

ИЗОФЕРМЕНТЫ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ТКАНЯХ ГИБЕРНИРУЮЩИХ РУКОКРЫЛЫХ (CHIROPTERA)

© 2018 г. Е.П. Антонова, В.А. Илюха, С.Н. Сергина, А.Р. Унжаков, В.В. Белкин

Институт биологии Карельского научного центра РАН, 185910, Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11

E-mail: antonova88ep@mail.ru

Поступила в редакцию 03.09.17 г.

Проведено сравнительное электрофоретическое исследование изоферментов лактатдегидрогеназы (НФ 1.1.1.27) в гомогенатах тканей сердечной и грудной скелетной мышцы, печени, почек и легких у пяти видов гибернарующих рукокрылых Chiroptera (северного кожанка *Eptesicus nilssonii* Keyserling et Blasius, бурого ушана *Plecotus auritus* L., ночниц: Брандта *Myotis brandtii* Eversmann, водяной *M. daubentonii* Kuhl и усатой *M. mystacinus* Kuhl), обитающих в Карелии вблизи северной границы ареала их распространения. В скелетной мышце рукокрылых было обнаружено высокое содержание аэробных изоферментов лактатдегидрогеназы-1 и лактатдегидрогеназы-2. Изоферментные спектры лактатдегидрогеназы тканей почек и скелетной мышцы у более мелких представителей гладконосых летучих мышей (ночницы Брандта и усатая) отличались наибольшим среди исследованных видов содержанием Н-субъединиц. Напротив, в изоферментных спектрах лактатдегидрогеназы почек бурого ушана и северного кожанка выявлено преобладание М-субъединиц. Обнаруженные межвидовые различия обуславливаются в контексте адаптации летучих мышей к гибернации.

Ключевые слова: изоферменты лактатдегидрогеназы, адаптация, гибернация, рукокрылые.

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ, L-лактатдегидрогеназа, НФ 1.1.1.27) представляет собой тетрамер, состоящий из двух типов субъединиц – субъединица Н (от англ. heart – сердце) и субъединица М (от англ. muscle – мышца). Изоферменты ЛДГ-1 и ЛДГ-5 образованы комбинацией идентичных Н- и М-субъединиц, соответственно, промежуточные же формы – ЛДГ-2 (НЗМ1), ЛДГ-3 (Н2М2), ЛДГ-4 (Н1М3) – являются гибридными и содержат субъединицы в разных соотношениях [1]. У млекопитающих М-изомер преобладает в гликолитических скелетных мышцах и в анаэробных условиях катализирует превращение пирувата в лактат, тогда как Н-изомер характерен для миокарда и функционирует в основном в аэробных условиях, конвертируя лактат в пируват. Таким образом, количество Н-субъединиц отражает аэробную мощность ткани, а преобладание М-субъединиц означает, что ткань преимущественно находится в относительно анаэробных условиях [2].

В сравнительной энзимологии ЛДГ широко используется в качестве модельного фермента при изучении биохимических адаптаций [2–4]. Выделяют две качественно различающиеся стратегии адаптации – резистентную и толерантную; примером последней является гибернация, при

которой наблюдается снижение температуры тела, уровня метаболизма и потребления кислорода [2,5–7]. Длительные периоды оцепенения у гибернантов регулярно перемежаются короткими периодами разогрева, когда температура тела восстанавливается до нормального эутермического уровня [6], что тесно связано с серьезными колебаниями уровня кислорода (гипоксия – реоксигенация). Уникальными объектами изучения биохимических и физиологических адаптаций организма к условиям гибернации являются рукокрылые Chiroptera. Расход энергетических запасов (жира) у них во время гибернации напрямую зависит от уровня основного обмена и количества пробуждений. У гибернарующих млекопитающих (грызунов и рукокрылых) по мере углубления зимней спячки продолжительность периодов гипотермии увеличивается и достигает максимума в середине гибернации (январь) [8,9]. Ранее проведенные исследования [10,11] свидетельствуют о том, что во время зимней спячки у млекопитающих (*Citellus tridecemlineatus* и *Myotis lucifugus*) наблюдаются метаболические сдвиги, сопровождающиеся изменениями в активности ЛДГ и распределении ее изоферментов.

