

ВПЛИВ СТАНУ ШТУЧНОГО ГІПОБІОЗУ НА ІНТЕНСИВНІСТЬ МЕТАБОЛІЧНИХ ПРОЦЕСІВ У КРОЛІВ

Д. О. МЕЛЬНИЧУК, С. Д. МЕЛЬНИЧУК, Н. Б. СІЛОНОВА

Національний аграрний університет Кабінету Міністрів України, Київ;
e-mail: quality_lab@nauu.kiev.ua

Исследованы метаболические процессы в организме кроликов при моделировании состояния гипобиоза. Установлено, что в состоянии гипобиоза у животных развивается респираторный субкомпенсированный ацидоз; в крови повышается содержание лактата и глутамата; в цитозоле печени возрастает активность малатдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы, изоцитратдегидрогеназы на фоне снижения активности пируваткарбоксилазы и альдегиддегидрогеназы.

К л ю ч е в ы е с л о в а: гипобиоз, температурный фактор, лактат, пируват, малат, глутамат, оксалоацетат, α -кетоглутарат, лактатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа, изоцитратдегидрогеназа, пируваткарбоксилаза, альдегиддегидрогеназа, алкогольдегидрогеназа, HCO_3^- , pCO_2 , pO_2 .

Дослідження молекулярних механізмів переходу і перебування тварин у стані природного і штучного зниження життєдіяльності (анабіоз, гіпобіоз, гібернація, естивація, торпідний стан тощо) належить до найактуальніших наукових проблем біології і дає можливість переглянути багато традиційних уявлень, розширити систему поглядів на цю проблему. Це, у свою чергу, відкриває нові шляхи досліджень з використанням раніше не врахованих можливостей.

Формування гіпобіотичного стану є адаптивною ознакою, властивою рослинам і тваринам, реалізація якої обумовлюється наявністю в живому організмі спеціалізованих систем, здатних забезпечувати його виживання в екстремальних умовах, існування в яких може призвести до його загибелі [1]. Швидкість та спрямованість метаболічних перетворень залежить від систем адаптивної регуляції і визначає якісний та кількісний бік відповіді організму на дію тих чи інших факторів. Недостатня активність адаптаційних процесів призводить до патологічних змін, що виявляється у метаболічних порушеннях різної інтенсивності і напрямку.

Дослідники значну увагу приділяють вивченню особливостей процесів обміну речовин в організмі тварин у стані штучного гіпобіозу, оскільки це має важливе значення для розроблення нових і модифікації вже відомих способів консервування клітин, тканин, органів, загального знеболювання організму, боротьби із хворобами тварин і людей, вирішення низки проблем стосовно перебування людей в екстремальних умовах.

З'ясовано, що основними фізіологічними чинниками розвитку гіпобіотичного стану організму тварин є гіпотермія, гіпоксія та гіперкапія.

Вивчається також комбінований вплив чинників гіпобіозу на процеси обміну [2]. Вуглекислота у переважній більшості досліджень розглядається як основний фактор, що гальмує теплопродукцію в організмі [3]. Проте встановлено, що у тканинах гетеротрофних організмів їй належить провідна роль в регуляції інтенсивності окисних та біосинтетичних процесів, але основна увага приділялася вивченню метаболічного значення HCO_3^- , як однієї з форм вуглекислоти, а pCO_2 не розглядався як регуляторний фактор [4,5]. Як показали результати проведених досліджень, цій формі вуглекислоти також належить важлива роль у формуванні гіпобіозу у тварин [6].

Метою роботи було вивчення інтенсивності функціонування циклу трикарбонових кислот та гліколізу за моделювання гіпобіозу у кролів.

