

Н. Н. Тютюнник, А. Р. Унжаков

Изоферментные спектры ЛДГ у гибридов, полученных при гибридизации песцов и лисиц

Аннотация. Проведен сравнительно-видовой анализ распределения изоферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в гомогенатах тканей сердца, почек, легких, селезенки, печени и скелетных мышц у вуалевых песцов (*Alopex lagopus* L.), лисиц (*Vulpes vulpes* L.) и песцово-лисыих гибридов (блюфростов). Установлено, что у этих представителей семейства Собачьих максимальные межвидовые различия отмечены в скелетной мышце, а минимальные – в сердце и почках. На основе кластерного анализа показано, что картина распределения изоэнзимов в сердце, легких и скелетных мышцах у песцово-лисыих гибридов, была более сходной с таковой у лисиц, чем у песцов.

Ключевые слова: гибрид, песец, лисица, изоферменты лактатдегидрогеназы, распределение в тканях.

Сведения об авторах:

Тютюнник Николай Николаевич — доктор сельскохозяйственных наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории экологической физиологии животных Института биологии КарНЦ РАН, Петрозаводск, Пушкинская, 11, тел. +7 (142) 57-31-07, эл. почта: tyutyunnik@krc.karelia.ru;

Унжаков Алексей Рудольфович — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаб. экологической физиологии животных ИБ КарНЦ РАН, Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11, тел. +7 (142) 57-31-07, эл. почта: uar@bio.krc.karelia.ru.

Введение. Актуальной задачей генетики является создание новых форм животных, включающие в одном организме, как родительские, так и собственные признаки и свойства. В звероводстве наибольший теоретический и практический интерес представляют гибриды, полученные в результате прямого скрещивания самок вуалевого песца с самцами серебристо-черной лисицы. Эти песцово-лисыи гибриды (bluefrost) отличаются более высокой жизнеспособностью потомства и интенсивностью роста по сравнению со щенками лисиц и песцов [1]. По окраске и структуре волосяного покрова у гибридов наблюдается четкая дихотомия, но в среднем они занимают промежуточное положение между лисицей и песцом. Длину тела гибриды наследуют, как правило, от лисиц, а конституцию — от песцов, в результате чего они существенно превосходят исходные виды по массе тела [2, 3].

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ, L-лактат: НАД⁺-оксиредуктаза, НФ 1.1.1.27) в большинстве тканей млекопитающих имеет тетрамерное строение, и ее изоферменты состоят из А- и В-субъединиц, являющимся продуктами независимых генных локусов *ldh-a* и *ldh-b* [4,5]. Известно, что тканевые изоферментные спектры ЛДГ у различных видов животных генетически детерминированы, могут отличаться даже в пределах такой таксономической единицы, как семейство [6,7,8]. В связи с этим представляет интерес изучение распре-

деления изоферментов ЛДГ у гибридов в сравнении с исходными формами.

Цель настоящей работы состояла в сравнительном анализе распределения изоферментных спектров ЛДГ в шести тканях у трех представителей семейства Собачьих: песцово-лисыих гибридов, вуалевых песцов и серебристо-черных лисиц.

Условия, материалы и методы исследований. Исследования были проведены на 7-месячных животных клеточного содержания: самки вуалевых песцов (*Alopex lagopus* L.), самцы серебристо-черных лисиц (*Vulpes vulpes* L.) самцы — песцово-лисыих гибридов (*Alopex*×*Vulpes* hybrids). Песцы и лисицы были выращены в зверохозяйстве ЗАО «Пряжинское» (Республика Карелия), гибриды — на звероферме ООО «Северная пушнина» (филиал «Знаменка», Псковская область). Песцово—лисыи гибриды были получены при скрещивании самок вуалевого песца с самцами серебристо-черных лисиц.

В период планового забоя были взяты образцы тканей сердца, почек, легких, селезенки, скелетной мышцы (*Musculus quadriceps femoris*) которые до проведения биохимического анализа хранили в низкотемпературной камере (-25°C). Для исследования изоферментного спектра ЛДГ гомогенаты тканей готовили на 0,05 М фосфатном буфере (рН=7,0). После центрифугирования при 6000g в течение 15 мин. в супернатантах проводили разделение изоферментов ЛДГ мето-

дом горизонтального энзимэлектрофореза на пластинках агарового геля с последующим окрашиванием и сканированием фореграмм [4]. Для анализа сканированных энзимограмм ЛДГ использовали компьютерную программу «Видеотест». Содержание каждого изофермента выражали в процентах от общего содержания ЛДГ. Достоверность различий групповых средних оценивали с использованием *t*-критерия. Для оценки сходства лисиц, песцов и лисо-песцовых гибридов по изоферментам ЛДГ использовали кластерный анализ [9].

