

## ИЗОФЕРМЕНТНЫЕ СПЕКТРЫ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ТКАНЯХ ЕНОТОВИДНЫХ СОБАК *Nyctereutes procyonoides* В ОСЕННИЙ ПЕРИОД

© 2016 г. А.Р. Унжаков, Н.Н. Тютюнник

Институт биологии Карельского НЦ РАН, 185910, Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11

E-mail: al.unzhakov@yandex.ru; tyutyunnik@krc.karelia.ru

Поступила в редакцию 04.05.16 г.

Проведено электрофоретическое исследование изоферментов лактатдегидрогеназы (НФ 1.1.1.27) в гомогенатах тканей сердечных и скелетных мышц, почек, легких, селезенки, печени енотовидных собак *Nyctereutes procyonoides* Gray из двух географических зон (Северо-Запад России и Польша), песцов *Alopex lagopus* L. и лисиц *Vulpes vulpes* L. в период подготовки к зимнему сезону. Енотовидные собаки, впадающие в природе в зимний сон, отличаются от других близких таксономически и по массе тела видов семейства псовых (лисица, песец) большей долей аэробных В-субъединиц лактатдегидрогеназы во всех органах кроме сердца. У енотовидных собак, находившихся в северном регионе, отмечено повышенное содержание «быстрых» анодных фракций лактатдегидрогеназы-1 и лактатдегидрогеназы-2 в тканях сердца, почек, легких, печени, селезенки по сравнению с особями южной географической зоны. Смещение лактатдегидрогеназной реакции в сторону образования пирувата свидетельствует о том, что в осенний период этот метаболит используется для синтеза жирных кислот в процессе липогенеза.

*Ключевые слова:* лактатдегидрогеназа, изоферменты, осенний период, енотовидная собака, лисица, песец.

Устойчивость любого организма к экстремальным условиям среды заключается в его способности противостоять воздействию внешних факторов [1]. Особый интерес представляют некоторые виды млекопитающих, использующие естественное состояние – зимнюю спячку – для адаптации к низким температурам окружающей среды и нехватке пищи [2,3]. Наиболее устойчивыми к неблагоприятным условиям являются животные, впадающие в глубокую (истинную) зимнюю гибернацию (суслики, сурки, летучие мыши). Однако для некоторых видов хищных млекопитающих (енотовидная собака, медведь, барсук) характерна длительная факультативная спячка, или зимний сон.

С точки зрения адаптации к неблагоприятным зимним условиям определенный интерес имеют разводимые в зоокультуре представители семейства псовых (*Canidae*) – енотовидная собака, песец, лисица – близкие таксономически и по массе тела виды [4–6]. Эти сравнительно недавно введенные в зоокультуру хищные млекопитающие сохранили биологические особенности обмена веществ и консерватизм своих

диких предков [4]. Следует отметить, что среди представителей семейства псовых имеется единственный вид (енотовидная собака *Nyctereutes procyonoides* Gray), который в северных широтах впадает в зимний сон [5–9]. При этом в южных районах зимнего оцепенения у них не наблюдается, или сроки его значительно сокращены [10].

Многие адаптационные перестройки в организме животных происходят в период подготовки к зимним холодам и бескормице [3,11]. Так, осенний сезон характеризуется усиленным синтезом гликогена, в конце лета наблюдается увеличение бурой жировой ткани и, соответственно, запаса липидов. Усиливается уровень энергетического обмена, двигательная активность, связанная с активным поиском пищи [2,3,12].

Важную роль в энергетическом обмене и в адаптивных реакциях организма играют изоферменты лактатдегидрогеназы (ЛДГ, L-лактатдегидрогеназа, НФ 1.1.1.27) [13–16]. У большинства млекопитающих ЛДГ в органах представлена пятью изоферментами, каждый из которых является тетрамером, образующимся при различных сочетаниях четырех полипептидных цепей двух типов: «сердечного» – В или Н (от

Сокращение: ЛДГ – лактатдегидрогеназа.

англ. heart) и «мышечного» – А или М (от англ. muscle) [17,18]. Относительные количества субъединиц М и Н тканей различного типа могут варьировать в широких пределах. Анодные фракции (ЛДГ-1 и ЛДГ-2) – изоферменты с большей электрофоретической подвижностью – образуются преимущественно из В-субъединиц, а катодные фракции (ЛДГ-3 и ЛДГ-4) – представлены А-субъединицами [13]. В процессе филогенеза проявляется фенотипически такое соотношение множественных молекулярных форм фермента, которое наиболее оптимально для приспособления организма к условиям окружающей среды, что является одной из стратегий биохимических адаптаций [1,19].

