

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ
ВETERИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ

На правах рукописи

УНЖАКОВ
Алексей Рудольфович

**ИЗОФЕРМЕНТНЫЕ СПЕКТРЫ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ
В ТКАНЯХ НОРОК (*Mustela vison* Schr.) И ПЕСЦОВ (*Alopex lagopus* L.)
КАК ИНДИКАТОРЫ ИХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ**

03.00.13 - физиология человека и животных

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург - 1997

Работа выполнена в лаборатории экологической физиологии животных
Института биологии Карельского научного центра РАН

Научный руководитель старший научный сотрудник,
кандидат сельскохозяйственных наук
Н.Н. ТЮТЮННИК

Официальные оппоненты доктор биологических наук, ст.н.с.
Н.Н. ИЕЗУИТОВА
доктор медицинских наук, профессор
В.В. РУДАКОВ

Ведущее учреждение Петрозаводский государственный
университет

Защита диссертации состоится "15" мая 1997 г. в 13 часов
на заседании диссертационного совета К 120.20.01 в Санкт-Петербургской
государственной академии ветеринарной медицины. Адрес: 196084 С.-
Петербург, ул. Черныговская, 5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Санкт-Петербургской
государственной академии ветеринарной медицины.

148418к

Автореферат разослан " " _____ 1997 г.



Ученый секретарь
диссертационного совета
доцент

Т.А. ЭЙСИМОНТ

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Одной из важнейших проблем современной физиологии является познание биологических путей приспособления животных к условиям существования. В изучении механизмов метаболической регуляции в живом организме большое значение имеют молекулярные формы энзимов - изоферменты. Предполагается, что определенный набор и соотношение изоэнзимов ключевого фермента гликолиза - лактатдегидрогеназы (ЛДГ, L-лактат: НАД - оксиредуктаза КФ 1.1.1.27) находится в тесной зависимости от метаболического профиля тканей (Райдер, Тейлор, 1983). В ряде экспериментов показана зависимость молекулярного спектра ЛДГ в тканях от условий гипоксии (Айтматов, 1973; Эпштейн и др., 1974; Palomba et al., 1976; Назыров, 1985; Купин, 1990 и др.).

В плане эколого-физиологических исследований в сравнительно-видовом аспекте представляют определенный интерес норки (*Mustela vison* Schir.) и песцы (*Lepus lagopus* L.) - пушные звери, введенные сравнительно недавно в зоокультуру и сохранившие консерватизм обмена веществ своих диких сородичей (Сегаль, 1975; Ильина, Соболев, 1990; Терновский, Терновская, 1994). В природе эти хищные млекопитающие имеют различные условия обитания: песцы - типичные сухопутные хищники Арктики, а норки - полуводные млекопитающие, образ жизни которых связан с дефицитом кислорода в условиях вынужденной гипоксии при нырянии.

В специальной литературе сведения по изучению тканевых изоферментов ЛДГ у этих хищных пушных зверей недостаточны. Между тем, в медицине и ветеринарии изоэнзимы широко применяются в диагностике при ряде патологий. То, что они являются высокочувствительными тестами для оценки различного физиологического состояния у животных, доказано многими исследователями (Купин, 1990; Топко, 1992; Байгильдин, 1993; Федоров, 1993). Последнее освобождает нас от необходимости специальной аргументации.

Цель и задачи исследований. Цель работы состояла в исследовании изоферментных спектров лактатдегидрогеназы в тканях американских норок и голубых песцов клеточного разведения.

В задачу исследований входило:

1. Изучить тканевую специфику изоферментов ЛДГ у взрослых зверей в зависимости от экологической специализации вида;
2. Определить содержание изоэнзимов ЛДГ у щенков норок и песцов на разных этапах постнатального развития;

3. Установить содержание изоферментов ЛДГ в зависимости от сезона года;

4. Изучить изоферментные спектры ЛДГ в ряде органов при введении в рацион животным янтарной кислоты и при алеутской болезни норки.

Научная новизна. Получены данные об изоферментных спектрах ЛДГ в различных тканях американских норок и голубых песцов клеточного разведения, изучены особенности возрастной и сезонной динамики изоэнзимных спектров ЛДГ, выявлены изменения в соотношении изоэнзимов в ряде органов при алеутской болезни норки.

Научно-практическое значение работы. Полученные данные углубляют наше представление об особенностях обмена веществ у норки и песцов, его перестройке в процессе индивидуального развития и адаптации к условиям окружающей среды, расширяют наши знания в области сравнительной физиологии и биохимии хищных пушных зверей. Результаты настоящей работы могут использоваться в системе физиолого-биохимического мониторинга (ФБМ) за физиологическим состоянием и здоровьем хищных пушных зверей, которая в настоящее время широко применяется в зверохозяйствах Карелии (Тютюнник, Кожевникова, 1996).