Основу современной хироптерофауны Республики Карелия на зимовках составляют широко распространенные оседлые бореальные гладконосые виды отряда Chiroptera – северный кожанок *Eptesicus nilssonii*, бурый ушан *Plecotus*

Сокращение: ЛДГ – лактатдегидрогеназа.

auritus и ночница Брандта *Myotis brandtii*. Другие виды этой группы (усатая ночница *M. mystacinus* и водяная ночница *M. daubentonii*) встречаются значительно реже [12]. Механизмы устойчивости к зимней спячке и их взаимосвязь с экологическими особенностями рукокрылых до настоящего времени изучены недостаточно, но, без сомнения, заслуживают самого пристального внимания.

В связи с этим целью нашего исследования явилось изучение особенностей распределения изоферментов ЛДГ в период зимней спячки у пяти видов рукокрылых, обитающих на северной границе ареала.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили пять видов гладконосых летучих мышей (Vespertilionidae, Chiroptera) – ночницы: водяная *Myotis daubentonii* Kuhl ($n = 2$, масса тела $8,49 \pm 0,38$ г), Брандта *M. brandtii* Eversmannn ($n = 3$, масса тела $6,57 \pm 0,66$ г) и усатая *M. mystacinus* Kuhl ($n = 2$, масса тела $4,49 \pm 0,53$ г), бурый ушан *Plecotus auritus* L. ($n = 3$, масса тела $7,28 \pm 0,39$ г) и северный кожанок *Eptesicus nilssonii* Keyserling et Blasius ($n = 10$, масса тела $8,68 \pm 0,42$ г). Выборочный сбор животных был проведен в период их спячки (с октября 2015 г. по март 2016 г.) на зимовках в Республике Карелия ($61\text{--}63^\circ$ с.ш., $30\text{--}36^\circ$ в.д.) по разрешению Управления охотничьего хозяйства Республики Карелия (№№ 0002-2010, 0001-2011, 00008-2013, 00011-2016). Все процедуры с животными проводили в соответствии с требованиями Комиссии по этике ИБ КарНЦ РАН и Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (European Communities Council Directive 86/609/ЕЕС). Численность летучих мышей в одной пещере или подземелье варьировала от 1 до 25 экземпляров, что и определило количественный и качественный объем выборки. Отловленных рукокрылых содержали в лабораторных условиях при температуре $+4^\circ\text{C}$ в течение суток, после чего производили взвешивание и декапитацию спящих животных с последующим отбором образцов тканей.

Для исследования изоферментного спектра ЛДГ гомогенаты тканей (печени, почек, сердца, легких и грудной скелетной мышцы) готовили на 0,05 М фосфатном буфере (рН 7,0) и оставляли для экстракции фермента на 16–18 ч в холодильнике при $+4^\circ\text{C}$, затем центрифугировали при 6000 г в течение 15 мин.

Разделение изоферментов ЛДГ осуществляли методом горизонтального энзимэлектрофореза на пластинках агарового геля по Вайму [13] с использованием отечественного прибора

ПЭФ-3 при напряжении 3–4 В/см и силе тока 50 мА/см. Продолжительность электрофореза составляла 90–120 мин. Методы выделения, разделения и определения изоферментов ЛДГ были описаны нами ранее [14]. Учитывая, что исследуемый фермент имеет тетрамерное строение, суммарное содержание Н- и М-субъединиц рассчитывали соответственно по формулам:

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

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

Результаты исследований были обработаны с применением пакетов программ MS Excel и Statgraphics. Сравнение проводили с применением непараметрического *U*-критерия Вилкоксона–Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изоферменты ЛДГ, участвуя в процессах приспособления к факторам внешней среды, обеспечивают обмен, характерный для каждого типа тканей и вида животных [15]. В результате нашего исследования была выявлена тканеспецифичность изоферментного спектра ЛДГ у изученных видов гладконосых летучих мышей (табл. 1, 2; рисунок).