Таким образом, недавно введенные в культуру млекопитающие семейства псовых (*Canidae*), сохранившие при разведении в клетках особенности своих диких сородичей, представляют удобную модель для изучения адаптивности метаболизма в сравнительно-видовом аспекте. Целью настоящей работы было изучение особенностей распределения изоферментных спектров ЛДГ в шести тканях у млекопитающих семейства *Canidae* в период подготовки животных к зимнему периоду.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись семимесячные животные клеточного содержания: енотовидные собаки *Nyctereutes procyonoides* Gray, песцы *Alopex lagopus* L. и лисицы *Vulpes vulpes* L. Песцы и лисицы были выращены в ЗАО «Пряжинское» (пос. Пряжа, Республика Карелия, 61° с.ш., 33° в.д.), енотовидные собаки – на звероферме ООО «Северная пушнина» (дер. Знаменка, Псковская область, 58° с.ш., 28° в.д.) и зверохозяйстве «Владковице» (г. Островец-Свентокшиски, Польша, 50° с.ш., 21° в.д.). Животных содержали в клетках при естественном освещении на стандартных рационах. В начале ноября в период планового забоя у представителей семейства псовых *Canidae* были взяты образцы тканей сердечной (правый желудочек) и скелетной (*M. quadriceps femoris*) мышц, почек, легких, селезенки, печени. Биологический материал до проведения электрофоретического анализа хранили в низкотемпературной камере (–25°C).

Для исследования изоферментного спектра ЛДГ гомогенаты тканей готовили на 0,05 М фосфатном буфере (рН 7,0) и оставляли для экстракции фермента на 16–18 ч в холодильнике при 4°C, затем центрифугировали при 6000 g в течение 15 мин. Для предотвращения разрушения ЛДГ под действием высоких температур

подготовку электрофоретических проб и электрофорез проводили в условиях, исключающих нагревание свыше 56°C [20].

Разделение изоформ лактатдегидрогеназы осуществляли методом горизонтального электрофореза на пластинках агарового геля по Вайму [21] с использованием отечественного прибора ПЭФ-3 при напряжении 3–4 В/см и силе тока 50 мА/см. Продолжительность электрофоретического разделения составляла 90–120 мин.

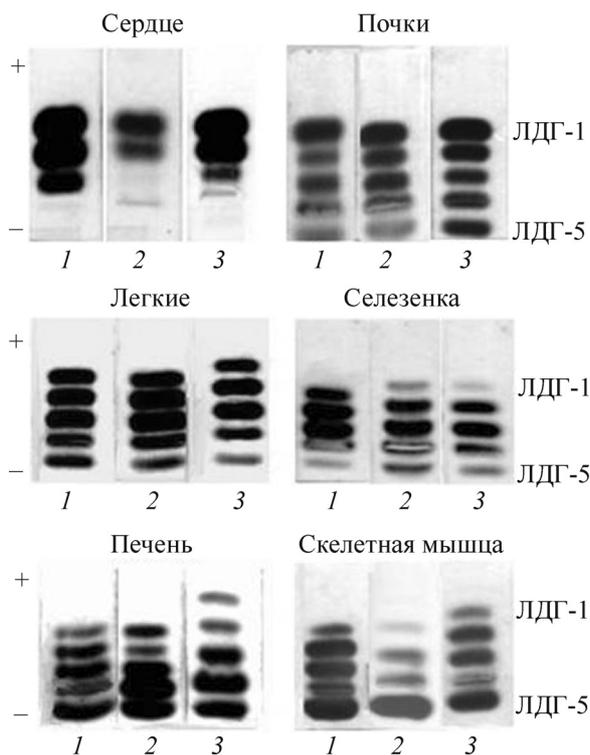
Концентрация реактивов красящей смеси была следующей: фосфатный буфер (рН 7,4) – 0,05 М, феназинметасульфат (Ferak, Германия) – 0,13 мкМ, нитротетразолиевый синий (Sigma, США) – 0,25 мкМ, никотинамидадениндинуклеотид (MP Biomedicals, США) – 0,45 мкМ, лактат натрия (MP Biomedicals, США) – 3,57 мкМ. Общий объем смеси составлял 50 мл на кювету из расчета окраски восьми пластинок. Окрашивание проводили при 37°C в течение 120 мин. Окрашенные пластинки промывали в проточной воде, фиксировали в 3%-м растворе уксусной кислоты в течение 5 мин, затем высушивали на фильтровальной бумаге при комнатной температуре в течение суток и сканировали. Изображения обрабатывали с помощью специальной компьютерной программы «Видеотест». По интенсивности окраски оценивали значения пяти фракций ЛДГ, их суммировали, полученную сумму принимали за 100% и вычисляли процентное содержание каждого изофермента. Учитывая, что исследуемый фермент имеет тетрамерное строение, суммарное содержание аэробных (В) и анаэробных (А) субъединиц рассчитывали соответственно по формулам:

$$B(\%) = 1 \times \text{ЛДГ-1}(\%) + 0,75 \times \text{ЛДГ-2}(\%) + 0,5 \times \text{ЛДГ-3}(\%) + 0,25 \times \text{ЛДГ-4}(\%);$$

$$A(\%) = 0,25 \times \text{ЛДГ-2}(\%) + 0,5 \times \text{ЛДГ-3}(\%) + 0,75 \times \text{ЛДГ-4}(\%) + 1 \times \text{ЛДГ-5}(\%).$$