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы изложены и обсуждены на Всесоюзном совещании "Экологическая энергетика животных" (Пушкино, 1988), конференциях молодых ученых (Петрозаводск, 1989, 1990), Десятом Всесоюзном совещании по эволюционной физиологии (Ленинград, 1990), Международном симпозиуме "Физиологические основы повышения продуктивности хищных пушных зверей" (Петрозаводск, 1991), I(XI) Международном совещании по эволюционной физиологии (СПб, 1996), на Юбилейной конференции, посвященной 50-летию Карельского научного центра РАН (Петрозаводск, 1996), а также на заседаниях лаборатории экологической физиологии животных Института биологии Карельского научного центра РАН (Петрозаводск, 1991-1997).

Положения, выносимые на защиту:

1. Изоферментные спектры лактатдегидрогеназы обладают видовой и тканевой специфичностью, изменяются в зависимости от возраста и сезона;

2. Сведения об органных спектрах ЛДГ пушных зверей могут использоваться при оценке физиологического состояния отдельного органа и организма в целом.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 статей, 6 тезисов и 1 патент.

Объем и структура. Содержание работы изложено на 154 страницах машинописного текста, включая 25 таблиц и 10 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, включающий современные сведения о биологических особенностях пушных зверей, а также о функциональной роли изоферментов ЛДГ в организме млекопитающих. Далее следуют раздел, в котором изложены материалы и методы исследования. Раздел результатов собственных исследований содержит 3 главы. Завершает работу заключение (обсуждение результатов), выводы, практические предложения и список литературы, включающего 265 источников, в том числе 134 на иностранных языках.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.

Объектами исследований служили американские норки (*Mustela vison* Schr.) и голубые песцы (*Alopex lagopus* L.) клеточного разведения. Животные содержались в стереотипных условиях на сбалансированном рационе питания, составленном по рекомендации НИИГЗК.

Выявление изоферментов ЛДГ (КФ.1.1.1.27.) проводили методом энзимэлектрофореза по Виему (Wieme, 1959) в нашей модификации (Мелдо и др., 1987) на 1%-ном агаровом геле в медноал-вероналовом буфере (рН=8.6). После гистохимической окраски электрофореграмм производили количественную оценку соотношения изоферментных фракций на денситометре "Хромоскан 200" (США) и на анализаторе фореграмм АФ-1.

Принимая во внимание наличие определенных этапов в онтогенезе у норки и песцов, выявление изоферментных спектров ЛДГ в экстрактах тканей сердца, печени, скелетных мышц, легких, почек и селезенки проводили у 10-, 15-, 20-, 25-, 30-, 60-, 90-, 120-, 150- и 180-суточных щенков, а также у взрослых (9 месяцев и старше) хищников. Учитывая сезонную цикличность обмена веществ у пушных зверей, изоферментные спектры ЛДГ в вышеперечисленных тканевых экстрактах изучали у взрослых особей в течение всего года: зимой (февраль), весной (апрель), летом (июль) и осенью (октябрь).

Экспериментальные данные обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики (Зайцев, 1990). Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Тканевая и видовая специфичность изоферментных спектров ЛДГ взрослых норок и песцов. У пушных зверей ЛДГ обнаружена в тканях в пяти молекулярных формах (табл.). У норок и песцов, как и у большинства млекопитающих (Markert, 1984) ткани и органы по изоферментным спектрам можно разделить на 3 группы. К первой группе относятся ткани норок и песцов с аэробным типом обмена, такие как сердце, почки, в изоферментных спектрах которых наблюдается высокое содержание анодных фракций - ЛДГ-1 и ЛДГ-2. В сумме оно составляет у норок в сердце - $69.85 \pm 0.61\%$, в почках - $75.41 \pm 1.17\%$, а у песцов - $90.29 \pm 0.93\%$ и $51.91 \pm 1.26\%$, соответственно, что свидетельствует об интенсивном протекании аэробного гликолиза в этих органах. Полученные данные согласуются с результатами исследований на других животных - на кроликах (Даниелян, Мовсесян, 1975; Javed et al, 1990), мышцах (Колумбет, Анненков, 1978), белых крысах (Ji et al, 1986), лошадях (Littlejohn, Blackmore, 1978). Вместе с тем, у обоих изученных видов хищных млекопитающих обнаружены свои особенности. Так, в изоферментных спектрах сердца норки отмечается повышенное значение ЛДГ-3 ($24.09 \pm 0.59\%$) и, следовательно, смещение метаболизма в сторону анаэробноза. У песцов, как и у других видов семейства собачьих (Everse, Kaplan, 1973), в почках наблюдается усиленный синтез ЛДГ-5 ($30.73 \pm 1.89\%$).

