

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ИЗОФЕРМЕНТНЫХ СПЕКТРОВ ЛДГ У НОРОК ОКРАСКИ БЕЛАЯ-ХЕДЛЮНД

А.Р. Унжаков, Л.К. Кожевникова, В.А. Илюха, Х.И. Мелдо, Н.Н. Тютюнник

Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск, Россия,
e-mail: tyutyunnik@krc.karelia.ru; uar@bio.krc.karelia.ru

Исследованы изоферментные спектры лактатдегидрогеназы (ЛДГ, НФ 1.1.1.27), сыворотки крови, печени, скелетных мышц и сердца у гомозиготных по рецессивному аллелю норок белых-хедлюнд (*h/h*). Показано, что у данного генотипа норок, как и у стандартных темно-коричневых (+/+), преобладает гликолитический тип обмена, что свидетельствует о консерватизме этой эволюционно древней ферментной системы. У них сохранена тканевая и видовая специфичность изоферментных спектров ЛДГ.

Введение

Процесс domestikации пушных зверей продолжается уже в пределах сотни лет и для норок он насчитывает 75 генераций. За этот относительно короткий по эволюционным меркам период промышленной domestikации американские норки (*Mustela vison* Schreber, 1777) претерпели ряд существенных морфо-физиологических изменений, часть которых (окраска волосяного покрова, размеры и пропорции тела, масса и соотношение внутренних органов) уже наследственно закрепилась благодаря искусственному отбору (Афанасьев, 1972, 1968). И все же пушные звери все еще сохранили стереотип своих диких предков – строгую сезонность размножения, линьки и обмена веществ.

Появление мутаций окраски у пушных зверей в условиях клеточного разведения – всегда очень редкое событие, радиационный и химический мутагенез в пушном звероводстве не могут быть использованы. Поэтому нужды мирового рынка пушнины в новых оригинальных окрасках всегда удовлетворялись сохранением и разведением случайно появляющихся в неволе новых цветных форм, в большинстве случаев рецессивной природы.

Д.К. Беляев, стоявший в числе первых ученых у истоков разработки основ генетики и селекции пушных зверей, в 1972 г. писал: «Уже

в первые годы разведения норок под контролем человека произошла дифференциация этого дикого вида на целый ряд типов, являющихся прообразом будущих пород, отличающихся друг от друга не только по окраске мехового покрова, но и по ряду важных признаков воспроизведения и жизнеспособности. Полученное уже сейчас окрасочное разнообразие норок, конечно, не предел; оно, несомненно, будет увеличиваться за счет вовлечения в селекционный процесс вновь возникающих или вновь выявляемых мутаций» (Беляев, 1972).

При выведении на основе полученных мутаций новых цветных типов норок и при установлении генетической обусловленности ряда интерьерных признаков первостепенное значение приобрело изучение интенсивности процессов обмена веществ у пушных зверей (Петрова, 1971). Показано, что у норок существует тесная зависимость гематологических показателей белкового, жирового и углеводного обменов от принадлежности зверей к определенному цветовому типу (Берестов, 1971). К.В. Макридина (1967) установила, что большая активность окислительного метаболизма свойственна мутантным норкам гомозиготным по рецессивному аллелю норок белых-хедлюнд (*h/h*) в сравнении их со стандартными темно-коричневыми норками (+/+). Норки белые-хедлюнд отличаются от стандартных и по другим

признакам. Плодовитость их ниже, они имеют меньшие размеры тела и живую массу, у них глубже процессы торможения, кроме того, они, как правило, глухие. Несмотря на это монорессивные мутантные норки белые-хедлюнд (*h/h*) имеют промышленное значение для их разведения в чистоте в условиях клеточного содержания.

Способы приспособления организма к условиям обитания, в конечном счете, сводятся к главной его составляющей – энергетическому обмену (Калабухов, 1946). Считается, что разнообразие окраски животных связано с определенными особенностями в поддержании теплового баланса, в том числе теплопродукции, в механизмах которой большое место занимают альтернативные пути наработки богатых энергией соединений (Шварц, 1980). В связи с этим представляло интерес изучение гликолитического метаболизма и уровня общего обмена (по активности сывороточных ферментов) норки белых-хедлюнд и сопоставление его с ранее полученными данными для стандартных норок.