Матеріали і методи

Для досліджень використовували кролів-самців з масою тіла 2,5–3,0 кг. Було сформовано дві дослідні групи: тварини першої дослідної групи отримували через наркозну маску газову суміш та знаходилися в камері зі зниженою температурою для введення їх у стан штучного гіпобіозу; з метою з'ясування впливу газової суміші під час моделювання гіпобіозу кролів другої дослідної групи утримували у камері зі зниженою температурою в умовах звичайного атмосферного повітря. Контролем були інтактні тварини. Через 3 год тварини першої дослідної групи переходили у стан штучного гіпобіозу, про що свідчило зниження температури тіла до $28,7 \pm 0,95$ °C проти контрольної ($37,9 \pm 0,26$ °C). Частота серцевих скорочень у дослідних тварин становила 145 ± 19 уд./хв, у контрольній групі – $210 \pm$

± 27 уд./хв, а кількість дихальних рухів зменшувалась до 57 ± 6 проти 162 ± 16 в контролі. У другій групі тварин, на яких діяв холодний чинник (+2 °С), температура тіла майже не змінювалася, а частота пульсу та дихання виявляли тенденцію до зростання.

Під час входження тварин у стан штучного гіпобіозу відбирали кров із вени вуха, через 1,5–2,0 год відбирали кров у кролів другої дослідної групи. Визначали рН, рО₂, рСО₂, СО₂ загальне, НСО₃⁻ на аналізаторі газів крові типу ОР – 215 угорської фірми «Radelkis» [7]. У крові, використовуючи ферментативні методи аналізу, визначали концентрацію пірувату, лактату, малату, оксалоацетату, глутамату та α -кетоглутарату [8]. Тварин декапітували під ефірним наркозом, в цитозольній фракції печінки визначали активність лактатдегідрогенази [9], малатдегідрогенази [10], ізоцитратдегідрогенази [11], альдегіддегідрогенази [12], алкогольдегідрогенази [13].

Одержані результати статистично обробляли за допомогою комп'ютерної програми "Microsoft Excel".

Результати та обговорення

Унаслідок проведених досліджень встановлено, що за штучного гіпобіозу спостерігається зниження рН крові тварин на 0,127, у той час як за гіпотермії відмічається його підвищення на 0,022. Під час моделювання стану штучного гіпобіозу у крові кролів знижується величина рО₂ та значно зростає рСО₂ проти контролю. У разі дії холодного чинника рСО₂ майже не змінюється, а рО₂ знижується порівняно з цим показником у тварин контрольної групи. З табл. 1 видно, що за моделювання стану штучного гіпобіозу у крові тварин підвищується рівень загального СО₂ та НСО₃⁻ проти контролю, в той час, як за дії холодного чинника ці показники знижуються.

З одержаних даних видно (табл. 1), що за моделювання стану штучного гіпобіозу у кролів розвивається респіраторний субкомпенсований ацидоз.

Отже, за умов гіпобіозу різні метаболічні форми вуглекислоти є регуляторними фактора-

ми метаболічної адаптації, що забезпечують перехід тварин до стану гіпобіозу. Згідно з концепцією метаболічної системи кислотно-лужного гомеостазу, істотну роль у змінах її параметрів мають відігравати реакції перетворення метаболітів проміжного обміну.

Проведеними дослідженнями встановлено, що стану гіпобіозу притаманні певні зміни метаболізму, про що свідчать результати, наведені у табл. 2.

Так, у кролів, які перебувають у стані гіпобіозу, порівняно з контролем зростає рівень лактату: через 1,5 год – на 29%, через 3 год – у 2,1 раза та глутамату на 41% через 3 год. Рівень пірувату також підвищується на 23 та 17%, оксалоацетату – на 22 та 12% через 1,5 та 3 год відповідно. Через 60 хв після припинення дії чинників гіпобіозу спостерігається зниження вмісту лактату, але він залишається на 75% вищим відносно контролю. Рівень інших досліджуваних метаболітів знаходиться в межах контролю. Аналогічні дані було одержано і в дослідах зі щурами [5, 6, 15].

За дії холодного чинника також спостерігається незначне підвищення у крові вмісту лактату. Інші показники суттєво не відрізняються від контрольних.

