

УДК 577.12:636.028:612.12:591.543.42

БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ СИРОВАТКИ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ШТУЧНОГО ГІПОБІОЗУ

С.Д. Мельничук¹, член-кореспондент НААН України

С.В. Хижняк¹, доктор біологічних наук

В.С. Морозова¹, аспірант*

В.В. Бойко¹, провідний інженер

Л.В. Бабич², кандидат біологічних наук

В.М. Войціцький¹, доктор біологічних наук

¹Національний університет біоресурсів і природокористування України

²Клінічна лікарня "Феофанія" ДУС

Визначено біохімічні показники сироватки крові щурів за умов штучного гіпобіозу та в динаміці виходу із цього стану. Виявлено особливості реакції-відповіді тварин на вплив факторів вуглекислотного штучного гіпобіозу (гіпотермії, гіперкапнії та гіпоксії), що виявляється у підвищенні вмісту глюкози, сечовини, сечової кислоти, неорганічного фосфору та зростанні активності креатинкінази. Зазначені зміни елімінуються під час виходу тварин зі стану гіпобіозу і досягають контрольних значень через 24 год після виходу із нього.

Вступ. Дослідження стану штучного гіпобіозу викликає поширений інтерес у науковців, що обумовлено перспективами використання моделі вуглекислотного гіпобіозу в медицині, ветеринарії та тваринництві як способу загального знеболювання, консервування біологічного матеріалу, терапевтичного методу тощо [1, 2]. Залишається до кінця нез'ясованим механізм біохімічних перетворень, за яких відбувається перехід організмів до гіпометаболічного рівня життєдіяльності. Встановлення цього механізму дасть змогу вирішити ряд проблемних питань, пов'язаних із впровадженням використання методу штучного вуглекислотного гіпобіозу на різних об'єктах дослідження.

Ключовим фактором, за якого відбувається перехід тварин у гіпометаболічний стан, наряду з гіперкапнією та гіпоксією, є гіпотермія. Характер виникаючих функціональних перебудов при розвитку переохолодження має й певну специфіку, відмінну від механізму розвитку низькотемпературної надрезистентності в теплокровних тварин [4].

За допомогою вимірювання біохімічних показників крові, при створенні стану штучного вуглекислотного гіпобіозу, можна отримати інформацію стосовно і організму в цілому, і процесів, які при цьому відбуваються. Підвищення чи зниження активності ферментів є чутливим показником фізіологічного стану організму [5]. Рівень вмісту певних речовин характеризує прояв різноманітних змін

*Науковий керівник – професор С.Д. Мельничук.

метаболізму та реакцію організму на зовнішній вплив [6, 7]. Тому дослідження біохімічних показників крові за умов штучного гіпобіозу, що дозволить отримати комплексну інформацію щодо біохімічної перебудови та стану організму в цілому, є актуальним.

Метою даної роботи є дослідження біохімічних показників сироватки крові щурів за умов штучно створеного гіпобіозу та в динаміці виходу з нього.

Матеріали і методи. Експерименти проводилися відповідно до вимог "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою" (Страсбург, Франція, 1985 р.), за загальними етичними принципами експериментів на тваринах, ухваленими Першим національним конгресом України з біоетики (2001 р.). У досліджах використовували білих безпородних щурів-самців масою 180–200 г, котрих утримували в стандартних умовах виварію. Тварин було поділено на контрольну (інтактні тварини) та 3 експериментальні групи: 1 – стан штучного гіпобіозу (3 год від початку експерименту); 2 – вихід зі стану штучного гіпобіозу (5 год від початку експерименту); 3 – стан через 24 год після стану штучного гіпобіозу (27 год від початку експерименту). Кількість тварин у кожній групі – 8. Стан штучного гіпобіозу створювали за детально описаною в роботах [8, 9] методикою Бахмет'єва-Джайя-Анжуса. Під час досліджень тварин поміщали в герметично закриту камеру об'ємом 3 дм³, яка знаходилась у термостаті за температури 4 °С. Протягом перебування щурів у камері змінюються і температура, і склад газового середовища – розвивається гіперкапнія (зростає вміст вуглекислого газу) та гіпоксія (зменшується рівень кисню) [8]. У тварин спостерігається зниження ректальної температури з 37 °С до 17 °С,

