

Министерство науки и высшего образования РФ
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«**СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
институт
Кафедра водных и наземных экосистем
кафедра

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

_____ М. И. Гладышев
подпись инициалы, фамилия
« _____ » _____ 20 __ г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Остромордая лягушка (*Rana arvalis*) как вектор выноса длинноцепочечных
ПНЖК из водных экосистем в наземных
тема

06.04.01 «Биология»
код и наименование направления

06.04.01.04 «Гидробиология и ихтиология»
код и наименование магистерской программы

Руководитель	_____	<u>канд. биол. наук</u>	<u>А.Е. Рудченко</u>
	подпись, дата	должность, научная степень	инициалы, фамилия
Выпускник	_____		<u>В.И. Ипаткина</u>
	подпись, дата		инициалы, фамилия
Рецензент	_____	<u>канд. биол. наук</u>	<u>Ю.К. Чугунова</u>
	подпись, дата	должность, научная степень	инициалы, фамилия

Красноярск 2023

СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ	1
ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТРАТУРЫ.....	6
1.1 Строение, классификация и физиологическое значение жирных кислот в организме человека и животных.	6
1.2 Жирные кислоты в трофических сетях внутренних водоемов	9
1.3 Трансферт жирных кислот из водные экосистемы в наземные	12
1.4 Значение ДГК для организма человека и животных.	17
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	22
2.1 Характеристика объекта исследования и район работы	22
2.1.1 Остромордая лягушка (<i>Rana arvalis</i>)	22
2.2 Отбор и подготовка проб к анализу	23
2.3 Газовая хроматография	25
2.4 Методы статистического анализа.....	26
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	28
1.1 Состав и содержание жирных кислот в биомассе молоди остромордой лягушки.....	28
1.2 Изучения урожая ЭПК и ДГК в головастиках остромордой лягушки и количественно оценить вынос сеголетками этих ЖК на сушу	31
1.2 Обсуждение полученных результатов	33
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	37
ВЫВОДЫ.....	39
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	40
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	41

ВВЕДЕНИЕ

Необходимость жирных кислот для растительного и животного организма была давно доказана. Например, полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), нужны для построения клеточных мембран в процессе роста, а насыщенные и мононенасыщенные жирные кислоты (НЖК и МНЖК) используются как источник энергии метаболических процессов (Tocher, 2003). Среди жирных кислот особо выделяют несколько физиологически значимых незаменимых ПНЖК омега 3 серии, такие как эйкозапенаеновая кислота (ЭПК) и докозагексаеновая кислота (ДГК). Эти ПНЖК необходимы для работы сердечнососудистой и нервной систем многих организмов и человека в том числе. Однако, наземные организмы не способны сами синтезировать ЭПК и ДГК, поэтому они получают их из пищи (Гладышев, 2012).

Основным источником незаменимых омега-3 ПНЖК в биосфере являются водные экосистемы, где они синтезируются диатомовыми и динофитовыми водорослями (Bell and Tocher, 2009). Синтезированные продуцентами в водных экосистемах ЖК передаются организмам высших трофических уровней по цепям питания.

Оценка путей (векторов) и количественного выноса длинноцепочечных ПНЖК на сушу является одним из актуальных направлений в водной экологии. Существует несколько векторов выноса ПНЖК из водных экосистем в наземные, показанные целым рядом работ (Гладышев, 2012).

Наиболее изученным вектором выноса ПНЖК в наземные экосистемы являются насекомые. Водные насекомые могут быть превосходной пищей для наземных потребителей, поскольку они содержат высокие концентрации незаменимых ПНЖК. По разным оценкам амфибионтные насекомые выносят в наземные экосистемы в общей сложности 80,5 мг ПНЖК на квадратный метр суши в год (Dominik, 2017). Еще одним вектором выноса ПНЖК из водной экосистемы в наземную являются рыбы, содержание ПНЖК в которых варьирует от 5 до 50 % от всех жирных кислот

(Rezanka,1989; Arts, 2001). Изучение разных векторов выноса необходимо для оценки потоков ПНЖК на сушу и их использования в разных сферах производства, например в фармацевтики и аквакультуре.

Земноводные, наряду с другими амфибионтными организмами, могут быть вектором переноса ПНЖК в наземные экосистемы. Это подтверждается тем, что головастики во время метаморфоза потребляют органическое вещество водного происхождения (Pryor,2014), а потом, в конце метаморфоза, выносят его на сушу.

Пищевая специализация амфибии на разных стадиях развития отличается. Пищей взрослых амфибий являются насекомые, в то время как головастики лягушек и жаб, по литературным данным, являются растительноядными организмами (Pryor,2014). Поскольку состав и содержание жирных кислот в животных в первую очередь зависит от пищи, то различия в составе кормовых объектов молодежи и взрослых особей амфибий могут сказаться на составе жирных кислот в их организмах.

Однако состав жирных кислот земноводных практически не исследован. При этом не многочисленные работы по составу жирных кислот земноводных касаются только взрослых особей. Например, такая работа была проведена в отношении леопардовой лягушки (*Rana pipiens*) (Martin et al., 2002). Есть также исследования жирнокислотного состава яйцеклеток песчаной жабы (*Bufo arenarum*) (Bruzzone et al., 2003), а также состава жирных кислот в плазме крови коричневой лягушки (*Rana temporaria*) (Zabelinskii,2012). На примере австралийской лягушки, роющей лопатницы (*Cyclorana alboguttata*), было доказано, что содержание ПНЖК в ее организме зависит от пищи (Berner et al., 2009)

Земноводные, как вектор выноса ПНЖК из водных экосистем в наземные рассматривались только в двух работах. Например, проводили изучение потока длинноцепочечных ПНЖК - ЭПК и ДГК, выносимых метаморфами краснобрюхой жерлянки (*Bombina orientalis*) (Ермохин и др., 2018). Также проводился анализ содержания ПНЖК в биомассе

американской жабы (*Anaxyrus americanus*) к концу метаморфоза (Fritz et al., 2018).

