

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О.В. ПАЛЛАДИНА

На правах рукопису

МЕЛЬНИЧУК Сергій Дмитрович

ГІПЕРКАПНІЯ ЯК ФАКТОР РЕГУЛЯЦІЇ ОБМІНУ РЕЧОВИН У
ТВАРИН В СТАНІ ПРИРОДНОГО ТА ШТУЧНОГО ГІПОБІОЗУ

03.00.04 - Біохімія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 1995

ДВ 33.020

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі біохімії ліпідів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна Національної Академії Наук України.

Науковий керівник - доктор біологічних наук, член-кор. НАН України
Гула Н.М.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Белік Я.В.

кандидат біологічних наук
Андрійчук Т.Р.

Провідна організація - Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України.

Захист відбудеться "25" *серпня* 1995 р. о 14 год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 01.84.01 в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України за адресою: 252601, Київ-30, вул. Леонтовича, 9.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту біохімії НАН України.

Автореферат розісланий "23" *листопада* 1995 року.

Вчений секретар
спеціалізованої ради



О.В. Кірсенко

ЛНБ України ім.В.Стефаника



00754913 (Т)

ЛНБ ім. В. Стефани
АН України

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

АКТУАЛЬНІСТЬ ПРОБЛЕМИ. Вивченню особливостей процесів обміну речовин в організмі тварин за умов різних форм гіпобіозу (анабіоз, літня (зимова) сплячки, естивація та інші), а також факторів, що спричиняють цей стан, приділялася та приділяється велика увага з боку багатьох вчених [Калабухов Н.И., 1946; Шмидт П.В., 1955; Палладін О.В., Белік Я.В та інші, 1955; Dawe A.R., Spurrier W.A., 1972, 1974; Попова Н.К., 1975, 1982; Голдовский А.М., 1986; Эмирбеков Э.З., Львова С.П., 1968 - 1990; Visconti Pablo E. et al, 1990; Storey K.B., 1990; Белоус А.М., Грищенко В.И., 1994;].

В результаті стало відомо, що основними фізіологічними чинниками розвитку гіпобіотичного стану організму тварин є гіпотермія або гіпертермія, дефіцит води та зменшення тривалості світлового дня. Окремі дослідники відводять певну роль у цьому процесі гіперкапнії, як фактору, що обумовлює гальмування теплопродукції в організмі тварин [Маршак В.Е., 1969]. Накопичений також значний експериментальний матеріал по вивченню комбінованого впливу вищевказаних чинників гіпобіозу на обмін речовин у тварин за умов природного та штучного гіпобіозу.

Проте залишаються ще мало вивченими системи регуляції метаболічного гомеостазу та роль і молекулярні механізми впливу вищевказаних чинників на розвиток і підтримання стану гіпобіозу у тварин та виходу з нього. В більшості випадків дослідники надають значної ролі в регуляції обміну речовин у цьому стані зміні в тканинах концентрації H^+ (як наслідок гіперкапнії [Hans - Otto Portner, 1980]), температури [Иванов К.П., 1968] та тригерам і антитригерам сплячки (речовини пептидної природи, видалені з тканин гібернуючих тварин) [Воробьев В.В., 1987].

МЕТА РОБОТИ ТА ЗАВДАННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ. Метою даної роботи було дослідити специфічну роль гіперкапнії та проаналізувати

молекулярні механізми впливу підвищення концентрації вуглекислого газу в тканинах тварин в стані гіпобіозу на процеси енергетичного, азотового та електролітного обміну речовин, які як відомо [Гулий М.Ф., Мельничук Д.О., 1978, Goldstein P. J., 1972, Mason C.V., 1990], тісно пов'язані з обміном вуглекислоти. Виходячи з поставленої мети, було заплановано проведення двох серій досліджень по вивченню особливостей вказаних обмінних процесів у тварин в стані природного та штучного гіпобіозу.

Перша - вивчити особливості стану кислотно-лужної рівноваги та обміну амонійного азоту в крові ховрахів за умов зимової сплячки (природний гіпобіоз (гібернація)), порівняно з станом їх активної життєдіяльності.

Друга - модифікуючи уже відомий метод переведення природно не гібернуючих тварин в стан штучного гіпобіозу [Бахметьев П.И., 1912; Andjus R., 1951; Сіаја J., 1940], вивчити специфічну роль фактору гіперкапнії на процес розвитку цього стану та на ряд процесів амонійного, енергетичного та електролітного обмінів речовин в тканинах шурів.

НАУКОВА НОВИЗНА. Розроблена модель для вивчення специфічного впливу гіперкапнії на обмін речовин та розвиток гіпобіотичного стану у тварин.

Показано, що гіперкапнія, поряд із гіпотермією та поступовим зниженням концентрації кисню в середовищі, являється одним із важливих факторів, які обумовлюють розвиток гіпобіозу у тварин. Встановлено, що в організмі тварин за умов гіпобіозу мають місце суттєві зміни енергетичного, азотового та електролітного обмінів. В роботі обговорюються можливі молекулярні механізми регуляторного впливу вуглекислоти на вищевказані сторони обміну речовин та розвиток гіпобіотичного стану у тварин.

ПРАКТИЧНА ЗНАЧИМІСТЬ РОБОТИ. Результати роботи можливо використовувати у медицині та ветеринарії (як спосіб модернізації засобів

анастезії), в кріомедицині та кріобіології (при розробці методів кріоконсервування клітин та тканин), в мікробіологічній та харчовій промисловості тощо.

АПРОБАЦІЯ РОБОТИ. Матеріали дисертації доповідались на Всесоюзному симпозіумі "Механізми зимньої сплячки" (Махачкала, 1990), на II Міжнародній конференції "Успіхи сучасної кріобіології (Харків, 1992), на VI Біохімічному з'їзді (Київ, 1992), на I з'їзді Українського товариства кріобіології та кріомедицини (Харків, 1995), наукових семінарах Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

СТРУКТУРА ДИСЕРТАЦІЇ. Дисертаційну роботу викладено на 151 сторінці машинописного тексту. Робота складається із вступу, огляду літератури, результатів досліджень та їх обговорення, висновків, списку літератури (з 216 першоджерел), 18-ти рисунків, 11-и таблиць та 3-х малюнків.

КОНКРЕТНИЙ ОСОБИСТИЙ ВНЕСОК ДИСЕРТАНТА. Експериментальна частина роботи виконана дисертантом особисто. Аналіз та обговорення проведено спільно з науковим керівником. Друковані праці підготовлені за безпосередньою участю автора.

