,43	0,67	0,43	0,51	0,58
7	-	+	+	0,43	0,70	0,79	0,64	0,66	0,84	0,47	0,49	0,60	0,62
8	+	+	+	0,41	0,52	0,69	0,54	0,62	1,00	0,85	0,93	0,92	0,88

Примечание. Статистические показатели в 9 и 10-й сериях, соответственно:
 $b_0 = 0,79$; $0,80$; $b_1 = -0,09$; $-0,01$; $b_2 = -0,15$; $0,01$; $b_3 = -0,04$; $-0,14$; $b_{12} = 0,07$; $0,04$;
 $b_{13} = -0,16$; $0,07$; $b_{23} = -0,09$; $0,09$; $b_{123} = 0,14$; $0,06$; $S^2(\bar{y}) = 0,0226$; $0,007$. В 9-й серии
 $y = 0,79 - 0,15x_2 - 0,16x_1x_2 + 0,14x_1x_2x_3$; $s_{ад}^2 = 0,05 < F_{s^2}(\bar{y}) = 0,067$. в 10-й серии
 $y = 0,80 - 0,14x_2 + 0,07x_1x_2 + 0,09x_2x_3 + 0,06x_1x_2x_3$; $s_{ад}^2 = 0,05 < F_{s^2}(\bar{y}) = 0,022$.

Аналогичные результаты в отношении видоспецифичного действия тех же белковых фракций того же вида животных получены нами в 9 и 10-й сериях опытов (табл. 37). Было исследовано влияние белковых фракций 1 и 2 из загущенных популяций головастиков *R. arvalis* на эндогенный метаболизм головастиков своего вида и *R. macrocnemis*, взятых на разных стадиях развития. Значимость коэффициентов регрессии, характеризующих эффект тройного взаимодействия ($b_{123} > t_s\{b_i\}$), указывает на достоверную зависимость влияния исследованных белков на эндогенный метаболизм отдельных особей в популяции от стадии развития реципиента и его таксономического положения. В табл. 38 представлены результаты изучения влияния низкомолекулярной фракции «воды скоплений» (из

Таблица 38

Влияние белков и низкомолекулярных метаболитов «воды скоплений» из загущенных популяций *Pana fuscus* на эндогенный метаболизм головастика своего вида (28-я стадия развития), развивавшихся в условиях разной плотности

Уровень	Независимые переменные											
	Низкомолекулярная фракция, мл \hat{x}_1	Плотность популяций реципиента \hat{x}_2	Высокомолекулярная фракция, мл \hat{x}_1	Плотность популяций реципиента \hat{x}_2								
Верхний (+) Нижний (-)	1,2 0,0	Нормальная Повышенная	1,2 0,0	Нормальная Повышенная								
Кодированные независимые переменные	ТТХ _д /ТТХ _в											
№ варианта	x_1	x_2	y_1	y_2	y_3	\bar{y}	\hat{y}	y_1	y_2	y_3	\bar{y}	\hat{y}
1	-	-	0,87	0,90	1,08	0,95	1,00	0,87	0,90	1,08	0,95	0,88
2	+	-	0,25	0,82	1,17	1,08	1,12	4,63	4,09	3,39	4,04	3,84
3	-	+	0,67	0,78	0,94	0,80	0,76	0,67	0,78	0,94	0,80	0,88
4	+	+	1,45	1,34	1,47	1,42	1,36	2,57	5,13	3,22	3,64	3,84

Примечание. Статистические показатели в 11 и 12-й сериях, соответственно: $b_0=1,06$; $2,36$; $b_1=0,18$; $1,48$; $b_2=0,04$; $-0,14$; $b_{12}=0,12$; $-0,06$; $s^2(\bar{y})=0,09$; $0,50$; $t_s(b_i)=0,007$; $0,18$. В 11-й серии $y=1,06+0,18x_1+0,12x_2$; $s_{ад}^2=0,009 < F s^2(\bar{y})=0,037$, в 12-й серии $y=2,36+1,48x_1$; $s_{ад}^2=0,046 < F s^2(\bar{y})=0,97$.

загущенной популяции головастика) и высокомолекулярной фракции, которая содержит все белки этой воды, на эндогенный метаболизм головастика своего вида из популяций с нормальной и повышенной плотностью. Регрессионный анализ данных повторяет результаты опытов с трипсином (см. табл. 35). Белки исследованной «воды скоплений» (см. табл. 38) усиливают интенсивность эндогенного метаболизма в гомогенатах головастика своего вида, развивавшихся в условиях повышенной плотности (варианты 1 и 2, 12-я серия). Этот активирующий эффект исчезает, когда белки оказываются полностью удаленными из «воды» с помощью сефадекса (варианты 1 и 2, 11-я серия).

Таким образом, метаболиты, накапливающиеся в процессе развития головастика исследованных нами видов земноводных, обладают не только видо- и стадиейспецифичностью в отношении к эндогенному метаболизму отдельных особей в популяции, но и органоспецифичны.

Обнаруженное нами исчезновение активирующего эффекта метаболитов в присутствии трипсина, гидролизующего белки, и явное сходство в характере действия на эндогенный метаболизм (видо- и стадиейспецифичность) между «цельной водой скоплений» и некоторыми белковыми фракциями этой воды позволяют, по-видимому, предполагать о существовании причинно-следственной связи между накоплением белковых веществ в загущенных популяциях личинок земноводных и метаболическими механизмами регуляции численности в этих популяциях.

В методическом отношении представленные в данном разделе серии опытов аналогичны нашим исследованиям в области изучения адаптации полевок-экономок к низким температурам (см. предыдущий раздел). Здесь применены планы ПФЭ типа 2² (см. табл. 34, 36, 38) и 2³ (см. табл. 37) и обычная классическая методика пассивного эксперимента (см. табл. 35). Преимущества таких планов можно наглядно показать, подсчитав ошибку в определении соответствующих коэффициентов регрессии и число поставленных опытов.

Так, при изучении органоспецифичности и видоспецифичности в действии «цельной воды скоплений» и некоторых белковых фракций нами получена точность, равная $s^2\{y\}/4 \cdot 2$ (или $s^2\{y\}/4 \cdot 3$), и результаты рассчитаны по данным 8 или 12 опытов.

Фактически в этих сериях опытов ставили меньше, так как в планах каждой из таблиц, в которых использовали ПФЭ типа 2², часть вариантов повторяется (с метаболитами и без метаболитов на гомогенатах задних конечностей, с метаболитами и без них на гомогенатах *R. arvalis*). Таким образом, при изучении органоспецифичности в действии «воды скоплений» на эндогенный метаболизм особей в популяции было поставлено 12 опытов (вместо 16), а при изучении видоспецифичности — 18 опытов (вместо 24).

Для решения тех же вопросов с той же степенью точности методом пассивного эксперимента необходим значительно больший объем работы. Чтобы узнать, как действует одна концентрация метаболитов (1,2 мл) на метаболизм гомогенатов трех органов или одна концентрация белковой фракции на метаболизм головастика трех различных видов, необходимо поставить либо 24 опыта (при $s^2\{b_i\}=s^2\{y\}/8$), либо 36 опытов (при $s^2\{b_i\}=s^2\{y\}/12$).

Следовательно, применение одного из простейших методов активного планирования и при изучении специфики действия белков «воды скоплений» на метаболизм личинок земноводных позволило наполовину сократить объем исследований, сохранив высокую точность в определении соответствующих коэффициентов регрессии.

По-видимому, следует подчеркнуть, что на первом этапе

изучения популяционных механизмов регуляции в наших исследованиях целесообразным было применение латинского квадрата. Данный план позволил резко сократить число опытов (в 30 раз!) и выявить главное звено в цепи явлений — перво-степенную роль в метаболической регуляции эффекта взаимодействий. На втором этапе возникла необходимость перейти к изучению конкретных взаимодействий. Так как экспериментирование по плану латинского квадрата не позволяет получить количественную характеристику влияния каждого из действующих в системе взаимодействий, то нами были использованы другие планы — ПФЭ типа 2^2 и 2^3 .

Изменение в стратегии эксперимента понизило эффективность исследования (количество опытов уменьшено в сериях только наполовину, а не в 30 раз), но в результате получена более совершенная научная информация (рассчитаны эффекты взаимодействий и составлены уравнения, адекватно описывающие, хотя и в приближительном виде, метаболический механизм регуляции численности в популяциях головастиков изученных видов).

Проведение эксперимента одновременно по двум матрицам ПФЭ типа 2^2 с использованием в каждом из планов одних контролей позволило отказаться от менее «статистически выгодных» разноразмерных планов и решить с помощью ПФЭ типа 2^2 задачу, в которой один фактор (концентрация метаболита) находится на двух уровнях, а другой (органическое происхождение гомогената или таксономическое положение реципиента) — на трех.

ПОЛНЫЙ ФАКТОРНЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТ ТИПА 2^2 ПРИ БИОХИМИЧЕСКОМ ИЗУЧЕНИИ ДИНАМИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА ЖИВОТНЫХ

Исследование динамического полиморфизма животных обогащается все более разносторонним подходом к этому явлению, который выражается в применении разнообразных методов. Некоторые данные свидетельствуют, что даже незначительные изменения в условиях окружающей среды могут привести к серьезным перестройкам в организме, затрагивая глубинные биохимические связи на молекулярном уровне (Matheja, Gegeps, 1968). Поэтому определенный интерес представляет изучение фенотипических вариантов у некоторых видов животных с целью возможного выявления биохимической дифференциации популяций.

Нами проведено сравнительное изучение исходного уровня окислительно-восстановительных процессов и их чувствительности к тироксину в гомогенатах «полосатых» и «бесполосых» морф *Rana arvalis* и *Bradybaena schrencki* (Midd) (Ковальчук и др., в печати).

В качестве подопытных животных использованы сеголетки *R. arvalis*, полученные в лабораторных условиях от особей, доставленных с Полярного Урала; *Br. schrencke* собраны в Забайкалье (хр. Хамар-Дабан).

Сеголеток лягушек гомогенизировали целиком, у моллюсков отсекали ногу. Гомогенат в обоих случаях готовили из расчета 20 мг ткани на 1 мл трисбуфера. Состав буферной смеси, методика приготовления гомогената и определение коэффициента $ТТХ_a/ТТХ_b$ в качестве показателя интенсивности окислительно-восстановительных процессов были описаны ранее (Рункова, Завада, 1974). Опыты ставили по плану ПФЭ типа 2^2 (первая и вторая серии) и методом пассивного эксперимента (третья серия). Регрессионный анализ результатов выполнен по стандартной методике (Налимов, Чернова, 1965; Максимов, Федоров, 1969). Данные пассивного эксперимента статистически обработаны (Рокицкий, 1961). Условия опытов, в которых использованы методы математического планирования эксперимента, представлены в табл. 39.

Результаты и их обсуждение

Анализ данных, представленных в табл. 39, 40, показывает, что «полосатые» морфы лягушек и моллюсков имеют более высокий исходный уровень окислительно-восстановительных процессов по сравнению с «бесполосыми» ($t_{56}=2,54$; для обоих видов $b_1 > t_s\{b_i\}$). Разница в абсолютных значениях коэффициента $ТТХ_a/ТТХ_b$ в первой и третьей сериях связана, по-видимому, с разницей в сроках постановки серии опыта. Апробированные концентрации тироксина не вызывают достоверных сдвигов в эндогенной активности оксидаз в гомогенатах исследованных видов амфибий и моллюсков ($b_2 < t_s\{b_i\}$).

Сравнительный анализ коэффициентов регрессии по взаимодействиям для моллюсков и амфибий показывает, что для первых, по-видимому, в большей степени характерна тенденция к появлению различий между морфами при введении в гомогенат тироксина (для амфибий $b_{12}=0,19$, для моллюсков $b_{12}=-1,4$). Можно предполагать, что различия в исходном уровне эндогенного метаболизма определяют и различную чувствительность к гормону у исследованных генетических вариантов. Как известно, тироксин вызывает активацию свободного окисления в тканях, и, как правило, выделение гормона наблюдается при действии низких температур (Park и др., 1958; Medina, Vacila, 1959; Северин, Ян Фу-юй, 1960; Turner, 1964).

Возможно, у двух изученных нами видов амфибий и моллюсков существуют два типа метаболической реакции на температуру и более высокому уровню окислительно-восстанови-

Матрица планирования ПФЭ типа 2² и результаты эксперимента

№ варианта	Кодированные независимые переменные		Тетразолвосстанавливающая активность гомогената, е/мл.												
			аргона				воздуха								
	x ₁	x ₂	у ₁	у ₂	у ₃	у ₄	у ₁	у ₂	у ₃	у ₄	у ₅	у ₆	у ₇	у ₈	
1	-	-	0,14	0,2	0,185	0,145	0,075	0,071	0,067	0,057	2,49	1,86	2,82	2,76	2,54
2	+	-	0,21	0,375	0,445	0,315	0,058	0,055	0,045	0,075	6,12	3,62	6,81	9,88	4,2
3	-	+	0,065	0,06	0,11	0,075	0,047	0,065	0,06	0,063	1,33	1,38	0,92	1,83	1,19
4	+	+	0,260	0,25	0,235	0,23	0,047	0,049	0,065	0,09	4,19	5,53	5,1	3,61	2,55

Первая серия

1	0,14	0,2	0,185	0,145	0,075	0,071	0,067	0,057	2,49	1,86	2,82	2,76	2,54	1,88
2	0,21	0,375	0,445	0,315	0,058	0,055	0,045	0,075	6,12	3,62	6,81	9,88	4,2	5,12
3	0,065	0,06	0,11	0,075	0,047	0,065	0,06	0,063	1,33	1,38	0,92	1,83	1,19	1,88
4	0,260	0,25	0,235	0,23	0,047	0,049	0,065	0,09	4,19	5,53	5,1	3,61	2,55	5,12

Вторая серия

1	0,85	0,81	0,80	0,90	0,095	0,1	0,115	0,095	8,4	8,9	8,1	6,9	9,5	9,2
2	0,405	0,40	0,35	0,35	0,015	0,015	0,02	0,018	22,6	27,0	26,6	17,5	19,4	20,6
3	0,625	0,595	0,80	0,75	0,065	0,075	0,06	0,08	10,0	9,6	7,9	13,3	9,4	9,2
4	0,23	0,23	0,255	0,215	0,014	0,012	0,012	0,012	18,7	16,4	19,2	21,3	17,9	20,6

Примечания. 1. Статистические показатели: $b_0=3,5; b_1=1,62; b_2=-0,77; b_{12}=-0,19; s^2\{\bar{y}\}=0,59; t_s\{b_1\}=1,2; y=3,5+1,62x_1;$
 $s_{a_1}^2=1,27 < F_{s^2}\{\bar{y}\}=2,3; F_{0,95}(2,12)=3,9$ (первая серия); $b_0=14,9; b_1=5,7; b_2=-0,58; b_{12}=-1,4; s^2\{\bar{y}\}=2,17; t_s\{b_1\}=2,2; y=14,9+$
 $+5,7x_1; s_{a_1}^2=4,4 < F_{s^2}\{\bar{y}\}=8,6$ (вторая серия).

2. \bar{x}_1 — морфы, верхний уровень (+), «полосатая», и нижний уровень (-), «бесполосая»; \bar{x}_2 — концентрация тироксина: 10 и 0 (первая се-
 рия), 30 и 0 ед/кг (вторая серия), соответственно.