Двух работ может быть не достаточно для оценки эффективности выноса ПНЖК в наземные экосистемы таким вектором, как амфибии. Зная о том, что головастики в водных экосистемах могут питаться организмами синтезирующими или содержащими ЭПК и ДГК, можно предположить, что к концу метаморфоза они могут выносить на сушу значительные количества этих кислот для наземных потребителей.

Поэтому, **целью работы** было изучение состава и содержания ЖК в биомассе головастиков и сеголеток остромордой лягушки *Rana arvalis Nilsson*, 1842 и особенностей выноса ими ЭПК и ДГК на сушу.

Задачи:

1. Изучить динамику состава жирных кислот в биомассе головастиков и сеголеток остромордой лягушки *Rana arvalis Nilsson*, 1842 в процессе метаморфоза.

2. Изучить количественное содержание ЭПК и ДГК в биомассе головастиков и сеголеток остромордой лягушки *Rana arvalis Nilsson*, 1842 в процессе метаморфоза;

3. Рассчитать «пул» ЭПК и ДГК в головастиках остромордой лягушки и количественно оценить вынос сеголетками этих ЖК на сушу.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТРАТУРЫ

1.1 Структура, классификация и физиологическое значение жирных кислот в организме человека и животных.

Липиды в организме животных выполняют различные функции: они являются главными компонентами биологических мембран клеток; являются источником энергии и метаболической воды, выполняют важную роль в процессах терморегуляции т.д. (Васьковский,1997). Что же такое липиды? Если обратиться к статье Васьковского В.Е 1997 г., то там можно увидеть такое определение: Липиды - это жирные кислоты и их производные.

Таким образом основной компонент липидов – это жирные кислоты (ЖК). Молекулы ЖК состоят из углеродной цепи, на одном конце которой находится карбоксильная (кислотная) группа (COOH), а на другом – метильная группа атомов (CH₃). Разные ЖК отличаются друг от друга количеством атомов углерода, а также количеством и положением двойных связей между атомами углерода (Гладышев,2012). Обычно между атомами углерода в ЖК находится одинарная связь, но благодаря ферменту десатураза происходит реакция - десатурации, в результате которой образуются двойные связи (Tocher, 2003).

В зависимости от того где возникают двойные связи в молекуле, ЖК делят на несколько групп. ЖК, не имеющие двойных связей, называются насыщенными жирными кислотами (НЖК). ЖК с двойными связями именуется ненасыщенными. Мононенасыщенные жирные кислоты (МНЖК) имеют одну двойную связь в цепочке молекулы. Ненасыщенные кислоты, содержащие две и более двойных связи, получили специальное наименование – полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) (Гладышев,2012).

В научной литературе широко используется краткое обозначение ЖК например 16:0, 18:1, где первая цифра указывает на количество атомов

углерода в цепи, включая карбоксильную группу, а цифра после двоеточия количество двойных связей (Васьковский,1997). Для ненасыщенных кислот нужно указывать еще и положение двойных связей и их конфигурацию. Для этого к двум цифрам добавляют букву n или ω , например: 18:3n-3, 20:4n-6, которая указывает на положение двойной связи относительно метильного конца молекулы (Васьковский,1997).

Липиды принято делить на простые и сложные. ЖК относят к простым липидам. Однако чаще всего простые липиды входят в состав сложных, таких как триацилглицеролы и фосфолипиды (Васьковский,1997; Тейлор, 2004). Самые распространенные нейтральные липиды это триглицериды (ТАГ). Они образуются при реакции конденсации трех гидроксильных групп глицерола и жирной кислоты. Их принято делить на жиры и масла в зависимости от того остаются ли они твердыми при 20 С(жиры) или при этой температуре имеют жидкую консистенцию (масла) (Тейлор, 2004). Основная функция триглицеридов – запасание и накопление энергии (Тейлор, 2004).

Наравне с трглицеридами можно сказать и про фосфолипиды (ФЛ). Фосфолипиды — это липиды содержащие фосфатную группу. Они состоят из гидрофильной головки и гидрофобного хвостика. Фосфолипиды участвуют в образовании клеточных мембран. (Тейлор,2004). В качестве ЖК остатков в молекулы ФЛов, как правило, входят в состав ПНЖК (Гладышев, 2012).

ПНЖК, необходимые животным (и человеку), но не синтезируемые в их организмах, называют незаменимыми. Незаменимыми они считаются потому, что позвоночные не могут их образовать, поскольку для этого у них просто нет необходимых ферментов (десатуразы $\Delta 12$ и $\Delta 15$, вставляющие двойную связь в положение $\omega 6$ и $\omega 3$ соответственно) (Bell and Tocher, 2009).

К незаменимым ПНЖК относятся: линолевая кислота (ЛК, 18:2n-6) с двумя двойными связями и альфа-линоленовая кислота (АЛК, 18:3n-3) с тремя двойными связями. (Гладышев,2012). Позвоночные животные не способны синтезировать эти кислоты из предшественника - олеиновой

кислоты (18:1n-9) (Bell and Tocher, 2009). Основная роль ЛК и АЛК в том, что из них образуются длинноцепочечные ПНЖК – это арахидоновая (эйкозатетраеновая) кислота (АРК, 20:4n-6), эйкозапентаеновая кислота (ЭПК, 20:5n-3) и докозагексаеновая кислота (ДГК, 22:6n-3). Как это видно из условных обозначений, АРК относится к семейству омега-6, а ЭПК и ДГК – к семейству омега-3 (Гладышев, 2012).

Наряду с другими жирными кислотами АРК, ЭПК и ДГК входят в состав фосфолипидов клеточных мембран (Bell and Tocher, 2009).