зменшення частоти серцевих скорочень з 380 до 80 ударів за хв, повністю втрачаються рухомість та реакція на больовий подразник, зникає рефлекс на положення, що свідчить про розвиток стану штучного гіпобіозу. Тварин контрольної групи декапітували в стані нормотермії (t° тіла 37 °С), а експериментальних груп – у стані штучного гіпобіозу (t° тіла 17 °С) та у відповідні терміни виходу із нього.

Кров збирали в пробірки і центрифугували при 1500 g протягом 15 хв для отримання сироватки крові. Вимірювання біохімічних показників, активності ферментів та ліпідів сироватки крові здійснювали на спектрофотометричному аналізаторі "BS–3000 P" фірми "Sinnova", за допомогою наборів реактивів фірми "Audit Diagnostics".

Експериментальні дані обробляли загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Вірогідність відмінностей між показниками експериментальної і контрольної груп оцінювали за t-критерієм Ст'юдента.

Результати та їх обговорення. Дослідження вмісту метаболітів у сироватці крові щурів в умовах експерименту не виявило достовірних змін вмісту загального білка, альбуміну, білірубину та креатиніну (табл. 1).

Встановлено значне зростання вмісту глюкози (в середньому в 2 рази). Це співпадає із виявленим раніше підвищенням глюкози в крові щурів за умов гіпотермії [3], враховуючи, що остання є одним із ключових факторів створення штучного гіпобіозу. В динаміці виходу тварин зі стану штучного гіпобіозу рівень глюкози нормалізується. Під час штучної гіпотермії концентрація глюкози в крові щурів підвищується за рахунок підвищення активності фосфорилази-А, яка, в свою чергу, стимулює розпад глікогену [3], що також може мати місце за умов штучного



Таблиця 1. Вміст метаболітів у сироватці крові щурів за умов штучного гіпобіозу ($M \pm m$, $n=8$)

Показник	Контроль	Група 1	Група 2	Група 3
Блок загальний, г/л	47,8 \pm 4,2	58,2 \pm 6,7	51,5 \pm 6,2	68,8 \pm 9,1
Альбумін, г/л	30,5 \pm 4,2	36,3 \pm 3,2	28,9 \pm 3,5	24,3 \pm 4,9
Глюкоза, ммоль/л	7,93 \pm 0,91	16,73 \pm 1,20*	7,25 \pm 0,81	7,55 \pm 0,59
Сечовина, ммоль/л	7,00 \pm 0,31	8,60 \pm 1,08*	8,54 \pm 1,09*	7,37 \pm 1,07
Сечова к-та, мкмоль/л	170,9 \pm 13,6	105,1 \pm 10,1*	109,1 \pm 10,6*	86,1 \pm 10,5*
Креатинін, мкмоль/л	432,2 \pm 48,3	515,0 \pm 48,1	444,3 \pm 51,7	551,9 \pm 63,9
Прямий білірубін, мкмоль/л	4,49 \pm 0,77	4,74 \pm 0,40	4,88 \pm 0,45	5,29 \pm 0,46
Загальний білірубін, мкмоль/л	30,52 \pm 2,94	30,01 \pm 1,55	30,33 \pm 3,09	31,64 \pm 2,67
Триацилгліцероли, ммоль/л	0,67 \pm 0,07	0,89 \pm 0,10	0,93 \pm 0,09*	0,85 \pm 0,07
Холестерол, ммоль/л	1,48 \pm 0,13	1,60 \pm 0,19	1,54 \pm 0,17	1,51 \pm 0,19
ЛПДНЩ, ммоль/л	0,30 \pm 0,03	0,40 \pm 0,05*	0,42 \pm 0,04*	0,39 \pm 0,03*
ЛПНЩ, ммоль/л	0,43 \pm 0,03	0,41 \pm 0,04	0,34 \pm 0,03*	0,35 \pm 0,03
ЛПВЩ, ммоль/л	0,75 \pm 0,06	0,79 \pm 0,07	0,78 \pm 0,07	0,77 \pm 0,06

* – P 0,05.