Вторую группу составляют ткани печени, скелетных мышц, в которых наблюдается высокое содержание катодных фракций ЛДГ. В печени обоих видов доля ЛДГ-5 составляет около 70%. Подобная закономерность выявлена и у других млекопитающих. Так, в гомогенатах печени крыс и кроликов активность ЛДГ-5 выше, чем ЛДГ-1 и по данным разных авторов составляет от 63.4 до 73.0% (Савицкий и др., 1979; Щербак, 1981 и др.). В скелетных мышцах у норок и песцов уровень ЛДГ-5 несколько ниже ($57.63 \pm 2.43\%$ и $45.05 \pm 2.25\%$ соответственно) и, особенно, у последних проявляется сдвиг гликолиза в сторону аэробного обмена. К этой же группе тканей следует отнести селезенку и легкие норки, поскольку, несмотря на весомую долю гибридных форм ($60.64 \pm 1.15\%$ в селезенке, $47.29 \pm 1.03\%$ в легких), наблюдается высокое значение содержания анаэробных фракций ЛДГ-5 ($35.76 \pm 1.42\%$ и $48.65 \pm 2.18\%$, соответственно).

К третьей группе относятся ткани селезенки и легких песцов (табл.), которые нельзя отнести к какому-то из двух вышесотмеченных типов метаболизма. В изоферментных спектрах этих тканей почти

Распределение изоферментов ЛДГ в тканях взрослых норок и песцов.

	ЛДГ-1	ЛДГ-2	ЛДГ-3	ЛДГ-4	ЛДГ-5	В	А
сердце							
норки М	32.85	37.00	24.09	4.46	1.60	74	26
(n=38) m	0.72	0.48	0.59	0.33	0.21		
песцы М	54.24	36.05	4.22	2.95	2.54	84	16
(n=26) m	1.13	0.72	0.53	0.41	0.44		
почки							
норки М	44.03	31.39	16.60	4.15	3.03	77	23
(n=34) m	1.42	0.70	1.09	0.73	0.51		
песцы М	36.86	15.05	7.28	10.08	30.73	54	46
(n=26) m	1.42	1.07	0.61	0.84	1.89		
скелетная мышца							
норки М	1.26	6.54	16.82	17.75	57.63	19	81
(n=38) m	0.21	0.76	1.18	0.96	2.43		
песцы М	23.43	16.36	6.18	8.98	45.05	43	57
(n=22) m	2.16	1.46	0.69	0.98	2.25		
печень							
норки М	2.11	4.15	11.21	12.14	70.39	13	87
(n=40) m	0.43	0.54	0.91	0.86	1.10		
песцы М	8.58	5.99	7.87	9.56	68.00	21	79
(n=23) m	1.10	0.86	0.83	1.44	1.78		
селезенка							
норки М	3.60	11.64	28.33	20.67	35.76	31	69
(n=35) m	0.57	1.00	0.79	1.20	1.42		
песцы М	6.29	24.74	36.18	15.91	16.85	47	53
(n=21) m	1.04	1.10	1.21	0.95	0.98		
легкие							
норки М	4.04	9.18	22.61	15.58	48.65	26	74
(n=33) m	0.84	1.02	1.06	0.96	2.18		
песцы М	16.97	22.47	21.87	14.02	24.66	48	52
(n=18) m	1.91	0.85	1.43	1.33	2.31		

равное содержание В- и А-субъединиц, в результате чего их соотношение (в %) в легких составляет 48:52, а в селезенке - 47:53. В тканях селезенки песцов самой высокой относительной активностью обладала гибридная фракция ЛДГ-3 - $36.18 \pm 1.21\%$, несколько меньшей ЛДГ-2 - $24.74 \pm 1.18\%$. В изозимном спектре ЛДГ тканей легких у песцов почти четверть активности было представлено пятой фракцией фермента (табл.).