Важнейшая физиолого-биохимическая роль двух других длинноцепочечных ПНЖК, АРК и ЭПК, состоит в том, что они биохимические предшественники синтеза липидных медиаторов – эйкозаноидов (Bell and Tocher, 2009). Из ЭПК синтезируются простагландины и тромбоксаны третьей серии, которые снижают артериальное давление. Так же из ЭПК образуются PG-3, которое обладает противовоспалительным эффектом и LT-5, который является антиаллергеном (Гладышев, 2012).

Так как человек не может производить ПНЖК сам, он получает их через пищу. В зависимости от возраста и состояния здоровья человека есть разные дозировки необходимого суточного количества ПНЖК.

Здоровый человек от 18 до 59 лет ежедневно должен потреблять 0,8-1,5 г (800-1 500 мг) жирных кислот. После 70 рекомендовано ежедневно принимать 1,5-2 г жирных кислот. Определяя норму в день ненасыщенных жирных кислот для детей, нужно брать во внимание не только возраст, а и индивидуальные особенности (вес, энергетическую ценность употребляемой пищи) (Bell and Tocher, 2009). Всемирная организация здравоохранения рекомендуют потреблять 0.5 - 1 г ЭПК+ДГК в сутки (или 2 - 3 порции жирной рыбы в неделю) для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний и расстройств (Рудченко, 2018).

1.2 Жирные кислоты в трофических сетях внутренних водоемов

Если рассматривать ЖК в трофических путях, то нужно начинать изучение с водных систем. И первым объектом изучения являются бактерии. Бактериальное сообщество в водоемах встречается в детрите, свежих осадках, донных отложениях, микробиальных матах.

В целом у бактерий встречаются следующие группы ЖК: насыщенные, мононенасыщенные, разветвленные (изо- и антеизо-кислоты), циклопропановые и гидроксикислоты с углеродными цепями от 10 до 19 атомов. (Сущик, 2008, Bell and Tocher, 2009)

Основными продуцентами ЖК в водоемах являются водоросли. Разные виды водорослей вырабатывают разные ЖК. Это связано с тем, что в организме находятся разные ферменты, которые и влияют на то, какие именно ЖК будут вырабатываться.

Характерными ЖК эукариотических зеленых водорослей являются С18 ПНЖК. Для диатомовых водорослей характерно повышенное содержание 14:0, 16:1n-7, а также специфических С16 ПНЖК семейств омега 7, омега 4 и омега 1 (Bell and Tocher, 2009). Для эвгленовых характерно содержание С20 ПНЖК прежде всего арахидоновой – до 10%, присутствуют 22:5, 22:6, 22:5n-3 и С16 ПНЖК (Сущик, 2008, Bell and Tocher, 2009). Динофитовые водоросли, как правило, богаты 16:0, 18:1n-9 и 22:6n-3, относительно много 18:4n-3 и 20:5n-3. Изредка присутствуют С16 ПНЖК (Сущик, 2008). В составе ПНЖК у золотистых водорослей доминируют 18:4n-3 и 20:5 (Сущик, 2008).

Цианобактерии содержат ЖК с углеродными цепями не более 18 атомов. По характерному составу ЖК выделяют 5 групп цианобактерий согласно классификации Кеньона - Мурата. Формирование данных групп цианобактерий обусловлено специфическими комбинациями генов десатураз у различных видов и штаммов. Наиболее характерными ЖК цианобактерий следующие: 16:0, 16:1n-7, 18:1n-9, 18:2n-6, 18:3n-3, 18:3n-6 (Сущик, 2008).

Теперь от продуцентов мы переходим к консументам. Консументы не способны создавать отдельные ЖК (такие как ЛЖК и АЛЖК), так как в их организме нет необходимых ферментов. Но консументы умеют накапливать ЖК в организме, передавая их дальше по трофическим путям.

Консументом первого порядка являются простейшие. Разные виды простейших имеют разное содержание ЖК, это связано с их питанием. Например, у инфузории, питающейся бактериями доля ПНЖК не велика, но преобладают моноеновые ЖК (Сущик, 2008, Bell and Tocher, 2009). В биомассе коловраток обнаружено относительно большое содержание насыщенных и моноеновых С16-18 ЖК (Сущик, 2008), а спектр доминирующих ПНЖК изменяется в зависимости от питания.

Планктон и бентос являются переходным звеном между продуцентами и консументами высшего порядка. Планктонные и бентосные животные питаются продуцентами и накапливают ЖК в своих организмах, передавая ЖК дальше по трофическим путям.

Дальше мы переходим к зоопланктону. Для ракообразных наиболее характерно содержание таких ЖК как: 16:0, 18:1 n-9 и ПНЖК 20:5n-3, 22:6n-3 и 20:4n-6 (Сущик, 2008).

Наиболее яркий представитель бентосных животных является амфипода. Амфиподы отличаются повышенным содержанием С22 ПНЖК и ЭПК, из-за их хищничества. Речные личинки поденок характеризовались относительно высоким содержанием 20:5n-3 (до 27%), 18:3n-3 (Сущик, 2008). У пресноводных моллюсков отмечено более низкое содержание 22:6n-3 при увеличении процентов 20:5n-3 и 20:4n-6 и более высокое содержание моноеновых кислот (Bell and Tocher, 2009).

Дальше по трофическим цепям мы переходим к рыбам. В тканях пресноводных рыб содержится много насыщенных ЖК и С18 ПНЖК. Разные виды рыб имеют разный спектр ЖК. Это связано с большим количеством факторов. На это влияет употребляемая пища, то есть если рыба растительная или всеядная, то в ее организме количество ПНЖК

значительно больше. Также на это влияют такие факторы как температура, возраст, стадия полового цикла (Bell and Tocher, 2009).

Из этого видно, что наибольшее количество ПНЖК содержится в продуцентах и консументах первого порядка, а дальше они передаются по трофической цепи позвоночным, которые не способны сами синтезировать или накапливать ЖК, и поэтому остро в них нуждаются.