Таблица 40

Результаты определения интенсивности окислительно-восстановительных процессов в гомогенатах двух морф *R. arvalis*

Морфа	Тетразолвосстанавливающая актив- ность гомогената, е/мл, в атмосфере		$\frac{TTX_a}{TTX_b}$ $\bar{X} \pm m$	Достовер- ность
	аргона $\bar{X} \pm m$	воздуха $\bar{X} \pm m$		
Третья серия				
«Полосатая»	$1,58 \pm 0,08$ (1)	$0,806 \pm 0,09$ (3)	$2,07 \pm 0,25$ (5)	} $t_{12}=5,61$ $t_{34}=2,02$ $t_{56}=2,54$
«Бесполосая»	$0,777 \pm 0,11$ (2)	$0,565 \pm 0,06$ (4)	$1,37 \pm 0,10$ (6)	

Примечание. Количество наблюдений в каждом опыте 5; в скобках — номер ва-
рианта.

тельных процессов соответствует меньшая чувствительность к тироксину, в то время как морфы с менее высоким уровнем эндогенного метаболизма выживают за счет повышенной лабильности обмена веществ, повышенной реактивности по отношению к гормону и низким температурам.

Преимущества использования математического планирова-
ния в данной работе становятся очевидными при сравнении
объема затраченного исполнителями труда, объема получен-
ной научной информации и ошибки в определении коэффициен-
тов регрессии в первой и двух последующих сериях.

В третьей серии израсходовано 10 животных, решен один
вопрос о различиях в исходном уровне эндогенного metabo-
лизма в гомогенатах двух морф, и ошибка в определении сте-
пени этих различий составляет величину, равную $s^2\{y\}/2,5$.
В первой и второй сериях израсходовано 16 животных, но полу-
чено вдвое больше информации (вопрос об исходном уровне
метаболизма и его чувствительности к тироксину) с точностью,
равной $s^2\{y\}/16$. Для решения этих вопросов методом класси-
ческого эксперимента, по аналогии с третьей серией, понадобилось
бы поставить 32 опыта (два варианта на контрольных гомогена-
тах обеих морф и два — с добавлением гормона, по восемь опы-
тов в каждом из вариантов).

* * *

Таким образом, возможность практического использования
методов математического планирования эксперимента в иссле-
дованиях эколого-биохимического характера апробирована
нами при изучении нескольких частных проблем современной
популяционной экологии: при изучении внутривидовой биох-
мической дифференциации, при изучении природы естественной
радиорезистентности и биологического полиморфизма и в про-

цессе исследования механизмов метаболической регуляции численности в популяциях.

На отдельных этапах исследования были применены разные планы, разные варианты статистической обработки данных в соответствии с теми различными ситуациями, которые могут встретиться при экспериментировании в области эколого-биохимических исследований (необходимость работы на малом числе животных и на разном количестве животных разных видов, когда в вариантах при сравнительном изучении разных объектов оказывается неодинаковое число параллельных определений; необходимость количественной оценки влияния, наряду с основными факторами, посторонних, мешающих факторов, исключение источников неоднородности, нестандартности изучаемого материала; необходимость количественной оценки влияния взаимодействий, выявление с помощью изучения этого влияния нестойких, временно существующих, но явных и достоверных различий в поведении животных одного вида, одной популяции и т. д.).

Преимущество математического планирования как метода, позволяющего значительно повысить эффективность любого исследования, в том числе и эколого-биохимического, рассмотрена нами в отдельных разделах настоящей работы и, по-видимому, не требует дополнительного обсуждения. При обобщении полученных результатов неизбежно возникают два вопроса дискуссионного характера, связанные с изучением разных экологических проблем. Это вопрос о необходимости и правомерности использования в активном эколого-биохимическом эксперименте не только абсолютных, но и относительных биохимических показателей и вопрос о специфике адаптации на разных уровнях интеграции.

Одна из главных методических особенностей, представленных в настоящем исследовании, — использование нового экспресс-метода изучения интенсивности эндогенного аэробного метаболизма, который состоит в спектрофотометрическом определении степени ингибирования широко известной «тетразоловой реакции» кислородом воздуха.

Этот метод впервые разработан нами в процессе изучения возможностей биохимического экспресс-прогноза эффективности радиозащиты. Он предназначался для поиска биохимических показателей, коррелирующих с радиорезистентностью, и в первую очередь должен был отвечать требованиям определения суммарного биохимического показателя в минимальном количестве ткани (выживаемость при облучении, так же как при действии любого экологического фактора, вряд ли определяется активностью одного фермента, а размеры селезенки, одного из самых радиочувствительных органов, у лабораторных животных составляют величину порядка 50—60 мг).

В связи с этими особенностями задачи выбор был останов-

лен на «тетразоловой реакции», которая широко применяется в практике. Она обладает высокой чувствительностью, универсальна, поскольку связана с активностью дегидрогеназ, сравнительно проста в выполнении, поскольку продукт восстановления нерастворим в воде, и может быть использована в работе с гомогенатами, которые ближе к целому организму по сравнению с другими биологическими препаратами типа гяллоплазмы и митохондрий.

Однако механизм «тетразоловой реакции» в биологических препаратах не изучен, и вопрос о природе ферментов, которые участвуют в восстановлении данного акцептора, остается дискуссионным. По-видимому, тетразолвосстанавливающая активность гомогенатов связана с суммарной активностью окислительно-восстановительных ферментов, и степень ингибирования «тетразоловой пробы» кислородом воздуха в сочетании с определением интенсивности восстановления тетразолхлорида в атмосфере аргона может быть использована как косвенный, но высоко чувствительный показатель интенсивности аэробного и анаэробного эндогенного метаболизма.

При определении «тетразоловой реакции» в наших исследованиях в гомогенат не вводился дополнительно субстрат, и интенсивность восстановления акцептора, вероятно, связана с суммарной активностью ферментов и наличием соответствующих субстратов. На данном этапе наших эколого-биохимических исследований, так же как и на первом этапе — при изучении эффективности радиозащиты, не ставилась задача изучения природы выбранного биохимического показателя.

В период проведения поисковых работ в области популяционной биохимической экологии важно иметь метод, позволяющий относительно быстро получить достоверную характеристику общей напряженности энергетического обмена у животных с учетом взаимовлияния максимума факторов, которые составляют вместе с изучаемым объектом единую экологическую систему. Приобретает большое значение корреляция изменений, определяемых данным методом, с изменениями физиологического характера, проявляющимися в условиях опыта *in vivo* на целом организме.

Разработанный в группе отдела спектрофотометрический метод определения коэффициента $T\bar{T}X_a/T\bar{T}X_b$ удовлетворяет этим требованиям. Он характеризует общую интенсивность эндогенных окислительно-восстановительных процессов, высоко чувствителен и позволяет получить характеристику гомогената, который содержит 10—20 мг/мл, прост в выполнении. Поэтому он может быть использован в серийных факторных исследованиях и, как показывают наши данные, полученные при изучении разных объектов и разных экологических проблем, явно коррелирует с реакциями физиологического характера в опытах на целом организме.

Чувствительность к гипоксии и изменения в активности эндогенных оксидов в гомогенатах головастиков некоторых видов амфибий (Ковальчук, Руикова, 1973)

Дата опыта	Вид животного	Плотность популяций; стадия развития	Среда, в которой изучались эндогенный метаболизм и чувствительность к гипоксии	Тетразоловая активность гомогената, е/мл, в атмосфере		Продолжительность наблюдения в условиях насыщения водной среды аргоном, мин	Выживаемость за период наблюдения, %	
				ТТХ _а	ТТХ _в			
11/V	<i>Rana macrosternis</i>	Повышенная, 26-я	«Вода скопленей» из популяций с повышенной плотностью Вода дистиллированная «Вода скопленей» из популяций с нормальной плотностью	1,2 0,8	0,4 0,5	3,1 1,8	90 90	20,0 0,0
21/V	То же	То же	«Вода скопленей» из популяций с повышенной плотностью Вода отстойная водопроводная «Вода скопленей» из популяций с нормальной плотностью	0,65 0,50	0,29 0,26	2,24 1,90	70 80	0,0 20,0
12/VI	<i>R. arvalis</i>	Повышенная, 27-я	«Вода скопленей» из популяций с повышенной плотностью Вода отстойная «Вода скопленей» из популяций с нормальной плотностью «Вода скопленей» из популяций с повышенной плотностью Вода отстойная «Вода скопленей» из популяций с нормальной плотностью	0,57 0,50 0,64	0,08 0,24 0,16	7,10 2,8 4,0	90 25 55	60,0 0,0 0,0
27/VI	<i>Pelobatus syriacus</i>	Повышенная, 26-я	«Вода скопленей» из популяций с повышенной плотностью Вода дистиллированная «Вода скопленей» из популяций с нормальной плотностью	0,68 0,30 0,52	0,05 0,10 0,08	13,6 3,0 6,5	60 10 35	50,0 0,0 0,0
			«Вода скопленей» из популяций с нормальной плотностью	0,42	0,10	4,2	20	0,0
			«Вода скопленей» из популяций с повышенной плотностью Вода дистиллированная «Вода скопленей» из популяций с нормальной плотностью	0,42 0,10	0,09 0,06	4,6 1,6	140 80	20,0 0,0
			«Вода скопленей» из популяций с нормальной плотностью	0,15	0,08	1,9	70	0,0

Таблица 42

Среднее квадратичное отклонение s , коэффициент вариации v_c и ошибка метода m при определении ТТХ_а/ТТХ_в в гомогенатах селезенки и печени лабораторных мышей одной линии, пола и возраста *

Доза радиации, p	Печень					Селезенка				
	\bar{n}	\bar{x}	s	$m, \%$	v_c	n	\bar{x}	s	v_c	$m, \%$
0	10	1,99	0,92	14,5	47,8	11	3,02	1,2	39,0	11,9
0	12	1,53	0,66	12,4	43,1	—	—	—	—	—
525	18	2,23	0,93	9,4	41,7	13	3,08	1,06	29,0	9,4
625	14	2,30	0,89	10,0	38,7	15	3,30	0,86	38,0	6,6
800	15	2,47	0,72	7,3	29,1	15	3,53	1,20	37,8	8,7
Среднее				10,7	40,8	—	—	—	33,6	9,1

* Данные каждой серии получены в течение 20 дней в результате суммирования показаний трех-четырёх опытов по трем животным в каждом.

Таблица 43

Среднее квадратичное отклонение s , коэффициент вариации v_c и ошибка метода m при определении ТТХ_а/ТТХ_в в гомогенатах селезенки и мышц лабораторных мышей 2-месячного возраста *

№ варианта	Условия опыта	n	\bar{x}	s	v_c	$m, \%$
1	Селезенка, октябрь . . .	9	1,80	0,28	15,0	5,1
2	То же	9	1,80	0,16	8,9	6,6
3	Мышца, апрель	23	4,72	0,90	19,0	3,8
4	Мышца, декабрь	20	1,05	0,13	12,0	2,8
Среднее					13,7	4,5

* Данные каждой серии получены в течение одного дня, при определении теста у всех взятых на исследование животных одновременно.

Так, в процессе изучения природы естественной радиорезистентности нами обнаружена корреляция активности эндогенных оксидов в гомогенатах селезенки лабораторных мышей с их выживаемостью при облучении (см. табл. 6).

В процессе изучения специфики биохимической адаптации к низким температурам у северных и южных подвидов полевых экономок обнаружена корреляция активности эндогенных оксидов в гомогенатах охлажденных животных с их способностью поддерживать ректальную температуру на уровне нормы (см. табл. 10, 14—16).

Таблица 44

Адаптация к охлаждению и изменения в интенсивности свободного окисления и активности эндогенных оксидаз в мышцах голубей и полевок-экономок (по данным Скулачева, 1962, и нашим)

№ варианта	Условия охлаждения	Голуби		Полевки-экономки			
		$t_{\text{тела}}, ^\circ\text{C}$	P/O	южный подвид		северный подвид	
				$t_{\text{тела}}, ^\circ\text{C}$	$\text{TТХ}_a/\text{TТХ}_b$	$t_{\text{тела}}, ^\circ\text{C}$	$\text{TТХ}_a/\text{TТХ}_b$
1	Без охлаждения	40	0,93	34,4	1,9	34,4	3,6
2	-15° С, 20 мин	19	1,03	25,4	2,8	25,4	3,9
3	-15° С, 20 мин, повторно для голубей и после 9-дневной акклимации к холоду для полевок-экономок	40	0,30	28,2	4,8	28,2	2,2

При изучении биохимических механизмов регуляции численности в популяциях обнаружена корреляция между активностью эндогенных оксидаз в гомогенатах отдельных особей «загущенных» популяций и интенсивностью роста и развития этих особей, определяющих степень их выживаемости и выживаемости популяции в целом.

Видо- и стадийспецифичность в действии регулирующего белка из «загущенной» популяции личинок земноводных на их эндогенный метаболизм коррелирует с видо- и стадийспецифичностью в действии данного белка на рост и развитие тех же особей, скорость регенерационного процесса (см. табл. 31, 33, 36, 37, также данные Шварца, Пястоловой, 1970а, б).

И, наконец, уровень эндогенных оксидаз в гомогенатах головастиков нескольких изученных нами видов земноводных (табл. 41) коррелирует с их выживаемостью в условиях кислородного голодания (при выдерживании в воде, насыщенной аргоном в присутствии метаболитов «загущенной» и «незагущенной» популяций, которые по-разному изменяют уровень эндогенного метаболизма в гомогенатах этих особей, обнаружены разные сроки гибели головастиков в условиях гипоксии).

Высокая чувствительность коэффициента $\text{TТХ}_a/\text{TТХ}_b$, определяемого в гомогенатах тканей, к таким экологическим факторам среды, как радиация, низкие температуры, повышенная численность особей в популяции, а также большая вариабельность теста в течение не только года, но и месяца (табл. 42), позволяет предполагать, что выбранный нами биохимический

показатель может служить неплохим индикатором адаптационной изменчивости организма, особенно если учесть корреляцию данного теста с результатами соответствующих, описанных выше опытов *in vivo*.

Интересна аналогия, которая обнаруживается между коэффициентом $\text{TТХ}_a/\text{TТХ}_b$ и широко известным биохимическим показателем P/O, характеризующим степень сопряженности фосфорилирующего и свободного окисления в организме. По данным В. П. Скулачева (1962), коэффициент P/O значительно изменяется от сезона к сезону и даже в течение одного месяца от опыта к опыту.

Результаты наших исследований (табл. 42, 43) показывают, что коэффициент $\text{TТХ}_a/\text{TТХ}_b$ также высокочувствителен к сезонным, включая суточные, колебаниям среды (коэффициент вариации, определяемый по данным, которые получены в течение месяца, значительно превышает вариабельность теста в опытах, где суточные влияния сезона сведены к минимуму). Направленность достоверных сдвигов в величине коэффициента $\text{TТХ}_a/\text{TТХ}_b$ и P/O по сезонам также коррелирует (минимум P/O и максимум $\text{TТХ}_a/\text{TТХ}_b$ падают на март, максимум P/O и минимум $\text{TТХ}_a/\text{TТХ}_b$ — на декабрь).

Хорошо известно, что сопряженность фосфорилирующего и свободного окисления ослабевает при введении тироксина, который является типичным разобщающим средством (Magnus, Hess, 1951).

В наших опытах при введении тироксина непосредственно в гомогенат также наблюдается повышение коэффициента $\text{TТХ}_a/\text{TТХ}_b$, что указывает на активацию эндогенного аэробного метаболизма (см. табл. 14, 15). И, наконец, главное, по-видимому, сходство коэффициента $\text{TТХ}_a/\text{TТХ}_b$ и P/O в том, что оба показателя коррелируют с изменениями ректальной температуры у животных в условиях экстремального охлаждения (табл. 44) и с интенсивностью роста особей (см. табл. 33) (Шварц, Пястолова, 1970а; Скулачев, 1962).