МОДЕЛІ ДОСЛІДЖЕНЬ, МЕТОДОЛОГІЯ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.

Першу серію досліджень проводили на крапчатих ховрах *Citellus suslicus* Gueld масою 150 - 200 грамів (дослідна група). Контрольною групою були тварини, яких відловлювали в активному стані життя (в середині червня). Тварин зразу ж декапітували, відбирали проби крові для подальших досліджень, згідно з методами, що викладені нижче.

До середини вересня тварини дослідної групи були в активному стані, перебуваючи в умовах віварію. Потім їх переводили у напівпідвальне приміщення з температурою 9 - 11 °С на годівлю сухим кормом (зерно, сухарі). Поступово, по мірі зниження температури навколишнього середовища до 5 - 8 °С, тварини почали переходити в стан зимової сплячки (жовтень місяць). В такому стані тварини перебували протягом трьох місяців. Характерним для стану сплячки було: температура тіла тварин знизилась до 6 - 8 °С, частота серцевих скорочень складала 10 - 15 за хвилину.

Через три місяці сплячки тварин декапітували, відбирали тканини та цільну кров (у гепаринізовані капіляри) для подальших досліджень.

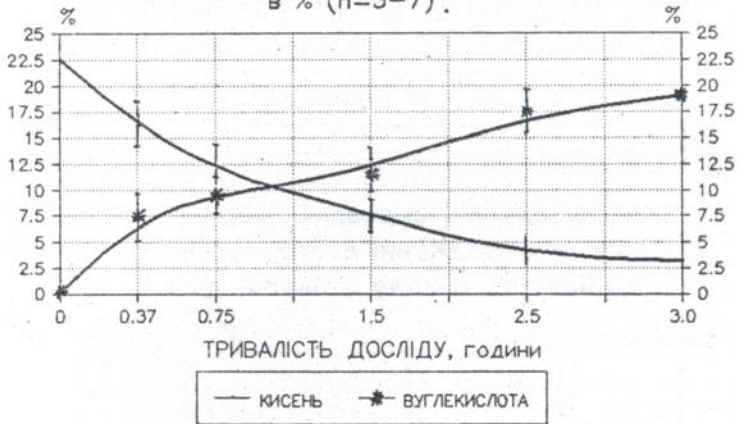
Другу серію досліджень проводили на самицях білих безпородних щурів масою 180 - 200 грамів, беручи за основу модель штучного гіпобіозу за методом Бахметьєва-Джайя-Анжуса [Бахметьев П.И., 1912; Andjus R., 1951; Сіаја J., 1940]. Ця модель передбачає комплексний вплив на організм тварини трьох факторів: гіпотермії, зниження концентрації кисню в середовищі та гіперкапнії. Виходячи з того, що метою досліджень було вивчення специфічної ролі гіперкапнії в розвитку гіпобіотичного стану, були розроблені ряд модифікацій вищевказаної моделі, які дозволяли вичленити специфічний вплив на обмін речовин лише однієї вуглекислоти. З цією метою дослідження проводилися на чотирьох групах тварин:

- контрольна - щурі за нормального фізіологічного стану;
- дослідна 1 - модель Бахметьєва-Джайя-Анжуса, де має місце комплексний вплив гіпотермії, гіперкапнії та зниження концентрації кисню в середовищі де знаходилися дослідні тварини;
- дослідна 2 - модифікована модель Бахметьєва-Джайя-Анжуса з виключенням впливу фактору гіперкапнії;
- дослідна 3 - модель вивчення впливу на організм тварин лише фактору гіпотермії.

Модель переведення тварин в гіпобіотичний стан по Бахметьєву-Джайю-Анжусу (дослідця 1). Тварин витримували протягом трьох годин у спеціальній герметичній камері (об'єм - 3л) при температурі зовнішнього середовища 3 - 5 °С. Як показали дослідження, за визначений час склад газів в камері суттєво змінювався (рис. 1). За вказаний період перебування тварин у зазначених умовах у них розвивався стан штучного гіпобіозу, на що вказують наступні дані: зниження температури їх тіла з 37 - 38 до 16 - 17 °С (рис. 2), зміна частоти серцевих скорочень з 380 - 390 до 80 - 82 за хвилину (рис.3), майже повна втрата рухомості та больових рефлексів.

Рис. 1.

Характер зміни газового складу атмосфери де знаходилися шурі в процесі розвитку гіпобіотичного стану і виведення з нього, в % (n=5-7).



Після трьохгодинного перебування тварин 1-ї дослідної групи в умовах комплексного впливу на них гіпотермії, поступового зниження концентрації кисню в середовищі та гіперкапнії, знімали вплив останніх двох факторів та посилювали перший. Для цього тварин переводили з камери в середовище з нормальним газовим складом, але з температурою 3 - 5 °С. Перебування

тварин у такому стані протягом 30 хвилин обумовлювало повну втрату їх рухомості та реакції на больові подразнення.

Рис. 2.

Особливості зміни температури середовища і температури тіла в динаміці розвитку гіпобіотичного стану та в процесі виведення із нього $^{\circ}\text{C}$, $n=5$.

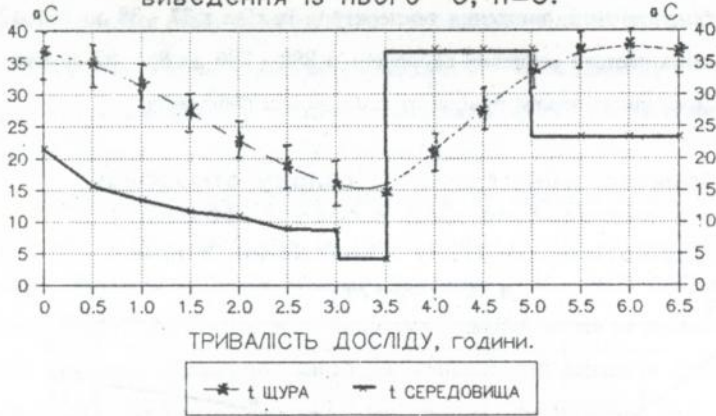
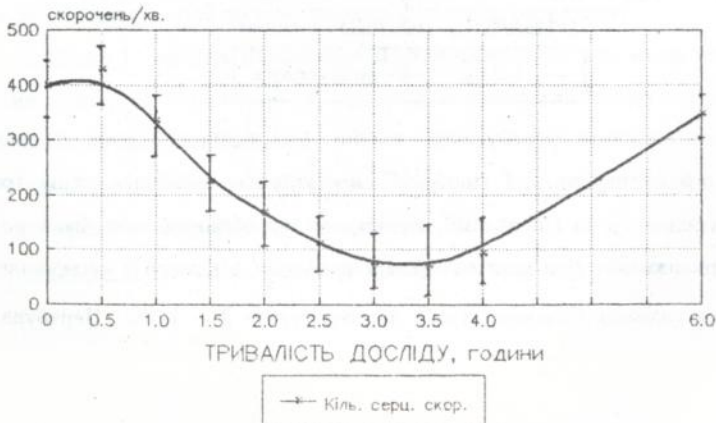


Рис. 3.