При дослідженні впливу гіпобіотичного стану на активність ферментів (табл. 3) було з'ясовано, що за штучного гіпобіозу в цитозолі печінки кролів змінюється активність ізоцитратдегідрогенази: на 73% прискорюється карбоксилювання α -кетоглутарату та на 45% зменшується декарбоксилювання ізоцитрату.

Гіпобіотичний стан впливає і на активність малатдегідрогенази: на 38% зростає рівень карбоксилювання пірувату, інтенсивність декарбоксилювання малату не змінюється. Відносно контролю відзначається зростання активності лактатдегідрогенази (на 27%), знижується активність альдегіддегідрогенази (у 2,4 раза) та піруваткарбоксилази (на 30%).

Температурний (холодовий) чинник не спричинює істотних змін активності досліджуваних ферментів.

Т а б л и ц я 1. Показники кислотно-лужного стану крові за штучного гіпобіозу у кролів ($M \pm m$, $n = 6$)

Показники	Контроль	Дія холодного чинника (+2 °С)	Стан гіпобіозу
рН	7,21 \pm 0,02	7,232 \pm 0,031	7,124 \pm 0,050
рО ₂ мм. рт. ст.	47,70 \pm 6,01	37,70 \pm 7,79	24,80 \pm 0,57
рСО ₂ мм. рт. ст.	46,40 \pm 3,54	38,60 \pm 6,52	69,10 \pm 4,02*
СО ₂ заг. ммоль/л	19,60 \pm 2,35	17,10 \pm 3,21	24,70 \pm 0,88*
НСО ₃ ⁻ ммоль/л	17,70 \pm 1,86	12,9 \pm 4,0	22,50 \pm 0,93*

* Тут і в табл. 2, 3 дані порівняно з контролем вірогідні, $p < 0,05$.

Підвищення інтенсивності реакцій карбоксилювання за участю ізоцитратдегідрогенази та малатдегідрогенази в печінці тварин, які перебувають у стані гіпобіозу, відносно контролю та дії зниженої температури, ймовірно, пов'язано зі збільшенням рівня вуглекислоти у тканинах, оскільки це один із чинників гіпобіотичного стану, за якого різні метаболічні її форми є регуляторними факторами, що можуть впливати на метаболічні процеси [2,5,14].

Функція цитоплазматичної $NADP^+$ -залежної ізоцитратдегідрогенази полягає в забезпеченні необхідного рівня α -кетоглутарату, який використовується для реакцій біосинтезу амінокислот у цитоплазмі, тому підвищення карбоксилювання α -кетоглутарату у стані гіпобіозу зміщує рівновагу цієї реакції в бік утворення ізоцитрату та зумовлює зниження кількості α -кетоглутарату. Правомірність такого припущення підтверджується одержаними нами даними (табл. 2).

Фізіологічне значення карбоксилювання пірувату в малатдегідрогеназній реакції полягає в утворенні C_4 -дикарбонових кислот, необхідних для функціонування циклу трикарбонових кислот та синтезу деяких амінокислот. Отже, інтенсифікація карбоксилювання за гіпобіозу може активувати ці процеси. Цитоплазматична малатдегідрогеназа бере участь у транспортуванні в мітохондрії $NADH$, утвореного в цитоплазмі внаслідок відновлення оксалоацетату до малату, який проникає в мітохондрії. NAD^+ -залежне окислення малату в мітохондріях також каталізується мітохондріальною малатдегідрогеназою, і зміна її активності в цитозолі за гіпобіозу може впливати на транспортування $NADH$ з цитозолу.

За участю піруваткарбоксилази відбувається карбоксилювання пірувату з утворенням оксалоацетату. Активність піруваткарбоксилази залежить від присутності ацетил-КоА – важливо-

го фактора для фізіологічного механізму контролю, тому що високий вміст ацетил-КоА є сигналом для збільшення кількості оксалоацетату, який за надлишку АТР перетворюється у процесах гліюконеогенезу, а під час його зниження, конденсуючись з ацетил-КоА, включається до циклу трикарбонових кислот, де відіграє суттєву роль у підтриманні необхідної концентрації проміжних продуктів останнього. З даних літератури відомо, що зниження рН, яке спостерігається під час гіпобіозу, супроводжується зниженням АТР-азної активності [15]. Тому можна припустити, що за цих умов подальші перетворення оксалоацетату відбуваються в циклі трикарбонових кислот. Зниження активності піруваткарбоксилази при цьому пов'язано зі зниженням вмісту оксалоацетату, рівень якого контролюється ацетил-КоА.