Таким образом, сходство предлагаемого нами нового биохимического показателя с хорошо известным коэффициентом P/O, корреляция его с физиологическими реакциями целого организма, высокая реактивность к действию экологических факторов, возможность общей характеристики интенсивности не только аэробного, но и анаэробного эндогенного метаболизма позволяют рекомендовать данный показатель как новый, достаточно объективный тест для изучения общей напряженности энергетического обмена в эколого-биохимических исследованиях.

Экспрессность и простота делают его особенно эффективным в эколого-биохимическом активном эксперименте, где необходимо за минимальный промежуток времени обработать максимум проб в условиях, близких к полевым.

Однако активный эксперимент предъявляет особые требования. Обычной предпосылкой регрессионного анализа любых данных является, как известно, нормальность распределения результатов наблюдений (Налимов, Чернова, 1965). Исследователь, имеющий дело с относительным показателем, неизбежно сталкивается с необходимостью преодолеть известную асимметрию в распределении относительных показателей при их измерении. Нам известно несколько способов, которые могут быть применены в данной ситуации. Эти способы рекомендуются математиками и широко используются в регрессионном анализе, в том числе и в активном эксперименте (Хальд, 1956; Bücher, Pette, 1961; Дедухова, Мохова, 1971).

В практической работе многие асимметричные распределения часто удается аппроксимировать нормальным законом, перейдя от случайной величины y к случайной величине $q = \lg x$ (Налимов, Чернова, 1965).

В случае малых значений $\lg x$ функция $y = \lg x$ в интервале $M(\lg x) \pm 2\delta \lg x$ почти совпадает с некоторым линейным преобразованием, и поэтому в условиях малого коэффициента вариации ($v_c < 15\%$) логарифмически нормальное распределение является фактически нормальным распределением (Налимов, 1960).

Наконец, Д. Финни (1970) подчеркивает, что вследствие подходящей рандомизации в дисперсионном анализе при нулевой гипотезе о том, что способы обработки дают одинаковый эффект, средние квадраты для способов обработки и ошибок имеют равные математические ожидания. В этом утверждении не требуется предположения о нормальности распределения, и оно справедливо для большинства принятых планов. Даже если ошибки индивидуальных участков не являются нормально распределенными, а должны рассматриваться как фиксированные количественные характеристики соответствующих им участков, процесс рандомизации приведет к тому, что распределение отношения средних квадратов будет приближаться к F -распределению.

Таким образом, существуют фактически три пути преодоления асимметрии в распределении результатов наблюдений: логарифмирование данных, отбор методик, которые дают минимальную ошибку воспроизводимости результатов и малый коэффициент вариации, и рандомизация опытов, т. е. случайная последовательность в их проведении. Нами была предпринята попытка экспериментального определения характера распределения тетразолвосстанавливающей активности гомогенатов в атмосфере аргона, воздуха и их отношения.

Результаты графического анализа данных, полученных при определении теста в гомогенатах мышц 50 животных, показали, что в распределении коэффициента TTX_a/TTX_b наблюдается заметная асимметрия. Определение этого коэффициента по дан-

ными нескольких серий опытов (см. табл. 43) в свою очередь позволяет считать, что предлагаемый метод имеет приемлемую в биохимии ошибку воспроизводимости результатов, а варибельность отношения TTX_a/TTX_b не превышает пределов, обеспечивающих приближенно-нормальное распределение ($v_c < 15\%$).

В то же время, учитывая асимметрию в распределении нового экспресс-показателя и большую чувствительность его к сезонным колебаниям среды, мы на всех этапах эколого-биохимических исследований, применяя методы математического планирования эксперимента, последовательность проведения опытов, как правило, рандомизировали.

Для проверки выводов регрессионного анализа одни и те же результаты активного эксперимента обрабатывали как нормально распределенные величины (тетразолвосстанавливающая активность, активность отдельных изоэнзимов, активность аэробного и анаэробного гликолиза) и относительные показатели, характеризующие сдвиги в анаэробном и аэробном метаболизме (TTX_a/TTX_b , H/M , $Q_{\text{лактат}}^a/Q_{\text{лактат}}^b$).

Анализ соответствующих таблиц с такими двойными вариантами статистических расчетов дает основание на определенное заключение. Основные выводы регрессионного анализа результатов, полученные при статистической обработке абсолютных и относительных показателей, совпадают.

В декабре 1971 и 1972 гг. при изучении активности эндогенных оксидаз мышц у двух подвидов полевок-экономок (см. табл. 10, 14 и 15) в трех различных вариантах охлаждения были обнаружены достоверные различия в реакции по данному тесту между северным подвидом и южным (b_{12} , b_{13} , $b_{123} > t_s\{b_i\}$). В этих сериях статистическая обработка результатов была выполнена и по абсолютному показателю. Анализ соответствующих коэффициентов регрессии показывает, что достоверные различия в реакции на охлаждение между северным и южным подвидом обнаруживаются при определении тетразолвосстанавливающей активности в атмосфере аргона, в то время как восстановление тетразолхлорида в атмосфере воздуха в гомогенатах охлажденных животных не изменяется (обратные отношения наблюдали в мартовских сериях). Очевидно, что достоверные различия между северным и южным подвидом по знаменателю в коэффициенте TTX_a/TTX_b в условиях отсутствия изменений в числителе, и наоборот, явно должны найти проявление в существовании достоверных сдвигов в реакции на низкие температуры у южного и северного подвида по относительному показателю — коэффициенту TTX_a/TTX_b , что в действительности и имеет место.

В декабре 1971 г. при изучении скорости анаэробного и аэробного гликолиза в гиалоплазме мышц (первая серия опытов) у двух подвидов полевок-экономок было обнаружено достоверное подавление аэробного и явная тенденция к активации анаэроб-

ного гликолиза у южного подвида при экстремальном охлаждении и акклимации. Статистическая обработка соответствующего относительного показателя $Q_{\text{лактат}}^a / Q_{\text{лактат}}^b$ указывает на ту же направленность изменений, которая приобретает степень достоверности во всех вариантах охлаждения (см. табл. 17).

Аналогичная общность выводов характерна и для результатов определения активности отдельных изоэнзимов и распределения *H*- и *M*-субъединиц изоэнзимов одного фермента (см. табл. 24 и 25). Показатель *H/M* получен⁶ на основании данных табл. 24 и является относительным показателем сдвигов в интенсивности анаэробного и аэробного метаболизма.

Таким образом, наш практический опыт использования относительных показателей в эколого-биохимическом активном эксперименте, включая и новый предлагаемый нами экспрест-тест определения общей напряженности энергетического обмена, позволяет считать, что относительные биохимические показатели в активном эколого-биохимическом эксперименте могут применяться при условии малой вариабельности теста или обязательной рандомизации опытов, аналогично определению известных относительных биохимических показателей, таких, как коэффициент сопряженности фосфорилирования и свободного окисления *P/O* (Beatt и др., 1965), соотношение *H*- и *M*-субъединиц изоэнзимов *H/M* (Mager и др., 1968), дыхательный контроль по Ларди и Уэлману, Чансу и Уильямсу V_{III}/V_0 и V_{III}/V_{IV} (Дедухова, Мохова, 1971).

По рекомендации В. Н. Максимова нами апробирован еще один прием для преодоления асимметрии коэффициента TTX_a/TTX_b , статистически обработаны данные табл. 10, 11, а также табл. 15 в соответствии с новым планом (ПФЭ типа 2⁵).

В качестве x_4 в варианте 1 взят сезон, в варианте 2 — концентрация тироксина, x_5 в обоих вариантах — условия инкубации гомогената (аргон, воздух). Данный прием улучшает статистические свойства предлагаемого нами показателя ($N=32$ и y — абсолютная величина).

Результаты регрессионного анализа в соответствии с новым планом ПФЭ типа 2⁵ показали, что ряд факторов (в частности взаимодействия x_{123} , x_{13} , x_{12}), которые в ранее выполненных нами вариантах расчетов имели хорошую достоверность, при использовании в качестве y тетразолвосстанавливающей активности гомогената стали малозначительными.

В связи с тем, что различные сдвиги в активности оксидазы при действиях низких температур в мышцах северного и южного

подвида полевок-экономок коррелируют, по нашим данным, с другими, не относительными, показателями (такими, как аэробный гликолиз, активность ЛДГ и активность ее изоэнзимов), по-видимому, несущественность этих различий в последнем варианте статистической обработки связана с колебаниями в содержании азота в гомогенатах. Аналогичные случаи исчезновения достоверности сдвигов при пересчете активности фермента на сырой вес хорошо известны в литературе (Reupaarje, 1961). Поэтому не случайно в биохимических экспериментах активность ферментов в гомогенатах, как правило, рекомендуют относить к растворимому белку или общему азоту пробы.

В наших опытах при определении тетразолвосстанавливающей активности использованы в каждом варианте разные навески ткани, из которых всякий раз готовили разное количество гомогената из расчета 20 мг сырого веса ткани на 1 мл. Естественные ошибки при взвешивании сырой ткани и возможные колебания в содержании общего азота в результате влияния на данный показатель трех изучаемых в опыте факторов являются причиной несущественности обнаруженных ранее достоверных влияний биологических взаимодействий.

При использовании относительного показателя, который рассчитывали для каждого гомогената, колебания в содержании общего азота, так же как в навеске сырой ткани, не могли повлиять на результаты определения степени ингибирования тетразоловой реакции кислородом воздуха (активность реакции в разных условиях инкубации определяли в одном гомогенате, с равным количеством азота, растворимого белка или сырого веса ткани).

Таким образом, тетразолвосстанавливающая активность, выраженная в экстинкциях на миллилитр, в наших опытах может быть связана в равной мере с влиянием изучаемых нами факторов (x_1 , x_2 , x_3) и с влиянием содержания белка или азота, которые могут быть разными не только в условиях действия разных температур у разного вида животных, но и от опыта к опыту, независимо от варианта, так как в свою очередь зависят от методики взвешивания и других ошибок. Последние в случае использования коэффициента TTX_a/TTX_b исключаются.

Обобщенный анализ полученных нами данных по коэффициенту TTX_a/TTX_b показывает, что с физиологическими реакциями организма (чувствительностью к гипоксии, радиации, охлаждению), как правило, коррелирует не тетразолвосстанавливающая активность гомогената, а степень ингибирования реакции восстановления данного акцептора кислородом воздуха. Пробы с разной интенсивностью восстановления в аргоне и воздухе (табл. 45, варианты 1 и 2) могут иметь одинаковую степень ингибирования реакции кислородом воздуха и одинаковую чувствительность животных к γ -облучению. Напротив, про-

⁶ Абсолютная активность *H* (*M*) = $\frac{\% H (M) \times \text{общ. активность ЛДГ}}{100}$; ЛДГ-1: 100% *H*, ЛДГ-2: 75% *H* и 25% *M*, ЛДГ-3: 50% *H* и 50% *M*; ЛДГ-4: 25% *H* и 75% *M*, ЛДГ-5: 100% *M* (Dawson и др., 1964).

Таблица 45

Интенсивность восстановления тетразолхлорида и степень ингибирования «тетразоловой реакции» кислородом воздуха в гомогенатах объектов с разной приспособляемостью к отдельным факторам среды (выборочные данные)

Объект исследования	Экологический фактор	№ варианта	ТТХ гомогената в атмосфере		$\frac{TТХ_a}{TТХ_b}$	Адаптация	
			аргона	воздуха			
Мыши линии БАЛБ лабораторные, селезенка	Норма, октябрь	1	1,18	0,56	2,10	Низкая.*	
		2	0,55	0,26	2,00		
	Норма, апрель После введения радиопротектора	3	0,720	0,200	3,60	Средняя	
		4	0,86	0,13	6,60		
То же, печень	Норма, октябрь, доза 575p	5	100%	100%	1,9	Радиочувствительна	
		6	81%	54%	3,0		
	Норма, доза 575p	7	100%	100%	1,5	Радиорезистентна	
		8	126%	66%	2,3		
Полевка-экономка южная, мышца	+18° С —15° С 9 дней, 0° С; 20 мин —15° С	9	Увеличивается	Снижается	1,9	34° С**	
		10			2,8		25° С
		11			4,8		
Головастики	В присутствии и отсутствии регулирующего белка	<i>Rana macrospemis</i> , 26-я стадия развития					
		12	0,57	0,08	7,1	90 мин; 60%***	
		13	0,50	0,26	2,9	80 мин; 60%	
		<i>Pelobutus syriacus</i> , 26-я стадия развития					
		14	0,42	0,09	4,6	140 мин; 20%	
15	0,15	0,08	1,9	70 мин; 0%			

* Выживаемость при облучении летальными дозами.
** Ректальная температура в условиях охлаждения.
*** Продолжительность наблюдения и выживаемость в условиях кислородного голодания.

бы с равной тетразолвосстанавливающей активностью в аргоне (варианты 12 и 13) могут иметь разный коэффициент $\frac{TТХ_a}{TТХ_b}$ и разную чувствительность животного к гипоксии. Пробы с равной величиной $TТХ_b$ (варианты 14, 15) в наших опытах имели разную степень ингибирования реакции и разную чувствительность к гипоксии. Резко различные по $TТХ_b$ гомогенаты (варианты 1 и 2) в то же время имеют близкие значения коэффициента $\frac{TТХ_a}{TТХ_b}$ и близкие величины выживаемости у облученных животных. Эти сопоставления, нам кажется, заставляют предполагать, что не тетразолвосстанавливающая активность гомогената связана с функциональной деятельностью животного, а показатель, характеризующий одно-

временно и общую интенсивность эндогенного метаболизма, и соотношение в нем аэробного и анаэробного звена.

Как правило, адаптации, по-видимому, способствует активация оксидазных ферментных систем (понижение $TТХ_b$) при условии повышения общего уровня энергетического обмена (увеличение $TТХ_a$).

Так, активация эндогенных оксидаз гомогената в некоторых наших опытах не коррелировала с повышением адаптации к неблагоприятным факторам среды, если уровень восстановления тетразолхлорида в аргоне оказывался чрезмерно низким (варианты 13 и 15, 6 и 7 — см. табл. 45).

Рекомендуя относительный показатель $\frac{TТХ_a}{TТХ_b}$ в качестве экспресс-теста, определяющего активность эндогенных оксидаз и коррелирующего с адаптационными способностями организма, следует подчеркнуть, что при анализе данных необходимо акцентировать внимание не только на увеличении показателя, но и на природе этого увеличения, направленности сдвигов в интенсивности восстановления акцептора при инкубации гомогената в атмосфере аргона.

Универсальность, высокая чувствительность и экспрессность спектрофотометрического метода определения общей напряженности энергетического обмена по коэффициенту $\frac{TТХ_a}{TТХ_b}$ в гомогенатах тканей позволила изучить данный показатель при действии различных экологических факторов на разных уровнях интеграции живого.

Нами получены результаты по активности эндогенных оксидаз при действии радиации на уровне организма (изучались изменения в эндогенном метаболизме селезенки и мышц лабораторных мышей одной линии в условиях γ -облучения).

Получены данные по активности эндогенных оксидаз на уровне отдельных генетических вариантов (обнаружены различия в интенсивности эндогенного метаболизма в гомогенатах полосатых и бесполосых морф некоторых видов амфибий и моллюсков, в норме и при гормональном воздействии в условиях физиологических температур). Параллельно получены сведения по активности эндогенных оксидаз при действии низких температур на уровне вида и подвида (выявлено своеобразие в метаболической реакции на охлаждение для *M. oesopomus* и для северной и южной формы вида).