Зміни швидкості серцевих скорочень у щурів при входженні в стан штучного гіпобіозу та виходу з нього, $n=4$.



На цьому етапі частину тварин декапітували та відбирали відповідні проби тканин для дослідження. Решта тварин використовувалася для біохімічних досліджень в динаміці їх виходу із гіпобіотичного стану. З цією метою щурів переміщали в термостат із звичайним газовим середовищем при температурі 37 °С і витримували в ньому протягом 1-ої години до появи в них рухомості. Після цього тварин переводили в звичайні умови навколишнього середовища.

Дослідження крові проводили протягом доби через певні проміжки часу (рис. 4 -7). За цих умов виживали практично всі піддослідні тварини. Помітних змін в їх поведінці через добу після виходу з стану гіпобіозу, порівняно з контролем, не спостерігали.

Рис. 4.

Рівні $p\text{CO}_2$ в крові щурів в динаміці розвитку штучного гіпобіозу та в процесі виходу з нього, в мм рт.ст.

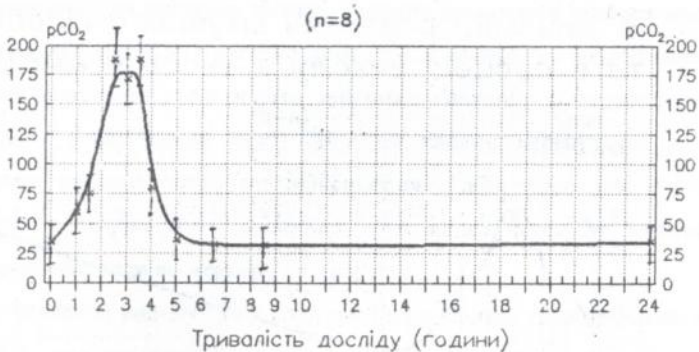


Рис. 5.

pH крові щурів в стані штучного гіпобіозу та в процесі виходу з нього.

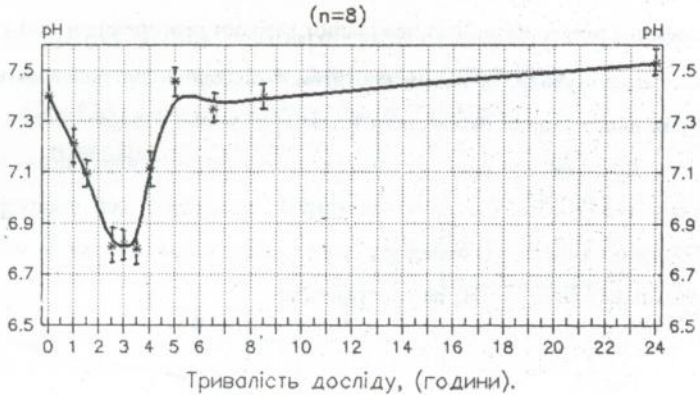


Рис. 6.

Концентрація HCO_3^- у крові щурів в динаміці розвитку штучного гіпобіозу та в процесі виходу з нього в ммоль/л.

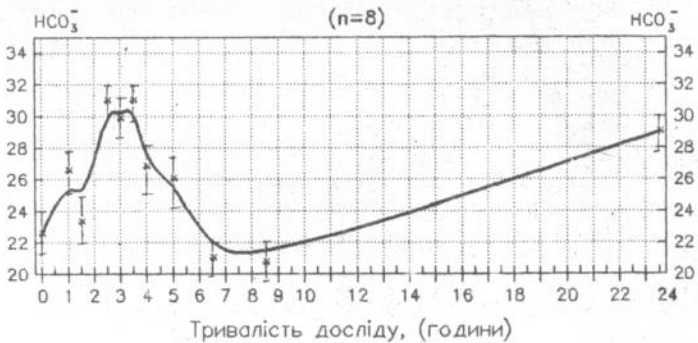


Рис. 7.

Рівні pO_2 в крові щурів в динаміці розвитку штучного гіпобіозу та в процесі виходу з нього в мм рт.ст.



Експерименти по вивченню специфічної ролі вуглекислоти в розвитку гіпобіозу (2-га дослідна група) проводили на моделі, де був виключений вплив гіперкапнії на організм тварин. Останнє досягалося шляхом постійного зв'язування лугом (КОН) вуглекислого газу в камері, де знаходилися щурі. При такій постановці дослідження стан штучного гіпобіозу у тварин розвинути не вдавалося, і вони гинули через 30 - 40 хвилин перебування в камері. Враховуючи наведені дані, ми здійснювали відбір проб для біохімічних досліджень у тварин обох дослідних груп якраз через 30 хвилин після початку експерименту до моменту їх загибелі.

Для вивчення впливу самої гіпотермії на розвиток гіпобіотичного стану у щурів (3-я дослідна група), тварин утримували у звичайному повітряному середовищі при температурі 4 - 5 °С. У цих тварин не відзначалось ознак розвитку гіпобіотичного стану. Температура їх тіла при цьому залишалася в нормі, а частота серцевих скорочень також була у межах норми. В результаті того, що ці тварини не переходили в стан штучного гіпобіозу, то проведення

подальших біохімічних досліджень на тваринах цієї групи вважали недоцільним.

1. У крові ховрахів (перша серія досліджень) визначали:

Показники кислотно-лужної рівноваги визначали на мікроаналізаторі pH Gas/Blood Analyzer за [Агапов Ю.Я., 1963];

Концентрації аміаку та глутаміну - за [Силакова А.И.и др., 1961];

Концентрацію сечовини - за біо-тестом фірми Lachema;

Концентрації вільних амінокислот - на рідинному хроматографі.

2. У крові піддослідних щурів (друга серія досліджень) визначали:

Показники стану кислотно-лужної рівноваги - за [Агапов Ю.Я., 1963].