Це припущення збігається з результатами визначення вмісту проміжних метаболітів циклу. Через 1,5 год дії гіпобіотичних чинників у крові зростає вміст пірувату та оксалоацетату, але через 3 год вже не спостерігається вірогідних змін щодо їхнього вмісту порівняно з контролем.

Одержані дані свідчать про те, що у стані гіпобіозу порушується рівновага між процесами карбоксилювання та декарбоксилювання, що є одним із чинників зниження інтенсивності функціонування циклу трикарбонових кислот.

При недостатньому забезпеченні тканин киснем, характерному для кролів у стані штучного гіпобіозу, значно збільшується у крові кількість лактату, який за участю лактатдегідрогенази (активність якої зростає) може утворюватися з пірувату. Регенерований під час відновлення пірувату до лактату NAD^+ , що є окисником для нових молекул гліцеральдегід-3-фосфату, може забезпечувати функціонування гліколізу. Одержані дані свідчать про те, що за штучного гіпобіозу ак-

Таблиця 2. Вміст метаболітів гліколізу та циклу трикарбонових кислот (мкмоль/г тканини) в печінці кролів за штучного гіпобіозу ($M \pm m$, $n = 5$)

Органічні кислоти	Контроль	Гіпобіоз			Холодовий чинник (+2 °C)		
		1,5 год	3 год	Через 60 хв після виходу з гіпобіозу	1,5 год	3 год	Через 60 хв після виходу з холоду
Лактат	2,77 ± 0,15	3,57 ± 0,16	4,84 ± 0,11*	5,80 ± 0,11*	2,75 ± 0,02	3,15 ± 0,03	2,68 ± 0,03
Піруват	0,12 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,03
Малат	0,15 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,18 ± 0,01
Оксалоацетат	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01
Глутамат	0,21 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,29 ± 0,02*	0,24 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,21 ± 0,01
α -Кетоглутарат	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,01

Таблиця 3. Активність ферментів цитозольної фракції печінки кролів за штучного гіпобіозу (нмоль/хв на 1 мг білка; $M \pm m$, $n = 5$)

Назва ферменту	Контроль	Стан гіпобіозу	Вплив холодового чинника (+2 °C)
Лактатдегідрогеназа	612 ± 30	776 ± 66	596 ± 47
Малатдегідрогеназа (карбоксилювання пірувату)	412 ± 23	568 ± 41*	487 ± 41
Малатдегідрогеназа (декарбоксилювання малату)	36 ± 2	33 ± 5	36 ± 5
Ізоцитратдегідрогеназа NADP-залежна (карбоксилювання α -кетоглутарату)	26 ± 7	45 ± 1*	25 ± 1
Ізоцитратдегідрогеназа NADP-залежна (декарбоксилювання ізоцитрату)	98 ± 4	54 ± 2*	89 ± 6
Піруваткарбоксилаза	620 ± 44	436 ± 27	616 ± 56
Альдегіддегідрогеназа	74 ± 1	31 ± 1*	108 ± 4
Алкогольдегідрогеназа	132 ± 8	144 ± 12	120 ± 11

тивність гліколітичних процесів підвищується.