Материалы и методы

Объектом исследования служили взрослые норки (*Mustela vison* Schreber, 1777) стандартные темно-коричневые (+/+) и мутантные белой окраски, известные как белые-хедлюнд (*h/h*), а также голубые песцы (*Alopex lagopus* Linnaeus, 1758), разводимые в специализированном звероводческом хозяйстве «Кондопожский зверовод» (Карелия). Материал для исследований ферментов (сыворотку крови и образцы тканей) получали в период осеннего забоя зверей на шкурку. Активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ, НФ 1.1.1.27), аспартат-аминотрансферазы (АСАТ, НФ 2.6.1.1.), аланин-трансферазы (АЛАТ; НФ 2.6.1.2.), щелочной фосфатазы (ЩФ, НФ 3.1.3.1.) в сыворотке крови определяли микроэкспресс-методом (Берестов, Тютюнник, 1971; Берестов, Кожевникова, 1981). Активность СОД – по модифицированной адренохромной методике (Fridovich, 1975). Выявление изоферментов ЛДГ в сыворотке крови и образцах тканей проводили методом энзимэлектрофореза на агаровом геле по Р. Виему (Wieme, 1959) в нашей модификации (Мелдо и др., 1987). Мор-

фо-биохимические показатели крови изучали у самок в течение года. Общий белок, гематологические показатели крови и фракционный состав белка определяли в день взятия крови (Берестов, 1981).

Экспериментальные данные обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики. Достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

При анализе изоферментных спектров сыворотки крови и органов норки белых-хедлюнд (см. табл. 1) видно, что все они представлены пятью молекулярными формами. При этом спектры ЛДГ органов обладали тканевой специфичностью и соответствовали типу метаболизма ткани.

Так, печень и скелетная мышца, для которых характерен анаэробный тип обмена, имели наибольшую активность катодных форм (сумма ЛДГ-4 и ЛДГ-5 составляла 84,6 % от общей активности лактатдегидрогеназы) и низкую анодную. В сердце, характеризующемся аэробным типом метаболизма, самая большая активность принадлежала быстрым фракциям (сумма ЛДГ-1 и ЛДГ-2 составляла 60,4 %, а ЛДГ-4 и ЛДГ-5 – всего 11 % от общей активности).

Сыворотка крови норки отражала общий тип обмена, свойственный полуводным хищникам семейства куньих, у которых по сравнению с сухопутными видами (песцы) преобладали субъединицы, ответственные за анаэробные пути гликолиза. Так, сумма катодных фракций составила 36,6 %, анодных – на треть ниже: 29,5 % от общей активности ЛДГ.

При сравнительном анализе суммарного содержания А- и В-субъединиц в органных спектрах стандартных и мутантных норки белых-хедлюнд, а также песцов выявлено, что белые норки по содержанию А-субъединиц были близки к стандартным темно-коричневым и значительно превышали их содержание по сравнению с песцами (рис. 1).

Таким образом, несмотря на длительный срок разведения в неволе при отсутствии воды для плавания у мутанта американской норки (*h/h*) сохранился выработанный предыдущей биохимической эволюцией признак, обес-