Таким образом, установлено, что у норок и песцов - видов различного экогенеза тканевые профили изоферментных спектров ЛДГ обладают видовой специфичностью. У норок наряду с сохранением в целом органической специфичности распределения изоферментов, присущей млекопитающим, в ряде органов (легкие, селезенка, скелетная мышца) наблюдается преобладание катодных фракций в изоферментном спектре ЛДГ, а в тканях сердца сдвиг метаболизма в сторону анаэробнозиса. Особенно хорошо это демонстрируется при расчете величины соотношения активности ЛДГ-5/ЛДГ-1. В тканях с анаэробным типом энергопродукции, таких, как мышцы и печень, коэффициент анаэробнозиса у норок на порядок и более превышает таковой у песцов, что отмечено и другими авторами (Кожевникова, 1987). Ранее видовые особенности норок обнаружены и на уровне эритроцитов. Так, в эритроцитах норок Сайсон (Saison, 1971) выявила, кроме типичных быстро мигрирующих изоферментов ЛДГ-1 и ЛДГ-2, гибридные формы - ЛДГ-3 и ЛДГ-4, а также ЛДГ-5. В то же время, в эритроцитах песцов анаэробная фракция ЛДГ-5 отсутствует (Серов, 1975). Предполагается, что под водой млекопитающие переходят на анаэробный тип обмена (Галанцев, 1977). При этом снижается потребление организмом кислорода, что рассматривается как один из возможных механизмов приспособления к гипоксии, развившийся у полуводных животных в процессе эволюции (Слониц, 1986). Отмеченный нами усиленный синтез анаэробных А-субъединиц в различных тканях прослеживается не только у норок, но и у ряда как водных (китов, кашалотов, тюленей), так и полуводных (бобров) млекопитающих (Peak et al., 1971; Blix et al., 1973; Shoubridge et al., 1976).

У песцов, как и у других сухопутных животных - крыс, кроликов, овец, лошадей (Markert, Holmes, 1972; Blix et al., 1973; Littlejohn, Blackmore, 1978; Bengtsson, Karlsson, 1981) отмечается более высокий тканевый уровень аэробных В-субъединиц. К особенностям этих типичных сухопутных хищников Арктики можно отнести специфический изоферментный профиль почек.

2. Возрастные изменения изозимов ЛДГ тканей. Рассмотренные выше типы распределения изоферментов ЛДГ характерны для тканей

взрослых особей норок и песцов. Однако, известно, что набор и соотношение изоферментов в тканях новорожденных не соответствует тканевому распределению изозимов взрослых особей того же вида (Markert, Moller, 1959; Bengtsson, Karlsson, 1981; Markert, Holmes, 1972; Salvatorelli et al., 1987). Принимая во внимание наличие определенных этапов в онтогенезе, выявление изоферментных спектров ЛДГ в экстрактах ряда тканей проводили у растущих норок и песцов с 10-ти до 180-суточного возраста.

Наши исследования показали, что изоферментные профили ЛДГ изученных тканей норок и песцов уже к 10-суточному возрасту обладает тканеспецифичными свойствами, т.е. в основном отражает тип обмена веществ, свойственный данному органу. Однако, изоферментные спектры ЛДГ в различные фазы онтогенеза имеют свои особенности, связанные, как видно, с перестройками метаболизма сообразно требованиям развивающегося организма.

В тканях сердца пушных зверей, начиная с 15-суточного возраста доля анодных форм фермента составляет более 2/3 от общей активности ЛДГ. Полное становление дефинитивного спектра ЛДГ сердца норок происходит в месячном, у песцов - двухмесячном возрасте, т.е. в период интенсивной фазы роста и усиления локомоций у зверей (Сегаль, 1975). Следующие энергетические траты, связанные с формированием зимнего опушения и репродуктивной системы, сопровождается статистически значимыми перестройками изозимного спектра ЛДГ сердца в 5-6-месячном возрасте.

Становление изозимного спектра ЛДГ тканей почек дефинитивного спектра ЛДГ в ходе онтогенеза у зверей происходит постепенно и идет через фазу уменьшения относительного содержания гибридного изофермента ЛДГ-3, завершаясь к 4-месячному возрасту, когда стабилизируются в основном показатели белкового обмена (Абрамов, 1974). У растущих норок высокая активность ЛДГ-5 в изозимном профиле ЛДГ печени проявляется уже в раннем онтогенезе и сохраняется во все дальнейшие фазы развития. У песцов явное преобладание ЛДГ-5 над другими фракциями выявляется лишь с 2-месячного возраста. Существенные перестройки в изозимном спектре ЛДГ печени обнаружены в 2-4-месячном возрасте, когда идет интенсивный рост щенков и усиливается аэробная фаза гликолиза. Об этом свидетельствует повышение доли анодных форм фермента (у норок до 22.3%), что, в свою очередь, приводит к падению показателя анаэробнозиса (отношение ЛДГ-5/ЛДГ-1) у норок с 209 (25-суточные звери) до 5.6, а у песцов со 198 до 35.6. Очевидно, это связано с тем, что по мере роста зверей энергетические по-

требности в основном обеспечиваются окислительной фазой метаболизма (Парина, Калиман, 1978). У пушных зверей полный набор изоферментов ЛДГ скелетных мышц наблюдается уже в месячном возрасте, когда происходит открытие глаз и слуховых проходов.

