

УДК 612.82:615.832.9:612.015.13:577.151.042

Л.М. Самохина^{2*}, В.В. Ломако¹

Активность химазы, тонина и кальпаинов в тканях крыс при умеренной краниocereбральной гипотермии

UDC 612.82:615.832.9:612.015.13:577.151.042

L.M. Samokhina^{2*}, V.V. Lomako¹

Activity of Chymase, Tonin and Calpains in Rat Tissues Under Moderate Craniocerebral Hypothermia

Реферат: Изучали влияние умеренного режима (32°C) краниocereбральной гипотермии (КЦГ) на активность специфических протеиназ химазы, тонина и кальпаинов в тканях крыс. Активность энзимов определяли в сыворотке крови, тканях структур центральной нервной системы (кора мозга, гипоталамус, ствол мозга, мозжечок) и внутренних органов (сердце, печень, легкие, почки) животных. Выявлено, что проводимая на фоне наркоза КЦГ (32°C) способствует резкому ингибированию активности химазы и, особенно, тонина (на 3–5 порядков) на фоне значительной активации кальпаинов (в 10–50 раз) во всех образцах, кроме сыворотки крови для кальпаинов (не изменялась). При КЦГ (32°C) по сравнению с контролем отмечены более значительные изменения в гипоталамусе, мозжечке и печени (для химазы), в мозжечке и печени (для кальпаинов), а по сравнению с действием наркоза – в мозжечке, легких, сердце и почках (для тонина), а также в гипоталамусе и мозжечке (для кальпаинов).

Ключевые слова: краниocereбральная гипотермия, химаза, тонин, кальпаины, крысы.

Реферат: Вивчали вплив помірного режиму (32°C) краниocereбральної гіпотермії (КЦГ) на активність специфічних протеїназ хімази, тоніну і кальпаїнів у тканинах щурів. Активність ензимів визначали в сироватці крові, тканинах структур центральної нервової системи (кора мозку, гіпоталамус, стовбур мозку, мозочок) і внутрішніх органів (серце, печінка, легені, нирки) тварин. Виявлено, що КЦГ (32°C), яка проводилася на фоні наркозу, сприяє різкому пригніченню активності хімази і, особливо, тоніну (на 3–5 порядків), яке відбувається на тлі значної активації кальпаїнів (в 10–50 разів) в усіх зразках, окрім сироватки крові для кальпаїнів (не змінювалася). При КЦГ (32°C) у порівнянні з контролем відзначено більш значущі зміни в гіпоталамусі, мозочку і печінці (для хімази), в мозочку і печінці (для кальпаїнів), а в порівнянні з впливом наркозу – в тканинах мозочка, легенів, серця і нирок (для тоніна), а також у гіпоталамусі та мозочку (для кальпаїнів).

Ключові слова: краниocereбральна гіпотермія, хімаза, тонін, кальпаїни, щури.

Abstract: The effect of moderate (32°C) craniocerebral hypothermia (CCH) on the activity of specific proteases such as chymase, tonin and calpains was studied. The proteases activity was determined in the blood serum, tissues of the central nervous system structures (cortex, hypothalamus, brain stem, cerebellum) and internal organs (heart, liver, lungs, kidneys) in animals. It has been revealed that the moderate CCH performed together with anesthesia promotes a sharp suppression of chymase and especially tonin activities (by 3–5 orders), accompanied with significant increase (in 10–50 times) of calpains activity. In comparison to the control the CCH led to more significant changes were found in hypothalamus, cerebellum and liver (for chymase), in the cerebellum and liver (for calpains), and if compared with the action of anesthesia the differences were present in the cerebellum, lungs, heart and kidneys (for tonin), in hypothalamus and cerebellum (for calpains).

Key words: craniocerebral hypothermia, chymase, tonin, calpains, rats.

В последнее время возобновился интерес к методу краниocereбральной гипотермии (КЦГ), который имеет ряд неоспоримых преимуществ перед общим охлаждением [19, 21]. Данный метод позволяет при форсированном охлаждении поверхности головы (когда преимущественно охлаждаются наименее устойчивые к гипоксии церебральные структуры, в первую очередь неокортекс) сохранить достаточно высокую температуру тела (ТТ) (в том числе сердца) и практически полностью

Recently an interest to the method of craniocerebral hypothermia (CCH), having numerous undeniable advantages over general cooling [3, 5], was renewed. In case of forced cooling of head surface (predominant cooling of the least resistant to hypoxia cerebral structures, especially the neocortex) this method allows to maintain reasonably high body temperature (BT) (including that of heart) and mostly eliminate the risk of ventricular fibrillation. According to the Guidelines of the European Council for Resuscitation, the

¹Отдел криофизиологии, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Лаборатория иммуно-биохимических и молекулярно-генетических исследований, ГУ «Национальный институт терапии имени Л.Т. Малой» НАМН Украины, г. Харьков

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: проспект Любви Малой, 2А, г. Харьков, Украина 61039; тел.: (+38 057) 373-20-24, факс: (+38 057) 373-37-37, электронная почта: lub.samokhina@gmail.com

Поступила 01.06.2017

Принята в печать 28.07.2017

¹Department of Cryophysiology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

²SE National Institute of Therapy of the L.T. Malaya name of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

*To whom correspondence should be addressed: 2A Lyubov Malaya ave., Kharkiv, Ukraine 61039; tel.: +380 57 373 2024, fax: +380 57 373 3737, e-mail: lub.samokhina@gmail.com

Received May, 01, 2017

Accepted June, 28, 2017

исключить опасность возникновения фибрилляции желудочков. Согласно методическим рекомендациям Европейского совета по реанимации, Американской ассоциации кардиологов и Ассоциации нейрохирургов России уровни терапевтической гипотермии находятся в диапазоне понижения ТТ (35...32°C), поскольку более низкий уровень базальной ТТ может вызывать развитие ряда опасных осложнений (кардиоваскулярная депрессия, фибрилляция и асистолия сердца, нарушение электролитного баланса, дисфункция печени и почек, снижение свертываемости крови и др.) [4].

К настоящему времени установлено несколько основных механизмов действия лечебной гипотермии: защита от гипоксии, являющейся постоянным компонентом большинства патологических процессов в организме; снижение уровня метаболизма в охлажденных тканях и уменьшение потребления энергии клетками путем их погружения в состояние «гибернации»; перераспределение энергоресурсов для реализации только жизненно важных процессов; обеспечение баланса в антиоксидантной системе и поддержание метаболического гомеостаза клетки. Все эти процессы способствуют восстановлению осмотического ионного градиента и устранению отека-набухания тканей центральной нервной системы (ЦНС). Нейропротекторная эффективность умеренной гипотермии определяется большими компенсаторными возможностями мозга и его пластичностью [37]. Проведение КЦГ способствует подавлению множественных механизмов вторичного повреждения, включая эксайтотоксичность, генерирование свободных радикалов, воспаление и апоптотическую гибель клеток.

В реализации защитных реакций организма участвуют протеолитические энзимы, или протеиназы, которые могут участвовать в посттрансляционных модификациях протеинов, изменении локализации внутриклеточных пептидов и активности других энзимов, а также в возникновении и развитии ряда патологических состояний, в частности заболеваний центральной нервной и сердечно-сосудистой систем. Особая роль в этих процессах принадлежит протеиназам ренин-ангиотензиновой системы (химаза, тонин и др.), которые участвуют в образовании ангиотензина II (АII), регуляции кровяного давления и способствуют прогрессированию сердечно-сосудистого ремоделирования [24, 38]. Химаза – (EC 3.4.21.39) является наиболее специфическим тканевым АII-образующим энзимом независимого от ангиотензин-превращающего энзима пути образования АII из ангиотензина I (AI) [25]. Химаза видоспецифичный энзим. В отличие от человека, приматов, собак и хомяков, у крыс и мышей она является ангиотенгиназой, поскольку гид-

American Heart Association and the Association of Neurosurgeons of Russia, the admissible BT range for therapeutic hypothermia are within 35...32°C, whereas a lower level of basal BT can cause a number of dangerous complications (cardiovascular depression, fibrillation and heart asystole, violation of electrolyte balance, dysfunction of liver and kidneys, decreased coagulability of blood, *etc.*) [17].