Відомо, що альдегіддегідрогеназа бере участь у функціонуванні адаптивних механізмів у рослин, що ростуть в екстремальних умовах. У насінні під час стану спокою активність альдегіддегідрогенази зростає. Їй надається важлива роль у формуванні пускових механізмів гіпобіотичного стану, а співвідношення ацетальдегіду до етанолу відображує рівень перебігу анаеробних біоенергетичних реакцій, знижуючись за активації життєдіяльності і підвищуючись у разі формування гіпобіотичного стану. В наших дослідженнях активність алкогольдегідрогенази за гіпобіозу у тварин не змінюється, але відбувається значне зниження активності альдегіддегідрогенази, яке має призводити до зниження перетворення ацетальдегіду на ацетат і супроводжуватися підвищенням рівня ацетальдегіду, а також збільшення співвідношення ацетальдегід/етанол, подібне до того, що спостерігається в насінні за гіпобіозу. Одержані дані дають можливість припустити наявність спільних ланок у механізмах формування природного і штучного гіпобіозів.

Зниження швидкості функціонування циклу трикарбонових кислот та активація гліколізу у кролів за гіпобіозу можуть бути пов'язані зі зміною каталітичної активності молекул ферментів. Процес може регулюватися через адаптивні зміни синтезу ключових ферментів і модифікацію їхньої активності метаболітами, кофакторами та іншими ефекторами.

INFLUENCE OF THE STATE OF ARTIFICIAL HIBERNATION ON INTENSITY OF METABOLIC PROCESSES IN RABBITS

D. O. Melnichuk, S. D. Melnichuk, N. B. Silonova

National Agrarian University, Cabinet of Ministers of Ukraine, Kyiv;
e-mail: quality_lab@nauu.kiev.ua

S u m m a r y

Metabolic processes were investigated in the rabbit organism when modeling a condition of hibernation. It is established that during hibernation respiratory subcompensated acidosis develops in animals; the content of lactate and glutamate rises in their blood; activity of lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase and isocitrate dehydrogenase increases in the liver cytosol of rabbits, while activity of pyruvate carboxylase and aldehyde dehydrogenase is reduced.

К е у w o r d s: hibernation, the temperature factor, lactate, pyruvate, malate, glutamate, oxaloacetate, α -ketoglutarate, lactatedehydrogenase, malatedehydrogenase, isocitratedehydrogenase, pyruvatecarboxylase, aldehydedehydrogenase, alkoholdehydrogenase, HCO_3^- , pCO_2 , pO_2 .

1. *Голдовский А. М.* Анабиоз и его практическое значение. Л. Наука. 1986. 162 с.

2. Мельничук С. Д., Роговський С. П., Мельничук Д. О. // Укр. біохім. журн. 1995. **67**, № 4. С. 67–75.
3. Маршак М. Е. Физиологическое значение углекислоты М. Медицина. 1969. 255 с.
4. Гулий М. Ф., Мельничук Д. А. Роль углекислоты в регуляции обмена веществ у гетеротрофных организмов. К.: Наук. думка. 1978. 243 с.
5. Мельничук Д. О. // Укр. біохім. журн. 1989. **61**, № 3. С. 3–21.
6. Мельничук С. Д., Мельничук Д. О., Фурманов Ю. О., Ярош П. В. // Наук. вісн. НАУ. 1998. Вип. 6. С. 43–61.
7. Агапов Ю. Я. Кислотно-щелочной баланс. М.: Медицина. 1963. 197 с.
8. Асатиани В. С. Ферментные методы анализа М.: Наука. 1969. 740 с.
9. Klingenberg M. / In Methods of Enzymatic Analysis. (Ed. H.U. Bergmeyer). Weinheim: Verlag Chemie. 1963. P. 528–538.
10. Sasha Englard / In Methods in Enzymologi. (Ed. I. M. Lowenstein). Weinheim: Verlag Chemie. 1969. **13**. P. 123–126.
11. Siebert F. // Ibid. **13**. P. 453–457.
12. Scrutton M. C., Olmsted M. R., Utter M. F. // Ibid. **13**. P. 258–261.
13. Hellstrom E., Tottmar O. // Acta pharmacol. et toxicol. 1982. **51**. P. 57–61.
14. Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. М.: Мир. 1988. 567 с.
15. Мельничук Д. О., Михайловський В. О., Мельничук С. Д. // Укр. біохім. журн. 2000. **72**, № 4–5. С. 70–80.

Отримано 27.07.2004