Также стоит отметить, что благодаря способности ряда описанных продуцентов синтезировать отдельные ЖК, такие кислоты можно использовать в качестве маркеров органического вещества. Эти ЖК называют «биомаркерами», а их повышенное содержание в мышечной ткани животного может указывать на наличие организмов, продуцирующих такие ЖК в цепи питания консумента. Этот факт широко используется при изучении пищевых сетей водоема и особенностей питания гидробионтов (Рудченко, 2018).

Основываясь на данных из литературы можно выделить основные маркерные жирные кислоты для каждого вида (Таблица 1.)

Таблица 1 - Объекты водных экосистем и их маркерные жирные кислоты.

Вид	Характерные ЖК
Продуценты	
Бактерии	насыщенные, мононенасыщенные, разветвленные (изо- и антеизо-кислоты), циклопропановые и гидроксикислоты с углеродными цепями от 10 до 19 атомов
Зеленые водоросли	C18 ПНЖК
Диатомовые водоросли	14:0, 16:1n-7, а также специфических C16 ПНЖК семейств омега 7, омега 4 и омега 1.
Эвгленовые водоросли	C20 ПНЖК, присутствуют 22:5, 22:6, 22:5n-3 и C16 ПНЖК.
Динофитовые водоросли	16:0, 18:1n-9 и 22:6n-3
Золотистые водоросли	18:4n-3 и 20:5
Цианобактерии	16:0, 16:1n-7, 18:1n-9, 18:2n-6, 18:3n-3, 18:3n-6.
Консументы	
Инфузории	Моноеновые ЖК
Коловратки	Насыщенные и моноеновые C16-18 ЖК
Ракообразные	16:0, 18:1 n-9 и ПНЖК 20:5n-3, 22:6n-3 и 20:4n-6
Амфиподы	C22 ПНЖК и ЭПК
Личинки поденок	20:5n-3 (до 27%), 18:3n-3
Пресноводные моллюски	20:5n-3 и 20:4n-6 и моноеновые кислоты
Пресноводные рыбы	насыщенные ЖК и C18 ПНЖК

1.3 Трансферт жирных кислот из водные экосистемы в наземные

Как уже говорилось, позвоночные не могут синтезировать ряд ПНЖК или делают это с низкой эффективностью, они получают их от продуцентов и консументов первого порядка из водной экосистемы. Доказательством того, что основным источником ПНЖК для наземных животных являются водные экосистемы, можно увидеть на трех примерах:

1. Мелкие плотоядные млекопитающие демонстрируют значительное снижение отношения ДГК к линолевой кислоте (18:2n-6) по мере того, как их зависимость от водных пищевых сетей уменьшается.

2. У сельдевых чаек в Великих озерах снижается концентрация C18 и C20n-3 ПНЖК по мере того, как их кормовая база смещалась от преимущественно водной к наземной пище.

3. Хищные рептилии, потребляющие морских птиц на небольших островах, имеют более высокое содержание ПНЖК в плазме, чем у рептилий, основной рацион которых составляют наземные животные (Lipids, 2009).

Пути переноса ПНЖК из водных экосистем в наземные, очень разнообразны. Одним из таких путей экспорта ПНЖК является вылет амфибиотных насекомых из водоемов. Личинки и куколки этих насекомых растут и развиваются в воде. Например, мухи, комары, не кусающиеся мошки и подёнки являются земноводными насекомыми. Их личинки питаются микроводорослями и другими водными организмами, и когда взрослые насекомые (имаго) появляются из куколок и летят на сушу, они приносят в свои тела ПНЖК, синтезируемые микроводорослями. Взрослые амфибиотические насекомые потребляются различными наземными животными (Lipids, 2009; Gladysheva, 2013).

Еще одним примером звена переноса ПНЖК из водных экосистем в наземные являются водные клопы из семейства Corixidae (Гребляки). Хотя эти водяные клопы являются водными как на личиночной, так и на взрослой стадиях, они могут распространяться по ландшафту и переносить основные ПНЖК из воды на землю, что делает их потенциально доступными для наземных потребителей. В зависимости от места обитания этих насекомых, в их организмах концентрируются разные типы ПНЖК (Sushchik, 2016).

До настоящего времени все оценки потока ЭПК и ДГК на сушу через вылет насекомых были основаны на усреднении разнородных данных, относящихся к совершенно различным экосистемам. Более того, концентрации ЭПК и ДГК в биомассе известны только для личинок, данные

по имаго практически отсутствуют, а количественные данные о вылете получены, в подавляющем большинстве случаев, лишь для обитателей водотоков, хотя во многих ландшафтах огромные площади заняты мелкими озерами, лужами и прочими временными водоемами, в которых часто доминируют представители другого отряда амфибионтных насекомых, а именно Odonata. Стрекозы входят в рацион большого количества видов птиц, не способных потреблять более мелких имаго, например Chironomidae (Гладышев, 2011).

После исследования проведенного в 1980–2009 гг. на Чановской экспедиционной базе Института систематики и экологии животных СО РАН в центральной части Барабинской лесостепи, было установлено что поток ПНЖК с биомассой стрекоз из водных экосистем в наземные составил $6.9 \text{ мг} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{год}^{-1}$ ($\text{кг} \cdot \text{км}^{-2} \cdot \text{год}^{-1}$) (Гладышев, 2011). Средняя глобальная оценка потока ПНЖК на сушу за счет вылета амфибионтных насекомых, населяющих в основном водотоки, варьирует в пределах от 2.5 до 11.8 $\text{мг} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{год}^{-1}$ (Гладышев, 2011). Следовательно, стрекозы – обитатели небольших временных стоячих водоемов – переносят в наземные экосистемы незаменимые биологически активные вещества в количествах, сопоставимых с другими амфибионтными насекомыми, являющимися основными объектами изучения в гидробиологии (Гладышев, 2011).