В тканях легких и селезенки у растущих песцов преобладают гибридные изоферменты ЛДГ. Следует отметить, что по мере роста зверей в этих тканях постепенно снижается содержание катодной фракции ЛДГ-5 при стабильном уровне гибридного изофермента ЛДГ-3. У растущих норок изоферментные профили ЛДГ в легких и селезенки характеризуются высокой долей ЛДГ-5. Надо отметить, что максимальный уровень этой катодной фракции наблюдается у 30-дневных щенков, когда увеличивается локомоция у зверей.

Анализ данных по изучению становления изоферментных спектров ЛДГ органов в ходе постнатального онтогенеза показал, что основное формирование изоферментного спектра ЛДГ у норок и песцов происходит уже в первые 20 дней после рождения. Изменения изоферментных спектров ЛДГ в онтогенезе связаны с ответственными периодами развития - интенсивной фазой роста и ее завершением, формированием зимнего опушения и созреванием репродуктивной системы, когда энергетические потребности организма меняются. При этом перестройка изозимного спектра ЛДГ прежде всего охватывает главный метаболизирующий орган - печень, а также почки, которые выполняют функцию выделения, обеспечивая тем самым баланс между процессами ассимиляции и диссимиляции растущего организма.

3. Сезонные изменения изоферментного спектра ЛДГ тканей. Сезонным изменениям у норок и песцов подвержен не только основной обмен (Ильина, Соболев, 1990), но и общая активность целого ряда сывороточных ферментов (Берестов, Кожевникова, 1981), отражающая флуктуации белкового, жирового и углеводного обменов в течение года. Сезонной цикличностью обладает и общая активность гликолитического фермента лактатдегидрогеназы сыворотки крови (Kozhevnikova, 1988).

Наши исследования изоферментных спектров ЛДГ на уровне органов показали, что высокое содержание В-субъединиц ЛДГ в экстрактах сердца и почек наблюдалось на протяжении всего года, что обеспечивало устойчивое протекание аэробного гликолиза. В рамках этого распределения в весенний период у норок наблюдалось снижение относительного содержания ЛДГ-1 в пользу увеличения гибридного изофермента ЛДГ-4 в 1.6 раза ($P < 0.05$) по сравнению с зимой. Содержание последнего у песцов повысилось лишь осенью и превышало летний уровень почти в 3 раза ($P < 0.01$).

В распределении изоферментов ЛДГ в тканях печени наблюдалось увеличение относительного содержания ЛДГ-4 у норок весной почти в 2 раза по сравнению с зимой ($P < 0.05$). У песцов отмечалось повышение активности ЛДГ-5 летом в 1.25 раза ($P < 0.01$) по сравнению с предыдущим сезоном года, что сопровождалось снижением почти вдвое относительного содержания гибридных изоферментов ЛДГ-2 ($P < 0.05$) и ЛДГ-3 ($P < 0.05$).

Сезонные перестройки изозимного спектра ЛДГ скелетных мышц норок и песцов были не однозначны. У норок летний период характеризовался максимальной активностью ЛДГ-5 и самым низким содержанием ЛДГ-4. Осенью наблюдалось падение относительного содержания ЛДГ-5 в 1.3 ($P < 0.01$) раза и увеличение гибридного изофермента ЛДГ-3 в 1.5 раза ($P < 0.05$) по сравнению с летом. Весной достоверно снижалось лишь содержание ЛДГ-1 в 3 раза ($P < 0.05$) по сравнению с зимним периодом.

У песцов перестройки изозимного спектра ЛДГ скелетных мышц охватывали весенний и осенний периоды, исключая лето. Весной почти вдвое увеличивалось содержание ЛДГ-2 по сравнению с зимой ($P < 0.001$), а осенью наблюдалось трехкратное падение ЛДГ-1 ($P < 0.001$), что сопровождалось повышением относительного содержания ЛДГ-5 в 1.6 раза ($P < 0.01$) по сравнению с летом.

Необходимо отметить, что общая направленность изменений изоферментного спектра ЛДГ печени и скелетных мышц согласуются с полученными ранее данными в сыворотке крови по сезонам года (Kozhevnikova et al., 1988). Как в сыворотке крови, так и в экстрактах печени и скелетных мышц самый низкий коэффициент анаэробноза был в зимний период. При этом его величина всегда была у песцов ниже, чем у норок, что связано с более высоким, чем у последних содержанием ЛДГ-1. В весенне-летний период возрастает роль анаэробного восстановления пирувата до лактата.