По распределению изоферментов ЛДГ у млекопитающих принято выделять три группы тканей [3,15–17]. У лошадей, лисиц, песцов, кроликов, крыс, мышей и ряда других видов прослеживается следующая закономерность: в сердце и почках преобладают изоэнзимы ЛДГ-1 и ЛДГ-2, напротив, в печени и скелетной мышце доминирующими изоферментами являются ЛДГ-4 и ЛДГ-5; к «промежуточной» группе тканей относятся легкие и селезенка, где преобладают гибридные формы фермента. В нашем исследовании у изученных видов рукокрылых классическая картина распределения изоферментов ЛДГ выявлена в следующих органах: в сердце и почках преобладают первая и вторая анодные фракции фермента (исключение почки северного кожанка и бурого ушана), в тканях печени преобладали ЛДГ-4 и ЛДГ-5, в легких – ЛДГ-2, ЛДГ-3 и ЛДГ-4. Однако в изоферментных спектрах грудной скелетной мышцы летучих мышей преобладали изоферменты ЛДГ-1 и ЛДГ-2 (табл. 2), что согласуется с литера-

Таблица 1. Процентное содержание изоферментов и Н- и М-субъединиц ЛДГ в тканях печени и почек у пяти видов рукокрылых

Изоферменты ЛДГ, %					Субъединицы, %	
ЛДГ-1	ЛДГ-2	ЛДГ-3	ЛДГ-4	ЛДГ-5	Н	М
Печень						
Водяная ночница <i>Myotis daubentonii</i> Kuhl. (n = 2)						
0,10 ± 0,10	0	0	0	99,90 ± 0,10	0,10 ± 0,10	99,90 ± 0,10
Ночница Брандта <i>Myotis brandtii</i> Eversmannn (n = 3)						
0,23 ± 0,23	0	0	0	99,77 ± 0,23	0,23 ± 0,23	99,77 ± 0,23
Усатая ночница <i>Myotis mystacinus</i> Kuhl. (n = 2)						
1,27 ± 0,82	0	0	0	98,73 ± 0,82	1,27 ± 0,82	98,73 ± 0,82
Бурый ушан <i>Plecotus auritus</i> L. (n = 3)						
0,42 ± 0,24	0	0	0	99,58 ± 0,24	0,42 ± 0,24	99,58 ± 0,24
Северный кожанок <i>Eptesicus nilssonii</i> Keyserling et Blasius (n = 10)						
0,27 ± 0,13	0	0	0	99,73 ± 0,13	0,27 ± 0,13	99,73 ± 0,13
Почки						
Водяная ночница <i>Myotis daubentonii</i> Kuhl. (n = 1)						
41,62	30,11	5,83	5,80	16,64	68,57	31,43
Ночница Брандта <i>Myotis brandtii</i> Eversmannn (n = 3)						
47,86 ± 4,29	23,64 ± 0,76	6,15 ± 0,72	10,19 ± 1,71	12,16 ± 2,63	71,21 ± 4,05	28,79 ± 4,05
Усатая ночница <i>Myotis mystacinus</i> Kuhl. (n = 1)						
48,72	25,55	7,61	9,45	8,67	74,05	25,95
Бурый ушан <i>Plecotus auritus</i> L. (n = 3)						
11,61 ± 0,09	22,44 ± 1,40	19,53 ± 2,67	15,49 ± 1,77	30,94 ± 1,53	42,07 ± 1,31	57,93 ± 1,31
Северный кожанок <i>Eptesicus nilssonii</i> Keyserling et Blasius (n = 10)						
15,05 ± 0,85*	22,17 ± 0,80	17,89 ± 1,27	9,26 ± 0,85**	35,62 ± 1,70*	42,94 ± 1,16*	57,06 ± 1,16*

Примечание. * – Различия достоверны по сравнению с ночницей Брандта; ** – по сравнению с бурым ушаном в той же ткани, $p < 0,05$.

турными данными по другим видам рукокрылых [11,18].

Также в результате исследования были обнаружены межвидовые различия в процентном содержании изоферментов ЛДГ. Так, среди трех изученных нами видов ночниц у водяной ночницы почти во всех органах (за исключением легких) выявлено наибольшее содержание М-субъединиц (табл. 1, 2). Более того, водяная ночница отличалась максимальным среди всех изученных видов рукокрылых содержанием изофермента ЛДГ-5 и, соответственно, М-субъединиц в печени (табл. 1).