Важно подчеркнуть, что в отличие от земноводных насекомых, большинство наземных насекомых содержат незначительное количество ЭПК и ДГК или вообще не содержат их. Глобальный экспорт ЭПК+ДГК в результате вылета амфибионтных насекомых был оценен примерно в $240 \times 10^6 \text{ кг} / \text{год}$, то есть на два порядка выше, чем выносят прибрежные хищники, питающиеся гидробионтами (Гладышев, 2010; Lipids, 2009; Gladyshev, 2013).

Наиболее заметным и хорошо задокументированным аспектом питания наземных животных водными организмами является потребление нерестового тихоокеанского лосося наземными хищниками. Это питание является одним из векторов выноса энергии и вещества морского

происхождения в наземные экосистемы. Медведи, как полагают, являются основным потребителем этой рыбы. Необходимо подчеркнуть, что рыба составляет большую часть рациона медведей за пределами района Тихоокеанского кольца, где нет анадромного лосося. Например, в окрестностях озера Йеллоустоун потребление форели медведями гризли составляет ~ 18 кг (Lipids, 2009; Gladyshev, 2013).

Глобальный экспорт ПНЖК через водоплавающих птиц оценивается примерно в 432×10^6 кг / год (Gladyshev, 2013). В свою очередь, птицы и их яйца потребляются наземными хищниками. После проведения разных экспериментов было доказано, что перенос незаменимых ПНЖК из водных экосистем в наземные по трофической цепи в паре рыбы–птицы может происходить с более высокой эффективностью, чем перенос общего органического вещества (Гладышев, 2010).

Еще один способ экспорта ПНЖК, встречающийся главным образом в океанах, - это вынос на берег отмерших останков гидробионтов и водорослей. По оценкам такой вынос ЭПК и ДГК, составлял около 24×10^6 кг / год (Gladyshev, 2013).

Таким образом, общий глобальный естественный экспорт ЭПК и ДГК из водных и наземных экосистем составляет ок. 698×10^6 кг / год (Gladyshev, 2013).

Существуют и другие возможные векторы выноса ЭПК и ДГК из водных экосистем в наземные. Так, например, недостаточно изученными остаются рептилии и амфибии, как звено на пути переноса ПНЖК. Одной из немногочисленных попыток оценить вклад некоторых амфибий в экспорт длинноцепочечных ПНЖК из водных в наземные экосистемы является работа Ермохина с соавторами. Коллективом авторов были изучены: обыкновенная чесночница (*Pelobates fuscus*), европейская пузатая жаба (*Bombina bombina*) и озерная лягушка (*Pelophylax ridibundus*) (Ермохин и др., 2018).

Экспорт общей биомассы трех видов земноводных на единицу площади поверхности озера составлял в среднем 0,594 г / м² в год (Ермохин и др., 2018). Если сравнивать содержание ЭПК+ДГК у этих видов, то, по результатам исследования, можно заметить, что у пузатой жабы оно преобладает. Среднегодовой общий экспорт ЭПК + ДГК амфибиями из озера составил 1,47 мг / м² площади водной поверхности. Если сравнивать количество экспорта ЭПК+ДГК между амфибиями и насекомыми, то можно заметить, что насекомые приносят ЭПК+ДГК больше. Это обусловлено тем, что водоемов, в которых встречаются амфибии намного меньше, чем тех, где обитают насекомые (Ермохин и др., 2018).

Люди, являются наземными хищниками, которые активно потребляют богатые ПНЖК ресурсы из водных экосистем. Общий мировой улов (1998–2003 гг.; морской и пресноводный) рыбы и моллюсков составлял $\sim 92,2 \times 10^6$ т в год -1 (ФАО, 2004 г.). Предположив, что содержание влаги составляет 80%, среднее содержание ПНЖК в захваченной влажной биомассе можно оценить как 2 мг г⁻¹. Таким образом, человек забирает из водных экосистем $\sim 1,8 \times 10^8$ кг / год ЭПК + ДГК. Это число примерно в 90 раз превышает экспорт ПНЖК через медведей, охотящихся на лосося в Тихоокеанском регионе. Потребление человеком диких и разводимых рыб и водных беспозвоночных составляет ~ 16 кг на человека в год. Это означает, что глобальное среднесуточное личное потребление ЭПК+ ДГК составляет около 0,1 г, то есть примерно в десять раз ниже, чем в настоящее время рекомендуется Всемирной организацией здравоохранения. Показатели рыболовства во всем мире, как было показано, слишком высоки, даже в настоящее время (Lipids, 2009; Gladysheva, 2013).

Таким образом, может потребоваться дальнейшее развитие аквакультуры и / или генной инженерии, например, внедрение генов, направляющих синтез ПНЖК, в наземные растения, производящие масличные культуры, для снабжения человечества необходимым

количеством необходимых ПНЖК, чтобы избежать чрезмерной эксплуатации природных водные экосистемы в будущем (Lipids, 2009; Gladysheva, 2013).

1.4 Значение ДГК для организма человека и животных.

ДГК имеет серьезные медицинские значение, поскольку его присутствие в организме положительно связано с профилактикой многочисленных человеческих заболеваний, включая рак и сердечные заболевания. ПНЖК, кроме того, имеет важное значение для неврологической функции (Stillwell and Wassall, 2003).

Существует все большее число доказательств, демонстрирующих, что ДГК увеличивает площадь мембраны, увеличивает ее проницаемость для воды и других растворенных веществ, увеличивает гибкость ацильной цепи, плохо взаимодействует с холестерином и может усиливать образование боковых доменов. Еще одним подтверждением уникальности ДГК является замечательное наблюдение со стороны нервной системы. Простое устранение одной двойной связи из ДГК, продуцирующей ДПА (22: 5, омега-6), приводит к потере нескольких поведенческих особенностей у животных (Stillwell and Wassall, 2003).