Результаты исследований были обработаны с применением пакетов программ MS Excel и StatGraphics. В таблицах приведены средние значения и их стандартные ошибки ( $M \pm m$ ). Сравнение различий между группами проводили с применением параметрического критерия Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$  и менее.

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования ИБ КарНЦ РАН «Комплексные фундаментальные и прикладные исследования особенностей функционирования живых систем в условиях Севера».



**Рис. 1.** Электрофореграммы изоферментных спектров ЛДГ в тканях сердца, почки, легких, селезенке, печени и скелетной мышце у енотовидных собак (1), лисиц (2) и песцов (3).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В результате исследования установлено, что у представителей семейства псовых в большинстве исследованных органов лактатдегидрогеназа присутствует в пяти молекулярных формах: от «быстрой» анодной фракции ЛДГ-1 до «медленной» катодной ЛДГ-5 (рис. 1, табл. 1–3). Тканевая специфичность набора изоферментов ЛДГ отражает метаболический профиль органов. По направленности метаболизма, преимущественному преобладанию его аэробных или анаэробных путей у млекопитающих принято выделять три группы тканей [13–16]. У крыс, мышей, свиней, лошадей, кроликов, обезьян и ряда других видов прослеживается следующая закономерность: в сердце, почках и эритроцитах преобладают аэробные анодные изоформы (ЛДГ-1 и ЛДГ-2). В печени и скелетной мышце доминирующими изоферментами являются катодные фракции ЛДГ-4 и ЛДГ-5, т.е. наблюдается преобладание А-субъединиц ЛДГ. К «промежуточной» группе тканей относятся легкие и селезенка, где преобладают гибридные формы фермента [13–16].

Установлено, что в сердечной мышце у видов *Canidae* доминируют анодные формы ЛДГ.

Так, отмечается высокое суммарное количество аэробных изоферментов ЛДГ-1 и ЛДГ-2, которое составило 94,4% у лисиц, 85,1 – у песцов и 85,7 – у енотовидных собак (табл. 1). Наибольшее содержание «чистой» аэробной фракции ЛДГ-1 выявлено у лисиц ( $60,7 \pm 2,5$ ,  $p < 0,05$ ). Доля катодной медленно мигрирующей изоформы ЛДГ-5 у песцов и енотовидных собак была низкой, а у лисиц – отсутствовала. В тканях миокарда отмечено более высокое процентное содержание анодной фракции ЛДГ-1 у енотовидных собак, содержащихся в северном регионе ( $48,3 \pm 3,3$ ), по сравнению с показателями у особей, выращенных в южной географической зоне ( $38,6 \pm 0,8$ ,  $p < 0,05$ ). В количественном отношении почти все пять фракций ЛДГ сердечной мышцы у разных видов *Canidae* укладываются в следующий ряд в порядке убывания активности: ЛДГ-1 > ЛДГ-2 > ЛДГ-3 > ЛДГ-4 > ЛДГ-5.

Источником энергии для работы почек, осуществляющих выделительную функцию, служат в основном процессы окислительного фосфорилирования [12]. Нашими исследованиями установлено, что в почках у всех представителей семейства псовых наблюдается высокое суммарное содержание анодных изоферментов ЛДГ-1 и ЛДГ-2, но, в отличие от миокарда, с явным преобладанием первой фракции (табл. 1). В тканях почек енотовидной собаки южной и северной географических зон количество «чистой» ЛДГ-1 было более высоким ( $41,1 \pm 1,9$  и  $46,0 \pm 4,5$  соответственно) по сравнению с песцами ( $32,3 \pm 1,6$ ,  $p < 0,05$ ). Более высокое процентное содержание аэробной фракции ЛДГ-2 в почках отмечено у енотовидных собак, выращенных в северном регионе ( $13,2 \pm 0,7$ ), чем у южных особей ( $9,4 \pm 0,7$ ;  $p < 0,05$ ). У обитающих на Северо-Западе России енотовидных собак, которые впадают в зимний сон, в почках выявлена наибольшая доля аэробных В-субъединиц ЛДГ по сравнению с другими животными.