Между ночницей Брандта и усатой ночницей было обнаружено сходство в распределении изоферментов ЛДГ в почках и скелетной мышце – у этих видов выявлено наибольшее среди изученных видов рукокрылых содержание Н-субъединиц в данных органах (рисунок; табл. 1, 2). Различия в изоферментном спектре ЛДГ между исследованными видами ночниц наблюдались в легких. Так, легочная ткань ночницы

Брандта отличалась от соответствующей ткани усатой ночницы преобладанием М-субъединиц и минимальным среди изученных видов относительным содержанием ЛДГ-1 и максимальным – ЛДГ-4 (табл. 2). В дополнение к этому, во всех органах, за исключением печени, у усатой ночницы, самого мелкого вида среди исследованных нами рукокрылых, преобладали Н-субъединицы ЛДГ (табл. 1, 2). Более того, усатая ночница отличалась минимальным по сравнению с другими исследованными видами относительным содержанием изофермента ЛДГ-5 в печени ($98,73 \pm 0,82$).

В изоферментных спектрах почек бурого ушана отмечено наименьшее среди изученных видов рукокрылых содержание Н-субъединиц (рисунок, табл. 1). Также в скелетных мышцах бурого ушана обнаружено минимальное среди изученных видов, а в сердечной ткани, напротив, максимальное содержание Н-субъединиц. Особенно легочной ткани этого вида было почти равное содержание Н- и М-субъединиц ЛДГ.

Таблица 2. Процентное содержание изоферментов и Н- и М-субъединиц ЛДГ в тканях легких, сердечной и скелетной мышцы у пяти видов рукокрылых

Изоферменты ЛДГ, %					Субъединицы, %	
ЛДГ-1	ЛДГ-2	ЛДГ-3	ЛДГ-4	ЛДГ-5	Н	М
Легкие						
Водяная ночница <i>Myotis daubentonii</i> Kuhl. (n = 1)						
14,11	9,02	19,62	40,09	17,16	40,70	59,30
Ночница Брандта <i>Myotis brandtii</i> Eversmannn (n = 3)						
5,98 ± 1,71	7,37 ± 0,62	17,06 ± 4,09	47,46 ± 7,12	22,14 ± 0,70	31,90 ± 2,44	68,10 ± 2,44
Усатая ночница <i>Myotis mystacinus</i> Kuhl. (n = 1)						
24,60	21,73	27,20	21,26	5,22	59,80	40,20
Бурый ушан <i>Plecotus auritus</i> L. (n = 3)						
22,82 ± 7,22	13,91 ± 2,87	20,66 ± 2,17	24,48 ± 7,10	18,14 ± 4,51	49,70 ± 7,07	50,30 ± 7,07
Северный кожанок <i>Eptesicus nilssonii</i> Keyserling et Blasius (n = 10)						
18,55 ± 3,01	13,02 ± 1,81	15,91 ± 1,71	29,42 ± 2,92	23,10 ± 4,31	43,62 ± 3,65	56,38 ± 3,65
Сердце						
Водяная ночница <i>Myotis daubentonii</i> Kuhl. (n = 1)						
81,56	18,44	0	0	0	95,39	4,61
Ночница Брандта <i>Myotis brandtii</i> Eversmannn (n = 3)						
85,57 ± 4,96	12,90 ± 4,13	0,60 ± 0,35	0,40 ± 0,23	0,53 ± 0,33	95,64 ± 1,66	4,36 ± 1,66
Усатая ночница <i>Myotis mystacinus</i> Kuhl. (n = 1)						
82,22	17,78	0	0	0	95,56	4,44
Бурый ушан <i>Plecotus auritus</i> L. (n = 3)						
87,19 ± 1,41	12,81 ± 1,41	0	0	0	96,80 ± 0,35	3,20 ± 0,35
Северный кожанок <i>Eptesicus nilssonii</i> Keyserling et Blasius (n = 10)						
82,59 ± 2,32	17,41 ± 2,32	0	0	0	95,65 ± 0,58	4,35 ± 0,58
Скелетная мышца						
Водяная ночница <i>Myotis daubentonii</i> Kuhl. (n = 2)						
67,57 ± 1,10	24,97 ± 4,33	5,74 ± 3,70	0,94 ± 0,94	0,79 ± 0,79	89,40 ± 2,26	10,60 ± 2,26
Ночница Брандта <i>Myotis brandtii</i> Eversmannn (n = 3)						
79,68 ± 3,39	17,46 ± 3,30	1,47 ± 0,33	0,48 ± 0,22	0,91 ± 0,25	93,63 ± 0,91	6,37 ± 0,91
Усатая ночница <i>Myotis mystacinus</i> Kuhl. (n = 1)						
74,68	24,26	0,62	0,12	0,32	93,22	6,78
Бурый ушан <i>Plecotus auritus</i> L. (n = 3)						
53,77 ± 4,25*	30,70 ± 2,25*	10,19 ± 3,82*	3,82 ± 2,24	1,52 ± 0,67	82,85 ± 3,52*	17,15 ± 3,52*
Северный кожанок <i>Eptesicus nilssonii</i> Keyserling et Blasius (n = 10)						
65,82 ± 2,62*	28,71 ± 1,47*	4,96 ± 1,32	0,13 ± 0,05	0,39 ± 0,06*	89,86 ± 0,97*	10,14 ± 0,97*