Відбір та аналіз проб проводили в динаміці розвитку штучного гіпобіозу та виходу з нього.

Концентрації Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , неорганічного фосфату в крові та гематокрит - на аналізаторі фірми "Cognit3" (Швеція). Відбір та аналіз проб здійснювали через 3,5 години після початку досліду.

Концентрації NH_3^+ і глутаміну - за [Силакова А.И.и др., 1961] та сечовини - за біо-тестом "Lachema", Чехія. Активність аргінази визначали - за [Robert T. Schimke., 1970], глутаматдегідрогенази - за [H.F. Fisher, 1985] та глутамінази - за [E. Kvamme, 1985]. Визначення активності вказаних ферментів проводили в печінці та нирках. Відбір та аналіз проб проводили через 3,5 години після початку досліду.

У печінці також визначали концентрації лактату - за [Hohorst H.J et al, 1959], пірувату - за [Hohorst H.J et al, 1959], α -кетоглутарату - за [Bergmeyer H.U. et al, 1963], глутамату - за [Bernet E. et al, 1963], малату - за [Hohorst H.J., 1963], оксалоацетату - за [Hohorst H.J., 1963]. Відбір та аналіз проб проводили через 30 хвилин та 3,5 години після початку досліджень.

Концентрацію глюкози в крові - за о-толуїділовим методом [біо-тест НПО "Биолар"].

Статистичну обробку даних проводили - за [А. Афіфи и др., 1982] за допомогою ЕОМ.

ОСНОВНІ РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.

Аналіз отриманих результатів вказує на те, що в період зимової сплячки в організмі ховрахів має місце респіраторний ацидоз з частковою нирковою компенсацією (респіраторний субкомпенсований ацидоз), (табл.1). Про це свідчить зменшення рН крові, підвищення рівня бікарбонатів та більш значне збільшення концентрацій розчинного вуглекислого газу (pCO_2) в крові тварин в стані сплячки порівняно з контролем (активний стан).

Дані табл.1 свідчать також, що в період гіпобіозу рівень O_2 в крові дослідних тварин майже в 4 рази перевищує аналогічний рівень у тварин контрольної групи. Цей важливий факт вказує на те, що обмін кисню в тканинах гібернуючих тварин має значні особливості.

Табл. 1. Рівні основних показників кислотно-лужної рівноваги в крові ховрахів за умов стану зимової сплячки та в активному стані, ($M \pm m$; $n=6-8$).

| Показники | Активний стан | Зимова сплячка |
|----------------------|-------------------|---------------------|
| pH | 7,266 \pm 0.003 | 7,101 \pm 0.041* |
| pO_2 мм рт. ст. | 43.03 \pm 5,43 | 174,32 \pm 12.69* |
| pCO_2 мм рт. ст. | 69,65 \pm 3,59 | 102,87 \pm 4,66* |
| CO_2 total ммоль/л | 35,0 \pm 1,0 | 38,0 \pm 2,27 |
| HCC_3^- ммоль/л | 33,1 \pm 1,1 | 35,0 \pm 2,13 |

Тут і далі * - $p < 0,05$ по відношенню до контролю.

В таблицях 2 та 3 представлені деякі показники обміну амонійного азоту та вмісту вільних амінокислот в крові ховрахів за умов зимової сплячки. Наведені дані вказують, що у тварин дослідної групи визначаються лише слідові кількості аміаку (майже в 60 раз менше, ніж у тварин контрольної групи). Приблизно в 6 разів зменшується концентрація глутамату, тоді як рівень глутаміну і сечовини у них перевищує контрольний рівень в 2 і 2,5

рази. Цей факт за умов тривалої природної гібернації може бути обумовлений гальмуванням утворення чи посилення процесів утилізації аміаку, або ж і тим і другим разом.

Табл. 2. Особливості змін концентрації основних субстратів азотого обміну в крові ховрахів за умов зимової сплячки та в активному стані, ($M \pm m$, $n = 6 - 8$).

| Показники | Активний стан | Зимова сплячка |
|-------------------|---------------|----------------|
| Аміак, мг% | 3,10±0,33 | 0,056±0,008* |
| Глутамін, мг% | 32,49±6,41 | 63,58±0,83* |
| Сечовина, ммоль/л | 4,44±0,13 | 12,05±1,35* |
| Гематокрит, % | 45,06±1,37 | 44,06±2,55 |

При дослідженні концентрації вільних амінокислот в крові ховрахів, що перебували в активному стані (контроль) та в стані гібернації (табл. 3) було відмічено помітне зниження сумарної концентрації їх у тварин дослідної групи (на 25%).

Табл. 3. Концентрації вільних амінокислот в крові ховрахів за умов зимової сплячки та в активному стані, ($M \pm m$, $n=6-8$).

| Показники | Активний стан | Зимова сплячка |
|-------------|---------------------|----------------|
| Аланін | мкг/мл 43.243±3.218 | 2.560±0.667* |
| Аргінін | мкг/мл 16.586±0.612 | 12.380±2.427 |
| Аспаргат | мкг/мл 4.614±0.299 | 0.938±0.167* |
| Гістидин | мкг/мл 18.600±0.565 | 13.583±1.681* |
| Гліцин | мкг/мл 29.329±1.797 | 4.167±1.050* |
| Глутамат | мкг/мл 20.471±0.535 | 3.500±0.445* |
| Ізолейцин | мкг/мл 10.643±1.123 | 11.750±2.046 |
| Лейцин | мкг/мл 17.386±2.014 | 24.650±2.789* |
| Лізін | мкг/мл 19.886±1.845 | 44.933±4.016* |
| Метіонін | мкг/мл 5.914±0.370 | 2.742±0.501* |
| Фенілаланін | мкг/мл 15.171±0.780 | 9.567±1.508* |
| Серін | мкг/мл 36.514±1.147 | 41.117±3.831 |
| Тірозин | мкг/мл 15.343±1.175 | 7.617±1.122* |
| Треонін | мкг/мл 15.014±1.703 | 7.367±0.922* |
| Валін | мкг/мл 21.886±2.069 | 24.701±1.681 |
| Сума | мкг/мл 290.56±2.03 | 211.96±5.84* |

Привертає до себе увагу факт різкого зменшення концентрацій в крові сплячих тварин таких заміennих амінокислот, як: аланін (в 16 разів), гліцин (в 7 разів), аспартат (в 5 разів) та незамінних - треоніну (в 2 рази), фенілаланіну (в 1,6 разів), метіоніну (в 2 рази), гістидіну (в 1,5 рази) та тірозіну (у 2 рази). Одночасно рівні таких амінокислот, як лейцин та лізін, в півтора - два рази вищі, ніж в період їх активної життєдіяльності. Такі зміни концентрацій перерахованих вище заміennих та незамінних амінокислот не дає нам зробити певні висновки щодо особливостей їх метаболізму при зимовій сплячці і потребує розширення відповідних досліджень в майбутньому.