Анализ и обсуждения результатов. Известно, что специфичный для разных органов и тканей изоферментный спектр ЛДГ проявляется уже на ранних стадиях онтогенеза и становится наиболее выраженным у взрослых животных [4,5]. В нашем исследовании установлено, что у представителей семейства собачьих в исследованных органах лактатдегидрогеназа существует в пяти молекулярных формах: от «быстрой» анодной фракции ЛДГ-1 до «медленной» катодной ЛДГ-5 (табл. 1).

В сердце количество анодных форм составляет доминирующую часть от общего содержания

ЛДГ. Так, отмечается высокое суммарное количество аэробных изоферментов ЛДГ-1 и ЛДГ-2, которое составило 94,4% у лисиц, 93,0 — у гибридов, 85,1 — у песцов. Доля катодной медленно мигрирующей анаэробной изоформы ЛДГ-5 у песцово-лисых гибридов и песцов была низкой, а у лисиц она отсутствовала. В количественном отношении все пять фракций ЛДГ сердечной мышцы у разных видов *Canidae* укладываются в ряд в порядке убыви относительного содержания: ЛДГ-1 > ЛДГ-2 > ЛДГ-3 > ЛДГ-4 > ЛДГ-5.

В почках у большинства представителей семейства собачьих наблюдается высокое суммарное содержание анодных аэробных изоферментов ЛДГ-1 и ЛДГ-2 с преобладанием первой фракции. В тканях почек песцово-лисых гибридов суммарное содержание этих изоферментов, по сравнению с другими видами, было самым высоким, составляя 57,0%. Известно, что источником энергии для осуществления выделительной функции почек служат, в основном, процессы окислительного фосфорилирования [4,5].

В легких у исследованных млекопитающих отмечено достаточно высокое содержание аэробной

Таблица 1. Изоферментные спектры лактатдегидрогеназы органов животных, % ($M \pm m$, $n=5$)

Исследуемые животные	ЛДГ-1	ЛДГ-2	ЛДГ-3	ЛДГ-4	ЛДГ-5
Сердце					
Песцово-лисий гибрид	53,5±2,0	39,5±1,5	3,9±0,7	2,9±0,8	0,2±0,2
Вуалевый песец	46,4±2,7*	38,7±0,4	10,2±1,9*	4,5±1,0	0,1±0,1
Серебр.-черная лисица	60,7±2,5*	33,7±1,9*	2,6±0,1	2,9±0,7	0
Почки					
Песцово-лисий гибрид	36,2±2,1	20,8±1,0	17,7±1,3	14,6±1,1	10,7±2,4
Вуалевый песец	32,3±1,6	22,0±1,1	12,3±0,8*	14,5±1,1	18,9±0,8*
Серебр.-черная лисица	35,2±2,0	20,6±0,6	19,4±1,5	14,2±1,2	10,6±1,3
Легкие					
Песцово-лисий гибрид	20,1±1,4	31,2±0,6	32,6±1,2	11,4±0,8	4,7±0,9
Вуалевый песец	12,0±1,6*	29,3±1,3	34,8±1,1	14,1±1,4	9,8±1,9*
Серебр.- черная лисица	18,9±1,3	26,6±0,7*	28,7±1,0*	14,2±0,6	11,6±1,9*
Селезенка					
Песцово-лисий гибрид	7,6±1,3	34,8±2,0	42,9±1,5	11,4±2,0	3,3±1,8
Вуалевый песец	2,7±0,7*	25,2±1,5*	41,2±1,1	18,5±0,8*	12,4±1,8*
Серебр.-черная лисица	13,1±4,9	31,6±4,2	31,6±3,8*	12,3±3,3	11,4±4,0
Печень					
Песцово-лисий гибрид	25,0±4,3	7,8±0,9	18,6±2,4	18,5±4,4	30,2±3,6
Вуалевый песец	6,7±1,1*	7,4±1,3	23,0±1,9	33,9±2,5*	28,9±4,7
Серебр.-черная лисица	12,5±2,6*	5,5±0,7	22,2±2,0	33,7±0,9*	26,1±1,0
Скелетная мышца					
Песцово-лисий гибрид	9,8±4,5	10,7±1,1	4,3±1,9	5,3±0,4	69,9±5,8
Вуалевый песец	3,1±1,4	17,1±2,5*	21,1±2,4*	12,7±1,7*	46,0±5,3*
Серебр.-черная лисица	1,7±1,0	8,6±2,9	11,5±1,9*	17,0±2,9*	61,3±6,6

Примечание: * $P < 0,05$ по *t*-критерию при сравнении с песцово-лисыми гибридами.