гіпобіозу. Крім того, зростання вмісту глюкози за умов штучного гіпобіозу може бути пов'язане із загальним зниженням інтенсивності метаболічних процесів та зменшенням витрат глюкози.

В умовах гіпобіозу в крові щурів спостерігається підвищення вмісту сечовини (у середньому на 23 %), яке зберігається під час виходу з гіпобіозу і повертається до контрольних значень через 24 год (табл. 1). Сечовина може відігравати роль антифризу, оскільки раніше було встановлено, що введення в організм тварин сечовини сприяє значному збільшенню відсотка їх виживання після охолодження [10]. Водночас, вміст сечової кислоти знижується на 38 % відносно контрольних значень і залишається зниженим через добу після виходу із гіпобіозу. Сечова кислота – це кінцевий продукт розпаду пуринових основ і її зниження свідчить про зниження рівня катаболізму пуринових основ й може мати компенсаторне значення у відповідь на зниження синтезу АТФ за умов штучного гіпобіозу [11, 12]. В свою чергу, пуринові основи є біологічно активними речовинами, які контролюють процеси перебу-

дови організму гібернантів при переході до зимової сплячки і при виході із цього стану [13]. Це підтверджується інгібіторною кардіотропною дією пуринових основ у складі низькомолекулярних фракцій із тканин тварин-гібернантів на ізольоване серце жаби [14].

Встановлено зміни у вмісті ліпідів та ліпопротеїнів сироватки крові за умов гіпобіозу (табл. 1). Ліпіди сироватки крові в основному знаходяться в складі ліпопротеїнів (ЛП), основна функція яких полягає в міжорганному транспорті ліпідів та регуляції ліпідного обміну [15]. Вони забезпечують транспорт ліпідів як екзогенного (у складі їжі), так і ендогенного походження (заново синтезованих у печінці та тонкій кишці) в систему циркуляції і далі до місць утилізації чи депонування [15, 16].

Зростання вмісту триацилгліцеролів за умов гіпобіозу співвідноситься із виявленим зростанням (у середньому на 30 %) вмісту ЛП дуже низької щільності, що є головною транспортною формою ендогенних триацилгліцеролів і може свідчити про зменшення їх утилізації в інших тканинах [15]. Крім того, в умовах дослі-

ду встановлено незначне зростання вмісту холестеролу у сироватці крові. Найбільш багаті хорестеролом ЛП низької щільності, які є основною транспортною формою холестеролу для потреб клітин судинної стінки [15]. Їх вміст у сироватці крові в умовах виходу зі стану гіпобіозу знижується на 20 %, що вказує на зменшення накопичення хорестеролу в судинах за цих умов. Можливо до зростання вмісту ліпідів, причому в більшій мірі це стосується триацилгліцеролів, призводить зниження процесу ліполізу [16]. Встановлено, що вміст ЛП високої щільності за умов досліду не змінюється. Відомо, що для щурів характерним є високий рівень у крові, порівняно з ЛП низької щільності, вмісту ЛП високої щільності, які можуть виявляти захисну (антиоксидантну) дію [15]. Перерозподіл у вмісті ліпідів та ЛП за умов гіпобіозу може бути обумовлений змінами ліпідного обміну на стадіях утворення чи утилізації ЛП.