By now, several basic mechanisms of therapeutic hypothermia impact have been discovered: protection against hypoxia, being a constant component of the majority of pathological processes in the body; reduction in the level of metabolism in cooled tissues and a decrease in energy consumption by cells due to their hibernation; redistribution of energy resources for performance of only vitally important processes, ensuring a balance in antioxidant system and maintaining the metabolic homeostasis of the cell. All these processes contribute to restoration of the osmotic ion gradient and elimination of edema-swelling of central nervous system (CNS) tissues. Neuroprotective efficacy of moderate hypothermia is determined by the large compensatory capacity of the brain and its plasticity [37]. CCH contributes to suppression of diverse mechanisms of secondary damage, including excitotoxicity, generation of free radicals, inflammation and apoptosis of cell.

Proteolytic enzymes or proteinases participate in implementation of protective responses of the body, as well as in post-translational modifications of proteins, change in localization of intracellular peptides and activity of other enzymes, and in development of a number of pathological conditions, in particular, diseases of the central nervous and cardiovascular systems. A special role in these processes belongs to proteinases of renin-angiotensin system (chymase, tonin, *etc.*) participating in formation of angiotensin II (AII), regulation of blood pressure and promoting the progression of cardiovascular remodeling [9, 38]. Chymase (EC 3.4.21.39) is the most specific tissue AII-forming enzyme of independent from angiotensin-converting enzyme pathway of AII formation from angiotensin I (AI)[9]. Chymase is a species-specific enzyme. Unlike humans, primates, dogs and hamsters the chymase of rats and mice is an angiotensinase, because it hydrolyzes the Tyr4-Ile5 bond in AII, and forms AII only at high AI concentrations [14, 33]. Tonin (EC 3.4.21.35) forms AII both from AI and directly from angiotensinogen [6].

It is known that hypothermia leads to reduction of both the amount of damaged neural tissue and the number of neurons died via necrosis and apoptosis [18]. The activation and progression of apoptotic processes during neurodegeneration can be caused by an abnormal activity of Ca²⁺-dependent cysteine enzymes, *i. e.* calpains (EC 3.4.22.17) [10, 11, 42]. Calpains parti-



ролизует связь Tug4-Ile5 в АП, образует АП только при высоких концентрациях АІ [29, 35]. Тонин (ЕС 3.4.21.35) образует АП как из АІ, так и непосредственно из ангиотензиногена [22].

Известно, что в условиях гипотермии уменьшается объем повреждения нервной ткани и количество погибших нейронов как по некробиотическому типу, так и путем апоптоза [30]. Активацию и прогрессирование апоптотических процессов при нейродегенерации может вызывать аномальная активность Ca^{2+} -зависимых цистеиновых энзимов – кальпаинов (ЕС 3.4.22.17) [25, 26, 42]. Кальпаины участвуют во многих биологических процессах [15, 25], включаются в адаптацию клеточного метаболизма к изменяющимся условиям окружающей среды [9]. Они принимают участие в базовых Ca^{2+} -зависимых клеточных процессах – передаче сигналов, клеточном цикле, пролиферации, дифференцировке, апоптозе, слиянии мембран, формировании мышечных волокон и др. [15]. При угнетении активности кальпаинов происходят торможение развития дисфункции эндотелия, сердечно-сосудистых осложнений, формирование структурных и функциональных изменений в тканях, а также отмечается нейропротекторный эффект [7, 8, 10, 15].

Ранее было показано [6], что умеренный режим КЦГ (32°C) способствует резкой активации реакций ограниченного протеолиза в сыворотке крови, тканях ЦНС (кора мозга, гипоталамус, мозжечок) и внутренних органов (сердце, легкие, печень и почки). При этом общая протеолитическая активность повышается на один-два порядка, а активность нетрипсиноподобных протеиназ (суммарная активность химотрипсина, химазы, частично тонина и других энзимов) увеличивается в разы во всех исследуемых тканях [6]. Однако вклад отдельных специфических энзимов, в частности химазы, тонина и кальпаинов, в процесс активации протеолиза при КЦГ не изучен. Исследование активности указанных энзимов поможет расшифровке механизмов развития и выяснению особенностей взаимосвязи вазоконстрикторных и апоптогенных изменений в гомеотермном организме при КЦГ.

Цель работы – изучить активность химазы, тонина и кальпаинов в сыворотке крови, тканях структур ЦНС и внутренних органов крыс при умеренном режиме краниocereбральной гипотермии (32°C).

Материалы и методы

Эксперименты проведены в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными VI Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2016) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позво-

ципировать в широком диапазоне биологических процессов [10, 35], они участвуют в адаптации клеточного метаболизма к изменяющимся условиям окружающей среды [25]. Они участвуют в базовых Ca^{2+} -зависимых клеточных процессах, таких как сигнализация, клеточный цикл, пролиферация, дифференциация, апоптоз, слияние мембран, формирование мышечных волокон, *etc.* [35]. Ингибирование активности кальпаинов сопровождается подавлением развития эндотелиальной дисфункции, сердечно-сосудистых осложнений, и формирования структурных и функциональных изменений в тканях, а также появления нейропротекторного эффекта [21, 22, 26, 35].

Было ранее показано [20], что умеренный режим КЦГ (32°C) способствует резкой активации реакций ограниченного протеолиза в сыворотке крови, тканях ЦНС (кора мозга, гипоталамус, мозжечок) и внутренних органах (сердце, легкие, печень и почки). Здесь общая протеолитическая активность возросла в один-два порядка, а активность нетрипсиноподобных протеиназ (суммарная активность химотрипсина, химазы, частично тонина и других энзимов) была увеличена в несколько раз во всех исследуемых тканях [20]. Несмотря на это, вклад отдельных энзимов, в частности, химазы, тонина и кальпаинов, в процесс активации протеолиза при КЦГ не изучен. Исследование активности этих энзимов поможет определить механизмы развития и выяснить, как взаимодействуют вазоконстрикторные и апоптогенные изменения в гомеотермном организме при КЦГ.

Целью исследования было изучение активности химазы, тонина и кальпаинов в сыворотке крови, тканях ЦНС и внутренних органах крыс при умеренном режиме краниocereбральной гипотермии (32°C).

Materials and methods

The experiments were carried out in accordance with the General Principles of Experiments in Animals, approved by the 6th National Congress in Bioethics (Kiev, 2016) and agreed with the statements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

The research was performed in 6–7-month-old male outbred albino rats which were kept before the experiment at the animal facilities with natural day/night cycle and a standard diet *ad libitum*. Before the CCH the animals were anesthetized (mixture of sodium thiopental (PAT Arterium, Ukraine) and sodium hydroxybutyrate (ISC Farmak, Ukraine) in the amount of 30 and 100 mg per kg of animal mass, correspondingly) to provide the neurovegetative blockade and suppress the specific responses to cold (such as muscle tremor and vasoconstriction). The controlled CCH was performed by means of the unit for programmable cooling (produced by the Special Constructing



ночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Работу выполняли на 6–7-месячных самцах белых беспородных крыс, которые до начала эксперимента содержались в условиях вивария при естественном световом режиме на стандартном рационе *ad libitum*.

Перед сеансом КЦГ для проведения нейровегетативной блокады и подавления специфических реакций организма на холод (в частности мышечной дрожи и вазоконстрикции) животных наркотизировали (смесь тиопентала натрия (Корпорация «Артериум», Украина) и оксибутирата натрия (ПАО «Фармак», Украина) из расчета 30 и 100 мг/кг массы соответственно). Управляемую КЦГ проводили на установке для программного охлаждения (производство СКТБ с ОП Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины [17]) в течение (60 ± 10) мин до достижения ректальной температуры (32°C) (умеренный режим гипотермии), которую измеряли электронным термометром.

Животных распределили на три группы ($n = 5$ в каждой): 1 – контроль (интактные крысы); 2 – действие наркоза; 3 – проведение КЦГ до уровня ректальной температуры (32°C). Забор биологического материала для анализа производили после декапитации животных.