фракции ЛДГ-1. С другой стороны, в легких у всех исследованных животных выявлено большое суммарное содержание промежуточных фракций ЛДГ-2, ЛДГ-3 и ЛДГ-4, которое было максимальным у песцов (78,2%) и минимальным у лисиц (69,5%). В порядке убывания относительного содержания изоферментов у этих хищников фракции ЛДГ располагаются следующим образом: ЛДГ-3 > ЛДГ-2 > ЛДГ-1 > ЛДГ-4 > ЛДГ-5.

В селезенке у всех изученных видов семейства собачьих наблюдалось доминирование промежуточных фракций ЛДГ. Суммарное содержание ЛДГ-2, ЛДГ-3 и ЛДГ-4 было наибольшим у песцово-лисыных гибридов (89,1%) и наименьшим у лисиц (75,5%).

В печени песцов, лисиц и гибридов относительное содержание М-субъединиц превышает такое Н-субъединиц. Ткани печени млекопитающих принято относить к анаэробным тканям, имеются данные об участии этого органа непосредственно в метаболизме катодного изофермента ЛДГ-5.

В скелетной мышце у исследованных животных в скелетной мышце доминировало содержание катодных фракций ЛДГ-4 и ЛДГ-5, причем у гибридов суммарное содержание этих изоферментов было выше, чем у песцов, но ниже, чем у лисиц. Ткани скелетных мышц позвоночных также принято относить к анаэробным тканям, хотя

известно, что они содержат два типа волокон, обладающих гликолитическим и окислительным обменом [4,5].

При сравнительном анализе изоферментных спектров ЛДГ шести исследованных органов и тканей разных видов *Canidae* обнаружено, что на основании суммарного содержания Н-субъединиц можно расположить их в ряд в порядке убывания следующим образом: сердце > почки > легкие > селезенка > печень > скелетная мышца. Однако, несмотря на то, что картина распределения изоэнзимов в органах у песцово-лисыных гибридов имела признаки обоих видов, но была наиболее сходной с таковой у лисиц.

Проведение кластерного анализа позволило установить сходства и различия в изоферментных спектрах органов и тканей у представителей семейства *Canidae* (рис. 1).

Согласно методу ближайшего соседа продемонстрирована близость песцово-лисыных гибридов с лисицами по изоферментным спектрам ЛДГ в селезенке, а также в сходных по метаболизму (т.е. по преобладанию лактатдегидрогеназной реакции) таких органах как сердце и почках (Рис. А). Возможно, что ЛДГ на уровне субъединиц у гибридов в этих органах наследуется по отцовской линии. Следует отметить, что и по окрасу опущения песцово-лисыные гибриды имеют сходство с самцами серебристо-черных лисиц. Интересно отметить, что кластерный анализ выявил близость распределения изоэнзимов лактатдегидрогеназы у лисиц и песцов (Рис. Б) в тканях печени и скелетной мышцы, в клетках которых происходит восстановление пирувата в лактат с помощью пируваткиназной реакции.

Выводы. При сравнительном анализе изоферментных спектров ЛДГ в органах исследованных млекопитающих обнаружены следующие особенности в распределении изоэнзимов. Кластерный анализ показал, что картина распределения изоэнзимов в сердце, легких и скелетных мышцах у песцово-лисыных гибридов, фенотипически близких с *Vulpes vulpes*, была более сходной с таковой у лисиц, чем у песцов. У представителей *Canidae* максимальные межвидовые различия отмечены в изоферментном спектре ЛДГ скелетной мышцы, а минимальные — в сердце и почках.

Данные, полученные в результате исследования изоферментных спектров ЛДГ в органах и тканях, позволяют расширить представления о биохимических особенностях физиологических процессов у представителей семейства *Собачьих*.