У младенцев ДГК необходим для роста и функционального развития головного мозга, а его дефицит приводит к различным нарушениям обучения и когнитивных функций. В зрелом возрасте ДГК поддерживает нормальную функцию мозга, и недавние данные свидетельствуют о том, что снижение потребления ДГК у взрослых связано с рядом неврологических расстройств, включая шизофрению и депрессию (Turner et al., 2003).

У млекопитающих ДГК находится в высокой концентрации только в отдельных тканях, таких как синапсомы, сперматозоиды и наружный сегмент ретинального стержня. ДГК может приближаться к 50 моль % от общего количества фосфолипидных ацильных цепей в этих мембранах. И без

того высокий уровень ДГК в этих мембранах не усиливается диетой, а после включения ДГК прочно удерживается за счет других жирных кислот (Stillwell and Wassall, 2003).

Недавнее открытие того, что состав жирных кислот тканевых фосфолипидов систематически меняется у разных видов, привело к предположению, что состав жирных кислот мембран является важным определяющим фактором скорости метаболизма, характерного для каждого вида. Например, как у птиц, так и у млекопитающих, по мере увеличения размера вида наблюдается уменьшение масс-специфичного BMR (базальной скорости метаболизма) и уменьшение полиненасыщенности мембран. Серия экспериментов по «пересечению видов» показывает, что скорость этой молекулярной активности в значительной степени обусловлена природой мембранного бислоя, окружающего эти мембранные белки, так что полиненасыщенные мембраны связаны с быстрыми мембранно-ассоциированными процессами (Hulbert., 2007).

Тогда можно предположить, что необходимый уровень ДГК для организма закладывается генетически и для каждого вида он свой.

Эту мысль подтверждает работа, в которой выдвинута и обоснована гипотеза о том, что суммарное содержание эйкозапентаеновой (ЭПК, 20:5n-3) и докозагексаеновой (ДГК, 22:6n-3) кислот в мышечной ткани рыб связано с видоспецифической (таксонспецифической) продолжительностью развития эмбриона. Анализ данных был проведен на примере рыб семейств Сиговых (Coregonidae) и Лососевых (Salmonidae). Было обнаружено, что рыбы с более длительным временем развития эмбрионов, которые наблюдаются при более низких температурах, имеют значительно более высокое содержание ЭПК + ДГК в мышцах (почти в 2,7) по сравнению с видами, принадлежащими к тем же семействам, но имеющими более короткие сроки развития эмбрионов. Эта ассоциация была объяснена тем, что эмбрион образует больше клеток на единицу объема ткани при более низких температурах, что требует большего

удельного количества клеточных мембран и, следовательно, большего количества ЭПК и ДГК для их производства (Artamonova et al., 2020).

Другим доказательством того, что содержание ДГК — это генетически заложенный фактор, является работа, в которой изучили содержание и состав жирных кислот (ЖК) у десяти видов зообентоса нескольких таксономических групп из разных пресноводных водоемов. Особое внимание было уделено незаменимым полиненасыщенным жирным кислотам, эйкозапентаеновой кислоте (ЭПК, 20: 5n-3), докозагексаеновой кислоте (ДГК, 22: 6n-3) и арахидоновой кислоте (АРК, 20: 4n-6); и соотношения n-3 / n-6 и ДГК / АРК. Содержание и соотношение этих ЖК у исследованных видов зообентоса существенно различались. Используя анализ канонических соответствий, сравнили профили ЖК видов изучаемых таксонов с учетом их кормовых стратегий и местообитаний (Makhutova et al., 2011).

В результате получили доказательства того, что филогенетическое положение зообентосных видов является ответственным и может привести к схожему составу жирных кислот, даже если виды или популяции обитают в разных водоемах или имеют разные стратегии питания (Makhutova et al., 2011).

Однако есть ряд работ доказывающих, что уровень содержание ДГК в организме зависит от его рациона. Например, проанализировали взаимосвязь между потребляемой пищей, содержащей большое количество ЖК, и суммарным содержанием ЭПК и ДГК в яйцах морских коньков и их новорожденных детенышей.

Для яиц *Hippocampus guttulatus* и новорожденных детенышей определяли содержание липидов и профиль жирных кислот, а также анализировали характер их потребления в период эмбрионального развития. В профиле жирных кислот яиц преобладали ПНЖК ($43,88 \pm 0,75\%$), тогда как новорожденные были богаты НЖК ($41,01 \pm 1,83\%$), а суммарное содержание ЭПК и ДГК падало. Это объясняется тем, что жизнеспособность яиц и

приспособленность личинок или молоди зависят от их рациона питания (Faleiro and Narciso, 2010).

В другой работе демонстрируется, что обеспечение яиц незаменимой жирной кислотой, докозагексаеновой кислотой (ДГК), зависит от содержания ДГК в рационе взрослых морских рыб. По мимо этого в статье показывают, что содержание ДГК во всем теле коррелирует с характеристиками, связанными с приспособленностью потомства (скорость передвижения, рост и выживание).

Эксперимент показал, что, содержание ДГК в рационе взрослых особей изменяет способность потомства выживать за счет дифференцированного обеспечения эмбрионов ДГК; меньшее количество ДГК в яйцах приводит к снижению содержания ДГК в организме потомства, а после нескольких недель экзогенного кормления на диете с высоким содержанием ДГК, приводит к увеличению количества этой кислоты в яйцах (22.0–45.4 мг/г в 1 эксперименте, 30.1–59.2 мг/г во 2 эксперименте, и 27.8–51.2 мг/г в 3 эксперименте).; некоторые показатели продуктивности потомства тесно связаны с содержанием ДГК в организме (Fuiman and Perez, 2015).

Кроме того есть работа, в которой исследуют, как полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК; т.е. омега-3 и -6 ПНЖК) связаны с общим липидным статусом, литорально-пелагической зависимостью и трофическим положением рыб предальпийского озера Лунц, Австрия, арктического гольца (*Salvelinus alpinus*), щуки (*Esox lucius*), окуня (*Perca fluviatilis*), кумжи (*Salmo trutta*), плотвы (*Rutilus rutilus*) и гольяна (*Phoxinus phoxinus*).