Активність ферментів, які характеризують структурно-функціональний стан гепатоцитів (аспартатамінотрансфераза, γ -глутамілтрансфераза, лужна фосфатаза) достовірно не змінюється в сироватці крові (табл. 2). Лужна фосфатаза

бере участь у реакціях обміну фосфорної кислоти. Відсутність змін активності лужної фосфатази свідчить про стабільність кісткової, печінкової тканин і фізіологічного мінерального обміну при гіпобіозі.

Стосовно аланінамінотрансферази встановлено зниження активності ферменту в умовах гіпобіозу в 1,9 разів, яка залишається пониженою і після виходу із стану гіпобіозу. Аланінамінотрансфераза каталізує реакцію трансамінування між аланіном та кетоглутаровою кислотою з утворенням пірувату і глутамату для забезпечення, зокрема, енергетичних потреб клітин при блокуванні або гальмуванні піруватдегідрогеназної реакції. Фермент виявлено практично в усіх тканинах ссавців, але найактивніший він у печінці [17]. Коферментом цього ферменту є піридоксальфосфат, який синтезується в організмі за участю АТФ в якості донора неорганічного фосфату. Оскільки процес синтезу АТФ за умов штучного гіпобіозу гальмується [11, 12], з цим може бути пов'язано і зниження активності аланінамінотрансферази.

Активність креатинкінази зростає в

Таблиця 2. Активність ферментів (Од/л) сироватки крові щурів за умов штучного гіпобіозу ($M \pm m$, $n=8$)

Показник	Контроль	Група 1	Група 2	Група 3
Аспартатамінотрансфераза	167,4 \pm 14,2	169,1 \pm 11,9	182,8 \pm 16,2	129,18 \pm 14,9
Аланінамінотрансфераза	109,4 \pm 10,2	58,2 \pm 2,5*	78,2 \pm 8,5*	86,2 \pm 6,4
γ -глутамілтрансфераза	5,5 \pm 0,7	4,5 \pm 1,1	6,3 \pm 0,6	6,7 \pm 0,7
Лактатдегідрогеназа	762,1 \pm 63,6	546,7 \pm 64,8*	678,4 \pm 51,9	534,4 \pm 43,0*
Лужна фосфатаза	508,8 \pm 54,2	459,1 \pm 39,8	467,0 \pm 26,0	598,9 \pm 54,6*
Кисла фосфатаза	33,02 \pm 4,0	24,1 \pm 3,9	37,9 \pm 3,2	28,4 \pm 4,7
Креатинкіназа	308,0 \pm 31,7	1093,8 \pm 107,9*	728,2 \pm 82,5*	319,8 \pm 38,9
Амілаза	544,1 \pm 42,5	478,2 \pm 37,3	498,6 \pm 59,6	657,2 \pm 56,1
Холінестераза	1308,3 \pm 124,3	986,6 \pm 29,3*	781,4 \pm 97,7*	832,5 \pm 83,1*

* – P 0,05.



3,6 разів у стані штучного гіпобіозу, однак через добу після виходу із цього стану повертається до рівня контролю (табл. 2). Це може відігравати адаптивну роль. Так, при виході тварин зі стану гіпобіозу (група 2) активність цього ферменту залишається підвищеною. При цьому у тварин спостерігається термогенез за рахунок скорочення м'язів (тремтіння), на який витрачається утворений креатинфосфат.

Стосовно кислій фосфатази та амілази, то їх активність у стані вуглекислотного гіпобіозу дещо падає, що характеризує зменшення інтенсивності обмінних процесів. Крім того, активність лактатдегідрогенази у стані штучного вуглекислотного гіпобіозу знижується в середньому на 28 %. Це узгоджується з підвищеним рівнем глюкози і може пояснюватися гальмуванням гліколітичних процесів.