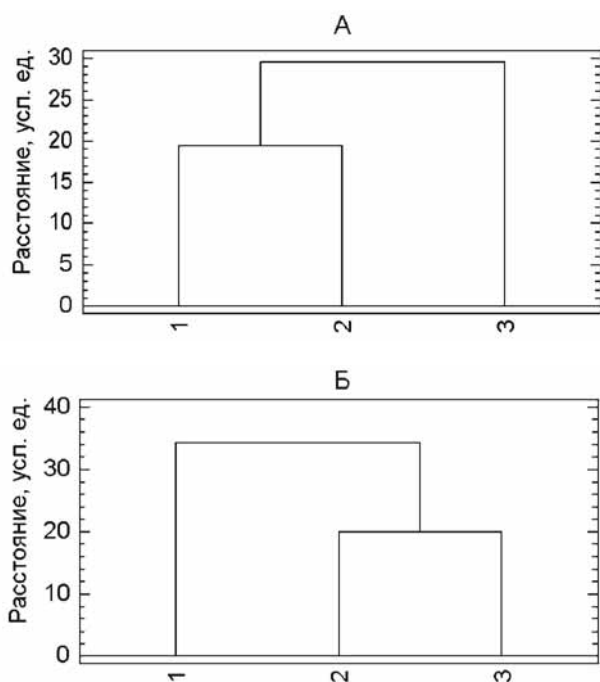


Рис. 1. Дендрограмма сходства изоферментных спектров ЛДГ в сердце, почках и селезенке (А) и в печени, скелетной мышце и легких (Б) у представителей семейства *Canidae*.

Условные обозначения: 1 — песцово-лисий гибрид, 2 — лисица, 3 — песец

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

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания (Тема № 50.1, № г.р.01201358732).

Литература

1. Колдаева Е. М. Породы пушных зверей и кроликов / Е. М. Колдаева, Л. В. Милованов, О. В. Трапезов. М.: Колос, 2003. 240 с.
2. Дормидонова О. Ю. Продуктивные качества гибридов, полученных при гибридизации лисиц и песцов: автореф. дисс... канд. биол. наук. СПб., 2009. 22 с.
3. Паркалов И. В. Межвидовая гибридизация в звероводстве // Кролиководство и звероводство. — 2008. — № 5. — С. 8–10.
4. Тютюнник Н. Н. Изоферментные спектры лактатдегидрогеназы органов пушных зверей различного экогенеза / Н. Н. Тютюнник, Л. К. Кожевникова, А. Р. Унжаков // Журн. эвол. биох. и физиол. 2005. — Т. 41, № 3. — С. 240–246.
5. Райдер К. Изоферменты / К. Райдер, К. Тейлор М.: Мир, 1983, 197 с.
6. Lin Y. Q. Comparison of enzyme activities and gene expression profiling between yak and bovine skeletal muscles / Y. Q. Lin, G. S. Wang, J. Feng // Livest. Sci. — 2011. — Vol. 135. №1. — P. 93–97.
7. O'Carra P. Tissue distribution of mammalian lactate dehydrogenase isoenzymes. / P. O'Carra, P. Mulcahy // Biochem. Soc. Trans. — 1990. — Vol. 18, №2. — P. 272–274.
8. Хочачка П. Биохимическая адаптация / П. Хочачка, Дж. Сомеро. М.: Мир, 1988. 568 с.
9. Коросов А. В. Компьютерная обработка биологических данных: метод. пособие / А. В. Коросов, В. В. Горбач. Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ. 2007. 76 с.

Tyutyunnik N. N., Unzhakov A. R.

LDH isoenzyme spectra in hybrids obtained by hybridization of blue fox end silver fox

Abstract. *There was carried out the comparative analysis of isoenzymes of lactate dehydrogenase (LDH) in homogenates of tissues of heart, kidney, spleen, lungs, skeletal muscles blue frost foxes (Alopex×Vulpes hybrids), blue foxes (Alopex lagopus L.), silver foxes (Vulpes vulpes L.). The maximal interspecies differences in Canids family studied were evaluated in skeletal muscle, and minimal in heart and kidney. Cluster analysis showed that the pattern of isoenzymes distribution in kidney, heart and lung in Alopex×Vulpes hybrids was the most similar to silver foxes.*

Key words: hybrid; blue fox; silver fox, lactate dehydrogenase isoenzymes, distribution in tissues.

Authors:

Tyutyunnik N. N. — Dr. of Agricultural Sciences, Prof., main scientific employee of laboratory animal ecophysiology Institute of Biology Karelian Research Centre RAS (IB KarRC RAS), Pushkinskaya St., 11, 185910, Petrozavodsk, Karelia, Russia, tel. +7 (142) 57-31-07, e-mail: tyutyunnik@krc.karelia.ru;

Unzhakov A. R. — Cand. (Phd) of Biology, Sciences, senior research of laboratory animal ecophysiology Institute of Biology Karelian Research Centre RAS (IB KarRC RAS) Pushkinskaya St., 11, 185910, Petrozavodsk, Karelia, Russia, tel. +7 (142) 57-31-07, e-mail: uar@bio.krc.karelia.ru.