Результаты этого исследования пищевой сети озера продемонстрировали, что общие липиды в сообществе рыб, литорально-пелагическая зависимость и трофическое положение объясняют омега-3 и -6 ПНЖК в тканях спинных мышц. Омега-3 и -6 ПНЖК у этих рыб уменьшались с увеличением трофического положения, демонстрируя, что эти важные ЖК не биоусилены с увеличением трофического уровня. Наконец, это исследование трофической сети озера предоставляет доказательства

взаимосвязи на уровне сообщества рыб между общим липидным статусом и ПНЖК или соотношением стабильных изотопов, тогда как сила таких взаимосвязей была менее сильной на уровне видов (Kainz et al., 2017). Исходя из этого возникает вопрос: что оказывает большее влияние на уровень содержания ДГК в организме, генетика или рацион питания?

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Характеристика объекта исследования и район работы

2.1.1 Остромордая лягушка (*Rana arvalis*)

Остромордая лягушка (*Rana arvalis*) широко распространена в лесной, лесостепной зонах и горах юга Сибири – от Северо-Восточной Франции на западе до Западного Забайкалья на востоке; северная граница ареала проходит по побережью Баренцева моря, далее – Северный Урал, юг Ямала и Гыданского полуострова, среднее течение Енисея, до Юго-западной Якутии; южная граница идет от побережья Адриатического моря к Черному морю, устью Днепра, низовьям Дона, Средней Волге, Северному Казахстану, огибая Алтай и Саяны, до Забайкалья (Куницын, 2010).

В Забайкалье остромордая лягушка обнаружена в Баргузинском заповеднике, где широко распространена в таежных местообитаниях долин рек, поднимаясь вверх по течению до 1000 м над у. м (Куницын, 2010).

Лягушки этого вида средних размеров, максимальная длина тела 80 мм. Кожа в целом гладкая, хотя на спине и по бокам могут встречаться бугорки разной величины, которые часто совпадают с темными пятнами. Верхняя часть тела окрашена в коричневатые тона от светлого до темного, с желтоватым, оливковым, розоватым или красновато-кирпичным оттенком. Темное височное пятно хорошо заметно. Спинно-боковые складки тонкие, светлые (Куницын, 2010).

Местообитания остромордой лягушки приурочены к лесной, лесостепной и степной зонам (Куницын, 2010). Предпочитают открытые биотопы – заливные луга, окраины кочковато-злаково-осоковых и моховых болот, опушки леса (Седалищев и Бекенева, 2004).

Уход на зимовку происходит во второй декаде сентября. Зимует в глубоководных озёрах. (Куницын, 2010) Остромордые лягушки пробуждаются и приступают к размножению в конце апреля – начале мая

при среднесуточной температуре атмосферы 12,4°C (5–19°C), а воды от 9,2°C (7–11°C) (Городилова 2010).

Первые кладки икры отмечались 10-12 мая, а период икрометания проходит в течение 10-12 дней. Развитие головастиков длится 45-55 дней, а первые сеголетки появляются на суше во второй – третьей декаде июля с длиной тела 13-18 мм (Седалищев и Бекенева, 2004).

Основу питания остромордой лягушки составляют жуки. Другие корма у лягушек из разных географических пунктов имеют разное значение. В одних случаях значительную долю в питании, кроме жуков, составляют пауки, кобылки, клопы и гусеницы; в других к этим кормам присоединяются комары, но падает значение клопов или исчезают и комары и клопы, но появляются муравьи (Куницын, 2010).

Отбор проб производился на Оз. Лесное (Емельяновский р-р, Красноярский край).

2.2 Отбор и подготовка проб к анализу

Молодь лягушки отлавливалась гидробиологическим сачком и помещалась в химический стакан с холодной чистой водой. Лягушки выдерживались без корма в течении суток для отчистки кишечного тракта от пищи. После этого каждая особь отдельно взвешивалась и помещалась во флакон с растворителем (хлороформ : этанол 2 : 1 по объему). Готовые пробы хранились в морозильной камере до обработки.

Пробы молоди остромордой лягушки отбирались в мае - июле 2022 г. в Оз. Лесное (Емельяновский р-р, Красноярский край). Все данные представлены в Таблице 2.

Таблица 2 - Описание собранных проб молоди остромордой лягушки (Оз. Лесное, Емельяновский р-р, Красноярский край, 2022).

Дата	№ на ЖК	Численность на м2	Стадия
28.05.2022	1-5	156,3±23,5	Головастик 1 день после выклева
06.06.2022	6-10	127,5±17,5	Головастик 10 день после выклева (Зачатки задних конечностей)
06.07.2022	11-12	72,9±11,6	Головастик 40 день после выклева (Зачатки передних конечностей)
23.07.2022	13-14	11,3±3,6	Сеголеток 57 день после выклева