Таблица 1

Распределение изоферментов ЛДГ в органах норок разных генотипов и песцов

Виды зверя и его генотип	ЛДГ-1	ЛДГ-2	ЛДГ-3	ЛДГ-4	ЛДГ-5
Печень					
Норка:					
белая-хедлюнд (<i>h/h</i>)	1,6 ± 0,9	3,2 ± 1,5	11,1 ± 0,9	14,1 ± 3,2	70,6 ± 4,6
стандартная (+/+)	2,1 ± 0,4	4,2 ± 0,5	11,2 ± 0,9	12,8 ± 0,9	70,4 ± 1,1
Песец	8,6 ± 1,1	5,9 ± 0,9	7,6 ± 0,8	7,9 ± 1,4	68,0 ± 1,8
Скелетная мышца					
Норка:					
белая-хедлюнд (<i>h/h</i>)	1,2 ± 0,2	2,6 ± 0,6	15,2 ± 2,6	25,6 ± 4,2	56,7 ± 6,3
стандартная (+/+)	1,2 ± 0,2	6,5 ± 0,8	16,8 ± 1,1	17,3 ± 0,9	57,7 ± 2,4
Песец	23,9 ± 2,2	17,4 ± 1,5	6,2 ± 0,7	9,0 ± 0,9	45,0 ± 2,3
Сердце					
Норка:					
белая-хедлюнд (<i>h/h</i>)	26,1 ± 0,9	34,2 ± 1,2	28,3 ± 1,1	8,2 ± 1,2	3,0 ± 0,5
стандартная (+/+)	32,9 ± 0,7	36,9 ± 0,5	24,1 ± 0,6	4,5 ± 0,3	1,6 ± 0,2
Песец	54,2 ± 1,1	36,0 ± 0,7	4,2 ± 0,5	2,7 ± 0,4	2,6 ± 0,4
Сыворотка крови					
Норка:					
белая-хедлюнд (<i>h/h</i>)	13,9 ± 0,7	15,6 ± 0,5	37,6 ± 1,6	12,7 ± 1,0	23,9 ± 1,5
стандартная (+/+)	17,1 ± 1,8	12,1 ± 0,7	28,7 ± 1,6	8,5 ± 0,9	33,6 ± 1,8
Песец	38,8 ± 1,7	8,5 ± 1,3	9,1 ± 1,4	7,9 ± 1,6	35,5 ± 2,1

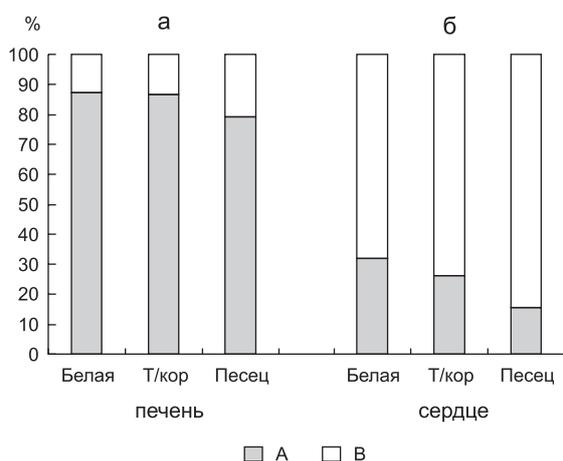


Рис. 1. Соотношение В(Н) и А(М) субъединиц ЛДГ в различных органах норок и песца.

печивающий функционирование организма в условиях вынужденной гипоксии. В то же время при сохранении видовой специфичности соотношения молекулярных форм фермента (т. е. преобладание А-субъединиц) по срав-

нению с сухопутными хищниками (в нашем случае – песцами) уровень общей активности ЛДГ в сыворотке крови норок белых-хедлюнд несколько смещен (рис. 2а) по сравнению со стандартными темно-коричневыми. Это указывает на снижение доли гликолиза в общей цепи энергопродукции и дает возможность предположить, что у норок белых-хедлюнд (*h/h*) окислительный метаболизм интенсивнее, чем у стандартных (+/+). Полученные результаты согласуются с более ранними опытами К.В. Макридиной (1967), которая установила, что теплопродукция норок белых-хедлюнд была на 32 % у самцов и на 22 % у самок выше, чем у стандартных норок.

Учитывая особенности данного эксперимента (норки белые-хедлюнд (*h/h*) были всегда мельче стандартных темно-коричневых (+/+), полученные данные можно рассматривать в свете известной закономерности о взаимосвязи интенсивности общего метаболизма и размеров