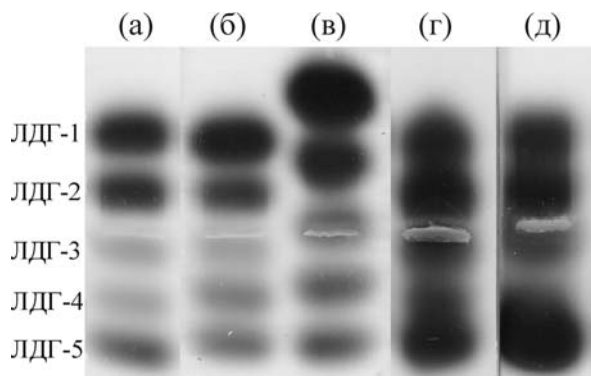
Примечание. * – Различия достоверны по сравнению с ночницей Брандта, $p < 0,05$.

Анализ изоферментных спектров ЛДГ в почках северного кожанка выявил максимальное среди изученных рукокрылых содержание ЛДГ-5 (достоверно выше, чем у ночницы Брандта, $p < 0,05$) (рисунок, табл. 1). В легких у северного кожанка, точно так же как и у ночниц (Брандта и водяной), преобладали М-субъединицы. Необходимо отметить, что в скелетной мышце у северного кожанка содержание как ЛДГ-1, так

и ЛДГ-2 было достоверно ниже, чем у ночницы Брандта ($p < 0,05$) (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Отмеченные нами органо-тканевые особенности распределения изоферментов ЛДГ отражают метаболический профиль органа. Так, среди изученных нами органов печень отлича-



Электрофореграммы почек водяной ночницы (а), ночницы Брандта (б), усатой ночницы (в), бурого ушана (г) и северного кожанка (д).

ется наиболее сложным обменом глюкозы (синтез и распад гликогена, липогенез, глюконеогенез и гликолиз) [17,19]. У сытых крыс гликолитическая способность печени эквивалентна ее способности к синтезу жирных кислот [19]. Высокое процентное содержание изоэстаза ЛДГ-5 в печени исследованных видов рукокрылых, вероятно, не является уникальным свойством гибернантов, поскольку печень негибирующего суслика *Spermophilus tridecemlineatus* Mitchell и лабораторной крысы также содержит более 90% М-субъединиц [10].

Почки являются органом, поддерживающим осмотический гомеостаз. Энергетическим источником их функционирования, особенно мозгового вещества, служит аэробный гликолиз, энергия которого используется в процессах клубочковой фильтрации и канальцевой реабсорбции [20]. В классическом представлении изоферменты ЛДГ тканей почек большинства млекопитающих располагаются в порядке убывания их процентного содержания: ЛДГ-1 > ЛДГ-2 > ЛДГ-3 > ЛДГ-4 > ЛДГ-5 [14,15]. Однако в изоферментном спектре ЛДГ почек изученных видов рукокрылых было выявлено высокое процентное содержание гибридных фракций ЛДГ-2, ЛДГ-3 и ЛДГ-4 (табл. 1; рисунок, в–д). Ранее нами было показано, что у зимоспящей лесной мышовки *Sicista betulina* Pallas в изоферментном спектре сердца и почек также преобладали гибридные фракции [21]. В тех тканях, где периодически создаются как аэробные, так и анаэробные условия, одновременное присутствие как Н-, так и М-субъединиц является наиболее выгодным – в этом случае большая часть молекул ЛДГ будет относиться к гибриднему типу.