Таким образом, сезонные перестройки изоферментного профиля ЛДГ в тканях печени и скелетных мышц у норок и песцов выражаются в изменении отношения активностей "чистых" форм энзима - ЛДГ-5 к ЛДГ-1 в зависимости от потребностей организма при адаптации к внешним факторам среды. Все это говорит о тонкой регуляции биохимических функций за счет систем, ответственных за энергообеспечение (Хаскин, 1975; Исаакян, 1972; Мак-Мюррей, 1980). У пушных зверей такая регуляция в большей степени проявляется в зимний период и выражается в стимуляции аэробных путей гликолиза как наиболее эффективных по энергопродукции.

4. Изоферментные спектры ЛДГ органов как индикаторы физиологического состояния. Анализ изложенных выше данных свидетельствуют о специфике распределения в тканях клинически здоровых норок и песцов изоферментов ЛДГ, о процессе их возрастных и сезонных изменений. Учитывая, что изоэнзимы являются высокочувствительными тестами для оценки физиологического статуса организма, мы посчитали возможным использование изоферментов ЛДГ для тестирования функционального состояния норок при патологии (алеутская болезнь), а также при введении в рацион гипотрофичным зверям нового биостимулятора - янтарной кислоты (ЯК).

Показано, что стимулирующее воздействие янтарной кислоты может проявляться как на уровне организма, тканей, так и клеток (Кондрашова, 1971, 1976, 1989). В митохондриях этот естественный метаболит цикла Кребса, обладая исключительной "восстановительной" мощностью, обеспечивает основное звено энергетического обмена - дыхательную цепь протонами, электронами и богатыми энергией соединениями.

Установлено, что эффект воздействия янтарной кислоты четко проявляется у гипотрофичных щенков норок. Сукцинат стимулирует при этом аэробные пути гликолиза. Происходит увеличение содержания быстрых фракций ЛДГ, что проявляется на уровне не только сыворотки, но и экстрактов печени. Это свидетельствует об активации энергетического обмена под влиянием ЯК. Стимуляция энергетрики под воздействием ЯК, обнаруженное нами в сыворотке крови и печени, нашло отражение на уровне целого организма, в частности, на интенсивности роста ослабленных щенков. Под влиянием ЯК общий привес молодняка увеличился в среднем на 10% по сравнению с контролем. Янтарная кислота, полученная из фурфурола, является относительно дешевым, промышленно освоенным продуктом. Поскольку по своей природе - это натуральный метаболит, то он не кумулируется в организме пушных зверей, что исключает его побочное действие. На основе этих данных нами был получен патент на использование ЯК из фурфурола как "Средство для улучшения качества меха норок" (N150704 от 01.04.1993 г.)

Известно, что изоэнзимы широко применяются в медицине и ветеринарии для оценки различных патологических отклонений в организме. Вирусный плазмодитоз - алеутская болезнь норок одно из тех заболеваний, которое наносит значительный ущерб клеточному норководству (Слугин, 1975; Pastirnac, Gruiа. 1986). При плазмодитозе в патологический процесс вовлекаются практически все органы и системы (Hyllseth et al., 1992). Поражение ряда органов нашло отражение в изменении со-

отношения изоферментных фракций ЛДГ в экстрактах сердца, печени, легких, почек, селезенки и в сыворотке крови. У больных норок в изоэнзимном спектре сыворотки крови наблюдается достоверное почти двукратное увеличение процентного содержания катодной фракции ЛДГ-5. Эти данные позволяют использовать изоэнзимы ЛДГ, наряду с экспресс-методами, для прижизненной диагностики алеутской болезни.

В сердце больных зверей по сравнению с здоровыми значительно снижается относительное содержание ЛДГ-1, что может быть вызвано развитием дистрофического состояния сердечной мышцы. В почках патологические изменения сопровождаются перераспределением активности анодных фракций - ЛДГ-1 достоверно снижается, в то же время ЛДГ-2 - возрастает. Достоверно повышается содержание фракции ЛДГ-5 в печени, что может быть связано с недостаточным поступлением кислорода в этот орган и некоторой компенсацией энергопродукции по гликолитическому пути.

Существенные сдвиги в соотношении изоферментных фракций ЛДГ обнаружены в изоферментном спектре селезенки и легких. В тканях селезенки нарастает ЛДГ-5 почти на 20% по сравнению с таковой у здоровых зверей. Однако несмотря на то, что при алеутской болезни отмечается скопление значительного числа плазматических клеток как в почках, так и в селезенке, механизм нарушения метаболизма различный. Если в первом случае нарушается соотношение анодных форм фермента, то в селезенке сдвиг направлен в сторону усиления анаэробных путей гликолиза. Как и в почках, в тканях легких аэробные фракции нарастают в среднем на 23%, а относительное содержание катодных (ЛДГ-5) падает на 15.7%. Очевидно поддержание аэробного гликолиза в этих тканях можно рассматривать как компенсаторную реакцию в связи с подавлением окислительных путей метаболизма в печени при данном заболевании.