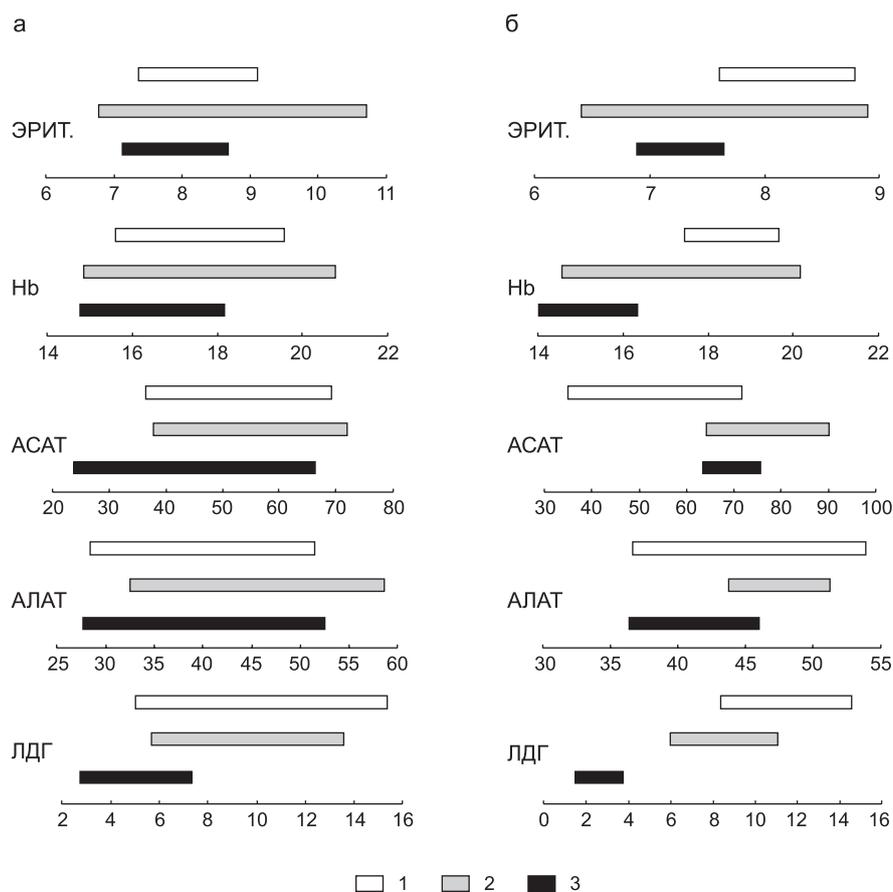


Рис. 2. Морфо-биохимические показатели крови у норок и песцов (эритроциты, 1012/л; гемоглобин, г/100 мл; АСАТ, ед; АЛАТ, ед; ЛДГ, мкМ пирувата/мл).

а – среднегодовой уровень; б – период лактации. 1 – стандартная темно-коричневая норка (+/+), 2 – норка белая-хед-люнд (*h/h*), 3 – песец.

тела и не относить их к плейотропному действию генов окраски.

Ранее нами было показано (Берестов, Кожевникова, 1981), что различия в общей активности ЛДГ у цветных норок – серебристо-голубых (*p/p*) и пастелевых (*b/b*) по сравнению со стандартными (+/+) проявляются лишь в самые ответственные периоды постнатального онтогенеза – после отсадки щенков от матерей (июнь) и при подготовке к зиме (ноябрь). У взрослых же норок не наблюдалось достоверных отличий в среднегодовых значениях ЛДГ, и мутантные формы по окраске меха по активности данного фермента сохраняли стереотип их стандартного по окраске сородича – наиболее близкого по окраске к исходной темно-коричневой форме американской норки.

При сравнительном анализе среднегодовых значений целого ряда биохимических показате-

телей у норок различных генотипов и у песцов (рис. 2а) установлено, что белые норки имеют отличия в метаболизме, которые проявляются на уровне ферментов крови. Они обладают более широким диапазоном колебаний этих показателей, соответствующим физиологической норме. Видно, что верхняя граница нормы у белых норок расширена в отношении числа эритроцитов, концентрации гемоглобина, активности АСАТ и АЛАТ. В то же время по сравнению со стандартными норками размах колебаний активности ЛДГ сужен (5,7–13,6 мкМ/мл, у стандарта – 5,1–15,4), а по сравнению с песцами значительно увеличен (2,8–7,3 мкМ/мл), что подтверждает, что доля гликолиза в общей цепи обмена у норок независимо от генотипа выше, чем у песцов.

Исходя из закономерности расширения диапазона колебаний изученных показателей

у норок белых-хедлюнд (*h/h*) было интересно исследовать адаптивность этих зверей в период лактации (рис. 2б). Установлено, что активность АСАТ резко возрастает (76,5 ед.), превышая уровень, наблюдаемый у стандартных норок (58,7 ед.), а активность ЛДГ снижается до 8,43 мкМ/мл (у стандартных – 11,38), оставаясь в пределах нормы. При этом активность СОД в эритроцитах крови у белых норок (*h/h*) была ниже, чем у стандартных (*+/+*), и коррелировала с уровнем гемоглобина. Из представленных данных видно, что у норок белых-хедлюнд в период лактации более выраженная ответная реакция проявляется со стороны биохимических показателей внутри доверительных границ нормы. В то же время произошло сужение размаха колебаний показателей по отношению к норме, а различия между белыми и стандартными норками увеличились. При этом вариабельность изученных показателей не высока, что свидетельствует об одинаковой «норме реакции» в промышленной популяции норок белых-хедлюнд.