Наконец, получены результаты по тому же биохимическому тесту в условиях действия такого экологического фактора, как повышенная плотность, на уровне еще более сложной экологической системы — популяции развивающихся особей одного вида в окружении развивающихся особей других видов с разной степенью генетического родства по отношению друг к другу. Обнаружена активация и ингибирование эндогенного метаболизма отдельных головастика в зависимости от их стадии развития и таксономического положения, как определенная

реакция популяции на увеличение численности в экосистеме, обеспечивающая ее выживаемость при одновременном сохранении генетической разнородности.

Обобщающий анализ этих данных позволяет предположить, что механизмы адаптации на некоторых уровнях интеграции специфичны, хотя и включают элементы, характерные для низких степеней сложности экосистем. Так, нами обнаружена одинаковая направленность в изменении эндогенного метаболизма при изучении его на уровне организма, популяции, подвида и вида в условиях действия радиации, низких температур и повышенной плотности.

Происходит повышение коэффициента TTX_a/TTX_b в селезенке защищенных радиопротектором лабораторных мышей, в мышцах южного подвида охлажденной полевки-экономки и у крупных головастиков южного вида в «загущенной» популяции. Эти сдвиги в интенсивности эндогенного метаболизма во всех перечисленных случаях сопровождаются частичной или полной адаптацией организма к указанным неблагоприятным факторам среды.

Однако эта общность характерна для животных, имеющих относительно широкий ареал и, следовательно, более широкий спектр приспособляемости к условиям существования: для одной из форм домовых мыши (белые, линия БАЛБ), южного подвида полевки-экономки, в целом для *M. oeconomicus* и для головастиков исследованных нами южных видов амфибий.

Принадлежность к определенному подвиду в случае адаптации к низким температурам коррелирует у животного с появлением иных, не связанных с увеличением активности эндогенного метаболизма, механизмов приспособления.

У северной полевки-экономки, как оказалось, в определенных вариантах охлаждения, несмотря на полную или частичную адаптацию к низким температурам, отсутствуют сдвиги в уровне коэффициента TTX_a/TTX_b или данный показатель не увеличивается, а достоверно снижается.

Если для южной полевки-экономки в условиях охлаждения характерна в целом интенсификация обмена (увеличение активности оксидаз и лактатдегидрогеназы, интенсивности анаэробного гликолиза, перераспределение *H*- и *M*-субъединиц изофермента), то для северного подвида, как показали наши данные, в большей степени характерны сдвиги на молекулярном уровне, изменения свойств ферментов при сохранении относительно нормального уровня эндогенного метаболизма, включая интенсивность аэробного окисления и анаэробного.

ЛИТЕРАТУРА

- Асатиани В. С. Новые методы биохимической фотометрии. М., «Наука», 1965.
Белицер В. А., Цыбакова Е. Т. О механизме фосфорилирования, сопряженного с дыханием.— Биохимия, 1939, № 4.

- Бак З. Химическая защита от ионизирующей радиации. М., Атомиздат, 1968.
Виноградова А. Н. Экологический анализ теплоустойчивости лактатдегидрогеназы пойкилотермных животных.— Экология, 1970, № 5.
Грановский Ю. В., Никишева В. В., Адлер Ю. П., Налимов В. В., Комиссарова Л. Н. Отсеивающие эксперименты при изучении экстракции циркония трибутилфосфатом.— Завод. лабор., 1963, т. 29, № 3.
Гусев М. В., Федоров В. Д. Изучение состояния морфологически дифференцированных клеток в развивающихся культурах синезеленых водорослей с помощью трифенилтетразолий хлорида.— Микробиология, 1962, т. 31, № 3.
Дедухова В. И., Мохова Е. Н. Выбор условий полярографической регистрации дыхания гомогената мозга.— Биологическая наука, 1971, № 4.
Завада Н. Ф., Павлов Г. П. Активность лактатдегидрогеназы и ее изоэнтальпийный спектр в гиалоплазме скелетной мышцы двух подвигов полевки-экономки в условиях экстремального охлаждения и акклиматизации.— Тезисы докладов Уральской конференции молодых ученых «Человек и биосфера». Свердловск, 1973.
Иванова А. З., Курнакова И. Н. Некоторые цитохимические исследования легочной ткани.— Архив анатом. гистологии, эмбриологии, 1960, т. 39, № 12.
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.
Ковальчук Л. А., Рункова Г. Г., Хохуткин И. М. Интенсивность окислительно-восстановительных процессов и их реакция на тироксин у различных морф амфибий и моллюсков.— Экология (в печати).
Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. М., «Высшая школа», 1971.
Кретович В. Д. Введение в энзимологию. М., «Наука», 1967.
Кушнарев В. М., Благовещенский В. А. Влияние замораживания — высушивания на сукциндегидрогеназную активность бактерий.— Микробиология, 1961, т. 26, № 4.
Ларский Э. Г. Методы зонального электрофореза. М., «Медицина», 1971.
Маркова Е. В. Латинские квадраты в планировании эксперимента.— Завод. лабор., 1968, № 1.
Маркова Е. В. Руководство по применению латинских планов при планировании эксперимента с качественными факторами. Челябинск, Южно-Уральское кн. изд-во, 1971.
Максимов В. Н., Федоров В. Д. Применение методов математического планирования эксперимента при отыскании оптимальных условий культивирования микроорганизмов. М., Изд-во МГУ, 1969.
Мишукова Е. А. Гликолиз при температурном разобщении дыхания и фосфорилирования.— Вопр. мед. хим., 1966, т. 12, № 3.
Налимов В. В. Применение математической статистики при анализе вещества. М., Физматгиз, 1960.
Налимов В. В., Чернова Н. А. Статистические методы планирования экстремальных экспериментов. М., «Наука», 1965.
Попова З. И. Быстрый метод дифференциации S- и R-форм микроорганизмов по их сукциндегидрогеназной активности.— Лабор. дело, 1963, № 2.
Разоронова В. А. Защитное действие меркамина при экспериментальном остром лучевом поражении.— Вопросы патогенеза экспериментальной терапии и профилактики лучевой болезни. М., Медгиз, 1960.
Рогозкин В. Д. Итоги применения различных средств защиты против острой лучевой болезни.— Вопросы патогенеза экспериментальной терапии и профилактики лучевой болезни. М., Медгиз, 1960.

- Рокицкий П. Ф. Основы вариационной статистики для биологов. Минск. Изд-во Белорус. гос. ун-та, 1961.
- Рункова Г. Г. О влиянии метаболитов земноводных разной степени генетической близости на эндогенный метаболизм головастиков *R. macrosternis* 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 (январь). Свердловск, 1974.
- Рункова Г. Г., Завада Н. Ф. Изучение возможности практического использования чувствительности эндогенных дегидрогеназ к аргону в биохимическом экспресс-прогнозе эффективности радиопротектора.—Тезисы к докладам 2-й Уральской конференции «Синтез, изучение свойств и применение детоксицирующих соединений» (апрель). Свердловск, 1971.
- Рункова Г. Г., Завада Н. Ф. О влиянии температурных условий введения диэтилдитиокарбамата на его радиозащитный эффект при облучении.—Экология (в печати).
- Рункова Г. Г., Завада Н. Ф., Купцова В. И. Особенности аэробного и анаэробного метаболизма тканей у двух подвидов полевки-экономки в условиях кратковременного экстремального охлаждения и акклимации.—Экология, 1974, № 3.
- 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, 1974, т. 217, № 3.
- Сагатовский В. И. Использование трифенилтетразолхлорида для ускоренного определения количества живых клеток в чумной вакцине.—Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунологии, 1961, № 5.
- Степанова З. А. О химической природе выделяемых в воду продуктов метаболизма личинок земноводных.—Экология, 1974, № 3.
- Северин С. Е., Ян Фу-юй. Окислительное фосфорилирование при термостоккозе.—Биохимия, 1960, № 25.
- Семаков В. Г. Влияние дегидрогеназной активности и цитохромооксидазных систем на жизнедеятельность сперматозоидов.—Там же, 1961, № 26.
- Скулачев В. П. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. М., Изд-во АН СССР, 1962.
- Скулачев В. П., Маслов С. П. Роль нефосфорилирующего окисления в терморегуляции.—Биохимия, 1960, т. 25.
- Торчинский Ю. М. О содержании сукциндегидрогеназы в микроструктурах аммонова рога мозга (количественная гистохимия).—Гистохимические методы в нормальной и патологической морфологии. М., Медгиз, 1958.
- Торчинский Ю. М. Об активности дегидрогеназных систем и содержании сульфгидрильных групп в некоторых отделах мозга кошки.—Биохимия, 1959, № 24.
- Урбах В. Ю. Математическая статистика для биологов и медиков. М., Изд-во АН СССР, 1963.
- Финни Д. Введение в теорию планирования экспериментов. М., «Наука», 1970.
- Хальд А. Математическая статистика с техническими приложениями. М., ИЛ, 1956.
- Шеффе Г. Дисперсионный анализ. М., Физматгиз, 1963.
- Шварц С. С. Эволюционная экология. Тр. Ин-та экол. раст. и живот. УФАН СССР, 1969, вып. 65.
- Шварц С. С., Пястолова О. А. Регуляторы роста и развития личинок земноводных. Специфичность действия.—Экология, 1970а, № 1.
- Шварц С. С., Пястолова О. А. Влияние метаболитов головастиков на скорость регенерации.—Докл. АН СССР, 1970б, т. 195, № 5.

- Alexander P., Bacq Z., Cousens S., Fox M., Herve A., Lasar T. Mode of action of some substances which protect against the lethal effects of X-rays.—Radiation Research, 1955, vol. 2.
- Aronson W., Pharmakis T. Enhancement of neotetrazolium staining for succinic dehydrogenase activity with cyanide.—Stain. Technol., 1962, vol. 37, N 5.
- Atkinson D. E. Regulation of enzyme activity.—Rev. Biochem., 1966, vol. 35.
- Bacq Z., Herve A. Sur un nouveau protecteur contre le rayonnement.—J. Suisse Med. (Schweiz. med. Wschr.), 1952, vol. 82.
- Barnes E. M. Tetrazolium reduction as a means of differentiating streptococcus faecalis from streptococcus faecium.—J. Gen. Microbiol., 1956, vol. 14.
- Black M. M., Opler S. R., Speer F. D. Observations on the reduction of triphenyltetrazolium chloride by normal and malignant human tissue.—Amer. j. Pathol., 1950, vol. 26.
- Bekky D. The protective action of dithiocarbamates against lethal effects of x-irradiation in mice.—Acta Physiol. Pharmacol. Neerl., 1956, vol. 4.
- Blatt W. F., Walker J., Mager M. Tissue lactic dehydrogenase isozymes: variation in rats during prolonged cold exposure.—Amer. j. Phys., 1965, vol. 4.
- Bücher F., Pette D. Сравнимые и специфические отношения в группировках ферментных активностей основных дающих энергию путей обмена.—Труды V Международного биохимического конгресса. Эволюционная биохимия. Симпозиум III. Москва, 1961.
- Dawson D. D., Goodfriend T. L., Kaplan M. O. Function of two types.—Sciens, 1964, vol. 143.
- Dietz A. A., Lubrano T. Separation and quantitation of lactic dehydrogenase isoenzymes by disc electrophoresis.—Anal. Biochem., 1967, vol. 20.
- Drimmelen G. C. Tetrazolium reduction as a rapid quality test for Brucella vaccine.—J. South Afr. vet. med. Ass., 1955, vol. 26, N 2.
- Eidus L., Diena B. G., Greenberg L. A rapid method for estimating the bacterial count of BCG vaccine.—Canad. publ. health., 1958, vol. 491.
- Elliot S. Ph. dependence of lactate dehydrogenase isozyme inhibition by substrate.—Nature, 1964, vol. 201.
- Elliot S., Peter E. Pool lactate and pyruvate concentrations in exercised ischemic canine muscle relationship of tissue substrate levels to lactate dehydrogenase isozyme pattern.—Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 1966, vol. 55.
- Gastambide O. M., Smith D. W. A rapid means of differentiating a typical acid-fast bacilli and avian tubercule bacilli from other mycobacteria. The neotetrazolium inhibition-test.—Amer. Rev. Tuberc., 1958, vol. 77, N 4.
- Gupta B. L., Kambo V. P. Histochemical localization of succinic dehydrogenase activity in the mitochondria of some invertebrate spermatozoa.—Nature, 1962, vol. 193.
- Gersiman M. Use of a tetrazolium salt for an easily discernible separation of serological phases.—J. Bacteriol., 1962, vol. 84, N 2.
- Ghys R. Radioprotection by acclimation to cold.—Nature, 1963, vol. 198.
- Huddleson F., Baltzer B. Differentiation of bacterial species and variation of bacterial species and variation within species by means of 2-3-5-triphenyltetrazolium chloride in culture medium.—Science, 1950, vol. 112, N 2918.
- Hirsch P., Cattaneo G., Morellini M. Für Frage der Reduzierung von 2-3-5-triphenyltetrazolium chlorid durch Mikroorganismen verschiedener Familienghörigkeit.—Z. Hyd. Infektionkrankh., 1958, Bd 145.
- Hannon J. P. Effect of prolonged cold exposure on in vitro respiration and anaerobic glycolysis of rat liver.—Amer. j. Phys., 1958, vol. 192.
- Hannon J. P. Effect of prolonged cold exposure on oxidative phosphorylation and adenosintriphosphatase of rat liver tissue.—Amer. j. Phys., 1959, vol. 196.
- Hannon J. P., Vaughen D. A. Effect of prolonged cold exposure on the glycolytic enzymes of liver and muscle.—Amer. j. Phys., 1960, vol. 198.