Обобщая все вышесказанное, следует отметить, что специфические черты тканевого изоферментного профиля ЛДГ, присущие норкам (амфибионтам) и несамам (сухопутным животным), являются отражением приспособления к естественной среде обитания. У норок, являющихся обитателями умеренной климатической зоны с четко выраженной сменой сезонов года, и приспособленных к жизни в двух средах (воде и суше), вероятно, в ходе длительной эволюции в связи с необходимостью функционирования в условиях вынужденной гипоксии при нырянии, сложилась четко выраженная предпочтительность в А-субъединицах ЛДГ. Биохимическая адаптация тканей к дефициту кислорода на уровне

изоферментных систем - частный случай общей закономерности приспособлений.

Песцы являются сухопутными представителями животного мира Субарктики и формирование свойственного им изоферментных спектров происходило у них под влиянием суровых условий климата Заполярья, для которого характерна долгая полярная зима и короткое холодное лето. Продолжительные миграции в поисках корма обусловили высокую активность его в течение всего года (Ильина, Соболев, 1990). Отражением этого, возможно, является стабильная активность В-субъединиц, обеспечивающая достаточно высокий уровень устойчивости функционирования организма в неблагоприятных условиях внешней среды на протяжении всего года.

Следует подчеркнуть, что эти различия четко проявляются несмотря на обитание норок и песцов в одной географической зоне (Карелия), в одинаковых условиях содержания и кормления, что свидетельствует о генетически закрепленном типе ЛДГ в организме. Это, в свою очередь, говорит о возможности использования данных объектов для дальнейших исследований в области сравнительной физиологии и биохимии.

Изозимные спектры ЛДГ различных органов являются хорошим тестом для выявления направленности гликолиза у представителей отряда хищных различного экогенеза на основных этапах онтогенеза и при смене сезонов года. С практической точки зрения установление тканевых профилей изоэнзимов ЛДГ необходимо для выявления на уровне органов отклонений в функционировании организма при патологических состояниях.

ВЫВОДЫ

1. Пушным зверям отряда хищных - норкам и песцам, присущ тканеспецифичный профиль распределения изоферментов ЛДГ, зависящий от метаболического профиля ткани. Изоэнзимные профили ЛДГ изученных органов взрослых зверей по типу обмена тканей можно объединить в три группы. В тканях сердца, почек норок и песцов преобладают анодные фракции ЛДГ-1 и ЛДГ-2, отражающие аэробный тип метаболизма. В тканях с выраженным анаэробным типом обмена - печени, скелетной мышце наибольшей относительной активностью обладают катодные фракции, особенно ЛДГ-5. К этой же группе тканей следует отнести селезенку и легкие норок, поскольку, несмотря на весомую долю гибридных форм, наблюдается высокое значение содержания анаэробных фракций ЛДГ-5. Третью группу тканей составляют легкие и селезенка

песцов, в которых наблюдается значительная активность гибридных форм ЛДГ.

2. Изоферментные спектры ЛДГ органов взрослых норок и песцов обладают видовой специфичностью. Обнаружено преобладание анаэробных А-субъединиц ЛДГ в тканях сердца, печени, скелетной мышцы, селезенки и легких у норок, амфибионтов семейства куньих, по сравнению с сухопутными песцами. Эту закономерность можно объяснить экологической адаптацией норки к полуводному образу жизни в прошлом.

3. Онтогенетические изменения изоферментных спектров ЛДГ обусловлены становлением определенных функциональных систем и отражают особенности обмена веществ на разных этапах развития пушных зверей. Формирование дефинитивного спектра ЛДГ в различных органах норок и песцов идет асинхронно. Основное формирование органических спектров ЛДГ в соответствии с типом метаболизма тканей завершается у норок и песцов в период раннего постнатального онтогенеза. Перестройки изоферментного спектра ЛДГ органов происходит на основных этапах онтогенеза, когда энергетические потребности меняются: в период созревания и окончательного формирования морфофункциональных систем, интенсивной фазы роста, формирования зимнего опушения и созревания репродуктивной системы.

4. Тканевая специфичность распределения изоферментов ЛДГ в целом сохраняется на протяжении года. Особенной стабильностью отличается изоферментный спектр сердечной мышцы. Под влиянием сезонных факторов внешней среды происходит некоторое перераспределение активности, охватывающее гибридные формы, как правило ЛДГ-4, относительное содержание которой весной значительно выше, чем летом. Во всех тканях норок, кроме сердца показатель анаэробноза (коэффициент отношения активности ЛДГ-5/ЛДГ-1) зимой снижается по сравнению с летним и осенним периодами при сохранении в целом специфического органического распределения изоэнзимов ЛДГ.