Активність холінестерази в умовах гіпобіозу зменшується у середньому на 25 % відносно контролю і залишається такою після виходу з цього стану. Це може свідчити про зниження синтетичної активності печінки [6]. До того ж, фермент ацетілхолінестераза відіграє ключову роль у процесах нейрогуморальної та синаптичної передачі: у холінергічних синапсах каталізує гідроліз ацетилхоліну і тим самим припиняє вплив даного медіатора на холінорецептор, що відповідає за проникність постсинаптичної мембрани для йонів [18]. При інгібуванні ацетілхолінестерази порушується передача нервових імпульсів. Сироваткова

холінестераза виконує в організмі захисні функції і попереджає інактивацію ацетилхолінестерази. Таким чином, зниження активності холінестерази в сироватці крові може свідчити про інгібування активності ацетилхолінестерази [18]. Це може відігравати ключову роль при переході тварин у стан штучного вуглекислотного гіпобіозу, під час якого спостерігається відсутність активності скелетної мускулатури, зниження частоти серцевих скорочень і дихальних рухів.

Вміст таких макроелементів як кальцій та магній не зазнає вірогідних змін протягом дослідів (табл. 3). Рівень фосфору в крові щурів за умов штучного гіпобіозу зростає в 1,6 разів. Фосфор є незамінним елементом, який входить до складу таких високоенергетичних сполук, як АТФ, АДФ та інших. Виявлене зростання його вмісту збігається з даними попередніх досліджень [11] та встановленим зниженням синтезу АТФ у клітинах печінки та серця при гіпобіозі [12].

Висновки

При штучно створеному гіпобіозі спостерігаються зміни біохімічних показників крові подібні до тих, що відбуваються за впливу гіпотермії на організм тварин, однак відрізняються від таких за умов природної гібернації. Ймовірно ці зміни свідчать про адаптаційний характер до впливу факторів, які мають місце за умов штучного гіпобіозу – гіпотермії, гіперкапнії та гіпоксії.

Пристосування до негативного впливу діючих факторів характеризується вірогідним підвищенням у крові щурів

Таблиця 3. Вміст макроелементів (ммоль/л) у сироватці крові щурів за умов штучного гіпобіозу ($M \pm m$, $n=8$)

Показник	Контроль	Група 1	Група 2	Група 3
Фосфор	$2,85 \pm 0,33$	$4,59 \pm 0,63^{**}$	$3,34 \pm 0,36$	$2,61 \pm 0,29$
Кальцій	$2,57 \pm 0,15$	$2,50 \pm 0,19$	$2,46 \pm 0,25$	$2,52 \pm 0,18$
Магній	$0,91 \pm 0,05$	$1,11 \pm 0,10$	$0,98 \pm 0,06$	$0,89 \pm 0,03$

* – $P < 0,01$.

вмісту глюкози, сечовини, сечової кислоти та неорганічного фосфору, а також активності креатинкінази. Зазначені зміни елімінуються під час виходу

тварин зі стану штучного гіпобіозу та досягають контрольних значень через добу після нього.