- Hochachka P. W., Hayes F. R. The effect of temperature acclimation on pathways of metabolism in the front.—*Canad. j. Zool.*, 1962, vol. 40.
- Hochachka P. W., Somero G. N. The adaptation of enzymes to temperature.—*Comp. Biochem. Phys.*, 1968, vol. 27.
- Hornsey S. The effect of hypothermia on the radiosensitivity of mice to whole-body irradiation.—*Proc. Roy. Soc. B*, 1957, vol. 147.
- Jacobson K. B., Murphy J. B., Dunaway P. B. Phylogenetic relationships of rodents on the basis of isoenzymes of lactate dehydrogenase.—*Comp. Biochem. Phys.*, 1969, vol. 28.
- Limperos G., Mosher W. A. Protection of mice against irradiation by thiourea.—*Science*, 1950, vol. 112.
- Levine H. B., Garber E. D. Detection of rough dissociant of *Pasteurella pestis* with tetrazolium chloride.—*J. Bacteriol.*, 1950, vol. 60, N 4.
- Lenard G. Dehydrogenase activity, as criterion for the determination of toxic effects on biological purification systems.—*Hydrobiologia*, 1965, vol. 25.
- Martius C., Hess B. The mode of action of thyroxine.—*Arch. Biochem. a. Biophys.*, 1951, vol. 33.
- Mager M., Blatt W. F., Newman R. W. Lactic dehydrogenase isozymes: variation in the plasma of men exposed to cold.—*J. Appl. Phys.*, 1968, vol. 24, N 5.
- Masoro E. J., Felts J. M. A biochemical mechanism for the depression in hepatic acetate oxidation in fasted coldexposed rats.—*J. Biol. Chem.*, 1959, vol. 234.
- Matheja J., Gegens E. T. Molekulare Entwicklung mineralisationsfähiger organischer Matrizen.—*Neues Jb. Geol. Paläontol. Monatsh.*, 1968, N 4.
- Medina H., Bacila M. Reversal by acetylcholine of the inhibition by thyroxine of oxidative phosphorylation in guinea-pig heart sarcosomes.—*Nature*, 1959, vol. 184.
- Monis B., Beback J. F. Tetrazolium salts and identification of *Corynebacterium diphtheriae*.—*Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1962, vol. 111, N 1.
- Morrison J. H., Kronheim S. The cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase in mouse leucocytes.—*J. Histochem. Cytochem.*, 1962, vol. 10, N 4.
- Park G. H., Meriwether B. P., Park C. R. The uncoupling of oxidative phosphorylation by thyroxine and triiodothyronine in ultrasonic extracts of liver mitochondria.—*Biochem. biophys. Acta*, 1958, vol. 28.
- Panagos S. L., Beyer R. E. Oxidative phosphorylation in liver mitochondria from cold-exposed rats.—*Amer. j. Phys.*, 1960, vol. 199.
- Panagos S. L., Beyer R. E., Masoro E. J. Oxidative phosphorylation in liver mitochondria from cold-exposed rats.—*Amer. Biochem. biophys. Acta*, 1958, vol. 29.
- Patkin J., Masoro E. J. Effect of cold stress on mitochondrial oxidative phosphorylation.—*Amer. j. Phys.*, 1960, vol. 199.
- Reynafarje B. Pyridine nucleotide oxidases and transhydrogenase in acclimatization to high altitude.—*Amer. Physiol.*, 1961, vol. 200.
- Selye H. The stress of life. Mc. Graw-Hill Co., NG-Ld-Toronto, 1956.
- Turner M. L. The effect of thyroxine and dinitrophenol on the thermal responses to cold.—*Endocrinology*, 1964, vol. 38.
- Winner B. Statistical principles in experimental.—*Desing*, 1962, N 4L.

О. А. ЖИГАЛЬСКИЙ, В. Я. ИЗАКОВ

ИЗУЧЕНИЕ СОВМЕСТНОГО ВЛИЯНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ, ЧАСТОТЫ СЕРДЦЕБИЕНИЯ И РАСТЯЖЕНИЯ НА СОКРАТИМОСТЬ МИОКАРДА

Изучение сократимости сердечной мышцы позволило выяснить раздельное влияние на амплитуду сокращения таких факторов, как частота сердцебиений (Орлов и др., 1971 а, б), степень предварительного растяжения (Жигальский, Изаков, 1972 а, б), температура (Изаков, Элик, 1969), а также ионов натрия, калия и кальция и ряда фармакологических веществ (Изаков и др., 1971, 1972; Гнисько и др., 1972; Орлов, Четверикова, 1970; Сальманович, 1966). Существо эксперимента состояло в том, что все факторы фиксировались на определенном уровне и при вариации какого-то одного (или реже двух) проверялось его влияние на исследуемый параметр (чаще всего на максимальную силу сокращения). Это — традиционный подход исследования, применяемый для изучения физико-химических механизмов явлений, в том числе для изучения механизмов, управляющих сократимостью миокарда.

Однако такой подход не может решить всех проблем, стоящих перед исследователями. Во-первых, не решаются задачи на оптимальность, а во-вторых, невозможно выявить эффекты, которые возникают при одновременном изменении многих факторов. К решению оптимальных задач приводят потребности медицины — практика требует, чтобы сердце не просто улучшало сократимость при данном лечебном воздействии, а именно оптимально, например, давало как можно большую величину систолического выброса (оптимизация по силе сокращения), как можно быстрее переходило с одного режима на другой (оптимальность по быстродействию), сокращалось при минимальных затратах энергии (оптимальность по экономическому критерию) и т. д. Кроме того, при действии того или иного лечебного фактора (главным образом фармакологических веществ)

требуется не только оптимальный подбор дозы, но и фона (физико-химические свойства среды, частота сердцебиений, степень диастолического заполнения), на котором разворачивается его действие.

Задачи на оптимальность, в том числе и в отношении сократимости миокарда, могут быть использованы при решении ряда биологических проблем, как-то: сравнительно-физиологическая оценка условий оптимального функционирования миокарда, изменение условий оптимума при адаптациях, при изменениях условий существования вида, при сопоставлении физиологических характеристик различных форм одного животного, обитающих в разных климатических зонах. Необходимое условие поиска оптимума в неуправляемом эксперименте — предварительное получение адекватной математической модели. Поиск математической модели многофакторного процесса необходим и вне решения оптимальных задач. Обычный метод фиксированных переменных не позволяет оценить эффекты, возникающие при совместном действии факторов, а если и позволяет, то ценой длительного, громоздкого эксперимента и не менее громоздких расчетов.

Учет всех факторов, определяющих ход процесса, весьма сложен. Даже те математические выражения, которые удалось получить, требуют значительного времени для расчетов. Более точные выражения сделают расчеты более сложными, но не дадут необходимой точности. Методы исследования, основанные на анализе и учете простейших причинно-следственных связей, в случае сложных задач оказываются практически непригодными и недостаточными (Налимов, 1971). Поэтому, помимо классического подхода, который необходим для понимания «физики» процесса, требуется применение статистических методов исследования. В связи с этим эксперименты по изучению физиологии миокарда как мышечной единицы (абстрагируясь от его роли в целом организме и его гемодинамической функции) можно разбить на две группы:

1) проверка основных теоретических положений, разработка методов исследования и изучение влияния конкретных физических, физико-химических и фармакологических воздействий (ионы, потенциал, растяжение и т. д.)

2) исследования, связанные с оптимизацией и отыскиванием наилучших режимов работы миокарда.

Вопросы методики первой группы носят специфический характер и всякий раз имеют специфическое решение. Наоборот, методика исследования второй группы независима от того, какой процесс и по какому параметру оптимизируется; опыты выполняются по единой методике (с единой математической основой). Применению такого подхода посвящена настоящая статья. Статистические модели, получаемые методами активного планирования, в некотором смысле можно считать противо-

положностью физико-химическому моделированию, поскольку механизмы явления нас не интересуют и объект (сердце) заранее рассматривается как «черный ящик».

Особенность мышечного сокращения сердца состоит в том, что это процесс многофакторный. Обилие факторов усложняет эксперименты, удорожает их, затягивает на длительный период, что само по себе ухудшает воспроизводимость данных. Даже если отобрать для исследования семь важнейших факторов (частота сердцебиений, температура, исходная длина мышцы, содержание ионов Na, Ca, K, предыстория деятельности) и делать опыты только в трехкратной повторности (что недостаточно), то нужно поставить $3^7 = 6561$ опыт, а если число повторностей свести к пяти, то получается астрономическое число. Вместе с тем выполнение исследований в неполном объеме не дало бы объективной информации о процессе, сделало бы исследование неполным. Кроме того, опыты, выполненные в течение длительного времени, вообще несопоставимы, так как возникают неконтролируемые изменения в составе животных, установке и т. д.

Выход из такого положения состоит в том, чтобы выбрать такой метод, который позволил бы существенно ускорить процесс проведения эксперимента и обработки полученных данных и давал бы одновременно возможность получить математическую модель изучаемого процесса. Таким является молодой, только входящий в обиход, но уже хорошо зарекомендовавший себя в исследованиях технологических процессов (Налимов, Чернова, 1965; Хикс, 1967; Адлер, Грановский, 1967) метод активного планирования. Этот метод является выражением нового, кибернетического подхода к исследованию. Он особенно ценен при неполном знании механизма явлений, как это имеет место в нашем случае. Речь идет о новой концепции, о новом способе построения моделей процесса, о способе сокращения времени и средств и повышения производительности труда исследователя.

В настоящей работе решаются следующие задачи с применением методов активного планирования:

- 1) оценка степени влияния управляющих факторов на силу сокращения и эффектов взаимодействия факторов;
- 2) создание математической модели сокращений сердечной мышцы.

Хотя число факторов, влияющих на сократимость миокарда, велико, однако в процессе нормальной жизнедеятельности состав и физико-химические свойства внутренней среды остаются на более или менее постоянном уровне. Поэтому первый путь при использовании указанного выше подхода состоял в отборе факторов, управляющих сокращениями непрерывно. Таковыми для миокарда лягушки являются частота сердцебиений, степень предварительного растяжения (исходная длина) и

температура. Сложнее обстоит дело, когда в число управляющих факторов включаются концентрации ионов. Как показывают наши исследования и литературные данные (Орлов, Изиков, 1969), эффект концентрации ионов зависит от времени и, как правило, он фазный. С другой стороны, на одном препарате даже при использовании оптимальных планов невозможно реализовать всю матрицу плана из-за большого числа опытов и наличия временного дрейфа. Сила сокращения полоски варьирует от препарата к препарату и зависит от ее размеров и геометрии расположения волокон. Даже при стандартизации величины полоски геометрия расположения волокон создает неконтролируемую помеху. Поэтому пока отсутствует возможность построения модели с оптимизацией силы сокращений в таком многофакторном эксперименте, где учитывается ионный состав среды.

Ввиду сказанного и больших естественных вариаций между препаратами, математические модели отыскивали для каждого препарата в отдельности и затем модели сравнивали.

Опыты проведены на пяти препаратах без повторностей, т. е. каждому варианту соответствует один y . Для определения $s^2\{y\}$ предварительно ставили серию опытов в 10 повторностях (один из вариантов матрицы факторного эксперимента многократно повторялся). Эксперименты проводили на полосках желудочка миокарда лягушки *Rana ridibunda*. Механическую активность регистрировали механотроном. Полное описание деталей установки дано ранее (Гинтько и др., 1972).

Теоретические соображения и предварительные эксперименты позволили отобрать для исследования следующие факторы:

	Точность фиксации	Диапазон
Период сердцебиений $T(x_2)$, сек	0,01	0,1—0,4
Растяжение $P(x_3)$, мг	20	100—400
Температура $t(x_1)$, °C	0,5	15—25

Частота сердцебиений сверху ограничена пропускной способностью миокарда, снизу — разумным пределом, т. е. той частотой, при которой предшествующая активность влияет на последующую. Растяжение снизу условно ограничено 100 мг, сверху — возникающими нелинейностями.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты расчетов приведены в таблице (для каждого опыта получены уравнения регрессий). Обращает на себя внимание, что понижение температуры ($-x_1$) увеличение частоты стимуляции (x_2) и степени растяжения (x_3) приводят к увеличению максимальной силы сокращения. Аналогичные результаты вы-

Матрица планирования ПФЭ типа 2^3 , результаты и данные регрессионного анализа в опыте по изучению совместного влияния температуры, частоты сердцебиений и растяжения на сократимость миокарда

№ варианта	Независимые переменные			Сократимость миокарда, мг		Статистические показатели
	x_1	x_2	x_3	y_i	\bar{y}	

Опыт 1

1	—	—	—	146	141,4	$b_0=287; b_1=-85,4; b_2=73,5;$ $b_3=134,8; b_{12}=-37,1; b_{23}=33,3;$ $b_{13}=-18,8;$ $s^2\{y_i\}=52,73; s^2\{\bar{y}\}=6,59;$ $s^2\{b_i\}=0,82; s\{b_i\}=0,90;$ $t_{0,95}\{b_i\}=2,12; t_{0,99}\{b_i\}=3,15;$ $s_{ад}^2=293,1 < F_{s^2}\{\bar{y}\}=430,3;$ $y=287-85,4x_1+73,5x_2+134,8x_3-$ $-37,1x_1x_2+33,3x_2x_3-18,8x_1x_3.$
2	+	—	—	75,5	82,4	
3	—	+	—	291,5	296,2	
4	+	+	—	96,0	88,8	
5	—	—	+	375,0	382,2	
6	+	—	+	252,6	248,0	
7	—	+	+	676,9	669,8	
8	+	+	+	382,5	387,2	

Опыт 2

1	—	—	—	88,3	78,8	$b_0=126,3; b_1=-64,1; b_2=37,1;$ $b_3=36,0; b_{12}=-28,2; b_{23}=9,4;$ $b_{13}=-19,7;$ $s^2\{y_i\}=93,86; s^2\{\bar{y}\}=13,40;$ $s^2\{b_i\}=1,67; s\{b_i\}=1,29;$ $t_{0,95}\{b_i\}=3,04; t_{0,99}\{b_i\}=4,51;$ $s_{ад}^2=703,0 < F_{s^2}\{\bar{y}\}=806,7;$ $y=126,3-64,1x_1+37,1x_2+36,0x_3-$ $-28,2x_1x_2+9,4x_2x_3-19,7x_1x_3.$
2	+	—	—	64,1	56,4	
3	—	+	—	181,0	190,6	
4	+	+	—	55,0	45,4	
5	—	—	+	162,0	171,4	
6	+	—	+	68,7	60,2	
7	—	+	+	330,4	320,8	
8	+	+	+	87,3	99,8	

Опыт 3

1	—	—	—	175	171,5	$b_0=357,4; b_1=-47,8; b_2=75,7;$ $b_3=171,4; b_{12}=-20,5; b_{23}=26,3;$ $b_{13}=-19,4;$ $s^2\{y_i\}=23,59; s^2\{\bar{y}\}=2,94;$ $s^2\{b_i\}=0,36; s\{b_i\}=0,6;$ $t_{0,95}\{b_i\}=1,41; t_{0,99}\{b_i\}=2,1;$ $s_{ад}^2=55,3 < F_{s^2}\{\bar{y}\}=192,5;$ $y=357,4-47,8x_1+75,7x_2+171,4x_3-$ $-20,5x_1x_2+26,3x_2x_3-19,4x_1x_3.$
2	+	—	—	98,3	101,7	
3	—	+	—	307,7	311,3	
4	+	+	—	163,0	159,5	
5	—	—	+	499,2	500,5	
6	+	—	+	354,4	353,1	
7	—	+	+	746,7	745,5	
8	+	+	+	514,8	516,4	

№ варианта	Независимые переменные			Сократимость миокарда, мг		Статистические показатели
	x_1	x_2	x_3	y_i	Δy_i	
Опыт 4						
1	—	—	—	135,7	135,7	$b_0=332,1; b_1=-166,9; b_2=48,2;$ $b_3=-214,8; b_{12}=-14,8; b_{23}=17,2;$ $b_{13}=-102,7;$ $s^2\{y_i\}=41,5; s^2\{\bar{y}\}=5,18;$ $s\{b_i\}=0,64; s\{b_i\}=0,8;$ $t_{0,95}\{b_i\}=1,88; t_{0,99}\{b_i\}=2,8;$ $s_{\text{зад}}=324 < F_{s^2}\{\bar{y}\}=338,6;$ $y=332,1 - 166,9x_1 + 48,2x_2 -$ $-214,8x_3 - 14,8x_1x_2 - 14,8x_1x_3 +$ $+17,2x_2x_3 - 102,7x_1x_3$
2	+	—	—	39,9	37,0	
3	—	+	—	217,3	227,3	
4	+	+	—	59,2	69,3	
5	—	—	+	731,3	736,3	
6	+	—	+	231,6	226,7	
7	—	+	+	901,6	896,7	
8	+	+	+	322,8	327,9	

Опыт 5						
1	—	—	—	59,5	49,7	$b_0=164; b_1=-45,9; b_2=46,6;$ $b_3=81,0; b_{12}=-28,4; b_{23}=16,8;$ $b_{13}=-20,4;$ $s^2\{y_i\}=87,29; s^2\{\bar{y}\}=10,9;$ $s\{b_i\}=1,36; s\{b_i\}=1,17;$ $t_{0,95}\{b_i\}=2,76; t_{0,99}\{b_i\}=4,09;$ $s_{\text{зад}}=546 < F_{s^2}\{\bar{y}\}=712,4;$ $y=164 - 45,9x_1 + 46,6x_2 + 31,0x_3 -$ $-28,4x_1x_2 + 16,8x_2x_3 - 20,4x_1x_3$
2	+	—	—	47,0	55,5	
3	—	+	—	160	161,1	
4	+	+	—	65,8	58,3	
5	—	—	+	210,1	220,1	
6	+	—	+	153,0	144,3	
7	—	+	+	409,8	403,7	
8	+	+	+	207,1	214,3	

текают из опытов с отдельным влиянием этих факторов. В дополнение можно утверждать, что увеличение температуры на 1° равносильно в выбранном температурном диапазоне увеличению частоты на 0,02—0,03 гц. Следовательно, чтобы компенсировать увеличение температуры на 1° , нужно изменить частоту сердцебиений на 0,02—0,03 гц. Сопоставление коэффициента, оценивающего влияние растяжения, с другими коэффициентами не имеет пока большого смысла, ибо неизвестен модуль перехода к величинам, действующим в целом сердце.