В тканях легких и селезенке у енотовидных собак по сравнению с лисицами и песцами обнаружено более высокое содержание В-субъединиц (табл. 2). С другой стороны, в легких и селезенке у всех исследованных животных выявлено большое суммарное содержание «гибридных» изоферментов ЛДГ-2, ЛДГ-3 и ЛДГ-4, которое было максимальным у песцов в селезенке (84,9%) и минимальным у лисиц в легких (69,5%). В тканях селезенки у енотовидных собак, в отличие от других изученных видов млекопитающих, отмечено большое содержание фракции ЛДГ-1 (табл. 2). Более высокое про-

**Таблица 1.** Процентное содержание изоферментов и В- и А-субъединиц ЛДГ в тканях сердечной мышцы и почек у трех видов семейства *Canidae*

Изоферменты ЛДГ, %					Субъединицы, %	
ЛДГ-1	ЛДГ-2	ЛДГ-3	ЛДГ-4	ЛДГ-5	В	А
Сердечная мышца						
Енотовидная собака <i>Nyctereutes procyonoides</i> Grey, Польша (n = 11)						
38,6 ± 0,8 <sup>#</sup>	40,0 ± 0,4	19,2 ± 0,8	1,5 ± 0,2 <sup>#</sup>	0,7 ± 0,1	79	21
Енотовидная собака <i>Nyctereutes procyonoides</i> Grey, Россия (n = 5)						
48,3 ± 3,3	37,4 ± 1,0	13,5 ± 2,5	0,5 ± 0,4	0,2 ± 0,1	83	17
Лисица <i>Vulpes vulpes</i> L., Россия (n = 5)						
60,7 ± 2,5*	33,7 ± 1,9	2,6 ± 0,1**	2,9 ± 0,7*	0	88	12
Песец <i>Alopex lagopus</i> L., Россия (n = 5)						
46,4 ± 2,7	38,7 ± 0,4	10,2 ± 1,9	4,5 ± 1,0**	0,1 ± 0,1	82	18
Почки						
Енотовидная собака <i>Nyctereutes procyonoides</i> Grey, Польша (n = 11)						
41,1 ± 1,9	9,4 ± 0,7 <sup>#</sup>	13,8 ± 1,4	17,4 ± 1,2 <sup>#</sup>	18,3 ± 1,0	59	41
Енотовидная собака <i>Nyctereutes procyonoides</i> Grey, Россия (n = 5)						
46,0 ± 4,5	13,2 ± 0,7	15,3 ± 1,7	11,6 ± 1,5	13,8 ± 2,5	67	33
Лисица <i>Vulpes vulpes</i> L., Россия (n = 5)						
35,2 ± 2,0	20,6 ± 0,6***	19,4 ± 1,5	14,2 ± 1,2	10,6 ± 1,3	64	36
Песец <i>Alopex lagopus</i> L., Россия (n = 5)						
32,3 ± 1,6*	22,0 ± 1,1***	12,3 ± 0,8	14,5 ± 1,1	18,9 ± 0,8	59	41

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 уровни значимости \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  при сравнении групп лисиц и песцов с группой енотовидных собак (Россия); уровни значимости <sup>#</sup>  $p < 0,05$ , <sup>##</sup>  $p < 0,01$  при сравнении группы енотовидных собак (Польша) с группой енотовидных собак (Россия).

центное содержание аэробной фракций ЛДГ-2 в селезенке отмечено у енотовидных собак, выращенных в северном регионе ( $21,3 \pm 0,4$ ), чем у южных особей ( $18,7 \pm 0,5$ ,  $p < 0,05$ ). В порядке убывания относительного содержания изоферментов в легких и селезенке у енотовидных собак фракции ЛДГ располагались следующим образом: ЛДГ-2 > ЛДГ-3 > ЛДГ-1 > ЛДГ-4 > ЛДГ-5.

Ткани скелетных мышц позвоночных принято относить к анаэробным, хотя известно, что они содержат два типа волокон, обладающих гликолитическим и окислительным обменом [22]. Однако осенью в скелетной мышце у впадающих в зимний сон енотовидных собак и аборигонов Арктики – песцов – по сравнению с лисицами обнаружено более высокое содержание аэробных В-субъединиц ЛДГ (табл. 3).

Ткани печени позвоночных также принято относить к анаэробным тканям. Имеются данные об участии этого органа непосредственно в метаболизме катодного изофермента ЛДГ-5 [13–15]. Наши исследования показали, что в печени песцов, лисиц и енотовидных собак от-

носительное содержание А-субъединиц выше, чем В-субъединиц (табл. 3). Енотовидные собаки, впадающие в зимнее оцепенение, отличаются от других видов семейства псовых (лисица, песец) наибольшей долей аэробных В-субъединиц ЛДГ в печени (табл. 3). В тканях печени наблюдается повышенное содержание «быстрых» анодных фракций ЛДГ-1 и ЛДГ-2 у енотовидных собак, содержащихся в северном регионе, чем у их южных сородичей.