На рис. 4-7 представлені дані про зміни основних параметрів кислотно-лужної рівноваги в крові щурів, які перебувають у стані штучного гіпобіозу. У ході досліджень у тварин дослідної групи відмічене різке наростання (в 6 - 6,5 раз) в крові парціального тиску розчинного вуглекислого газу (pCO_2) до 175 мм рт.ст. (рис. 4), та різке зниження рН крові (з 7,4 до 6,8), концентрація бікарбонатів у крові зазнає значного збільшення (на 40 - 42%), (рис.5), що характеризується як гострий респіраторний ацидоз (рис.6). Всі вищенаведені зміни обміну речовин мають зворотний характер, і через 1,5 - 2 години після виведення тварини із стану гіпобіозу, вони (тварини) повертається до звичайного способу життя. Слід також відзначити, що протягом усього досліду рівень кисню в крові тварин не зменшується нижче величин, характерних для нормобіозу (рис. 7). Ці дані свідчать про те, що у тварин за умов штучного гіпобіозу не відмічається розвитку гіпоксії в тканинах.

Виключення гіперкапнії з числа досліджуваної групи чинників гіпобіозу (гіпотермія, гіперкапнія та зниження концентрації кисню у навколишньому середовищі) обумовлює зовсім інші зміни в обміні речовин та в фізіологічному стані тварин (2-га дослідна група), (табл.4). Через 25 хвилини перебування тварин за цих умов відбувається різке зниження: величини рН їх крові (з 7,39 до 6,88), концентрації кисню в крові (з 74,57 до 27,34 мм

рт.ст.) та бікарбонатів (з 22,5 до 10,7 ммоль/л) (метаболічний ацидоз). Помічено, що рівень $p\text{CO}_2$ в крові тварин цієї дослідної групи при цьому практично не змінюється відносно контролю. Подальше перебування в камері тварин у вищезазначеному середовищі протягом 5 - 10 хвилин викликає їх смерть.

Отже, попередження накопичення CO_2 в камері, де знаходилися піддослідні тварини, шляхом його постійного зв'язування, обумовлює не тільки суттєві фізіологічні, а і значні зміни ряду біохімічних показників. Ці дані конкретно вказують на те, що гіперкапіія (надлишок CO_2 в крові) спричиняє значний вплив на метаболізм кисню, бікарбонатів та протонів у тканинах.

Табл. 4. Вплив дії гіпотермії та поступового зниження концентрації кисню в середовищі (без гіперкапії) на динаміку змін температури тіла, серцевих скорочень та основних показників кислотно-лужної рівноваги крові щурів, ($M \pm m$, $n=3$).

| Тривалість досліджу, хв | Температура тіла щура, °С | Частота серцевих скорочень скор./хв. | pH | $p\text{O}_2$ мм рт.ст. | $p\text{CO}_2$ мм рт.ст. | HCO_3^- ммоль/л |
|-------------------------|---------------------------|--------------------------------------|-------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Початок досліджень | | | | | | |
| 10 | 36.2 ± 0.2 | 450 ± 50 | 7.395 ± 0.035 | 74.57 ± 2.95 | 34.25 ± 1.95 | 22.45 ± 1.32 |
| 20 | 35.5 ± 0.2 | 460 ± 42 | - | - | - | - |
| 25 | 34.7 ± 0.3 | 77 ± 15 | - | - | - | - |
| | 34.2 ± 0.2 | 44 ± 12 | 6.876 ± 0.035 | 27.3 ± 2.6 | 37.6 ± 2.8 | 10.7 ± 0.6 |

Результати проведених досліджень по вивченню особливостей електролітного балансу та обміну амонійного азоту у щурів за умов штучного гіпобіозу свідчать про те, що в крові дослідних щурів порівняно з контролем збільшується концентрація неорганічного фосфору (в 2,3 рази), магнію (в 1,7 рази). Вміст калію в крові щурів дослідної групи при цьому зменшується (на 33%), а кальцію - лише має тенденцію до цього (табл.5). Концентрації Na^+ , Cl^- в крові щурів практично не відрізнялись від контрольних величин (табл.5). Зменшення концентрації калію в крові тварин дослідної групи може

вказувати на те, що внутрішньоклітинні параметри кислотно-лужної рівноваги, очевидно, зазнають ще більших змін, ніж в крові. Можна також гадати, що при такому сильному зниженні рН крові, що має місце у тварин дослідних груп, суттєвих, змін зазнають і процеси транспорту електролітів (в тому числі аніонів) через мембрани клітини.

Підсумовуючи отримані дані щодо стану електролітного балансу в крові щурів в умовах штучного гіпобіозу, слід відмітити, що найбільш суттєвих змін зазнають концентрації таких катіонів, як K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , а також таких аніонів, як неорганічні фосфати та бікарбонати. Значне зростання неорганічних фосфатів вказує на те, що ацидоз, який має місце в стані штучного гіпобіозу, є наслідком не тільки накопичення CO_2 (респіраторний), а і наслідком суттєвих метаболічних змін. На підтвердження цього вказує підвищення на 30% концентрації лактату у цьому стані. Отже, можна припустити, що ацидоз щурів у стані гіпобіозу має змішаний характер (респіраторний і метаболічний).

Табл. 5. Концентрації основних електролітів крові у щурів в нормі та за умов штучного гіпобіозу ($M \pm m$; $n=8$).

| Показники | Контроль | Дослід |
|------------------------|-------------------|--------------------|
| Na^+ , ммоль/л | $146,15 \pm 1,44$ | $143,93 \pm 0,94$ |
| K^+ , ммоль/л | $7,59 \pm 0,19$ | $5,90 \pm 0,27$ * |
| Ca^{2+} , ммоль/л | $1,17 \pm 0,14$ | $1,02 \pm 0,19$ |
| Mg^{2+} , ммоль/л | $2,31 \pm 0,08$ | $3,94 \pm 0,19$ * |
| Cl^- , ммоль/л | $101,5 \pm 0,2$ | $95,5 \pm 0,03$ |
| Неорг.фосфати, ммоль/л | $7,75 \pm 0,46$ | $17,65 \pm 0,46$ * |
| Гематокрит, % | $45,58 \pm 2,03$ | $43,36 \pm 2,55$ |

Отримані результати дослідів, які характеризують особливості азотового обміну в організмі тварин за умов штучного гіпобіозу, вказують на те, що вміст аміаку та глутаміну в крові тварин досліджуваної групи зріс

майже в 6 та 2,2 рази відповідно. Концентрація сечовини при цьому в крові щурів експериментальної групи була нижчою (табл. 6).