Приведенные данные свидетельствуют также о существовании в системе регуляций сократимости миокарда членов взаимодействия. Это означает, что влияние температуры зависит от уровня, на котором находятся частота и растяжение. Аналогичный вывод справедлив и для растяжения (его действие определяется текущими значениями температуры и частоты), и для частоты. Стационарные характеристики хронотропии зависят от действующей температуры и растяжения. То, что имеется взаимодействие между частотой и растяжением, не

противоречит ранее сделанному выводу о том, что растяжение не влияет на динамические характеристики гомеометрического регулятора, ибо коэффициент при x_2x_3 свидетельствует об эффекте растяжения на статическую характеристику хронотропии. Следует также обратить внимание на то, что коэффициенты при x_1x_2 и x_1x_3 таковы, что взаимодействия стремятся увеличить сократимость миокарда именно при низких температурах.

Биологическая значимость эффектов взаимодействия становится ясной, если принять идею о существовании температурного квазигомеостаза у холоднокровных, направленного на увеличение сократимости миокарда при низких температурах, что как бы компенсирует влияние температуры, направленное на снижение скорости биохимических процессов, а следовательно, и «активности» животного. Таким образом, при низкой температуре гетерометрический и гомеометрический регуляторы сократимости становятся более эффективными. Вклад взаимодействия температура — растяжение в сократимость при низких температурах должен особенно возрастать в связи с тем, что при низких температурах заполнение желудков кровью резко увеличивается вследствие удлинения диастолического интервала. С другой стороны, повышение чувствительности к частоте при низких температурах имеет «смысл» в связи с малыми вариациями частоты сердцебиений при низких температурах. Приведенные математические модели получены, когда факторы (t° , P , T) были независимыми. Однако в реальных условиях частота сердцебиений является функцией температуры, а степень растяжения — функцией частоты, а следовательно, и температуры, поэтому

$$y = b_0 - b_1 t^\circ + b_2 T(t^\circ) + b_3 P\psi[f(t^\circ)] - b_{12} t^\circ T(t^\circ) - b_{13} t^\circ P\psi[f(t^\circ)] + b_{23} T(t^\circ) P\psi[f(t^\circ)].$$

При выяснении зависимости $P\psi[f(t^\circ)]$ удается построить относительно полную математическую модель влияния температуры на сократимость миокарда холоднокровных животных.

ЛИТЕРАТУРА

- Адлер Ю. П., Грановский Ю. В. Обзор прикладных работ по планированию эксперимента. Изд-во МГУ, 1967.
- Гнидько Р. В., Изаков В. Я., Орлов Р. С. Установка для изучения связи возбуждения и сокращения клеток миокарда лягушки. — Физиол. ж. СССР, 1972, т. 1, № 58.
- Гнидько Р. В., Орлов Р. С., Изаков В. Я., Ведерников Ю. Н. О возможности смены доминирующего типа электрогенеза в клетках миокарда лягушки *Rana temporaria* под влиянием двухвалентных катионов. — Ж. эволюц. биол. и физиол., 1972, № 8.
- Жигальский О. А., Изаков В. Я. Особенности механической активности миокарда при низких температурах. — Теоретические проблемы действия низких температур на организм. Мат-лы 3-й Всесоюз. конф. Владимир, 1972а.

- Жигальский О. А., Изаков В. Я. О взаимоотношении гомеометрической и гетерометрической систем регуляции сократимости миокарда.— Мат-лы IV Международного биофизического конгресса. М., 1972.
- Изаков В. Я., Гнистько Р. В., Шевелев В. М. К действию тетродоксина на электрическую и механическую активность ритмически работающего миокарда.— Физиол. ж. СССР, 1971, т. 3, № 57.
- Изаков В. Я., Гнистько Р. В., Шевелев В. М. Исследование роли ионов натрия в электромеханическом сопряжении в клетках миокарда.— Труды IV Международного биофизического конгресса, т. 2, М., 1972.
- Изаков В. Я., Элик Е. Ф. Влияние температуры на внутриклеточно-регистрируемые потенциалы действия.— Физиол. ж. СССР, 1969, т. 6, № 55.
- Налимов В. В. Теория эксперимента. М., «Наука», 1971.
- Налимов В. В., Чернова Н. А. Статистические методы планирования экспериментов. М., «Наука», 1965.
- Орлов Р. С., Изаков В. Я. Основные вопросы механизма сопряжения сокращения и возбуждения в миокарде.— Физиол. ж. СССР, 1969, т. 3, № 55.
- Орлов Р. С., Изаков В. Я., Кеткин А. Т., Плеханов И. П. Регуляторные механизмы клеток гладкой мускулатуры и миокарда. М., «Наука», 1971а.
- Орлов Р. С., Изаков В. Я., Шевелев В. М. Природа частотозависимого саморегуляторного механизма сокращений клеток миокарда.— Физиол. ж. СССР, 1971б, т. 2, № 57.
- Орлов Р. С., Четверикова Е. Ф. Роль ионов кальция в следовых электрических и механических процессах клеток сердечной мышцы.— Докл. АН СССР, 1970, т. 2, № 192.
- Сальманович В. Я. Электролиты и сокращение миокарда.— Физиология и патология сердечно-сосудистой системы. Научный обзор, 1966, вып. I (2).
- Хикс Ч. Р. Основные принципы планирования эксперимента. М., «Мир», 1967.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ ПЛАНИРОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА
В БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ, 1975

УДК 571.1 : 51+591.5

Г. Г. РУНКОВА, В. Н. МАКСИМОВ, Л. А. КОВАЛЬЧУК,
И. М. ХОХУТКИН

ИНТЕНСИВНОСТЬ ЭКСТРАМИТОХОНДРИАЛЬНЫХ
И МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ПУТЕЙ ОКИСЛЕНИЯ
У РАЗЛИЧНЫХ МОРФ *BRADYBAENA LANTZI*
В УСЛОВИЯХ ОХЛАЖДЕНИЯ

В опытах на моллюсках и амфибиях *Bradybaena schrencki* и *Rana arvalis* были обнаружены достоверные различия в эндогенной активности оксидаз у полосатых и бесполосых морф указанных видов в условиях +15, +18°C (Рункова, статья в наст. сборнике).

Цель настоящей работы — выяснить вопрос о наличии тех же различий у лево- и правовращающих морф *Bradybaena lantzi* при определении эндогенной активности оксидаз в гомогенатах и гналоплазме животных в условиях более широкого диапазона температур.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Моллюски *Bradybaena lantzi*, использованные в опытах, собраны в районе г. Алма-Аты (исследовалась природная популяция). Методика приготовления гомогената и определение активности эндогенных оксидаз по чувствительности тетразоловой реакции к кислороду воздуха описана нами ранее (Ковальчук и др., 1974). Гналоплазму готовили из гомогенатов ноги взрослой особи при центрифугировании в условиях 9000 г. Опыты ставили по плану полного факторного эксперимента типа 2²⁻⁴ и активность оксидаз определяли в гналоплазме и гомогенате тканей ноги моллюска в зависимости от принадлежности его к лево- и правовращающему генетическому варианту в условиях выдерживания животного при 30, 20, 10 и 0°C в течение 15 мин.

Расчет коэффициентов регрессии выполнен по схеме Ятса (Максимов, Федоров, 1969). Значимость коэффициентов регрес-

Таблица 1

Независимые переменные и их уровни

Уровень	Морфа x_1	Вид препарата x_2	Температура 15-минутного воздействия, In vivo, °C x_3
Первый (+1)	Правозакрученная	Гомогенат	+30
Второй (-1)	Левозакрученная	Гиалоплазма	+20
Третий (+3)	—	—	+10
Четвертый (-3)	—	—	0

Таблица 2

Матрица планирования ПФЭ 2³⁻⁴, результаты опытов и данные регрессионного анализа

№ опыта	Кодированные переменные			$\frac{T\bar{X}_a}{T\bar{X}_b}$	Этапы формализованной схемы Ятса				Эфф-факт	Обозначение эфф-факта	b_i	Ранжировка	
	x_1	x_2	x_3		\bar{y}_{ij}	1	2	3				\sqrt{d}	№
1	-1	-1	-3	2,0	5,0	11,0	88,9	4,0	—	x_1	5,56	—	—
2	+1	-1	-3	3,0	6,0	11,3	18,5	4,0	4,6	x_2	—	1	0,3
3	-1	+1	-3	2,1	3,0	21,7	59,5	4,0	14,9	x_3	3,72	2	0,8
4	+1	+1	-3	3,9	8,3	44,9	23,0	4,0	5,8	x_2x_3	—	3	1,6
5	-1	-1	-1	2,0	3,2	2,8	112,1	8,94	12,5	x_1	1,40	4	1,7
6	+1	-1	-1	1,0	18,5	2,9	25,3	8,94	2,8	x_2x_3	—	5	2,0
7	-1	+1	-1	2,2	3,5	0,9	120,7	8,94	13,5	$x_1x_2x_3$	1,51	16	2,7
8	+1	+1	-1	6,1	41,4	11,9	38,0	8,94	4,2	$x_1x_2x_3$	—	7	2,8
9	-1	-1	+1	2,2	1,0	1,0	27,9	4,0	5,7	x_3^2	—	8	4,2
10	+1	-1	+1	1,0	1,8	5,3	10,9	4,0	2,7	$x_1x_3^2$	—	9	4,6
11	-1	+1	+1	8,2	-1,0	15,3	18,3	4,0	4,6	$x_2x_3^2$	—	10	4,6
12	+1	+1	+1	10,3	3,9	37,9	6,6	4,0	1,6	$x_1x_2x_3^2$	—	11	5,7
13	-1	-1	+3	2,3	-1,2	0,8	2,7	8,94	0,3	x_3^3	—	12	5,8
14	+1	-1	+3	1,2	2,1	4,9	15,1	8,94	1,7	$x_1x_3^3$	—	13	12,5
15	-1	+1	+3	14,2	-1,1	3,3	6,9	8,94	0,8	$x_2x_3^3$	—	14	13,5
16	+1	+1	+3	27,2	13,0	14,0	18,0	8,94	2,0	$x_1x_2x_3^3$	—	15	14,9

Примечание. Этапы 1, 2 и 3 заполнены в соответствии с алгоритмом Ятса для факторных экспериментов типа 2^{n-k}; значения эфф-фактов рассчитаны делением чисел этапа 3 на соответствующие им величины \sqrt{d} ; коэффициенты регрессии b_i найдены для факторов x_1 и x_2 делением чисел этапа 3 на 16, а для x_3 — на 8 (Good, 1958; Margolin, 1967; Максимов, Федоров, 1969).

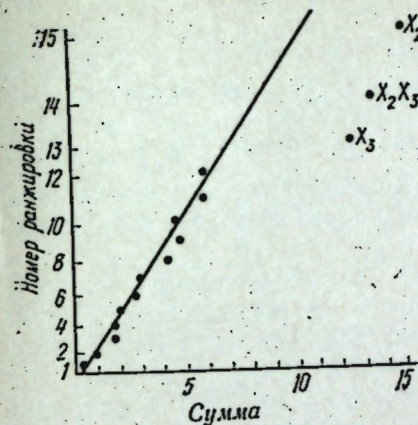
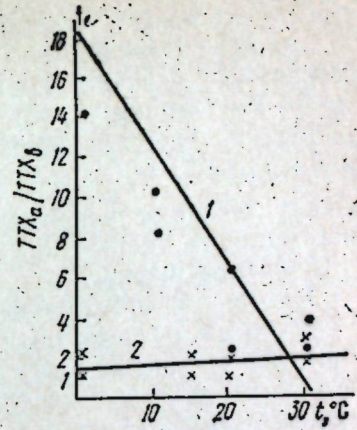


Рис. 1. Полувероятностный график к табл. 2.

Рис. 2. Эндогенная активность оксидаз в гомогенатах и гиалоплазме лево- и правозакручивающих морф *Bradybaena lantzi* после 15-минутного выдерживания интактных животных в условиях разных температур. 1 — гомогенат, 2 — гиалоплазма.

сни, а следовательно, и достоверность различий в активности оксидаз в гиалоплазме и гомогенате лево- и правозакручивающих морф среднеазиатского вида моллюсков в условиях четырех исследованных температур определяли методом построения полувероятностного графика (Margolin, 1967). Условия опытов (факторы) представлены в табл. 1, план опытов, результаты эксперимента и данные регрессионного анализа — в табл. 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По данным поставленной серии опытов (см. табл. 2) построен полувероятностный график (рис. 1). Отчетливо видно, что точки, соответствующие меньшим, незначимым эффектам, хорошо ложатся на прямую, проходящую через начало координат. Это указывает на отсутствие значительных отклонений от нормального распределения у результатов измерения активности оксидаз в гомогенате и гиалоплазме животных (ТТХ_а/ТТХ_б). Эффекты, резко выпадающие из нормальной совокупности (x_2 , x_3 и x_2x_3), соответствуют значимым коэффициентам регрессии. Следовательно, активность эндогенных оксидаз в наших опытах достоверно неодинакова в гиалоплазме и гомогенате исследованных тканей (x_2), и эти различия зависят в свою очередь от температурного воздействия на интактное животное (x_2x_3). Уравнение с соответствующими значимыми коэффициентами регрессии имеет вид $y = 5,56 + 3,72x_2 + 1,4x_3 + 1,51x_2x_3$.

где y — активность оксидаз ($ТТХ_a/ТТХ_b$) и x_2, x_3, x_2x_3 — независимые переменные (факторы) в натуральных единицах. Используя условия кодирования ($x_2 = -1$ — гиалоплазма и $x_2 = +1$ — гомогенат), мы получаем соответствующие уравнения регрессии для гиалоплазмы и гомогената: $y = 1,84 - 0,11x_3$ и $y = 9,88 + 2,91x_3$. Данные уравнения позволили рассчитать теоретические величины активности оксидаз y для гиалоплазмы и гомогената тканей ноги моллюска в условиях четырех исследованных температур.