Изоферментам ЛДГ присущи разные кинетические характеристики – зависимость от рН, при котором они проявляют максимальную активность, сродство к субстратам и кофакторам [15,16]. Во время гибернации происходит

снижение частоты дыхания, кровообращения и общее подавление большинства обменных процессов, в том числе энзиматической активности ферментов. В исследовании на малой бурой ночнице *Myotis lucifugus* Le Conte [11] была выявлена более низкая активность ЛДГ в тканях печени, сердца и грудной скелетной мышцы у гибирующих животных по сравнению с активными. Наряду с этим в период спячки фермент демонстрирует более высокую устойчивость к колебаниям температуры: у гибирующих ночниц в температурном диапазоне от 5 до 20°C константа Михаэлиса для ЛДГ была более стабильной, чем у активных животных, что скорее всего связано с различиями кинетических характеристик изоферментов [11]. В нашем исследовании среди изученных видов в почках выявлена более высокая электрофоретическая подвижность изоферментов ЛДГ-1 и ЛДГ-2 у усатой ночницы (рисунок, в).

Сердце млекопитающих, для которого в качестве энергетического субстрата лактат является более предпочтительным, чем глюкоза, в классическом представлении является органом с преобладанием первой и второй анодных фракций ЛДГ-1 и ЛДГ-2 [15,17]. Ранее в исследовании на сусликах [10] было продемонстрировано, что доля субъединиц ЛДГ М-типа (каковыми являются ЛДГ-4 и ЛДГ-5) значительно увеличивалась в сердечной ткани во время гибернации.

Несмотря на то что скелетную мышцу принято относить к тканям с преобладанием ЛДГ-4 и ЛДГ-5 [2,15,17], волокна грудной скелетной мышцы рукокрылых отличаются высокой окислительной способностью (по активности сукцинатдегидрогеназы) и низким гликолитическим потенциалом (по активности фосфофруктокиназы) [22]. Именно поэтому у исследованных нами летучих мышей в изоферментных спектрах грудной скелетной мышцы преобладали изоферменты ЛДГ-1 и ЛДГ-2, что согласуется с ранее полученными на других видах гладконосых летучих мышей данными [11,18]. Более высокое содержание аэробных изоферментов ЛДГ-1 и ЛДГ-2 в скелетной мышце летучих мышей по сравнению с другими млекопитающими свидетельствует о сдвиге лактатдегидрогеназной реакции в сторону образования пирувата. Однако в работе [23] было обнаружено увеличение концентрации лактата в плазме во время пробуждения у летучих мышей, что может быть следствием выведения его из органов во время интенсификации процессов кровообращения и указывает на возникновение гипоксии в тканях.

Помимо тканевых особенностей распределения изоферментов нами были обнаружены межвидовые различия изоферментного спектра

ЛДГ, что, возможно, является видовым признаком и/или отражает физиологические особенности гипотермного периода. Все исследованные пять видов рукокрылых впадают в зимнюю спячку, но условия гибернации отличаются [12,24,25]. Основные критерии зимних местообитаний – температура и влажность воздуха, обеспечивающие определенный микроклимат убежищ, благоприятный для избегания заморозания и высыхания животных [5,12]. На данный момент существует теория, согласно которой на северной границей ареала обитания виды, широко распространенные на Севере, преднамеренно зимуют в более холодных условиях, не используя никаких дополнительных энергосберегающих методов, в отличие от видов из более южных регионов [26]. Так, например, гибернация у ночниц (северная граница ареала их обитания находится южнее, чем у северного кожанка и бурого ушана) проходит при более высоких температурах, чем у других исследованных видов [25]. Более того, в целях минимизации энергетических затрат во время гибернации ночницы Брандта и усатая чаще используют микроукрытия (щели и шпурсы), а также образуют кластеры в отличие от северного кожанка, который может зимовать в малозащищенных от мороза пещерах, непригодных для других видов летучих мышей, и располагаться в них преимущественно открыто на поверхностях потолка и стен [12,25]. Более того, продолжительность периодов оцепенения у северного кожанка в среднем больше по сравнению с бурым ушаном и водяной ночницей [24]. Эти факты позволяют предположить, что кожанок имеет другую стратегию экономии энергии, используя как низкую температуру окружающей среды, так и более длинные бауты гибернации [24,26]. Однако необходимо отметить, что изоферментный спектр ЛДГ определяется не только потребностями при низком уровне метаболизма, но и необходимостью быстро восстанавливать метаболический гомеостаз при переходе к активному состоянию. В результате нашего исследования между ночницами Брандта и усатой было выявлено сходство в распределении изоферментов ЛДГ в почках и скелетной мышце. Данные виды отличались наибольшим среди изученных видов рукокрылых содержанием Н-субъединиц в этих органах (рисунки; табл. 1, 2). Более того, во всех органах, за исключением печени, у усатой ночницы, самого мелкого вида среди исследованных нами рукокрылых, преобладали Н-субъединицы ЛДГ (табл. 1, 2), что возможно, является адаптацией для быстрой утилизации циркулирующего лактата. Напротив, у водяной ночницы, наиболее крупной среди изученных нами ночниц, почти во всех органах (за исключением легких) выявлено наибольшее содержание М-субъединиц