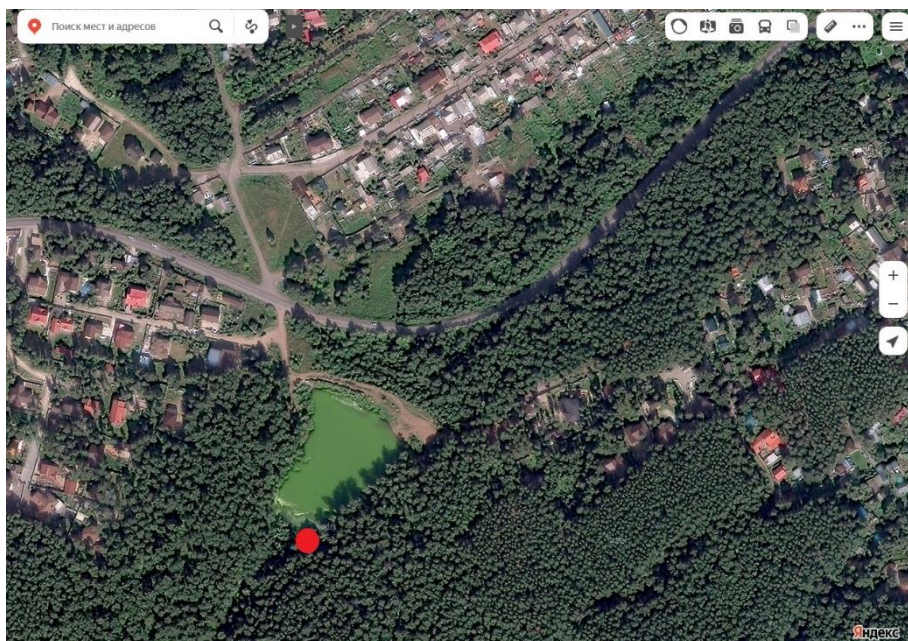


Рисунок 1 – Станция отбора проб молоди остромордой лягушки (*Rana arvalis*) на оз. Лесное (Плодово-Ягодная станция, Емельяновский район).

Подготовка проб к анализу состава и содержания жирных кислот включала в себя два этапа: экстракцию липидов из биомассы и метанолиз.

На этапе экстракции липидов разрушаются клеточные стенки и высвобождаются липиды. Перед экстракцией в пробу добавляем внутренний стандарт (метиловый эфир 19:0, 2 мг/мл) для количественного определения липидов. В процессе экстракции пробу перетирали в ступке со смесью растворителей хлороформ : этанола (2:1 по объему) и стеклянными бусами. Готовый экстракт пропускали через слой NaSO_4 для удаления воды. Далее смесь растворителей удаляли выпариванием на роторном испарителе (35°C).

Следующим этапом подготовки был метанолиз. Во время метанолиза разрушаются сложные липиды и после реакции переэтерификации получаются метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК). Именно МЭЖК используется для газовой хроматографии, так как они летучий и при этом термостабильны.

Для получения МЭЖК экстракт липидов подвергали двойному метанолизу сначала 10 минут в щелочной среде (8 % NaOH в метаноле), потом 10 минут в кислой среде (3% H_2SO_4 в метаноле). Метанолиз проводили на водяной бане при 95° . После завершения метанолиза смесь промывали раствором NaCl (33%) и гексаном. Полученный экстракт МЭЖК вместе с гексаном отделяли из смеси с помощью делительной колонки. Из очищенного экстракта гексан выпаривали на роторном испарителе (35°C). Полученную пробу хранили в морозильной камере до анализа.

2.3 Газовая хроматография

Хроматография - метод разделения веществ или частиц, основанный на различиях в их скорости перемещения в системе друг несмешивающихся и движущихся друг относительно друга фаз. Газовая хроматография – разделяет пробы в парообразном состоянии с помощью несущего газа (подвижная фаза) и колонки, заполненной жидкостью и (или) твердыми частицами (Долгоносов, 2005 г).

Определение состава МЭЖК из биомассы головастиков серой жабы проходило на газовом хроматографе, оснащённом спектрометрическим детектором (модель 6890/5975С; Agilent Technologies, Santa Clara, USA) и капиллярной колонкой HP-FFAP (длина колонки 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм).

2.4 Методы статистического анализа

Для оценки содержания ЖК в биомассе сеголеток рассчитывалось процентное содержание отдельных ЖК по формуле 1:

$$\text{ЖК (\%)} = \frac{S}{\sum S \times 100} , \quad (1)$$

где S – площадь хроматографического пика отдельной ЖК;

Для всех полученных данных были применены методы описательной статистики.

Одним из показателей, которые характеризуют цельность и однородность выборки, является стандартная ошибка. Для ее вычисления было определено среднее значение по формуле 2:

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{n} , \quad (2)$$

где x – значение отдельного измерения; n – число всех измерений;

Кроме того была рассчитана стандартная ошибка по формуле 3:

$$S_{\bar{X}} = \frac{S}{\sqrt{n}} , \quad (3)$$

где S – дисперсия среднего значения; n – число всех измерений;

Для определения статистически значимых отличий процентного и количественного содержания ЖК в биомассе сеголеток амфибий был использован однофакторный дисперсионный анализ ANOVA. Процедура дисперсионного анализа состоит в определении соотношения систематической (межгрупповой) дисперсии к случайной (внутригрупповой) дисперсии в измеряемых данных.

Достоверность отличий ЖК оценивалась по критерию Фишера. При уровне значимости $p \leq 0,05$ отличия между выборками считались достоверными.

Для проверки гипотезы о принадлежности выборки нормальному закону распределения, был использован критерий Колмогорова-Смирнова.

Все статистические расчеты были выполнены в программах Microsoft Excel и STATISTICA 9.0.

Министерство науки и высшего образования РФ
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
институт
Кафедра водных и наземных экосистем
кафедра

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

_____ М. И. Гладышев
подпись инициалы, фамилия
« _____ » _____ 20 __ г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Остромордая лягушка (*Rana arvalis*) как вектор выноса длинноцепочечных
ПНЖК из водных экосистем в наземных
тема

06.04.01 «Биология»
код и наименование направления

06.04.01.04 «Гидробиология и ихтиология»
код и наименование магистерской программы

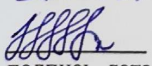
Руководитель


подпись, дата
23.06.23

канд. биол. наук
должность, научная степень

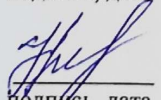
А.Е. Рудченко
инициалы, фамилия

Выпускник


подпись, дата

В.И. Ипаткина
инициалы, фамилия

Рецензент


подпись, дата
19.06.2023

канд. биол. наук
должность, научная степень

Ю.К. Чугунова
инициалы, фамилия

Красноярск 2023