Кровь собирали в пробирки, отстаивали 10 мин в условиях комнатной температуры и центрифугировали 15 мин при 5 000g на «MPW-331» («Mechanika Precyzyjna», Польша). Печень перфузировали охлажденным физиологическим раствором. Образцы тканей (по 300 мг) коры мозга, гипоталамуса, мозжечка, ствола мозга, легких, сердца, печени и почек промывали охлажденным физиологическим раствором и гомогенизировали в 3 мл Na-фосфатного буфера pH 7,4 при 4–6°C, затем центрифугировали 10 мин при 5 000g на «PC6» («Dastan», Казахстан) при 4°C. Пробы сыворотки крови и аликвоты 10%-х гомогенатов тканей до проведения анализа хранили при –20°C.

В сыворотке крови и безъядерных фракциях гомогенатов тканей определяли активность химазы, тонины и кальпаинов высокочувствительными энзиматическими методами, разработанными в ГУ «Национальный институт терапии имени Л.Т. Малой НАМН Украины». Применяемые в работе методы основаны на расщеплении иммобилизованного на поверхности полистирола комплекса маркерного энзима (пероксидазы хрена) и протеинового субстрата [18]. В результате протеолитической реакции происходят расщепление и десорбция субстрата с поверхности полистирола вместе с молекулами связанного с ним маркерного энзима. Для оценки активности химазы в качестве субст-

and Technical Bureau with Experimental Unit of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine [16]) during (60 ± 10) min till reaching the rectal temperature to 32°C (moderate hypothermic regimen), measured with an electronic thermometer.

The animals were divided into three groups ($n = 5$ in each): 1 – control (intact rats); 2 – anesthesia effect; 3 – CCH performance up to reaching the rectal temperature to 32°C. Biological samples were collected after animal decapitation.

Blood was collected into tubes, left for 10 min at room temperature and centrifuged for 15 min at 5,000g with MPW-331 device (Mechanika Precyzyjna, Poland). The liver was perfused with a cold physiological saline. Tissue samples (300 mg) of cortex, hypothalamus, cerebellum, brain stem, lung, heart, liver and kidneys were washed with cold physiological saline and homogenized in 3 ml of Na-phosphate buffer pH 7.4 at 4...6°C, then centrifuged for 10 min at 5,000g with PC-6 device (Dastan, Kazakhstan) at 4°C. The samples of blood serum and tissue homogenate aliquots were stored at –20°C prior to the analysis.

Blood serum and nucleus-free fractions of homogenates were used to study the activity of chymase, tonin and calpains by highly sensitive enzymatic methods developed at the SE National Institute of Therapy of the L.T. Malaya name of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine. The used methods are based on cleavage of the complex of marker enzyme (horseradish peroxidase) and the protein substrate immobilized on the polystyrene surface [27]. The proteolytic reaction results in the cleavage and desorption of the substrate from the polystyrene surface together with molecules of marker enzyme bound with it. To evaluate the activity of chymase we have used the 3–8 AII fragment (ICN, USA) as the substrate, for tonin we have used protamine sulfate (ICN) and bovine serum albumin (ICN) for calpains. Before the assessment of chymase activity we performed the suppression of trypsin, plasmin, serum kallikrein, tonin (has both trypsin- and chymotrypsin-like activities) by introducing 1:1 v/v soybean trypsin inhibitor (STI) solution with 0.01 µg/ml concentration and incubated for 5 min at 37°C. To determine the activity of tonin, the kallikrein-like enzymes were preliminarily inhibited by adding 1:1 v/v aprotinin (ICN) (20 µg/ml) and incubated for 5 min at 37°C. The activity of calpains was determined as the difference between the activity of proteinases mixed with CaCl₂ and cysteine (Reachim, Ukraine) to obtain final concentrations of 5 mM and activity of proteinases supplemented with ethylenediaminetetraacetate (Reachim, Ukraine) until a final concentration of 10 mM. Calpains' activity was assessed by proteolytic reaction: the samples were placed on polystyrene plates (KIMA, Italy) with immobilized horseradish peroxidase (ICN) and



рата использовали фрагмент 3-8 АП («ICN», США), тонина – протаминасульфат («ICN»), кальпаинов – бычий сывороточный альбумин («ICN»). Перед анализом активности химазы предварительно отдельно проводили реакцию подавления трипсина, плазмина, сывороточного калликреина, тонина (обладает трипсин- и химотрипсин-подобной активностью) добавлением 1:1 по объему соевого ингибитора трипсина («ICN») в концентрации 0,01 мкг/мл и инкубировали 5 мин при 37°C. Для определения активности тонина предварительно ингибировали калликреин-подобные энзимы добавлением 1:1 по объему апротинина («ICN») (20 мкг/мл) и инкубировали 5 мин при 37°C. Активность кальпаинов определяли как разницу между активностью протеиназ добавлением CaCl₂ и цистеина («Реахим», Украина) до получения конечных концентраций 5 мМ и активностью протеиназ с добавлением этилендиаминтетраацетата («Реахим», Украина) до получения конечной концентрации 10 мМ. Активность кальпаинов оценивали по протеолитической реакции: образцы вносили в лунки полистироловых планшетов («КИМА», Италия) с иммобилизованным комплексом пероксидазы хрена («ICN») и альбумина сыворотки быка в параллелях. Затем к одной из параллелей добавляли CaCl₂ и цистеин, ко второй – этилендиаминтетраацетат (активность кальпаинов оценивали по разнице показателей). В качестве контроля использовали растворы трипсина («Spofa», Чехия). Далее проводили реакцию расщепления иммобилизованного энзим-субстратного комплекса. Активность химазы, тонина и кальпаинов рассчитывали по изменению активности маркерного энзима – пероксидазы хрена в реакции с ортофенилендиамином («Реахим», Украина). Активность химазы и тонина выражали в $E \times 10^{-3}$ или наномолях субстрата в минуту, кальпаинов – в миллиграммах на литр трипсина в час.

Оптическую плотность образцов измеряли на фотометре-анализаторе иммуноферментном «Humanreader» («Human», Германия).

Статистическую обработку данных проводили методом Стьюдента-Фишера с использованием программного обеспечения «Excel» («Microsoft», США).

Результаты и обсуждение

Действие умеренного режима КЦГ (32°C) способствовало резкому ингибированию по сравнению с контролем (на 3–5 порядков) активности химазы и особенно тонина во всех изученных образцах тканей (табл. 1, 2). Более значительное снижение активности химазы ($p_{к\Box} \leq 0,01$) отмечено в гипоталамусе, мозжечке, а также печени – органе, в котором аккумулируются тучные клетки, высво-

bovine serum albumin complex in parallel wells. Then, CaCl₂ and cysteine were added to one of the parallels, and ethylenediaminetetraacetate was added to the second one (the activity of calpains was estimated by the difference in indices). Trypsin solutions were used as a control (Spofa, Czech Republic). Thereafter the cleavage of immobilized enzyme substrate complex was performed. The activity of chymase, tonin and calpains was calculated from the change in the activity of marker enzyme – horseradish peroxidase in reaction with orthopheny-lenediamine (Reachim, Ukraine). The activity of chymase and tonin was expressed in $E \times 10^{-3}$ or nanomoles of substrate per minute, the index for calpains was calculated in milligrams per liter of trypsin per hour.

The optical density of the samples was measured with photometer Immunoassay Analyzer Humanreader (Human, Germany).

The data were statistically processed by Student-Fisher test using the Excel software (Microsoft, USA).

Results and discussion

The effect of a moderate CCH regimen of 32°C contributed to a sharp inhibition in comparison with the control of the activity of chymase and especially tonin in all the studied tissue samples (by 3–5 orders) (Tables 1, 2). A more significant decrease in chymase activity ($p_k < 0.01$) was observed in the hypothalamus, cerebellum, and also in liver, the organ within which the chymase releasing the mast cells is accumulated (Table 1). Compared with anesthesia CCH resulted (group 2) in a less significant decrease in tonin activity in the tissues of cerebellum, lungs, heart and kidneys (Table 2). Herewith, an increase in calpains activity (in 10–50 times) was revealed in all the samples, except blood serum (it was unchanged) (Table 3). The most pronounced increase in calpains activity at CCH was observed in liver and cerebellum, in case of anesthesia *per se* it was found in the tissues of hypothalamus, cerebellum and liver (Table 3). It should be noted that the CCH contributed to the least increase of calpains activity in hypothalamus and cerebellum if compared with anesthesia.