Література

1. Мельничук С.Д., Мельничук Д.О. Гіпобіоз тварин (молекулярні механізми та практичне значення для сільського господарства і медицини): Монографія. — К.: Видавничий центр НАУ, 2007. — 220 с.
2. Мельничук Д.О., Мельничук С.Д., Арнаута О.В. Влияние углекислотной среды на сохранность эритроцитов в консервированной крови животных // Научный вестник НАУ. — 2004. — № 75. — С. 163–165.
3. Эмирбеков Э.З., Львова С.П. Механизмы биохимических изменений при низких температурах тела. — Ростов.: Изд-во Рост. ун-та, 1985. — 80 с.
4. Калабухов Н.И. Спячка млекопитающих. — М.: Наука, 1985. — 210 с.
5. Медведев В.В., Волчок Ю.З. Клиническая лабораторная диагностика: Справочник для врачей / Под. ред. В.А Яковлева. — СПб.: Гиппократ, 1995. — 208 с.
6. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. — М.: Медицина, 2002. — С. 535–544.
7. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. — М.: "МЕДпресс-информ" — 2004. — С. 524–526.
8. 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.
9. Мельничук С.Д. Основні показники кислотно-основного стану крові та обмінних процесів у разі гіпобіозу та загальної анестезії за ампутації кінцівки // Укр. біохім. журн. — 2001. — 73, № 6. — С. 80–83.
10. Гершеневич З.С., Кричевская А.А., Шугалей В.С. Роль мочевины в мозге // Науч. сообщ. за 1964 год. — Ростов, 1965. — С. 215–216.
11. Мельничук С.Д., Вихованець В.І. Вплив умов штучного гіпобіозу на енергетичний обмін у щурів // Укр. біохім. журнал. — 2005. — 11, №3. — С. 131–135.
12. Мельничук С.Д., Морозова В.С., Хижняк С.В., Войціцький В.М. Показники дихання і фосфорилування мітохондрій гепатоцитів щурів за умов штучного гіпобіозу // Біологія тварин. — 2012. — 14, № 1–2. — С. 155–161.
13. Игнатьев Д.А., Сухова Г.С., Ляшков А.Е. Температурные и кардиотропные эффекты пептидов киоторфина и неокиоторфина в опытах на зимоспящих и незимоспящих животных // Успехи физиологических наук. — 2009. — 40, № 3. — С. 68–88.
14. Ашмарин И.П., Сосулина Л.Ю., Сухова Г.С., Кузьмин В.С. АДФ-рибоза и цАДФ-рибоза эндогенные регуляторы клеточного ионного баланса кардиотропное действие АДФ-рибозы // Успехи физиологических наук. — 2006. — № 1. — С. 3–17.
15. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения: Руководство для врачей. — 3-е изд., перераб. и доп. — СПб.: Питер Ком, 1999. — 512 с.
16. Долгов В.В. Лабораторная диагностика нарушений обмена липидов. — М.: Медицина, 2001. — 218 с.
17. Скіяров О.Я. Біохімічний склад рідин організму та їх клітинно-діагностичне значення. — К.: Здоров'я, 2004. — 188 с.
18. Старостина В.К., Дёгтева С.А. Холинэстераза: методы анализа и диагностическое значение. — Новосибирск: Вектор Бест, 2008. — 35 с.



АННОТАЦІЯ

Мельничук С.Д., Хижняк С.В., Морозова В.С., Бойко В.В., Бабич Л.В., Войціцький В.М., *Биохимические показатели крови крыс в условиях искусственного гипобииоза // Биоресурсы и природопользование. – 2013. – 5, № 3-4. – С. 5-11.*

Изучены биохимические показатели сыворотки крови крыс в условиях искусственного гипобииоза и в динамике выхода из этого состояния. Выявлены особенности реакции-ответа животных на воздействие факторов углекислотного искусственного гипобииоза (гипотермии, гиперкапнии и гипоксии), которые проявляются в повышении содержания глюкозы, мочевины, мочевой кислоты и неорганического фосфора, а также росте активности креатинкиназы. Указанные изменения элиминируются при выходе животных из состояния гипобииоза и достигают контрольных значений через 24 часа после выхода из него.

SUMMARY

S. Melnychuk, S. Khyzhniak, V. Morozova, V. Boiko, L. Babych, V. Voitsytskyi. *The biochemical indicators of rats blood under the artificial hypobiosis // Biological Resources and Nature Management. – 2013. – 5, № 3-4. – P. 5-11.*

The biochemical indicators of rats' blood serum were determined under the artificial hypobiosis and in the dynamics of the release from this state. The peculiarities of animals' reaction-response to the influence of the factors of the artificial carbon dioxide hypobiosis (such as hypothermia, hypercapnia and hypoxia) were revealed. These peculiarities result in the increase of the level of glucose, urea, uric acid, inorganic phosphorus and the creatine kinase activity. These changes are eliminated when the animals recover from the state of artificial hypobiosis and achieve control values in 24 hours after the animals recovery from this state.