Табл. 6. Концентрація аміаку, глутаміну та сечовини в крові щурів за штучного гіпобіозу ($M \pm m$, $n=12$).

| Показники | Контроль | Дослід |
|-------------------|--------------------|---------------------|
| Аміак, мг% | 0.176 \pm 0.026 | 1.035 \pm 0.117* |
| Глутамін, мг% | 14.854 \pm 1.027 | 32.762 \pm 1.550* |
| Сечовина, ммоль/л | 0.976 \pm 0.096 | 0.677 \pm 0.044* |

Аналіз даних наведених в табл. 7 вказують на те, що у тварин за умов штучного гіпобіозу активність таких ключових ферментів амонієгенезу, як глутаматдегідрогеназа, глутаміназа та аргіназа у печінці та нирках знижується, порівняно до контролю, що корелює із змінами концентрацій досліджуваних субстратів амонійного обміну.

Табл. 7. Активність основних ферментів азотогового обміну в тканинах щурів в стані штучного гіпобіозу, ($M \pm m$, $n=12$).

| Об'єкти досліджень | Контроль | Гіпотермічне середовище | Штучний гіпобіоз |
|--|------------------|-------------------------|--------------------|
| Г л у т а м і н а з а | | | |
| Печінка, (μ моль NAD/1 мг білка за хв). | 9,61 \pm 1,18 | 5,46 \pm 0,36 * | 7,60 \pm 0,62 |
| Нирки, (μ моль NAD/1 мг білка за хв). | 24,96 \pm 3,54 | 22,54 \pm 1,88 | 15,90 \pm 0,79 * |
| Г л у т а м а т д е г і д р о г е н а з а | | | |
| Печінка, (μ моль NAD/1 мг білка за хв). | 223,3 \pm 15,9 | 179,6 \pm 23,5 | 168,7 \pm 47,6 |
| Нирки, (μ моль NAD/1 мг білка за хв). | 122,6 \pm 28,0 | 134,2 \pm 19,8 | 95,0 \pm 12,8 |
| А р г і н а з а | | | |
| Печінка, (μ моль NAD/1 мг білка за хв). | 3,73 \pm 0,84 | 1,47 \pm 0,23 * | 1,36 \pm 0,37 * |
| Нирки, (μ моль NAD/1 мг білка за хв). | 1,11 \pm 0,19 | 0,48 \pm 0,09 * | 0,48 \pm 0,14 * |

Отже, можна гадати, що наростання концентрації аміаку в тканинах тварин дослідної групи зумовлюється перш за все відносним посиленням у них процесів амонієгенезу. Подібні закономірності в обміні амонійного азоту відзначено при вивченні цих процесів у тварин та людей за умов респіраторного і, особливо, метаболічного ацидозу [Векслер Я.И., 1962].

Аналіз результатів дослідів (табл. 8) на щурах, які перебували в стані штучного гіпобіозу, показує також, що при цьому стану вміст глюкози в крові тварин підвищився на 62%, порівняно із контрольною групою. Це можна розглядати як прояв гомеостатичної реакції організму, яка направлена на зв'язування надлишку протонів в біологічних рідинах (ацидозний стан). Відмічено, що через 30 хвилин від початку дослідження концентрація глюкози в крові щурів 1-ї та 2-ї дослідної групи зменшується на 40 - 43% порівняно з контролем. Проте у тварин, які увійшли в стан гіпобіозу (через 3,5 години після початку дослідження), спостерігається різке наростання концентрації глюкози в крові, що вказує на значне посилення глюконеогенезу в тканинах за цих умов (табл. 8).

Табл. 8. Вплив гіперкапнії на концентрацію глюкози в крові щурів, ($M \pm m, n=5$).

| Досліджувані стани | ГЛЮКОЗА, (мг%) |
|--|---------------------|
| Контроль | 157,76 \pm 21,62 |
| Вплив гіпотермії, зниженої концентрації кисню в середовищі та <u>гіперкапнії</u> (через 3,5 години після початку дослідження). | 254,30 \pm 29,06* |
| Вплив гіпотермії, зниженої концентрації кисню в середовищі та <u>гіперкапнії</u> (через 30 хв. після початку дослідження). | 81,90 \pm 8,47* |
| Вплив гіпотермії та зниженої концентрації кисню в середовищі (без гіперкапнії), (через 30 хв. після початку дослідження). | 86,96 \pm 6,56* |

За умов штучного гіпобіозу у щурів були відмічені суттєві зміни у концентраціях основних субстратів гліколізу та циклу трикарбонових кислот

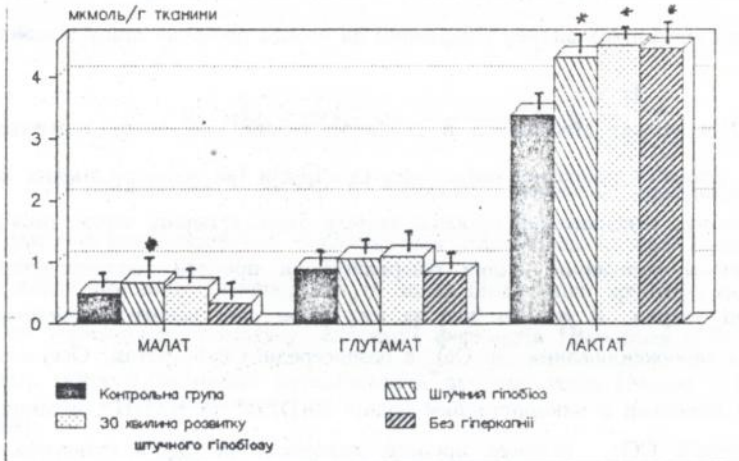
(рис. 8 - 9). Показано, що в стані штучного гіпобіозу підвищується концентрація лактату та малату на 28 та 33,5%, відповідно. Помічена тенденція до збільшення вмісту пірувату, глутамату, оксалоацетату на 32,8, 18 та 17%, відповідно. В той же час відмічено зменшення вмісту α -кетоглутарату на 43,2%, що свідчить про певну перебудову функціонування трикарбонного циклу і узгоджується з літературними даними по цьому питанню [Тимофеев Н.Н., 1981]. Розрахунок співвідношення відновлених субстратів до окислених показав, що в стані штучного гіпобіозу співвідношення лактат/піруват та малат/глутамат лишаються без суттєвих змін, а глутамат/ α -кетоглутарат - збільшується на 107% порівняно з активним станом. Це останнє корелює із значними змінами в енергетичному та амонійному обміні, на що вказувалося вище. Дані щодо співвідношення відновлених форм ($NADH^+$ та $NADPH^+$) до окислених (NAD^+ та $NADP^+$) в тканинах тварин, на яких діяли лише гіпотермією та зниженою концентрацією кисню в середовищі (без гіперкапічного фактору), вказують на тенденцію до зменшення вищевказаних співвідношень малат/оксалоацетат, глутамат/ α -кетоглутарат, та збільшення лактат/піруват.