The reduction of chymase and tonin activity indicates a decrease in formation of vasoconstrictor peptide, AII from AI and/or angiotensinogen in tissues [6, 9, 14, 33]. It is known that anesthesia suppresses the body specific responses to cold, in particular vasoconstriction. Hypothermia can be accompanied with increase in the level of neuropeptides and a simultaneous decrease in activity of specific proteinases, in particular mast cell chymase [12]. Normally, chymase is not secreted and it is stored inside intracellular granules of mast cells, and its release requires an activation and degranulation of mast cells. Chymase activity is affected by oxidative stress, inflammatory processes,



бождающие химазу (см. табл. 1). В результате проведения КЦГ по сравнению с действием наркоза (группа 2) отмечено менее существенное снижение активности тонина в тканях мозжечка, легких, сердца и почек (см. табл. 2). При этом выявлено повышение активности кальпаинов (в 10–50 раз) во всех образцах, кроме сыворотки крови (не изменялась) (табл. 3). Наиболее выраженное увеличение активности кальпаинов при КЦГ отмечено в печени и мозжечке, а в результате действия наркоза – в тканях гипоталамуса, мозжечка и печени (табл. 3). Следует отметить, что КЦГ по сравнению с действием наркоза способствовала меньшему повышению активности кальпаинов в гипоталамусе и мозжечке.

Снижение активности химазы и тонина указывает на уменьшение образования вазоконстрикторного пептида АП из АІ и/или ангиотензиногена в тканях [22, 25, 29, 35]. Известно, что наркоз подавляет специфические реакции организма на холод, в частности вазоконстрикцию. В условиях гипотермии может повышаться уровень нейропептидов при одновременном снижении активности специфических протеиназ, в частности химазы тучных клеток [27]. В норме химаза не секретируется и содержится во внутриклеточных гранулах тучных клеток, для ее выброса необходима активация и дегрануляция тучных клеток. На активность химазы влияют оксидативный стресс, воспалительные процессы, гипоксия и ишемия миокарда, способствующие дегрануляции тучных клеток. Показано, что развивающийся в условиях гипотермии оксидативный стресс приводит к увеличению в тканях количества тучных клеток, которые также участвуют в регуляции регенеративных процессов [2].

Следует отметить, что химаза имеет три pH-зависимые формы: низкую – каталитически неактивную, нейтральную – с нормальной активностью и высокую – с повышенной каталитической активностью [33]. После 3-часовой холодовой экспозиции при 4°C активность химазы в тканях крыс также снижается [13], как и при умеренной КЦГ (32°C) (см. табл. 1), что может указывать на переход энзима в каталитически неактивную pH-зависимую форму. При гипотермии развивается метаболический ацидоз (pH сдвигается в кислую сторону) [40], что может быть причиной отмеченного при КЦГ резкого снижения активности не только химазы, но и тонина (см. табл. 1 и 2), пос-

Таблица 1. Активность химазы ($E \times 10^{-3}$) в тканях крыс при краниocereбральной гипотермии 32°C ($M \pm m$)

Table 1. Chymase activity ($E \times 10^{-3}$) in rat tissues under craniocerebral hypothermia of 32°C ($M \pm m$)

Образцы тканей Tissue samples	Контроль Control	Наркоз Anesthesia	КЦГ CCH
Кора мозга Cortex	16,048 ± 5,524	0,020 ± 0,005 ²	0,022 ± 0,007 ²
Гипоталамус Hypothalamus	23,863 ± 4,728	0,023 ± 0,006 ²	0,024 ± 0,008 ¹
Мозжечок Cerebellum	15,828 ± 4,592	0,020 ± 0,005 ²	0,019 ± 0,008 ¹
Стол мозга Brain stem	21,461 ± 5,608	0,017 ± 0,004 ¹	0,030 ± 0,006 ²
Сыворотка крови Blood serum	1,766 ± 0,611	0,006 ± 0,001 ²	0,004 ± 0,001 ²
Легкие Lungs	19,130 ± 6,479	0,008 ± 0,002 ²	0,014 ± 0,003 ²
Сердце Heart	17,499 ± 8,370	0,012 ± 0,003 ²	0,035 ± 0,007 ³
Печень Liver	16,565 ± 4,205	0,036 ± 0,004 ²	0,033 ± 0,008 ¹
Почки Kidneys	12,138 ± 4,784	0,012 ± 0,003 ²	0,021 ± 0,008 ³

Примечание: ^{1, 2, 3} – различия значимы по сравнению с контролем $p < 0,01$, $p < 0,05$, $p < 0,1$ соответственно.

Note: ^{1, 2, 3} – differences are statistically significant if compared with control $p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.1$, respectively.

hypoxia and myocardial ischemia, which contribute to degranulation of mast cells. It is shown that oxidative stress developing under hypothermia conditions promotes an increase in tissues of mast cells' number participating in regulation of regenerative processes as well [2].

It should be noted that chymase has three pH-dependent forms: low pH is catalytically inactive, neutral one possess normal activity and high pH dependent has an increased catalytic activity [32]. After 3 hours of cold exposure at 4°C, the chymase activity in rat tissues is also reduced [30], like during moderate CCH (32°C) (Table 1), that may indicate the transition of enzyme to catalytically inactive pH-form. Hypothermia is followed by metabolic acidosis (acidic shift of pH) [40], that may be the reason for a sharp decrease in the activity of not only chymase, but also tonin (Tables 1, 2) observed under CCH, because the optimal pH value for their activity is 8.5 [39].

It should be noted that optimal carrying-out of CCH is accompanied by a simultaneous decrease of BT, heart rate and blood pressure [20, 40]. Tissue kallikreins are powerful modulators of blood pressure and their

кольку значение рН для проявления их активности составляет 8,5 [39].

Следует отметить, что при оптимальном проведении КЦГ одновременно снижаются ТТ, сердечный ритм и артериальное давление [6, 40]. Мощным модулятором кровяного давления являются тканевые калликреины, содержание которых увеличивается при хронической гипотензии [41]. Тканевые калликреины – кислые гликопротеины, включающиеся также в процессы адаптации и защиты. При рН 8,0–9,0 действуют кининогеназы, генерирующие кинины, а при рН 3,5–4,5 – тканевые калликреины. Таким образом, КЦГ, сопровождающаяся гипотензией, может способствовать переключению энзимной кинин-ангиотензиновой системы на вазодепрессорную функцию.

Необходимо отметить, что происходящая при КЦГ (32°C) значительная активация нетрипсина-подобных протеиназ (в разы) [6], отмечаемая на фоне ингибирования активности химазы и тонина (см. табл. 1 и 2), очевидно, связана с проявлением активности других энзимов. Известно, что кроме тонина (крысиного калликреина rK_2) в тканях крыс находится и rK_9 [10], который в образовании АП почти в 100 раз менее активен, чем rK_2 . Оптимальный рН для rK_2 составляет 6,2, а для rK_9 – 6,85, вероятно, на фоне снижения активности химазы и тонина при КЦГ в поддержании вазодинамической функции может участвовать rK_9 .

Нами была выявлена обратная корреляция в изменениях активности химазы и кальпаинов при КЦГ: повышение активности кальпаинов наиболее выражено в тканях мозжечка (в 40 раз) и печени (в 50 раз) на фоне значительного снижения активности химазы (см. табл. 1, 3). Повышение активности кальпаинов указывает на активацию апоптогенных процессов и увеличение количества разрушенных клеток, при этом в поврежденных клетках химазы проявляет протеолитическую активность сразу же после освобождения из гранул [38]. Ее низкая активность обусловлена, вероятнее всего, глубиной (ТТ 32°C) и длительностью гипотермии (60 ± 10) мин.