На рис. 2 представлены точки, соответствующие экспериментальным и расчетным данным, и построены соответствующие кривые зависимости активности оксидаз в гомогенате и гиалоплазме от температуры в условиях опыта *in vivo*. Незначимость эффектов x_1 и x_1x_3 указывает на отсутствие различий в активности оксидаз между лево- и правовращающими вариантами *Bradybaena lantzi* в пределах изученных температур. Анализ значимых коэффициентов регрессии (см. рис. 1 и 2) дает основание считать, что обе морфы *Bradybaena lantzi* увеличивают активность митохондриальных оксидаз при охлаждении. Экстрамитохондриальные пути окисления в механизмах адаптации лево- и правовращающих вариантов *Bradybaena lantzi* к низким температурам, по-видимому, не имеют существенного значения. Признаков дифференциации по эндогенной активности оксидаз внутри этого вида при изучении данной популяции нами не обнаружено.

ЛИТЕРАТУРА

- Ковальчук Л. А., Рункова Г. Г., Хохуткин И. М. Интенсивность окислительно-восстановительных процессов и их реакция на тироксин у различных морф амфибий и моллюсков. — Экология, 1974, № 3.
- Максимов В. Н., Федоров В. Д. Применение математического планирования эксперимента при обыскании оптимальных условий культивирования микроорганизмов. М., Изд-во МГУ, 1969.
- Good J. The interaction algorithm and practical fourier analysis. — J. Reg. Statist., Ser. B., 1958, vol. 20.
- Margolin V. H. Systematic methods for analysing $2^n 3^m$ factorial experiments with applications. — Technometrics, 1967, vol. 9, N 2.

УДК 571.1 : 51 + 591.5

Г. Г. РУНКОВА, В. Н. МАКСИМОВ, Л. А. КОВАЛЬЧУК,
И. М. ХОХУТКИН

О ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЭНДОГЕННЫХ ОКСИДАЗ В ГОМОГЕНАТАХ ДВУХ МОРФ *BRADYBAENA LANTZI* К ТИРОКСИНУ

В поисках признаков биохимической дифференциации внутри видов и отдельных популяций животных нами обнаружены достоверные различия и склонность к их появлению у двух подвидов полевки-экономки и двух морф *Bradybaena schrencki* по активности оксидаз и чувствительности их к тироксину (Рункова и др., 1974; Ковальчук и др., 1974). При изучении в том же плане лево- и правозакрученных морф среднеазиатского вида моллюсков *Bradybaena lantzi* при охлаждении интактных животных достоверных различий между морфами по эндогенной активности оксидаз обнаружить не удалось (см. статью Рунковой и др. в наст. сборнике). Представляло интерес исследовать *Bradybaena lantzi* и в отношении чувствительности оксидаз обеих морф к тироксину, используя не одну, а несколько концентраций гормона и взяв в качестве объекта животных из двух природных популяций вида.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Моллюски *Bradybaena lantzi*, исследованные в данной серии опытов, собраны в районе г. Алма-Аты: левозакрученные морфы популяции А — на высокогорном участке (~2000 м), правозакрученные — у подножия гор (~1000 м). Лево- и правозакрученные морфы популяции В — с одного участка (~1200 м).

Методика приготовления гомогената из тканей ноги моллюска и методика измерения активности эндогенных оксидаз описана в предыдущей работе (см. статью Рунковой в наст. сборнике).

Опыты поставлены по плану полного факторного эксперимента типа $2^3 \cdot 4$. В серии определяли тетразолвосстанавливаю-

№ варианта	Кодированные независимые переменные				ТТХ-восстанавливающая активность, $\frac{e}{мл}$ $\cdot 10^3$	Этапы формализованной схемы Ятса			Эффект	Обозначение эффекта	b_i	Ранжировка		ТТХ-восстанавливающая активность, $\frac{e}{мл}$ $\cdot 10^3$	ТТХ _а ТТХ _в
	x_1	x_2	x_3	x_4		1	2	3				4	\sqrt{d}		
1	+	+	+	+	20	40	110	313	1701	5,6	53,15	1	8	13,51	1,96
2	+	+	+	-	20	70	203	383	467	5,6	14,59	2	10	18,63	1,70
3	+	+	-	+	10	63	123	370	407	5,6	12,72	3	12	14,89	1,87
4	+	+	-	-	60	140	260	635	385	5,6	12,03	4	14	68,13	1,19
5	+	-	+	+	40	50	124	53	753	5,6	23,53	5	16	26,49	-
6	+	-	+	-	23	73	246	231	79	5,6	-	6	17	31,61	-
7	+	-	-	+	60	90	117	130	127	5,6	-	7	18	27,87	-
8	+	-	-	-	80	170	518	53	161	5,6	5,96	8	20	81,11	-
9	-	+	+	+	13	37	50	107	953	12,6	-	9	21	14,06	3,54
10	-	+	+	-	37	87	3	103	101	12,6	-	10	22	19,18	2,86
11	-	+	-	+	10	63	77	170	173	12,6	-	11	22	15,44	3,31
12	-	+	-	-	63	183	154	27	153	12,6	-	12	22	68,68	1,52
13	-	-	+	+	23	40	84	87	909	12,6	5,68	13	23	49,76	-
14	-	-	+	-	67	77	46	95	287	12,6	-	14	24	58,88	-
15	-	-	-	+	30	264	17	50	269	12,6	-	15	25	51,14	-
16	-	-	-	-	140	254	70	153	513	12,6	-	16	27	104,38	-
17	+	+	+	+	10	0	30	93	195	5,6	-	17	28	14,62	5,0
18	+	+	+	-	27	17	50	137	255	5,6	-	18	28	19,74	3,96
19	+	+	-	+	10	17	23	122	139	5,6	-	19	29	16,00	4,65
20	+	+	-	-	77	20	80	401	95	5,6	-	20	34	69,24	1,84
21	+	-	+	+	20	24	50	47	235	5,6	-	21	36	73,04	-
22	+	-	+	-	43	53	120	77	155	5,6	-	22	40	78,16	-
23	+	-	-	+	80	44	37	38	127	5,6	-	22	42	74,42	-
24	+	-	-	-	103	110	10	87	261	5,6	-	24	45	127,66	-
25	-	+	+	+	20	17	50	47	361	12,6	-	25	46	15,17	6,35
26	-	+	+	-	20	67	37	57	303	12,6	-	26	68	20,29	5,00
27	-	+	-	+	47	23	29	70	281	12,6	-	27	72	16,55	5,90
28	-	+	-	-	30	66	66	47	201	12,6	-	28	72	69,79	2,16
29	-	-	+	+	157	0	50	13	353	12,6	-	29	75	96,31	-
30	-	-	+	-	107	17	0	37	251	12,6	-	30	83	101,43	-
31	-	-	-	+	67	50	17	50	133	12,6	-	31	133	97,69	-
32	-	-	-	-	187	120	170	187	461	12,6	-	32	-	150,93	-

Таблица 2

Независимые переменные и их уровни

Уровень	Популяции x_1	Морфа x_2	Условие инкубации гомогената x_3	Концентрация тироксина в гомогенате x_4
Первый (-3)	A	Правозакрученные	Аргон	0,0
Второй (-1)	B	Левозакрученные	Воздух	15,0
Третий (+1)	-	=	=	30,0
Четвертый (+3)	-	=	=	45,0

шую активность гомогената у двух морф x_2 из двух популяций x_1 в присутствии трех разных концентраций тироксина x_4 в зависимости от условий инкубации (в атмосфере аргона или воздуха) x_3 .

Коэффициенты регрессии рассчитаны по формализованной схеме Ятса (Максимов, Федоров, 1969) по данным тетраэзола-восстанавливающей активности (a по ТТХ_а/ТТХ_в). Значимость эффектов и коэффициентов регрессии определяли с помощью построения полувероятностного графика (Good, 1958; Margolin, 1967). На основании значимых коэффициентов регрессии составляли уравнение регрессии, по которому рассчитывали теоретические значения тетраэзола-восстанавливающей активности гомогената в атмосфере аргона и воздуха и по этим расчетным

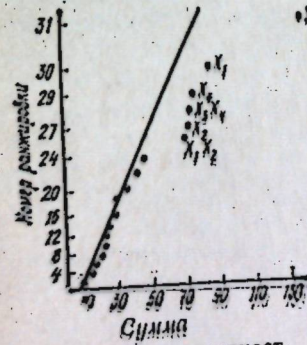


Рис. 1. Полувероятностный график, построенный по данным табл. 2.

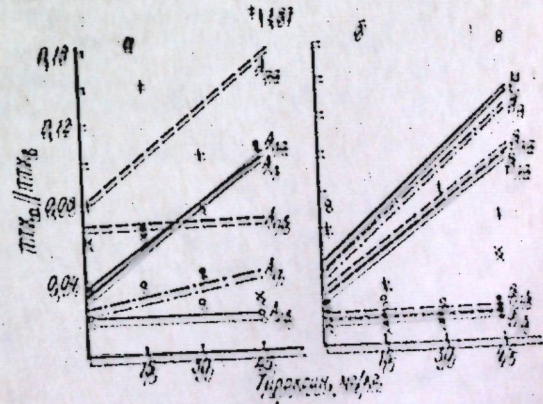


Рис. 2. Интенсивность восстановления тетраэзола и эндогенная активность гомогената двух морф *Escherichia coli* при введении возрастающих концентраций тироксина.

a — популяция A, $б$ — популяция B.
 $Вл$, $Вп$, $Ал$, $Ап$ — ТТХ_а/ТТХ_в в гомогенатах аэробной или правозакрученной морфы популяции A или B.
 $а$, $б$ — инкубация гомогената в атмосфере аргона или воздуха.

данным определяли активность эндогенных оксидаз ($ТТХ_a/ТТХ_b$).

Этот прием позволил сгладить экспериментальные данные, «отсекая» случайные отклонения, и оперировать при анализе результатов не экспериментальными значениями тетразолвосстанавливающей активности, а рассчитанными величинами $ТТХ_a/ТТХ_b$, более близкими к истинным значениям эндогенной активности оксидаз. План опытов, результаты определения и данные регрессионного анализа представлены в табл. 1, а условия опытов (факторы) — в табл. 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Построение полувероятностного графика по данным эксперимента (рис. 1) показывает, что влияние тироксина, введенного в гомогенат, на интенсивность восстановления тетразолхлорида достоверно (x_1). Однако это влияние зависит от условий инкубации гомогената (x_3x_4). Тетразолвосстанавливающая активность гомогената изменяется в атмосфере аргона. С увеличением концентрации гормона она явно возрастает у обеих морф из обеих популяций (рис. 2). В атмосфере воздуха при введении тироксина тетразоловая реакция своей интенсивности не изменяет. Обнаружены различия и между морфами (x_2), но они касаются только популяции А. В популяции В чувствительность к тироксину у обеих морф одинакова. Активность эндогенных оксидаз у левозакрученной морфы популяции А в присутствии возрастающих концентраций тироксина увеличивается в большей степени, чем у правозакрученной.

Таким образом, дифференциация по чувствительности эндогенных оксидаз к тироксину наблюдается в исследованной нами популяции *Bradybaena lantzi* и не обнаружена в популяции В.

ЛИТЕРАТУРА

- Ковальчук Л. А., Рункова Г. Г., Хохуткин И. М. Интенсивность окислительно-восстановительных процессов и их реакция на тироксин у различных морф амфибий и моллюсков.— Экология, 1974, № 3.
- Максимов В. Н., Федоров В. Д. Применение методов математического планирования эксперимента при отыскании оптимальных условий культивирования микроорганизмов. Изд-во МГУ, 1969.
- Рункова Г. Г. Опыт применения некоторых методов математического планирования эксперимента в эколого-биохимических исследованиях.— Статья в наст. сборнике.
- 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.
- Рункова Г. Г., Максимов В. Н., Ковальчук Л. А., Хохуткин И. М. Интенсивность экстрамитохондриальных и митохондриальных путей окисления у различных морф *Bradybaena lantzi* в условиях охлаждения.— Статья в наст. сборнике.
- Good J. The interaction algorithm and practical fourier analysis.— J. Roy. Statist. Soc., Ser. B, 1958, vol. 20.
- Margolin B. H. Systematic methods for analysing 2^n3^m factorial experiments with applications.— Technometrics, 1967, Bd 9, N 2.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ ПЛАНИРОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА
В БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ, 1975

УДК 571.1 : 51+591.5

Н. Ф. ЗАВАДА, Г. П. ПАВЛОВ

ГЕОГРАФИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ И ЕЕ ИЗОФЕРМЕНТОВ У УЗКОЧЕРЕПНОЙ ПОЛЕВКИ В УСЛОВИЯХ ЭКСТРЕМАЛЬНОГО ОХЛАЖДЕНИЯ

Географическую изменчивость вида чаще всего связывают с разными условиями существования. Условия жизни в Субарктике требуют интенсификации обмена веществ, которые необходимы для усиления выделения тепла и усиления ряда других процессов, связанных с сезонными изменениями жизнедеятельности организма (Шварц, 1963). Это приводит к повышению энергетических трат организмом. В этой связи особое значение приобретают приспособления, направленные на экономизацию энергии, которые в конечном счете и приводят к внутривидовой дифференциации.

Северные подвиды узкочерепной полевки отчетливо отличаются от южных по ряду морфологических и физиологических особенностей (Шварц и др., 1960). Однако биохимические процессы, лежащие в основе внутривидовой дифференциации, изучены недостаточно. При изучении внутривидовой изменчивости полевко-экономок в разных условиях охлаждения были обнаружены различия по таким показателям, как эндогенная активность оксидаз, скорость анаэробного гликолиза, активность лактатдегидрогеназы и ее изоферментов (Рункова и др., 1974; Завада, Павлов, 1973). Эти данные дали основание предполагать, что дифференциация внутри вида усиливалась анаэробным окислением углеводов.

В настоящей статье представлены результаты изучения активности лактатдегидрогеназы и ее изоферментов у самцов и самок узкочерепной полевки в условиях экстремального охлаждения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

В опытах на узкочерепных полевках (*Microtus gregalis gregalis* Pallas, *M. gregalis major* Ognev) использованы 2—3-месячные самцы и самки 7—10-го поколения животных, полу-

Активность ЛДГ и ее изоферментов в мышцах северного и южного подвида узкочерепной полевки в условиях экстремального охлаждения

Уровень	Натуральные независимые переменные			Кодированные независимые переменные				
	Пол x_1	Подвид x_2	Температура 20-минутного воздействия, °С x_3	Активность изоферментов ЛДГ, % к общей активности			Общая активность ЛДГ	
Верхний + . . .	Самка	<i>Microtus gregalis gregalis</i>	18	ЛДГ-1	ЛДГ-2	ЛДГ-3	ЛДГ-5	ЛДГ
Нижний — . . .	Самец	<i>M. gregalis major</i>	-15	\bar{y}_{ul}	\bar{y}_{ul}	\bar{y}_{ul}	\bar{y}_{ul}	\bar{y}
1	—	—	—	12,0	25,7	31,9	30,9	4,69
2	+	—	—	25,6	24,4	26,1	23,4	4,88
3	—	+	—	26,7	30,7	23,5	18,6	4,54
4	+	+	—	26,9	26,3	27,5	19,2	3,91
5	—	—	+	25,0	19,9	27,7	26,0	5,17
6	+	—	+	36,6	26,1	22,6	15,8	5,23
7	—	+	+	40,8	26,3	18,9	13,5	4,5
8	+	+	+	28,9	26,6	22,7	22,6	4,5

Примечание. Статистические показатели:

	ЛДГ-1	ЛДГ-2	ЛДГ-3	ЛДГ-5	ЛДГ
0	27,8	25,7	25,1	21,2	4,68
1	1,7	0,1	-0,39	-0,87	-0,05
2	3,0	16,7	-1,96	-2,67	-0,34
3	5,0	-1,0	-2,14	-1,67	0,17
12	4,6	-1,1	2,34	3,34	0,11
23	-1,80	1,52	0,06	0,8	0,06
23	-0,99	0,0	-0,21	1,26	0,03
123	-1,26	-0,35	-0,11	1,49	0,09
\bar{y}	80,1	31,35	28,19	30,97	0,18
(s_{t1})	3,31	2,08	2,00	2,08	0,24

енные при разведении в виварии. Основатели модельных популяций привезены из районов Среднего Урала (южные подвиды) с п-ва Ямал (северные подвиды).