Таким образом, при сравнительном изучении изоферментного спектра ЛДГ установлено, что у мутантных норок белых-хедлюнд (*h/h*), как и у стандартных темно-коричневых (*+/+*), преобладает гликолитический тип обмена, что свидетельствует о консерватизме этой эволюционно древней ферментной системы. У них сохранена тканевая и видовая специфичность изоферментных спектров ЛДГ. В период физиологического напряжения организма, например, лактации, когда возрастает функциональная нагрузка на организм, у этих норок проявляются генотипические различия по ряду морфо-биохимических показателей.

Литература

- Афанасьев В.А. Изменения пушных зверей под влиянием одомашнивания: Тез. докл. // Совещание, посвященное 100-летию выхода в свет книги Ч. Дарвина «Изменение животных и растений под влиянием одомашнивания» (1868). 18–20 декабря 1968 г. М.: Изд-во МГУ, 1968. С. 23–28.
- Афанасьев В.А. Изменение пушных зверей при разведении в клетках // Проблемы доместикации животных и растений. М.: Наука, 1972. С. 33–37.
- Беляев Д.К. Генетические аспекты доместикации животных // Проблемы доместикации животных и растений. М.: Наука, 1972. С. 39–45.
- Берестов В.А. Биохимия и морфология крови пушных зверей. Петрозаводск: Карелия, 1971. 291 с.
- Берестов В.А. Лабораторные методы оценки состояния пушных зверей. Л.: Наука, 1981. 151 с.
- Берестов В.А., Кожевникова Л.К. Ферменты крови пушных зверей. Л.: Наука, 1981. 184 с.
- Берестов В.А., Тютюнник Н.Н. Уровень липидов, холестерина и липопротеинов в сыворотке крови пушных зверей // Уч. зап. Петрозаводского ун-та. Петрозаводск, 1971. Т. 17. Вып. 4. С. 21–29.
- Калабухов Н.И. Сохранение энергетического баланса как основа процесса адаптации // Журн. общ. биологии. 1946. Т. 7. № 6. С. 417–434.
- Макридина К.В. Теплопродукция стандартных и цветных норок // Уч. зап. Петрозаводского ун-та. Петрозаводск, 1967. Т. 15. Вып. 4. С. 39–46.
- Мелдо Х.И., Унжаков А.Р., Осташкова В.В. Особенности электрофоретического разделения изоферментов лактатдегидрогеназы у пушных зверей // Методические подходы к изучению физиологии пушных зверей. Петрозаводск, 1987. С. 28–36.
- Петрова Г.Г. Возрастная и сезонная динамика гематологических показателей норок *Mustela vison* Br. с различной окраской меха: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Петрозаводск, 1971. 18 с.
- Шварц С.С. Экологические закономерности эволюции. М., 1980. 280 с.
- Fridovich I. Superoxide dismutases // Ann. Rev. Biochem. 1975. V. 44. № 1. P. 147–159.
- Wieme R. Studies on Agar-gel Electrophoresis. Brussel, 1959. 519 p.

Афанасьев В.А. Изменения пушных зверей под влиянием одомашнивания: Тез. докл. // Совещание,

SPECIFICITY OF LACTATE DEHYDROGENASE ISOENZYME SPECTRA OF WHITE MINK

A.R. Unzhakov, L.K. Kozhevnikova, V.A. Ilukha, H.I. Meldo, N.N. Tyutyunnik

Institute of Biology, Karelian Research Centre RAS, Petrozavodsk, Russia,
e-mail: tyutyunnik@krc.karelia.ru; uar@bio.krc.karelia.ru

Summary

The isoenzyme spectra of lactate dehydrogenase (LDH, EC 1.1.1.27) in the blood serum, liver, skeletal muscles and heart of Hedlund type white mink (*h/h*) were investigated. White and standard American minks display a glycolytic type of metabolism. It indicated on conservatism of this evolutionary ancient enzymatic system. The minks retain the species and tissue specificity of isoenzymatic LDH spectra.