При сравнительном анализе изоферментных спектров ЛДГ шести исследованных органов и тканей разных видов *Canidae* обнаружено, что на основании суммарного содержания субъединиц В-типа можно расположить их в ряд в порядке убывания следующим образом: сердце > почки > легкие > селезенка > печень > скелетная мышца.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что у млекопитающих лактатдегидрогеназа во всех тканях, кроме семенника [23], существует в пяти изоформах [13]. Каждый изофермент ЛДГ представляет собой тетрамер

**Таблица 2.** Процентное содержание изоферментов и В- и А-субъединиц ЛДГ в тканях легких и селезенки у трех видов семейства *Canidae*

Изоферменты ЛДГ, %					Субъединицы, %	
ЛДГ-1	ЛДГ-2	ЛДГ-3	ЛДГ-4	ЛДГ-5	В	А
Легкие						
Енотовидная собака <i>Nyctereutes procyonoides</i> Grey, Польша ( $n = 11$ )						
18,3 ± 1,5	33,9 ± 1,0 <sup>#</sup>	26,4 ± 1,1	16,0 ± 1,1	5,3 ± 0,6 <sup>#</sup>	61	39
Енотовидная собака <i>Nyctereutes procyonoides</i> Grey, Россия ( $n = 5$ )						
19,7 ± 2,3	38,9 ± 2,0	27,6 ± 2,1	10,4 ± 2,4	3,4 ± 0,4	65	35
Лисица <i>Vulpes vulpes</i> L., Россия ( $n = 5$ )						
18,9 ± 1,3	26,6 ± 0,7***	28,7 ± 1,0	14,2 ± 0,6	11,6 ± 1,9***	57	43
Песец <i>Alopex lagopus</i> L., Россия ( $n = 5$ )						
12,0 ± 1,6*	29,3 ± 1,3**	34,8 ± 1,1*	14,1 ± 1,4	9,8 ± 1,9*	55	45
Селезенка						
Енотовидная собака <i>Nyctereutes procyonoides</i> Grey, Польша ( $n = 11$ )						
18,7 ± 0,5 <sup>#</sup>	35,5 ± 1,3	31,9 ± 0,7	10,3 ± 1,3	3,6 ± 0,7	64	36
Енотовидная собака <i>Nyctereutes procyonoides</i> Grey, Россия ( $n = 5$ )						
21,3 ± 0,4	34,2 ± 2,7	32,3 ± 0,7	9,0 ± 2,3	3,2 ± 1,3	65	35
Лисица <i>Vulpes vulpes</i> L., Россия ( $n = 5$ )						
13,1 ± 4,9	31,6 ± 4,2	31,6 ± 3,8	12,3 ± 3,3	11,4 ± 4,0	56	44
Песец <i>Alopex lagopus</i> L., Россия ( $n = 5$ )						
2,7 ± 0,7***	25,2 ± 1,5*	41,2 ± 1,1***	18,5 ± 0,8**	12,4 ± 1,8**	47	53

**Таблица 3.** Процентное содержание изоферментов и В- и А-субъединиц ЛДГ в тканях скелетной мышцы и печени у трех видов *Canidae*

Изоферменты ЛДГ, %					Субъединицы, %	
ЛДГ-1	ЛДГ-2	ЛДГ-3	ЛДГ-4	ЛДГ-5	В	А
Скелетная мышца						
Енотовидная собака <i>Nyctereutes procyonoides</i> Grey, Польша ( $n = 11$ )						
1,5 ± 0,3	16,6 ± 1,4	25,3 ± 0,5	18,5 ± 0,7	38,1 ± 1,4	31	69
Енотовидная собака <i>Nyctereutes procyonoides</i> Grey, Россия ( $n = 5$ )						
1,5 ± 0,4	18,3 ± 2,2	25,4 ± 0,7	18,0 ± 1,1	36,8 ± 1,8	32	68
Лисица <i>Vulpes vulpes</i> L., Россия ( $n = 5$ )						
1,7 ± 1,0	8,6 ± 2,9*	11,5 ± 1,9***	17,0 ± 2,9*	61,3 ± 6,6**	18	82
Песец <i>Alopex lagopus</i> L., Россия ( $n = 5$ )						
3,1 ± 1,4	17,1 ± 2,5*	21,1 ± 2,4	12,7 ± 1,7*	46,0 ± 5,3	30	70
Печень						
Енотовидная собака <i>Nyctereutes procyonoides</i> Grey, Польша ( $n = 11$ )						
6,7 ± 1,0	13,2 ± 1,5 <sup>#</sup>	22,2 ± 1,3	26,5 ± 1,2 <sup>##</sup>	31,4 ± 1,9	34	66
Енотовидная собака <i>Nyctereutes procyonoides</i> Grey, Россия ( $n = 5$ )						
8,0 ± 1,2	19,1 ± 0,7	25,4 ± 1,7	16,8 ± 2,0	30,8 ± 2,4	39	61
Лисица <i>Vulpes vulpes</i> L., Россия ( $n = 5$ )						
12,5 ± 2,6	5,5 ± 0,7***	22,2 ± 2,0	33,7 ± 0,9***	26,1 ± 1,0	36	64
Песец <i>Alopex lagopus</i> L., Россия ( $n = 5$ )						
6,7 ± 1,1	7,4 ± 1,3***	23,0 ± 1,9	33,9 ± 2,5***	28,9 ± 4,7	32	68