(табл. 1, 2). Ранее было продемонстрировано [18], что по сравнению с листоносими летучими мышами (Phyllostomidae) изоферментные спектры ЛДГ грудной мышцы гладконосых летучих мышей (Vespertilionidae), способных к быстрому и маневренному полету, отличаются преобладанием Н-субъединиц и больше зависят от аэробного метаболизма, чем от анаэробных процессов.

Ранее было показано, что северный кожанок ($2,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$) и бурый ушан ($2,7 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$) зимовали в более холодных и сухих местах, в то время как водяная ночница ($4,4 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$) и усатая ночница / ночница Брандта ($4,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$) зимовали в более теплых и более влажных местах [25]. В изоферментных спектрах почек и скелетной мышцы бурого ушана и северного кожанка было обнаружено самое низкое среди изученных видов рукокрылых содержание Н-субъединиц (табл. 1, 2). Именно в этих органах обнаружено максимальное количество достоверных межвидовых различий. Так, анализ изоферментных спектров ЛДГ почек северного кожанка выявил максимальное среди изученных рукокрылых содержание ЛДГ-5 (достоверно выше, чем у ночницы Брандта), а в скелетной мышце у северного кожанка и бурого ушана содержание как ЛДГ-1, так и ЛДГ-2 было достоверно ниже, чем у ночницы Брандта.

Таким образом, при сравнительном анализе изоферментных спектров ЛДГ органов исследованных млекопитающих обнаружены следующие особенности в распределении изоэнзимов. В скелетной мышце рукокрылых по сравнению с другими млекопитающими отмечено высокое содержание аэробных изоферментов ЛДГ-1 и ЛДГ-2. Изоферментные спектры ЛДГ тканей почек и скелетной мышцы у ночниц Брандта и усатой отличались наибольшим среди исследованных видов содержанием аэробных «сердечных» Н-субъединиц. Кроме того, во всех органах, за исключением печени, у усатой ночницы, самого мелкого вида среди исследованных нами рукокрылых, преобладали Н-субъединицы ЛДГ. Напротив, у водяной ночницы, более крупной среди изученных нами ночниц, почти во всех органах (за исключением легких) выявлено наибольшее содержание М-субъединиц. Также в изоферментных спектрах ЛДГ почек бурого ушана и северного кожанка обнаружено максимальное среди исследованных видов содержание изофермента ЛДГ-5 и преобладание М-субъединиц.

Авторы выражают особую благодарность сотрудникам лаборатории экологической физиологии животных ИБ КарНЦ РАН к.б.н. Е.А. Хижкину и А.В. Морозову за помощь в отлове животных.