Исследования проводили по плану полного факторного эксперимента (ПФЭ) типа 2³ (Максимов, Федоров, 1969). В опытах на узкочерепных полевках изучалось влияние 20-минутного

экстремального охлаждения при -15°С в зависимости от принадлежности к южному или северному подвиду и полу. Приводим независимые переменные и их уровни (см. таблицу).

Активность лактатдегидрогеназы и ее изоферментов определяли в гиалоплазме скелетной мышцы. Навеску бедренной мышцы в 100 мг гомогенизировали с 8 мл 0,05 М фосфатного буфера (рН 7,5). Полученный гомогенат центрифугировали 30 мин при 10000 g (все работы производили на холоде). Полученную гиалоплазму отделяли от осадка и использовали для определения. Общую активность лактатдегидрогеназы устанавливали оптическим тестом Варбурга по методу Генри (цит. по Асатиани, 1965).

Активность фермента находили по падению экстинкции НАД·Н₂ за 1 мин при 22°. Состав инкубационной смеси: в 2 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,5) содержалось 2,5 мг/мл НАД·Н₂, 1,0 мг/мл пирувата натрия, 0,1 мл гиалоплазмы. Активность фермента выражали в микромолях НАД·Н₂/мл и рассчитывали по формуле

$$A = \frac{\Delta E}{3,11 \cdot V}$$

где A — общая активность лактатдегидрогеназы; ΔE — изменение экстинкции за 1 мин; V — начальный объем гиалоплазмы; 3,11 — коэффициент экстинкции 1 мкмоль НАД·Н₂ при 340 нм.

Разделение изоферментов лактатдегидрогеназы проводили методом вертикального электрофореза в 5,5%-ном полиакриламидном геле, по Дитцу и Любрано (Dietz, Lubrano, 1967).

Для электрофоретического анализа применяли камеру фирмы «Reanal», рассчитанную на 12 трубок. Разделение изоферментов продолжалось 90 мин при силе тока 2,5 ма на трубку. По окончании электрофореза гели из трубок извлекали, помещали в пробирки и заливали инкубационной смесью для проявления изоферментов лактатдегидрогеназы. Инкубация длилась 2 ч при 37°С. Состав инкубационной смеси (Сафонова, Сафонова, 1971) на 100 мл 0,2 М трис-буфера (рН 7,5) содержал: 1,05 г лактата лития, 40 мг НАД, 8 мг нитросинего тетразолия, 2 мг фенозинметасульфата.

Для количественного определения изоферментов использовали микрофотометр МФ-2 с записывающей приставкой, разработанной в Институте питания АМН СССР (Бондаренко и др., 1971). Оптическую плотность отдельных электрофоретических фракций, отражающую активность изоферментов, определяли по формуле

$$s = \frac{h}{2} \cdot l$$

где s — активность изофермента, усл. единицах; h — логарифм высоты пика; l — основание пика.

Затем вычисляли процентное соотношение активности каждого изофермента в пробе по формуле

$$A = \frac{s_n \cdot 100\%}{s_{\text{общ}}}$$

где A — активность n -го изофермента, % к общей активности; s_n — активность n -го изофермента; $s_{\text{общ}}$ — сумма активностей всех изоферментов.

В процессе регрессионного анализа результатов использованы стандартные методы статистической обработки в соответствии с планом ПФЭ типа 2^3 (Налимов, 1960).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Регрессионный анализ данных показывает, что у северного подвида узкочерепной полевки общая активность лактатдегидрогеназы выше, чем у южного ($b_2 > ts\{b_i\}$). Однако активность аэробного и анаэробного гликолиза у северного подвида при этом достоверно не отличается от южного (Рункова и др., 1974). По-видимому, лактатдегидрогеназа мышц узкочерепных полевок не является ферментом, лимитирующим интенсивность гликолиза. Изоферментный спектр лактатдегидрогеназы мышц исследованного вида (см. таблицу), как оказалось, зависит от пола животного и от температурного воздействия (b_{12} , b_2 и $b_3 > ts\{b_i\}$ для отдельных изоэнзимов). Как видно из приведенных данных (см. таблицу), изоферментный спектр лактатдегидрогеназы мышц узкочерепных полевок несколько отличается от типично мышечного, для которого характерно сильное преобладание доли медленно движущихся изоферментов ЛДГ=5 и ЛДГ=4. В спектре узкочерепных полевок отмечены лишь следы ЛДГ=4, а общая активность лактатдегидрогеназы у самок южного подвида и самцов северного распределена в целом поровну между изоферментами. Если исходить из физиологической роли ЛДГ=1, которая, по мнению ряда исследователей (Cahn и др., 1962; Dawson и др., 1964), ответственна за протекание аэробного гликолиза, то такой характер распределения изоферментного спектра дает основание предположить наличие в мышцах узкочерепных полевок указанного пола и подвида одинаково развитых систем аэробного и анаэробного окисления. У самок южного подвида и самок северного, напротив, в спектре преобладает ЛДГ=1, а активность ЛДГ=3 и ЛДГ=5 незначительна.

Действие охлаждения вызывает достоверное уменьшение активности ЛДГ=1 и увеличение ЛДГ=3 в мышцах животных обоих полов и подвигов ($b^3 > ts\{b_i\}$).

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 подвигов полевки-экономки в условиях экстремального охлаждения и акклимации.— Тезисы докладов Уральской конференции молодых ученых «Человек и биосфера». Свердловск, 1973 (УНЦ АН СССР).
- 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. Применение математической статистики при анализе вещества. М., Физматгиз, 1960.
- Рункова Г. Г., Завада Н. Ф., Купцова В. В. Особенности аэробного и анаэробного метаболизма в тканях двух подвигов полевки-экономки в условиях экстремального охлаждения и акклимации.— Экология, 1974, № 3.
- Сафонов В. И., Сафонова М. П. Анализ белков и ферментов методом электрофореза в полиакриламидном геле.— Труды Всесоюзного совещания «Электрофорез в полиакриламидном геле и его применение в биологии, сельском хозяйстве, медицине, пищевой промышленности». М., 1971.
- Шварц С. С. Пути приспособления наземных позвоночных животных к условиям существования в Субарктике, т. 1. Млекопитающие — Труды Ин-та биологии УФАН СССР, 1963, вып. 33.
- Шварц С. С., Покровский А. В., Копени К. И. Сравнительное изучение некоторых биологических особенностей *M. g. gregalis*, *M. g. major* и их помесей.— Зоол. ж., 1960, т. 39, вып. 6.
- Cahn R. D., Kaplan N. O., Levine L., Lwilling E. The nature and development of LDH.— Science, 1962, vol. 136.
- Dawson D. B., Goodfriend T. L., Kaplan N. O. Function of two types LDH.— Science, 1964, vol. 143.
- Dietz, Lubrano. Separation and Quantitation of lactic Dehydrogenase Isoenzymes by Disc Electrophoresis.— Anal. Biochem., 1967, vol. 20.

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
В. Н. Максимов. Полиномиальные модели при решении задач экологической физиологии и биохимии	3
Г. Г. Рункова. Опыт применения некоторых методов математического планирования экспериментов в эколого-биохимических исследованиях	18
О. А. Жигальский, В. Я. Изаков. Изучение совместного влияния температуры, частоты сердечбиений и растяжения на сократимость миокарда	105
Г. Г. Рункова, В. Н. Максимов, Л. А. Ковальчук, И. М. Хохуткин. Интенсивность экстрамитохондриальных и митохондриальных путей окисления у различных морф <i>Bradybaena lantzi</i> в условиях охлаждения	113
Г. Г. Рункова, В. Н. Максимов, Л. А. Ковальчук, И. М. Хохуткин. О чувствительности эндогенных оксидаз в гомогенатах двух морф <i>Bradybaena lantzi</i> к тироксину	117
Н. Ф. Завада, Г. П. Павлов. Географическая изменчивость лактатдегидрогеназы и ее изоферментов у узкочерепной полевки в условиях экстремального охлаждения	121

УДК 571.1 : 51+591.5

Полиномиальные модели при решении задач экологической физиологии и биохимии. Максимов В. Н. «Математическое планирование эксперимента в биологических исследованиях». Свердловск, 1975 (УИЦ АН СССР).

Рассмотрены два типа задач многофакторных исследований: оптимизация процесса и выяснение особенностей влияния на него каждого отдельного фактора и всех их совокупностей с учетом взаимодействий. Изложены возможные практические трудности биологического исследования и даны способы преодоления их с помощью математического планирования с учетом специфики эколого-биохимического и эколого-физиологического эксперимента.

Табл. 1. Иллюстраций 4. Библ. 12 назв.

УДК 571.1 : 51+591.5

Опыт применения некоторых методов математического планирования эксперимента в эколого-биохимических исследованиях. Рункова Г. Г. «Математическое планирование эксперимента в биологических исследованиях». Свердловск, 1975 (УИЦ АН СССР).

Обобщен экспериментальный материал, полученный при практическом использовании полного и дробного факторного эксперимента, а также планирования по типу латинского квадрата в процессе изучения внутривидовой дифференциации, регуляции численности в популяциях и природы динамического полиморфизма. Представлены данные сравнительного анализа точности исследования, объема труда, научной информации и практических рекомендаций в параллельно поставленных пассивном и активном экспериментах. В результате применения указанных математических методов обнаружена явная биохимическая дифференциация внутри вида полевки-экономки, показана принципиальная возможность экспресс-определения эффективности радиозащиты с помощью нового, предлагаемого автором, биохимического экспресс-теста, и получены данные о биохимических механизмах метаболической регуляции численности в популяциях некоторых видов земноводных.

Таблиц 46. Иллюстраций 6. Библ. 83 назв.

УДК 571.1+591.112

Изучение совместного влияния температуры, частоты сердечбиений и растяжения на сократимость миокарда. Жигальский О. А., Изаков В. Я. «Математическое планирование эксперимента в биологических исследованиях». Свердловск, 1975 (УИЦ АН СССР).

Рассмотрен вопрос сократимости сердечной мышцы как многофакторного процесса методами активного планирования эксперимента. Управляющими факторами были частота сердечбиений, степень растяжения и температура. Понижение температуры, увеличение частоты стимуляции и степени растяжения повышают максимальную силу сокращения. Приведенные данные также свидетельствуют о существовании в системе регуляции сократимости миокарда членов взаимодействия. Это означает, что влияние температуры зависит от уровня, на котором находятся частота и растяжение. Аналогичный вывод справедлив и для растяжения, и для частоты.

Таблиц 1. Библ. 16 назв.

УДК 571.1 : 51+591.5

Интенсивность экстрамитохондриальных и митохондриальных путей окисления у различных морф *Bradybaena lantzi* в условиях охлаждения. Рункова Г. Г., Максимов В. Н., Ковальчук Л. А., Хохуткин И. М. «Математическое планирование эксперимента в биологических исследованиях». Свердловск, 1975 (УНЦ АН СССР).

Представлены результаты определения эндогенной активности оксидаз в гомогенате и гиалоплазме лево- и правовращающих морф *Bradybaena lantzi* с 30-минутным охлаждением интактных животных при 30, 20, 10 и 0°С. Активность оксидаз определялась по чувствительности театразоловой реакции к кислороду воздуха путем параллельного определения интенсивности восстановления 2, 3, 5-трифенилтетразолхлорида гомогенатом или гиалоплазмой моллюсков при инкубации их в атмосфере аргона и воздуха. Достоверные различия между лево- и правовращающими морфами по эндогенной активности оксидаз в условиях исследованных температур отсутствуют. При охлаждении в гомогенатах обеих морф наблюдается достоверная активация эндогенных оксидаз. Изменения в гиалоплазме слабо выражены и имеют противоположную направленность. Высказано предположение о несущественности роли экстрамитохондриальных путей окисления в механизме адаптации исследованного вида моллюсков к низким температурам.

Таблиц 2. Иллюстраций 2. Библ. 4 назв.

УДК 571.1 : 51+591.5

О чувствительности эндогенных оксидаз в гомогенатах двух морф *Bradybaena lantzi* к тироксину. Рункова Г. Г., Максимов В. Н., Ковальчук Л. А., Хохуткин И. М. «Математическое планирование эксперимента в биологических исследованиях». Свердловск, 1975 (УНЦ АН СССР).

Представлены результаты определения интенсивности восстановления тетразолхлорида и эндогенной активности оксидаз в гомогенатах лево- и правозакрученных морф *Bradybaena lantzi* из двух популяций вида при введении возрастающих доз тироксина. Опыты поставлены по плану полного факторного эксперимента типа 2³.4. Тироксин в гомогенатах обеих популяций увеличивает интенсивность восстановления тетразолхлорида в атмосфере аргона и не изменяет тетразолвосстанавливающей активности гомогенатов в атмосфере воздуха. Обнаружены достоверные различия в чувствительности к тироксину между морфами популяций А. Реакция на тироксин со стороны эндогенных оксидаз в гомогенатах исследованных морф популяции В одинакова; признаков дифференциации между лево- и правозакрученными морфами популяции В для данного вида не обнаружено.

Таблиц 2. Иллюстраций 2. Библ. 7 назв.

УДК 571.1 : 51+591.5

Географическая изменчивость лактатдегидрогеназы и ее изоферментов у узкочерепной полевки в условиях экстремального охлаждения. Завада Н. Ф., Павлов Г. П. «Математическое планирование эксперимента в биологических исследованиях». Свердловск, 1975 (УНЦ АН СССР).

Представлены результаты изучения активности лактатдегидрогеназы и ее изоферментов у северных и южных подвидов

узкочерепной полевки в условиях 20-минутного экстремального охлаждения. Общая активность лактатдегидрогеназы, а также активность изоферментов ЛДГ-3 и ЛДГ-5 у северного подвида узкочерепной полевки выше, чем у южного. В условиях охлаждения узкочерепная полевка, независимо от принадлежности к подвиду, снижает активность изофермента ЛДГ-1 и увеличивает активность ЛДГ-3. Обнаруженные внутривидовые различия в активности лактатдегидрогеназы и ее изоферментов рассматриваются как результат адаптации вида к разным условиям существования.

Таблиц 1. Библ. 12 назв.

**МАТЕМАТИЧЕСКОЕ ПЛАНИРОВАНИЕ
ЭКСПЕРИМЕНТА
В БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ**

Труды Института
экологии растений и животных
УНЦ АН СССР, вып. 97

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

Редактор Т. И. Слесарева
Обложка М. Н. Гарипова
Техн. редактор Н. Р. Рабинович
Корректор Н. И. Гладких

РИСО № 662-23(75). ИС 15147. Сдано в
набор 29/XI 1974 г. Подписано к печати
23/VI 1975 г. Формат 60×90/16. Усл. печ.
л. 8,25. Уч.-изд. л. 9,5. Тираж 1500.
Заказ 649. Цена 95 коп.

РИСО УНЦ АН СССР, Свердловск, К-49,
Первомайская, 91.
Типография изд-ва «Уральский рабочий»,
г. Свердловск, пр. Ленина, 49.

95 к.