Наблюдаемое повышение активности кальпаинов при КЦГ (32°C) во всех исследуемых образцах (кроме сыворотки крови) согласуется с полученными ранее данными, касающимися увеличения общей протеолитической активности [6]. При этом

Таблица 2. Активность тонина ($E \times 10^{-3}$) в тканях крыс при краниocereбральной гипотермии 32°C ($M \pm m$)

Table 2. Tonin activity ($E \times 10^{-3}$) in rat tissues under craniocerebral hypothermia of 32°C ($M \pm m$)

Образцы тканей Tissue samples	Контроль Control	Наркоз Anesthesia	КЦГ CCH
Кора мозга Cortex	6,103 ± 1,775	0 ¹	0,005 ± 0,002 ²
Гипоталамус Hypothalamus	8,320 ± 1,767	0,004 ± 0,001 ³	0,005 ± 0,002 ²
Мозжечок Cerebellum	6,974 ± 2,303	0 ¹	0,009 ± 0,002 ^{2, #}
Ствол мозга Brain stem	1,951 ± 0,857	0,002 ± 0,001 ¹	0,006 ± 0,002 ³
Сыворотка крови Blood serum	12,989 ± 1,154	0,003 ± 0,001 ¹	0,007 ± 0,001 ¹
Легкие Lungs	8,819 ± 1,757	0 ¹	0,008 ± 0,003 ^{1, #}
Сердце Heart	11,127 ± 2,016	0 ¹	0,009 ± 0,003 ^{1, #}
Печень Liver	12,285 ± 2,286	0,005 ± 0,002 ¹	0,011 ± 0,003 ¹
Почки Kidneys	12,408 ± 1,251	0 ¹	0,009 ± 0,002 ^{1, &}

Примечание: ^{1, 2, 3} – различия значимы по сравнению с контролем $p < 0,01$, $p < 0,05$, $p < 0,1$ соответственно; ^{#, &} – различия значимы по сравнению с действием наркоза $p < 0,1$, $p < 0,05$ соответственно.

Note: ^{1, 2, 3} – differences are statistically significant if compared with the control $p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.1$, respectively; ^{#, &} – differences are statistically significant if compared with anesthesia effect $p < 0.1$, $p < 0.05$, respectively.

content increases under chronic hypotension [41]. Tissue kallikreins are acidic glycoproteins, which are also involved into adaptation and protection processes. At pH 8.0–9.0, the kinin generating kininogenases are active, and at pH 3.5–4.5 do the tissue kallikreins. Thus, CCH accompanied by hypotension, can contribute to the switching of enzyme kinin-angiotensin system to vasodepressor function.

Interestingly that significant activation of non-trypsin-like proteinases (by several times) [20], occurring during CCH (32°C), is observed on the background of inhibition of chymase and tonin (Tables 1, 2) and is obviously associated with a manifested activity of other enzymes. It is known that except tonin (rat kallikrein rK_2), rat tissues contain rK_9 [26], which is almost in 100 times less active than rK_2 in АП formation. The optimal pH for rK_2 is 6.2, and for rK_9 it is 6.85, therefore rK_9 may likely participate in the maintenance of vasodynamic function at the decreased chymase and tonin activity under CCH.

We had found an inverse correlation in the changes of chymase and calpains activity under CCH: increased calpains activity is most pronounced in the tissues of



отмеченный нами более выраженный характер изменений активности кальпаинов в мозжечке (см. табл. 3) может быть связан с их участием в реализации нормальной и аномальной функций мозга [15, 23]. Кальпаины участвуют в репарации цитоскелета и клеточных мембран, разрушении рецепторных протеинов и их обновлении, активации других энзимов и процессах митоза. Активация кальпаинов является следствием длительного повышения уровня Ca^{2+} в цитозоле. Их действие практически необратимо, приводит к нерегулируемой деградации внутриклеточных структур и усилению кальпаин-зависимых путей апоптоза, в результате чего развивается дегенерация тканей, в том числе в центральной нервной системе [20].

Следует отметить, что нейроны не способны к митозу и особенно чувствительны к накоплению недеградированных продуктов протеинового обмена, которые должны эффективно разрушаться внутриклеточными протеиназами. В норме более 25% синтезированных *de novo* клеточных протеинов дефектны и подвергаются быстрому расщеплению. Дефектные протеины нефункциональны, участвуют в aberrантных взаимодействиях, образуют нерастворимые протеиновые агрегаты и обладают цитотоксичностью. Предполагают, что кальпаины могут быть начальным звеном, запускающим дальнейшее убиквитинирование протеинов [7], способствующее их деградации с помощью протеиназ. Различают μ - и m -кальпаины, которые активируются при микро- и миллимолярных концентрациях Ca^{2+} , соответственно. Физиологическое соотношение μ - и m -кальпаинов в разных отделах ЦНС оценивается как 1:9, а содержания кальпастина (ингибитора кальпаинов) достаточно для полного подавления активности всего пула кальпаинов [25]. Кроме того, при длительной активации кальпаинов кальпастин подвергается кальпаин-зависимой деградации, приводящей к более значительной энзимной активации путем положительной обратной связи.

Кальпаины вовлечены в процессы синтеза и упаковки нейромедиаторов в синаптические пузырьки, регуляцию везикулярного транспорта, модуляцию их рецепторов, а также в процессы стабилизации/дестабилизации цитоскелета нейронов. Кальпаины могут включаться в процессы адаптации клеточного метаболизма к изменяющимся условиям окружающей среды [3, 8],

Таблица 3. Активность кальпаинов (мг/л ч) в тканях крыс при краниocereбральной гипотермии 32°C ($M \pm m$)

Table 3. Calpains activity (mg/l per hour) in rat tissues under craniocerebral hypothermia of 32°C ($M \pm m$)

Образцы тканей Tissue samples	Контроль Control	Наркоз Anesthesia	КЦГ CCH
Кора мозга Cortex	0,127 ± 0,034	2,432 ± 0,599 ²	2,781 ± 0,548 ²
Гипоталамус Hypothalamus	0,166 ± 0,060	7,360 ± 2,52 ²	3,763 ± 0,844 ²
Мозжечок Cerebellum	0,050 ± 0,011	3,176 ± 0,216 ¹	2,253 ± 0,680 ²
Ствол мозга Brain stem	0,091 ± 0,020	1,553 ± 0,410 ²	2,936 ± 0,687 ²
Сыворотка крови Blood serum	0,422 ± 0,100	0,733 ± 0,219	0,728 ± 0,280
Легкие Lungs	0,278 ± 0,133	1,720 ± 0,435 ³	3,142 ± 0,712 ⁴
Сердце Heart	0,252 ± 0,073	4,373 ± 1,448 ²	6,766 ± 1,888 ²
Печень Liver	0,079 ± 0,028	3,346 ± 1,380 ²	4,453 ± 1,047 ²
Почки Kidneys	0,124 ± 0,048	2,886 ± 0,548 ²	2,633 ± 0,623 ²

Примечание: ^{1,2,3,4} – различия значимы по сравнению с контролем $p < 0,001$, $p < 0,01$, $p < 0,05$, $p < 0,1$ соответственно.

Note: ^{1,2,3,4} – differences are statistically significant if compared with the control $p < 0,001$, $p < 0,01$, $p < 0,05$, $p < 0,1$, respectively.

cerebellum (in 40 times) and liver (in 50 times) on the background of significant decrease of chymase activity (Tables 1, 3). The increase of calpains activity indicates an activation of apoptogenic processes and the rise in number of disrupted cells, while in the damaged cells the chymase exhibits proteolytic activity immediately after release from granules [38]. Its low activity is most likely due to hypothermia depth (BT 32°C) and duration ((60 ± 10) minutes).

The observed rise in calpains activity under CCH (32°C) in all the studied samples (except blood serum) is in agreement with the data obtained earlier showing an increase in total proteolytic activity [20]. In this case, the more pronounced character of changes in calpains activity of cerebellum (Table 3) can be associated with its participation in implementation of normal and abnormal brain functions [7, 35]. Calpains participate in reparation of cytoskeleton and cell membranes, destruction of receptor proteins and their renewal, activation of other enzymes, as well as in mitosis. Activation of calpains is caused by prolonged increase of Ca^{2+} level in cytosol. Their action is virtually irreversible and leads to unregulated degradation of intracellular structures and activation of calpain-depen-

в том числе и при гибернации [25]. При этом структуры среднего и промежуточного мозга реагируют на гипотермию более выражено, чем кора больших полушарий. Накопление ТБК-активных продуктов при гипотермии в неокортексе выше, чем в стволовых структурах [16].