Рис. 8.



Рис. 9

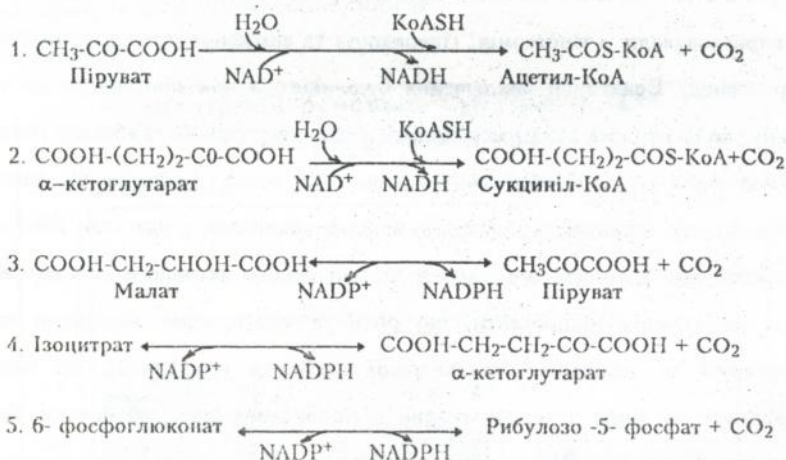
Концентрації основних субстратів ЦТК та гліколізу в печінці щурів.



На підставі отриманих результатів слід відзначити, що для введення щурів в стан штучного гіпобіозу важливу роль мають всі три фактори, які ми використовували: - гіпотермія, гіперкапнія та зниження концентрації кисню в середовищі. Практично виключення будь-якого з них призводить до такого стану, коли тварина або не переходить в стан зворотнього глибокого гіпобіозу, або ж вона гине. Комбінований вплив цих трьох факторів на дослідних тваринах дає можливість порівняно швидко викликати у них стан гіпобіозу із збереженням здатності повернення до звичайного активного способу життя. При цьому слід підкреслити, що роль та молекулярні механізми впливу гіпотермії та зниженої концентрації кисню в середовищі, як одних з важливих чинників переходу тварин в гіпобіозний стан, накопичено багатий матеріал [Тимофеев Н.Н., 1981, Агаджанян Н.О., 1972], тоді як відносно ролі вуглекислоти в цьому процесі існують в основному лише припущення [Баев В.И. и др., 1978]. Базуючись на результатах досліджень метаболічної ролі вуглекислоти у гетеротрофних організмів [Krebs H.A., Wood H.G.,

Werkman S.H., Langmore W.Y., Hastings A.B. et al, 1943 - 1990; Гулий М.Ф., Мельничук Д.О. та інші, 1968 - 1994] та враховуючи результати досліджень щодо особливостей обміну речовин в стані гіпобіозу, пропонується такі пояснення механізмів впливу гіперкапнії на процес розвитку стану гіпобіозу у тварин:

а) в умовах гіперкапнії в тканинах тварин має місце гальмування реакцій декарбоксілювання органічних субстратів (за законом діючих мас), що пригнічує окиснювальні процеси взагалі. Цим, в першу чергу, імовірно, пояснюється негативний вплив гіперкапнії на процеси теплопродукції в організмі тварин. В той же час за цих умов слід чекати стимулювання процесів карбоксилювання, де CO_2 є безпосереднім субстратом. Оскільки ці процеси пов'язані з використанням водню NADPH^+ та NADH^+ , підвищення концентрації CO_2 гальмує процеси використання O_2 в окиснювально-відновних реакціях, що і спостерігали;



б) різке підвищення $p\text{CO}_2$ в тканинах зумовлює зміни констант рівноваги реакцій взаємодії $p\text{CO}_2$ з аміногрупами білків, пептидів та інших NH_2 -речовин, в тому числі ферментів, що спричинює значні зміни їх активності;



в) збільшення $p\text{CO}_2$ в тканинах зумовлює прямопропорційне збільшення концентрацій H^+ у біологічних рідинах, що впливає практично на всі ланки обмінних, транспортних та інших біологічних процесів, включаючи зміни гормонального статусу, активації ферментів [Вороб'єв В.В., 1987] і навіть репресії/активації функціонування окремих генів [Mason C.B. et al, 1990];

г) зміна $p\text{CO}_2$ у організмі тварин дослідної групи зумовлює ряд суто фізіологічних впливів: на стан серцево-судинної системи, секрецію та хімічний склад травних соків, функціональну діяльність легенів, нирок тощо.

Всі ці механізми реалізації регуляторного впливу змін концентрацій CO_2 та HCO_3^- у тканинах на обмін речовин у тварин і є, імовірно, тими, які разом з гіпотермією та зниженою концентрацією кисню в середовищі де знаходилися дослідні тварини лежать в основі розвитку гіпобіотичного стану як природного способу переживання несприятливих умов зовнішнього середовища.

ВИСНОВКИ

1. В організмі щурів у стані штучного гіпобіозу, який обумовлюється спільним впливом гіпотермії, зниження концентрації кисню в середовищі та гіперкапнії, відмічається розвиток гострого респіраторного ацидозу, про що свідчить зниження величини рН крові до 6,8 - 6,7, підвищення рівню $p\text{CO}_2$ (в середньому в 5,5 - 6 разів) та концентрації бікарбонатів (в середньому на 20 - 25%). Гіпотермія та зменшення концентрації кисню в середовищі (стан виключення з групи вказаних факторів гіперкапнії) обумовлюють розвиток гострого метаболічного ацидозу та швидку смерть тварин. При цьому знижувалась рН крові до 6,876, концентрація бікарбонатів та $p\text{O}_2$ в ній до 10,7 ммоль/л та 27,3 мм рт.ст. відповідно.