(рис. 2) и образуется при различных сочетаниях четырех субъединиц двух типов: сердечного (В) и мышечного (А), синтез которых контролируется двумя неаллельными аутосомными генами – *Ldh-a* и *Ldh-b* [13].

Гомополимерные изоферменты ЛДГ-1 и ЛДГ-5, состоящие только из В- и А-субъединиц, различаются по электрофоретической подвижности, аминокислотному составу, ферментативной активности (рН-оптимуму, величине  $K_m$ ), чувствительности к ингибиторам, функциональным свойствам и т.д. [14,18]. Изоферменты лактатдегидрогеназы, принимая участие в катализе противоположно направленных реакций взаимопревращений лактата и пирувата, осуществляют собственно пируваткиназную (восстановление пирувата в лактат с помощью анаэробных изоферментов ЛДГ-4 и ЛДГ-5 с субъединицами А) или лактатдегидрогеназную (аэробное окисление накопившегося лактата в пируват с помощью аэробных изоферментов ЛДГ-1 и ЛДГ-2 с субъединицами В) реакции [15,16,24].

Близкое таксономическое отношение енотовидных собак к лисицам и песцам подтверждается литературными данными. Так, на основе выполненных 20 ядерных нуклеотидных сиквенсов, 3-х сиквенсов митохондриальной ДНК, кодирующих единицы I и II цитохром *c*-оксидазы с фрагментами цитохрома *b*, был проведен соответствующий филогенетический анализ [6]. Результаты выстроенного филогенетического древа показали генетическую близость енотовидной собаки (*N. procyonoides*) к лисице (*V. vulpes*) и песцу (*A. lagopus*).

Изучаемые млекопитающие – средние по размерам хищники, их масса тела обычно не превышает 10 кг. В летний период масса тела этих животных минимальна и варьирует у енотовидных собак в пределах 5,4–5,9 кг, у песцов – 4,1–5,9 кг, у лисиц – 4,9–6,7 кг [7–9,12,25]. Существенные сезонные изменения массы тела у них происходят осенью за счет накопления липидных запасов. Подкожные и внутренние жировые резервы имеют важное энергетическое и термоизоляционное значение, позволяя животным благополучно пережить экстремальные условия зимнего периода, в том числе вынужденное голодание [7]. В осеннее время они достигают максимальной величины практически у всех хищных млекопитающих. Так, к началу ноября масса тела за счет жировой ткани увеличивается у енотовидных собак и песцов на 30–50% [7,8,25]. Установлено, что благодаря высоким липидным резервам впадающие в зимний сон енотовидные собаки являются наиболее ус-

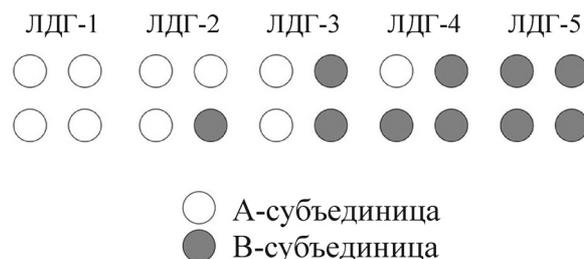


Рис. 2. Схема тетрамерной структуры состоящих из В- и А-субъединиц изоферментов ЛДГ млекопитающих.

тойчивыми и к голоданию [26]. В условиях эксперимента успешно размножались енотовидные собаки, голодавшие более четырех месяцев – с середины ноября до начала апреля. Голодание енотовидных собак со снижением веса до 60% от исходной массы тела не нарушало сперматогенез самцов и не прерывало беременность самок. Устойчивость к пищевой депривации у других представителей семейства псовых значительно ниже, чем у енотовидных собак. Так, песцы успешно размножались после 20–30 дней, а лисицы – после 10–20 дней полного алиментарного голодания [26].