Известно, что в условиях гипотермии разрушается четвертичная структура АТФазы, синтез АТФ резко нарушается, и клетка испытывает недостаток энергии. При дефиците энергии создается избыток ионов кальция внутри клетки, что влияет на активность Ca^{2+} -зависимых процессов. Накопление ионизированного кальция в цитозоле становится основным фактором, нарушающим метаболизм и функции клетки [28]. Следует также отметить, что фосфорилирование блокирует *m*-кальпаин и является еще одним важным механизмом регуляции активности кальпаинов [34, 36]. Блокирование их активности может снизить реакцию астроцитов и микроглии, связанную с патологическими проявлениями [8, 15, 31, 32].

Ранее нами было показано, что в тканях крыс при разных режимах охлаждения проявляются определенные изменения как общей протеолитической активности, так и активности отдельных специфических протеиназ. После ритмических холодовых воздействий (в течение 65 мин при 4...5°C ТТ не изменяется) наблюдается значительная активация реакций ограниченного протеолиза (активность нетрипсиноподобных протеиназ, общая протеолитическая активность) [5], как и в условиях КЦГ 32°C [6], а также эластаз [14], а активность кальпаинов, напротив, снижается [11]. После холодовой экспозиции (в течение 3 ч при 4°C ТТ не изменяется) активность химазы и тонина подавляется [13]. В тканях хомяков при гибернации (в течение 3–3,5 суток при 4°C ТТ – 8°C) и крыс при искусственном гипометаболизме (гипоксически-гиперкапническая модель) (в течение 3 ч при 4°C и ТТ – 17°C) активность химазы, тонина и кальпаинов имела разнонаправленный и тканеспецифический характер [1, 12, 13]. При КЦГ (в течение (60 ± 10) мин при 0°C локально и ТТ – 32°C), как показано в данной работе, на фоне подавления активности химазы и тонина происходит повышение активности кальпаинов, наиболее выраженное в тканях мозжечка и печени (см. табл. 1, 3). Следовательно, активность протеиназ зависит от интенсивности и длительности холодового воздействия, глубины гипотермии, что, вероятно, обусловлено необходимостью поддержания адекватного уровня метаболизма.

Таким образом, умеренный режим КЦГ (32°C) вызывает разнонаправленные изменения активности специфических протеиназ в тканях ЦНС и внутренних органов. Происходит резкое снижение

dent pathways of apoptosis, resulting in the development of tissue degeneration, e.g. in central nervous system [4].

It should be noted that neurons are not capable of mitosis and are more sensitive to the accumulation of undegraded protein exchange products, which must be effectively destroyed by intracellular proteinases. Normally, more than 25% of *de novo* synthesized cellular proteins are defective and exposed to rapid cleavage. Defective proteins are non-functional, take part in aberrant interactions, form insoluble protein aggregates, and are cytotoxic. It is suggested that calpains can be the initial link that triggers further ubiquitination of proteins [21], which contributes to their degradation by proteinases. One distinguishes *m*- and *m*-calpains, activated at micro- and millimolar concentrations of Ca^{2+} , respectively. The physiological ratio of μ - and *m*-calpains in different sections of the CNS is 1:9, and calpastatin content (a calpain inhibitor) is sufficient to completely suppress the activity of the whole calpains pool [10]. In addition, during long-term activation of calpains, calpastatin is exposed to calpain-dependent degradation leading to more significant enzyme activation by positive feed-back linkage.

Calpains are involved into the synthesis and packaging of neurotransmitters in synaptic vesicles, regulation of vesicular transport, modulation of their receptors, as well as into neuronal cytoskeleton stabilization/destabilization [15, 22]. Calpains may be involved into the adaptation of cellular metabolism to variable environmental conditions [15, 22], including hibernation [9]. Herewith the mid- and interbrain structures react more actively to hypothermia than the brain cortex, and the accumulation of TBA-active products under hypothermia in neocortex is higher than in the stem structures [8].

It is known that under hypothermia the quaternary structure of ATPase is damaged, the ATP synthesis is strongly impaired, and therefore the cell lacks energy. Energy deficiency leads to an excess of intracellular calcium content, that affects to the activity of Ca^{2+} -dependent processes. Accumulation of calcium ions in cytosol becomes the main factor that disbalances the metabolism and functions of the cell [13]. It should also be noted that phosphorylation blocks *m*-calpain that is another important mechanism for regulating the calpains activity [34, 36]. Blocking their activity can reduce the response of astrocytes and microglia, associated with pathological manifestations [22–24, 35].

We have previously shown that under different cooling regimes the rat tissues were characterized by certain changes both in total proteolytic and individual specific proteinase activity. After rhythmic cold exposures (during 65 min at 4...5°C, and unchanged BT), there was a significant activation of the reactions



активности химазы и тонина, которое может быть связано с реализацией вазоконстрикторных реакций. При этом наблюдаемая значительная активация кальпаинов может приводить к развитию апоптогенных процессов в организме и обеспечиваться длительным повышением концентрации кальция, что, в свою очередь, является результатом проявления энергозависимых процессов при гипотермии. Активацию апоптоза с участием кальпаинов можно рассматривать как пусковой механизм высвобождения и проявления активности химазы и тонина *ex tempore*, что в условиях КЦГ приводит к истощению их ресурсов. Выявленные изменения, вероятно, отражают вызванные гипотермией масштабные перестройки в организме, направленные на поддержание необходимого уровня гомеостаза и реализацию компенсаторно-приспособительных реакций.

Изучение активности других нетрипсиноподобных протеиназ необходимо для определения их роли в контроле и реализации вазодинамических реакции при снижении ТТ в условиях проведения КЦГ.

Выводы

В результате проведения сеанса умеренного режима КЦГ (снижение ТТ до 32°C) резко (на 3–5 порядков) подавляется активность химазы и тонина (энзимов тканевого образования вазоконстрикторного пептида ангиотензина II) на фоне существенного (в 10–50 раз) повышения активности Ca²⁺-зависимых протеиназ кальпаинов в сыворотке крови, тканях ЦНС (кора мозга, гипоталамус, мозжечок, ствол мозга) и внутренних органов (сердце, печень, легкие и почки), кроме сыворотки крови для кальпаинов (не изменялась).

Литература

1. Бабійчук Г.О., Самохіна Л.М., Шило О.В. та ін. Хімаза, тонін та кальпаїни за умов гіпометаболічного стану у щурів // Проблеми криобіології. – 2005. – Т. 15, №3. – С. 465–466.
2. Бобр О.А., Мяделец О.Д., Дубовский В.В. Динамика популяции тучных клеток в течении раневого процесса у крыс, подвергнутых гипобиотическим состояниям (голодание, гипотермия) // Вестник Витеб. гос. мед. ун-та. – 2006. – Т. 5, №4. – С. 21–27.
3. Карпенко М.Н., Тихомирова М.С. Роль кальпаинов в регуляции синаптической передачи // Рос. физиолог. журнал им. И.М. Сеченова. – 2014. – Т. 100, №4. – С. 385–393.
4. Лесников Д.В., Радушкевич В.Л. Краниocereбральная гипотермия в комплексе интенсивной терапии металкогольных психозов // Прикладные информ. аспекты медицины. – 2014. – Т. 17, №1. – С. 111–114.
5. Ломако В.В., Самохіна Л.М. Вплив ритмічного охолодження на деякі етологічні та біохімічні показники щурів з експериментальною депресією // Проблеми криобіології. – 2011. – Т. 21, №1. – С. 22–33.

of limited proteolysis reactions (non-trypsin-like proteinase and, total proteolytic activity) [19], like the one observed during CCH 32°C [20], as well as did the activity of elastases [31], and *vice versa* the activity of calpains, was decreased [28]. After a cold exposure (for 3 hours at 4°C and unchanged BT) chymase and tonin activity was suppressed [30]. In tissues of hibernating hamsters (for 3–3.5 days at 4°C, BT was 8°C) and rats under artificial hypometabolism (hypoxic-hypercapnic model) (for 3 hours at 4°C, BT was 17°C) activity of chymase, tonin and calpains was changed multi-directionally and tissue-specifically [1, 29, 30]. As shown in this paper, the CCH (during (60 ± 10) min at 0°C locally, BT was 32°C), results in a rise of calpains activity, on the background of inhibited chymase and tonin, mostly pronounced in the tissues of cerebellum and liver (Tables 1, 3). Therefore, the activity of proteinases depends on the intensity and duration of cold exposure, the depth of hypothermia, and that is probably due to the necessity to maintain an adequate level of metabolism.