5. Изоферментные спектры ЛДГ тканей являются чувствительными индикаторами физиологического состояния пушных зверей, что продемонстрировано при использовании в качестве кормовой добавки янтарной кислоты для гипотрофичных норок. При алеутской болезни норок обнаружены достоверные изменения в изоферментных спектрах тканей сердца, почек, селезенке, легких, печени и сыворотке крови. Сведения об органических спектрах ЛДГ пушных зверей могут использоваться при оценке физиологического состояния отдельного органа и организма в целом.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Сведения об органических спектрах ЛДГ у норок и песцов могут быть использованы в научных исследованиях и практическом звероводстве при определении метаболического профиля животных, при анализе эффективности лечебных и профилактических мероприятий, при оценке физиологического состояния отдельного органа и организма в целом, при изучении патогенеза заболеваний и влияния на организм зверей различных экстремальных факторов. Кроме того, полученные данные могут найти применение в эколого-физиологических исследованиях популяций норок и песцов в природе.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. 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.
2. Осташкова В.В., Унжаков А.Р. О сроках хранения образцов тканей и сыворотки крови для определения активности ферментов у пушных зверей // Методические подходы к изучению физиологии пушных зверей. Петрозаводск, 1987.- С. 51-59.
3. Кожевникова Л.К., Осташкова В.В., Унжаков А.Р. Особенности биоэнергетики хищных млекопитающих различного экогенеза // Экологическая энергетика животных. Тез. докл. Всесоюз. совещ. Пущино, 1988.- С. 67.
4. Унжаков А.Р. Сравнительная характеристика изоферментов ЛДГ у пушных зверей в сыворотке крови // Актуальные проблемы биологии и рационального использования природных ресурсов Карелии. Матер. конф. молодых ученых. Петрозаводск, 1989.- С. 92-93.
5. Кожевникова Л.К., Осташкова В.В., Мелдо Х.И., Унжаков А.Р. Особенности становления конечного звена гликолиза в постнатальном онтогенезе полуводных и сухопутных млекопитающих // Тез. докл. 10-го Всесоюз. совещ. по эволюционной физиологии. Л., 1990.- С. 315.
6. Унжаков А.Р. Влияние янтарной кислоты на рост норок // Физиологические основы повышения продуктивности хищных пушных зверей. Тез. докл. Межд. симп. Петрозаводск, 1991.- С. 76.
7. Унжаков А.Р., Мелдо Х.И. Становление изоферментных спектров ЛДГ в различных органах у норок в процессе постнатального онтогенеза

// Биологические исследования растительных и животных систем. Петрозаводск, 1992.- С. 96-108.

8. Тютюнник Н.Н., Кожевникова Л.К., Бадовская М.Н., Кондрашова М.Н., Илюха В.А., Мелдо Х.И., Узенбаева Л.Б., Унжаков А.Р., Латашко В.М., Найденов Ю.В., Музыченко Г.Ф. Средство для улучшения качества меха норок // Патент НИИГПЭ N150704 ХРП от 01.04.1993 г.

9. Унжаков А.Р. Регуляция физиологического состояния норок с помощью янтарной кислоты // Контроль состояния и регуляция функций биосистем на разных уровнях организации. Петрозаводск, 1993.- С. 74-79.

10. Унжаков А.Р. Изменения изоэнимных спектров ЛДГ пушных зверей различного экогенеза в ходе индивидуального развития // Проблемы экологической физиологии пушных зверей. Петрозаводск, 1994.- С. 57-70.

11. Kozhevnikova L.K., Tyutyunnik N.N., Meldo H.I., Unzhakov A.R. Seasonal variation in the isoenzymatic profile of lactate dehydrogenase in organs of farm mink and polar foxes // Scientifur,- 1996.- V.20, N 1.- P. 54-60.

12. Tyutyunnik N.N., Kozhevnikova L.K., Meldo H.I., Unzhakov A.R., Kondrashova M.N., Badovskaja L.A. Succinic acid as a stimulator of physiological processes and productivity in farm mink // Scientifur,- 1996.- V.20, N 1.- P. 85-91.

13. Тютюнник Н.Н., Кожевникова Л.К., Унжаков А.Р. К эколого-физиологической интерпретации энзиматических различий у некоторых хищных млекопитающих // Тез. докл. I(XI) Межд. совещ. по эвол. физиологии. С.-Петербург, 1996.- С. 241-242.

14. Унжаков А.Р. Становление изоферментных спектров ЛДГ у норок и песцов в процессе индивидуального развития // 50 лет Карельскому ЦНЦ РАН. Тез. докл. науч. конф. Петрозаводск, 1996. С. 79.

148418K