Финансовое обеспечение исследования осуществлялось из средств Федерального бюджета на выполнение государственного задания (темы 0221-2014-0031 и 0221-2014-0037), а также при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-34-00283 мол_а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. Philp, L. A. Macdonald, and P. W. Watt, *J. Exp. Biol.* **208**, 4561 (2005).
2. P. Hochachka and G. Somero, *Biochemical adaptation* (Oxford University Press, New-York., 2002).
3. S. Sergina, E. Antonova, V. Ilyukha, et al., *Comp. Biochem. Physiol.* **190B**, 37 (2015).
4. K. B. Storey, *Comp. Biochem. Physiol.* **199**, 13 (2016).
5. Н. И. Калабухов, *Спячка млекопитающих* (Наука, М., 1985).
6. G. Heldmaier, S. Ortman, and R. Elvert, *Respir. Physiol. Neurobiol.* **141**, 317 (2004).
7. F. Breukelen and S. L. Martin, *Physiology* **30**, 273 (2015).
8. А. И. Ануфриев и Ю. В. Ревин, *Plecotus et al.* **9**, 8 (2006).
9. Н. Г. Соломонов, А. И. Ануфриев и И. М. Охлопков, *Наука и образование* **2**, 60 (2012).
10. R. F. Burlington and J. H. Sampson, *Comp. Biochem. Physiol.* **25**, 185 (1968).
11. T. W. Moon, *Comp. Biochem. Physiol.* **59B**, 183 (1978).
12. В. В. Белкин, Д. В. Панченко, К. Ф. Тирронен и др., *Экология* **5**, 374 (2015).
13. R. Wieme, *Studies on agar-gel electrophoresis*. (Brussels, 1959).
14. А. Р. Унжаков и Н. Н. Тютюнник, *Биофизика* **61** (4), 758 (2016).
15. Л. К. Кожевникова, Н. Н. Тютюнник, А. Р. Унжаков и Х. И. Мелдо, в сб. *Проблемы экологической физиологии пушных зверей* (Изд-во КНЦ РАН, Петрозаводск, 2004), сс. 8–27.
16. К. Райдер и К. Тейлор, *Изоферменты* (Мир, М., 1983).
17. П. Хочачка и Дж. Сомеро, *Биохимическая адаптация* (Мир, М., 1988).
18. D. Valdivieso, E. Conde, and J. R. Tamsitt, *Comp. Biochem. Physiol.* **27**, 133 (1968).
19. H. F. Woods and H. A. Krebs, *Biochem. J.* **125**, 129 (1971).
20. Ю. В. Наточин, *Проблемы эволюционной физиологии водно-солевого обмена* (Наука, Л., 1984).
21. Е. П. Антонова, Е. А. Хижкин и А. Е. Полетаева, в сб. *Труды Международного форума по проблемам науки, техники и образования* (2012), с. 114.
22. R. B. Armstrong, C. D. Ianuzzo, and T. H. Kunz, *J. Comp. Physiol.* **119**, 141 (1977).
23. M. Lee, I. Choi, and K. Park, *J. Neurochem.* **82** (4), 867 (2002).
24. А. И. Ануфриев, *Механизмы зимней спячки мелких млекопитающих Якутии* (Изд-во СО РАН, Новосибирск, 2008).
25. Y. Siivonen and T. Wermundsen, *Mammalia* **72**, 50 (2008).
26. T. Wermundsen and Y. Siivonen, *Lutra* **53** (2), 51 (2010).

Lactate Dehydrogenase Isoenzyme Patterns in Tissues of Hibernating Bats (Chiroptera)

E.P. Antonova, V.A. Ilyukha, S.N. Sergina, A.R. Unzhakov, and V.V. Belkin

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

A comparative electrophoretic assay of lactate dehydrogenase isoenzymes (EC 1.1.1.27) in tissues homogenates of cardiac and skeletal muscles, liver, kidneys and lungs has been carried out in five species of torpid bats Chiroptera – the northern bat *Eptesicus nilssonii* Keyserling and Blasius, the brown long-eared bat *Plecotus auritus* L., the Brandt's bat *Myotis brandtii* Eversmann, the Daubenton's bat *M. daubentonii* Kuhl and the whiskered bat *M. mystacinus* Kuhl, living in Karelia near the northern border of species distribution area. High contents of aerobic lactate dehydrogenase 1 and lactate dehydrogenase 2 isoenzymes were detected in pectoral muscle of studied bats. In small-sized bats (the whiskered and Brandt's bats) the lactate dehydrogenase isoenzyme spectra in kidney and skeletal muscle showed H subunits in the highest content among studied species. However, in the northern bat and the brown long-eared bat the predominant M-subunits were revealed in kidney lactate dehydrogenase pattern. Species differences are discussed in the context of bat adaptations to hibernation conditions.

Keywords: lactate dehydrogenase isoenzyme, adaptation, hibernation, Chiroptera