Thus, the moderate CCH regimen (32°C) causes a multi-directional changes in specific proteinases activity in the tissues of central nervous system and internal organs. There is a sharp decrease in the activity of chymase and tonin that may be associated with the implementation of vasoconstrictor reactions. Herewith the observed significant activation of calpains leading to the development of apoptogenic processes in an organism, can be caused by a long-term increase in calcium concentration that, in turn, is the outcome of energy-dependent processes occurring under hypothermia. Activation of apoptosis involving calpains can be considered as a triggering mechanism for the release and manifestation of chymase and tonin activity *ex tempore*, resulting in depletion of their resources under CCH conditions. The revealed changes probably reflect the massive rearrangements in the body caused by hypothermia, which maintain the relevant level of homeostasis and implementation of compensatory-adaptive reactions.

The study of the activity of other non-trypsin-like proteinases will help to clarify their role in the control and implementation of vasodynamic reactions following BT decreasing during the CCH.

Conclusions

The activity of chymase and tonin (enzymes of tissue formation of vasoconstrictive peptide angiotensin II) was sharply suppressed (by 3–5 orders) under moderate CCH, and accompanied by a significant (by 10–50 times) increase in the activity of Ca²⁺-dependent proteinases of calpains in the blood serum, tissues of CNS (cerebral cortex, hypothalamus, cerebellum, brain stem) and internal organs (heart, liver, lungs and kidneys), except blood serum for calpains (unchanged).



6. Ломако В.В., Самохина Л.М., Шило А.В., Бабийчук Г.А. Кра-ниоцеребральная гипотермия стимулирует реакции ограниченного протеолиза в тканях крыс // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2016. – Т.26, №3. – С. 238–248.
7. Ломоносова Ю.Н., Шенкман Б.С., Немировская Т.Л. Кальпаинзависимые процессы в скелетных мышцах при функциональной разгрузке // Доклады Акад. наук. – 2014. – Т. 458, №6. – С. 714–717.
8. Лысенко Л.А., Канцерова Н.П., Рендаков Н.Л., Немова Н.Н. Кальпаины и их эндо- и экзогенные регуляторы в различных моделях нейродегенерации // Биоорган. химия. – 2014. – Т. 40, №6. – С. 695–702.
9. Нурмагомедова П.М., Абасова М.М., Эмирбеков Э.З. Активность Са²⁺-зависимых нейтральных протеаз в тканях суслика в динамике зимней спячки и в ходе самосогревания после индуцированного пробуждения // Бюл. эксперимент. биологии и медицины. – 2011. – Т. 151, №5. – С. 509–512.
10. Самохина Л.М. Стресс, гипертензия и адаптация. Энзимы вазоконстрикции и деструкции в условиях стресса, гипотензии. Ритмические холодовые воздействия. – Saarbrücken: Lambert Academic Publishing, 2015. – 212 с.
11. Самохина Л.М., Бабийчук Г.А., Ломако В.В. Влияние ритмического холодового воздействия на активность кальпаинов у крыс с алкоголь-зависимой гипертензией // Теор. и практич. аспекты совр. криобиологии: Материалы Междунар. заоч. науч.-практич. конф. (24 марта 2014 г., Россия–Украина). – Сыктывкар, 2014. – С. 373–382.
12. Самохіна Л.М., Ломако В.В., Шило О.В. Хімаза, тонін та кальпаїни за умов природної гібернації у хом'яків // Досягнення біології та медицини. – 2010. – №2. – С. 29–32.
13. Самохина Л.М., Ломако В.В., Шило А.В. Влияние холодовой экспозиции на активность химазы и тонина в тканях крыс // Биофизика живой клетки. – 2014. – Т. 10. – С. 180–182.
14. Самохина Л.М., Стародуб Н.Ф., Бабийчук Г.А., Ломако В.В. Влияние ритмического холодового воздействия на активность эластаз у самок крыс с алкоголь-зависимой гипертензией // Проблемы криобиологии. – 2012. – Т. 22, №1. – С. 49–60.
15. Стародуб М.Ф., Самохіна Л.М., Коваль С.М., Снігурська І.О. Кальпаїни: загальна характеристика та їхня роль за різних станів організму // Укр. біохім. журнал. – 2014. – Т. 86, №1. – С. 5–20.
16. Эмирбеков Э.З., Пашаева М.Э., Айдунбеков Ф.Т., Магомедов К.К. Влияние церебрамина и умеренной гипотермии на свободнорадикальные процессы в мозге крыс при окклюзии сонных артерий // Фундамент. исследования. – 2013. – №10, Ч. 4. – С. 797–801.
17. А.с. № 904695 СССР, МКИ А61F 7/12. Аппарат для охлаждения и согревания головного мозга / В.В. Королев, Г.А. Бабийчук, В.Г. Бегунов и др.; заявитель Опытное производство Института проблем криобиологии и криомедицины НАН УССР. – №2654721; заявл. 15.08.78; опубл. 15.02.82, Бюл. №6.
18. Пат. 20171, Україна, МПК С 12 Q 1/38. Спосіб визначення активності протеїназ або їх інгібіторів в біологічних рідинах / Л.М. Самохіна, О.А. Дубінін; заявник і патентовласник Інститут терапії АМН України. – №4654144/SU; заявл. 22.12.97. – опубл. 25.12.97, Бюл. №6.
19. Bonaventura J., Alan D., Vejvoda J. et al. History and current use of mild therapeutic hypothermia after cardiac arrest // Arch. Med. Sci. – 2016. – Vol. 12, №5. – P. 1135–1141.
20. Chakraborti S., Alam M.N., Paik D. et al. Implications of calpains in health and diseases // Indian J. Biochem. Biophys. – 2012. – Vol. 49, №5. – P. 316–328.
21. Cook C.J. Induced Hypothermia in Neurocritical Care: A Review // J. Neurosci. Nurs. – 2017. – Vol. 49, Issue 1. – P. 5–11.
22. Damasceno D.D., Lima M.P., Motta D.F. et al. Cardiovascular and eletrocardiographic parameters after tonin administration in Wistar rats // Regul. Pept. – 2013. – Vol. 181, №10. – P. 30–36.