Енотовидная собака, обитающая на Северо-Западе России, характеризуется довольно крупными размерами тела и относится к подвиду *N. p. ussariensis* Matsthe [8,11]. Обычно енотовидная собака проявляет двигательную активность, связанную с поиском кормов, в сумеречное и ночное время. Однако в осенний период, когда животные накапливают запасы подкожного жира, их можно встретить и в дневные часы [12]. Так, в октябре и начале ноября интенсивно питающиеся енотовидные собаки попадают как в сумерки, так и в дневное время, особенно в интервале от 12 до 15 часов. Увеличение содержания электрофоретических фракций ЛДГ-1 и ЛДГ-2 в ряде органов свидетельствует о смещении лактатдегидрогеназной реакции в сторону образования пирувата, который является одним из ключевых универсальных метаболитов в организме. Анаэробное окисление пирувата приводит к образованию высокоэнергетического соединения – ацетил-КоА, сложного органического вещества, необходимого для синтеза жирных кислот. Следовательно, осенью при достаточно высоком поступлении питательных веществ, в том числе и углеводов, пируват используется в конечном счете в процессе липогенеза *de novo*. Сложный метаболический путь превращения пирувата можно упрощенно представить следующим образом:

## ЛДГ

Углеводы → глюкоза → лактат → пируват → ацетил-КоА → жирные кислоты → липиды.

Следовательно, роль лактатдегидрогеназы связана с переключением энергообеспечения с углеводов, как основного источника энергии, на липиды.

Установлено, что прерывистый зимний сон у енотовидной собаки в северных частях России может продолжаться до середины марта [9]. Однако в южных районах у этих зверей зимнее оцепенение не наблюдается [10], или сроки его значительно сокращены. Эксперимент проводился одновременно в начале ноября в двух различных географических зонах – на Северо-Западе России и в более южной Польше. На этот период у северной группы хищников приходится усиление процесса липогенеза, в то время как у «южных» сородичей сохраняется обычное состояние. В результате этого у енотовидных собак, содержащихся в северном регионе, в тканях сердца, почек, легких, печени наблюдается более высокое относительное содержание аэробных В-субъединиц ЛДГ по сравнению с южными особями. Локомоторная активность енотовидных собак в осенний период значительно выше, чем у песцов [27]. Кроме того, отличительной особенностью *Nyctereutes procyonoides* является увеличение потребления кислорода и интенсивности метаболизма при наступлении нижней критической температуры +15°C [28,29], тогда как у голубого песца она находится на уровне минус 6°C [30].

Как видно, энергообеспечение организма осенью у енотовидных собак идет по более эффективному аэробному пути, о чем свидетельствует более высокое содержание В-субъединиц в изоферментном спектре ЛДГ почек, легких, селезенки, печени и скелетной мышце по сравнению с песцами и лисицами. Более интенсивное жиронакопление, более низкий уровень температуры тела, смещение обмена в сторону образования пирувата с последующим превращением в жирные кислоты позволяет енотовидным собакам создавать в организме энергорезервы, которые экономно расходуются в период зимнего сна. Эти особенности можно рассматривать как адаптивную реакцию организма, сложившуюся исторически и направленную на накопление фонда эндогенных жиров в осенний период подготовки к зиме и его использование при экстремальных воздействиях – низких температурах и вынужденном голодании.

Таким образом, при сравнительном анализе изоферментных спектров ЛДГ органов исследу-

емых млекопитающих обнаружены следующие особенности в распределении изоферментов. Показано, что у впадающих в зимний сон енотовидных собак при осеннем увеличении накопления липидов в организме в изоферментных спектрах ЛДГ во всех исследованных тканях, за исключением сердечной мышцы, содержится наибольшее количество В-субъединиц по сравнению с другими видами млекопитающих клеточного содержания семейства псовых. Установлено, что процентное содержание анодных изоферментов ЛДГ-1 и ЛДГ-2 в тканях сердца, почек, легких, печени, селезенки было выше у енотовидных собак, содержащихся в северном регионе, чем у южных особей. Сдвиг метаболизма в сторону образования пирувата свидетельствует о том, что осенью при достаточно высоком эндогенном поступлении питательных веществ, в том числе и углеводов, этот важный метаболит используется для синтеза жирных кислот в процессе липогенеза *de novo*.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания (тема № 0221-2014-0001).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. П. Хочачка и Дж. Сомеро, *Биохимическая адаптация* (Мир, М., 1988).
2. Н. И. Калабухов, *Спячка млекопитающих* (Наука, М., 1985).
3. H. V. Carey, M. T. Andrews, and S. L. Martin, *Physiol. Rev.* **83**, 1153 (2003).
4. В. А. Берестов и Л. К. Кожевникова, *Ферменты крови пушных зверей* (Наука, М., 1985).
5. А. А. Насимович, в кн. *Песец, лисица, енотовидная собака* (Наука, М., 1985), сс. 116–146.
6. П. Лапа, С. Лапински, В. Сливяк и др., *Вестн. ВОГиС* **13** (3), 647 (2009).
7. И. Л. Туманов, *Биологические особенности хищных млекопитающих России* (Наука, СПб., 2003).
8. J. Asikainen, A. M. Mustonen, H. Нувдринен and P. Nieminen, *Zoolog. Sci.* **21** 385 (2004).
9. П. И. Данилов, *Новые виды млекопитающих на Европейском Севере России* (Карельский научный центр РАН, Петрозаводск, 2009).
10. А. В. Паршинцев, *Науч. труды Гос. природного заповедника «Присурский»* **30** (2), 13 (2015).
11. Е. В. Карадулева, И. М. Санталова и Н. М. Захарова, *Биофизика* **59** (5), 926 (2014).
12. П. И. Данилов, О. С. Русаков и И. П. Туманов, *Хищные звери Северо-Запада СССР* (Наука, Л., 1979).
13. К. Райдер и К. Тейлор, *Изоферменты* (Мир, М., 1983).