2. У щурів за умов штучного гіпобіозу має місце гальмування поглинання кисню.

3. Розвиток у щурів штучного гіпобіозу обумовлює певні зміни електролітного балансу, про що свідчать підвищення концентрацій: Mg^{2+} (на 71%), фосфатів (на 226%), бікарбонатів (на 20-25 %); зменшується: K^+ (на 33 %) та має тенденцію до зменшення концентрація Ca^{2+} ; залишаються без змін концентрації Cl^- та Na^+ .

4. Стан штучного гіпобіозу у щурів обумовлює значне посилення процесів амонієгенезу (рівень аміаку в крові підвищується у 5,5 - 6 разів), тоді як процеси сечовиноутворення - гальмуються (концентрація знижується у 1,4 рази). Ці показники в певній мірі корелюють з результатами вивчення концентрацій глутаміну, глутамату, α -кетоглутарату, пірувату і оксалоацетату в крові та печінці та з активностями глутаматдегідрогенази, глутамінази та аргінази в печінці та нирках.

5. Стан штучного гіпобіозу викликає суттєві зміни у величині співвідношення окислених та відновлених піримідиннуклеотидів в тканинах в

сторону його зменшення, на що вказують концентрації та співвідношення пірувату і лактату, α -кетоглутарату і глутамату, оксалоацетату і малату.

6. Для стану штучного гіпобіозу в організмі щурів характерна гіперглікемія (концентрація глюкози в крові дослідних тварин вища на 62% порівняно із контролем) та посилення гліколітичного шляху її розпаду, на що вказує накопичення лактату (на 30%) в печінці.

7. В стані природного гіпобіозу в організмі ховрахів відзначено також розвиток респіраторного ацидозу, але більш компенсованого, про що свідчать отримані дані: зниження величини рН крові (з 7,266 до 7,101), підвищення рівню pCO_2 (з 69,65 до 102,87 мм рт.ст.) та тенденція до збільшення концентрації бікарбонатів.

8. В стані природного гіпобіозу в тканинах гіпобіозних тварин співвідношення між процесами амонієгенезу і утилізації аміаку суттєво змінюються на користь утилізації, на що вказує значне зменшення концентрацій аміаку в крові (в 60 раз) порівняно із станом нормобіозу. Це припущення корелює також з даними змін концентрацій сечовини і глутаміну (збільшення у 2,5 та 2 рази відповідно) та глутамату (зменшення в 6 разів) порівняно із активним станом.

9. В крові гібернуючих тварин має місце тенденція до зниження (на 25%) сумарної концентрації вільних амінокислот, порівняно з контролем.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ НАУКОВИХ ПРАЦЬ ПО ТЕМІ
ДИСЕРТАЦІЇ.

1. Мельничук Д.А., Роговский С.П., Скорик Л.В., Мельничук С.Д.
Кислотно-щелочное равновесие и обмен аммонийного азота при искусственной гибернации у крыс // Механизмы зимней спячки. Тезисы докл. Всесоюзный симпозиум - Махачкала, 1990. - С. 75.
2. Melnichuk D.A., Rogovsky S.P., Skorik L.V., Melnichuk S.D.
"Study of certain induced of electrolytic blood balance and intermediary exchange in tissues during artificial hibernation of rats" // Current progress in cryobiology II International conference (21-25 April) Kharkov, 1992. - P. 123.
3. Мельничук С.Д. Роль гіперкапнії в розвитку стану штучного гіпобіозу за умов спільної дії гіпотермії, гіпоксії та гіперкапнії // I З'їзд українського товариства кріобіології та кріомедицини (18 - 20 жовтня 1995р). Тези доп. - Харків, 1995. - С. 165 - 166.
4. Мельничук Д.О., Роговський С.П., Мельничук С.Д., Скорик Л.В. та інші.
Вуглекислота як регуляторний чинник метаболічної адаптації тварин за умов штучного та природного гіпобіозу // I З'їзд українського товариства кріобіології та кріомедицини (18 - 20 жовтня 1995р). Тези доп. - Харків, 1995. - С. 167 - 168.
5. Мельничук С.Д., Роговський С.П., Мельничук Д.О. "Особливості кислотно-лужної рівноваги та азотого обміну в організмі щурів за умов штучного гіпобіозу" // Укр. біохім. журн. - 1995. - 67, №4 С. 67 - 75.

Мельничук С.Д. "Гиперкапния как фактор регуляции обмена веществ у животных в состоянии природного и искусственного гипобиоза".

Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 03.00.04. - биохимия. Институт биохимии им. А.В. Палладини НАН Украины, Киев, 1995.

Работа посвящена изучению специфической роли и молекулярных механизмов воздействия углекислоты на процессы развития и поддержания состояния естественного и искусственного гипобиоза у животных.

Показано, что гиперкапния наряду с гипотермией и постепенным снижением концентрации кислорода в среде является одним из важных факторов, обуславливающих развитие гипобиоза у животных. Установлено, что в организме животных в условиях гипобиоза имеют место существенные изменения энергетического, азотистого и электролитного обменов. В работе обсуждаются возможные механизмы регуляторного влияния гиперкапнии на вышеуказанные стороны обмена веществ и развитие гипобиотического состояния у животных.

Ключові слова: гіпобіоз, гібернація, гіпотермія, гіперкапнія, кислотно-лужна рівновага, азотовий обмін, електролітний баланс, енергетичний обмін.

Melnychuk S.D. "Hypercapnia as the regular factor of exchange of substances at the animals in a condition natural and artificial hibernation".

Manuscript.

The dissertation Thesis on obtaining a scientific Degree of Philosophy Doctor (Biology) on a speciality: 03.00.04 - Biochemistry. A.V. Palladin Institute of National Academy of Science, Kiev, 1995.

The work is devoted to study of a specific role and molecular mechanisms of carbondioxide effect on processes of development and support of a condition natural and artificial hibernation at the animals.

It have shown, that hypercapnia alongside with hypothermia and gradual decrease of oxygen concentration in environment, is one of important factors, causing developments at the animals' hibernation. It was established, that in organisr: of the animals in conditions hibernation takes place an essentielles of changes power, nitric and electrolitic of exchanges. In work possible gears regulatoric influence of the hypercapnia on the above-stated parties of exchange of substances and hibernation development at the animals are discussed.

AB 33.625

AB 33.625