14. Л. К. Кожевникова, Н. Н. Тютюнник, А. Р. Унжаков и др., Журн. эволюц. биохимии и физиологии **36** (1), 24 (2000).
15. Л. К. Кожевникова, Н. Н. Тютюнник, А. Р. Унжаков и др., Рос. физиол. журн. им И. М. Сеченова **90** (2), 187 (2004).
16. А. Р. Унжаков и Н. Н. Тютюнник, Журн. эволюц. биохимии и физиологии (в печати).
17. J. Everse and O. N. Kaplan, Adv. Enzymol. **37**, 61 (1973).
18. P. Marmillot, T. Keith, D. K. Srivastava, and H. R. Knull, Arch. Biochem. Biophys. **315** (2) 467 (1994).
19. R. P. Singh, K. V. N. Sastry, N. K. Pandey, et al., Theriogenology **75** (3), 555 (2011).
20. Э. Гааль, Г. Медьеши и Л. Верецкеи, *Электрофорез в разделении биологических макромолекул* (Мир, М., 1982).
21. R. Wieme, *Studies on agar-gel electrophoresis* (Brussels, 1959).
22. T. Sayd, T. Mera, and M. Veronique, Comp. Biochem. Physiol. **120B** (1), 153 (1998).
23. В. И. Афромеев и В. Н. Ткаченко, Биофизика **44** (5), 931 (1999).
24. G. T. Favero, S. Stavriaanes, and G. A. Klug, Exp. Physiol. **84**, 989 (1999).
25. P. Prestrud, Arctic **44**, 132 (1991).
26. Ю. С. Заболотских, Дис. ... д-ра биол. наук (Рос. гос. аграр. заоч. ун-т, М., 2000).
27. H. Korhonen, Comp. Biochem. Physiol. **91A** (2), 263 (1988).
28. H. Korhonen and M. Harri, Comp. Biochem. Physiol. **77A** 213 (1984).
29. M. Mustonen, J. Asikainen, K. Kauhala, et al., Chronobiol. Int. **24** 1095 (2007).
30. H. Korhonen, M. Harri, and E. Hohtola, Comp. Biochem. Physiol. **82A** (4), 959 (1985).

## Isoenzyme Spectra of Lactate Dehydrogenase in Tissues of Raccoon Dogs *Nyctereutes procyonoides* in Autumn

A.R. Unzhakov and N.N. Tyutyunnik

*Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences,  
ul. Pushkinskaya 11, Petrozavodsk, 185910 Russia*

Electrophoretic assay of lactate dehydrogenase (LDH, EC 1.1.1.27) isoenzymes in tissue homogenates of cardiac and skeletal muscles, kidneys, lungs, spleen, and liver of raccoon dogs *Nyctereutes procyonoides* Grey from two geographic areas (North-West of Russia, Poland), arctic blue foxes *Alopex lagopus* L., silver foxes *Vulpes vulpes* L. in the period of preparation for the winter season has been carried out. Raccoon dogs, falling in the winter sleep in nature, are different from the other species of canids (foxes, arctic foxes) close to them taxonomically and by body mass, possessing a greater proportion of aerobic B-subunits of LDH in all organs except the heart. The elevated levels of the «fast» anode fractions of LDH 1 and LDH-2 in tissues of heart, kidneys, lungs, liver, and spleen were detected in raccoon dogs in the northern region as compared to species in southern geographical area. A shift in the lactate dehydrogenase reaction towards formation of pyruvate indicates that in autumn this metabolite is used for fatty acid synthesis in the lipogenesis process.

*Key words: lactate dehydrogenase, isoenzymes, autumn, raccoon dog, silver fox, arctic blue fox*