References

1. Babijchuk G.O., Samokhina L.M., Shylo O.V. et al. Chymase, tonin and calpains under hypometabolic state in rats. Probl Cryobiol 2005; 15(3): 465–466.
2. Bobr O.A., Myadelets O.D., Dubovsky V.V. Dynamics of the population of mast cells during the wound process in rats subjected to hypobiotic conditions (starvation, hypothermia). Vestnik of Vitebsk State Medical University 2006; 5(4): 21–27.
3. Bonaventura J., Alan D., Vejvoda J. et al. History and current use of mild therapeutic hypothermia after cardiac arrest. Arch Med Sci 2016; 12(5): 1135–1141.
4. Chakraborti S., Alam M.N., Paik D. et al. Implications of calpains in health and diseases. Indian J Biochem Biophys 2012; 49(5): 316–328.
5. Cook C.J. Induced hypothermia in neurocritical care: A review. J Neurosci Nurs 2017; 49(1): 5–11.
6. Damasceno D.D., Lima M.P., Motta D.F. et al. Cardiovascular and eletrocardiographic parameters after tonin administration in Wistar rats. Regul Pept 2013; 181(10): 30–36.
7. Duffy K.R., Duffy M.S. An in situ method for the examination of calcium-dependent proteolysis. J Neurosci Methods 2011; 201(2): 333–339.
8. Emirbekov E.Z., Pashaeva M.E., Aйдунбеков F.T., Magomedov K.K. Influence of cerebramin and mild hypothermia on free-radical processes in rat's brain within carotid artery occlusion. Fundamental Research 2013; 10(part 4): 797–801.
9. Ferrario C.M. Cardiac remodelling and RAS inhibition. Ther Adv Cardiovasc Dis 2016; 10(3): 162–171.
10. Goll D.E., Thompson V.F., Li H. et al. The calpain system. Physiol Rev 2003; 83(3): 731–801.
11. Granic I., Nyakas C., Luiten P.G. et al. Calpain inhibition prevents amyloid-beta-induced neurodegeneration and associated behavioral dysfunction in rats. Neuropharmacol 2010; 59(4–5): 334–342.
12. Harvima I.T., Viinamaki H., Naukkarinen A. et al. Association of cutaneous mast cells and sensory nerves with psychic stress in psoriasis. Psychother Psychosom 1993; 60: 168–176.
13. Hochachka P.W. Defense strategies against hypoxia and hypothermia. Science 1986; 231(4735): 234–241.
14. Inoue K., Nishimura H., Kubota J. et al. Alternative angiotensin II formation in rats arteries occurs only at very high concentrations of angiotensin I. Hypertension 1999; 34(3): 525–530.
15. Karpenko M.N., Tikhomirova M.S. The role of calpains in the regulation of synaptic transmission. Neuroscience and Behavioral Physiology 2014; 100(4): 385–393.
16. Korolev V.V., Babiychuk G.A., Begunov V.G. et al., inventors. Apparatus for cooling and warming of the brain. Certificate of Authorship of the USSR № 904695. 1982 Feb. 15.
17. Lesnikov D.V., Radushkevich V.L. Craniocerebral hypothermia in intensive therapy complex of metalcohol psychosis. Prikladnye inphormatsyonnye aspekty meditsyny 2014; 17(1): 111–114.
18. Ley O., Bayazitoglu Y. Effect of physiology on the temperature distribution of a layered head with external convection. Int J Heat and Mass Transfer 2003; 46(17): 3233–3241.
19. Lomako V.V., Samokhina L.M. Effect of rhythmic cooling on some ethological and biochemical indices in rats with experimental depression. Probl Cryobiol 2011; 21(1): 22–33.
20. Lomako V.V., Shylo A.V., Babijchuk G.A., Samokhina L.M. Craniocerebral hypothermia stimulates reactions of limited proteolysis in rat tissues. Probl Cryobiol Cryomed 2016; 26(3): 238–248.
21. Lomonosova J.N., Shenkman B.S., Nemirovskaya T.L. Calpine-dependent processes in skeletal muscles with functional discharge. Doklady Akademii Nauk 2014; 458(6): 714–717.
22. Lysenko L.A., Kantserova N.P., Rendakov N.L., Nemova N.N. Calpains and their endo- and exogenous regulators at various models of neurodegeneration. Rus J Bioorganic Chem 2014; 40(6): 695–702.
23. Machado V.M., Morte M.I., Carreira B.P. et al. Involvement of calpains in adult neurogenesis: implications for stroke. Front Cell Neurosci 2015; 9: 22.



23. Duffy K.R., Duffy M.S. An in situ method for the examination of calcium-dependent proteolysis // *J. Neurosci. Methods*. – 2011. – Vol. 201, №2. – P. 333–339.
24. Ferrario C.M. Cardiac remodelling and RAS inhibition // *Ther. Adv. Cardiovasc. Dis*. – 2016. – Vol. 10, №3. – P. 162–171.
25. Goll D.E., Thompson V.F., Li H. et al. The calpain system // *Physiol. Rev*. – 2003. – Vol. 83, №3. – P. 731–801.
26. Granic I., Nyakas C., Luiten P.G. et al. Calpain inhibition prevents amyloid-beta-induced neurodegeneration and associated behavioral dysfunction in rats // *Neuropharmacol*. – 2010. – Vol. 59, №4–5. – P. 334–342.
27. Harvima I.T., Viinamaki H., Naukkarinen A. et al. Association of cutaneous mast cells and sensory nerves with psychic stress in psoriasis // *Psychother. Psychosom*. – 1993. – Vol. 60, №3–4. – P. 168–176.
28. Hochachka P.W. Defense strategies against hypoxia and hypothermia // *Science*. – 1986. – Vol. 231, №4735. – P. 234–241.
29. Inoue K., Nishimura H., Kubota J. et al. Alternative angiotensin II formation in rats arteries occurs only at very high concentrations of angiotensin I // *Hypertension*. – 1999. – Vol. 34, №3. – P. 525–530.
30. Ley O., Bayazitoglu Y. Effect of physiology on the temperature distribution of a layered head with external convection // *Int. J. Heat and Mass Transfer*. – 2003. – Vol. 46, Issue 17. – P. 3233–3241.
31. Machado V.M., Morte M.I., Carreira B.P. et al. Involvement of calpains in adult neurogenesis: implications for stroke // *Front. Cell. Neurosci*. – 2015. – Vol. 9. – P. 22.
32. Medeiros R., Kitazawa M., Chabrier M.A. et al. Calpain inhibitor A-705253 mitigates Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline in aged 3xTgAD mice // *Am. J. Pathol*. – 2012. – Vol. 181, №2. – P. 616–625.
33. Schechter N.M., Plotnick M., Selwood T. et al. Diverse effects of pH on the uninhibition of human chymase by serpins // *The American society for biochemistry and molecular biology*. – 1997. – Vol. 272, №39. – P. 24499–24507.
34. Shimizu M., Tanaka R., Uchida M. et al. Effect of Angiotensin II Type 1 receptor blocker on cardiac angiotensin-converting enzyme and chymase-like activities, and cardiac fibrosis in cardiomyopathic hamsters // *J. Vet. Med. Sci*. – 2006. – Vol. 68, №3. – P. 227–233.
35. Shiraha H., Glading A., Chou J. et al. Activation of m-calpain (calpain II) by epidermal growth factor is limited by protein kinase A phosphorylation of m-calpain // *Mol. Cell. Biol*. – 2002. – Vol. 22, №8. – P. 2716–2727.
36. Suzuki K., Hata S., Kawabata Y., Sorimachi H. Structure, Activation, and Biology of Calpain // *Diabetes*. – 2004. – Vol. 53, Suppl 1. – P. S12–S18.
37. Szczygieł J., Mazurek J., Swiatkowski A. et al. The neuroprotective effect of mild therapeutic hypothermia after out-of-hospital cardiac arrest with successful reanimation – a case report // *Pol. Merkur. Lekarski*. – 2016. – Vol. 40, №237. – P. 177–181.
38. Takai S., Jin D. Improvement of cardiovascular remodelling by chymase inhibitor // *Clin. Exp. Pharmacol Physiol*. – 2016. – Vol. 43, №4. – C. 387–393.
39. Takai S., Shiota N., Sakaguchi M. et al. Characterization of chymase from human vascular tissues // *Clin. Chim. Acta*. – 1997. – Vol. 265, №1. – P. 13–20.
40. Turk E.E. Hypothermia // *Forensic. Sci. Med. Pathol*. – 2010. – Vol. 6, №2. – P. 106–115.
41. Wang J., Xiong W., Yang Z. et al. Human tissue kallikrein induces hypotension in transgenic mice // *Hypertension*. – 1994. – Vol. 23, №2. – P. 236–243.
42. Yildiz-Unal A., Korulu S., Karabay A. Neuroprotective strategies against calpain-mediated neurodegeneration // *Neuropsychiatr Dis. Treat*. – 2015. – Vol. 11. – P. 297–310.
24. Medeiros R., Kitazawa M., Chabrier M.A. et al. Calpain inhibitor A-705253 mitigates Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline in aged 3xTgAD mice. *Am J Pathol* 2012; 181(2): 616–625.
25. Nurmagedova P.M., Abasova M.M., Emirbekov E.Z. The activity of Ca²⁺-dependent neutral proteases in squirrel tissues in the dynamics of hibernation and during self-warming after induced awakening. *Bull Exp Biol Med*; 2011: 151 (5): 509–512.
26. Samokhina L.M. Stress, hypertension and adaptation. Enzymes of vasoconstriction and destruction at stress, hypo- and hypertension. The rhythmic cold effects. Lambert Academic Publishing, Saarbrücken; 2015.
27. Samokhina L.M., Dubinin A.A., inventors. A method for determining the activity of proteinases or their inhibitors in biological fluids. Patent of Ukraine № 20171, IPC C 12 Q 1/38. 1997 Dec 25.
28. Samokhina L.M., Babychuk G.O., Lomako V.V. Influence of the rhythmic cold effect on the activity of calpains in rats with alcohol-dependent hypertension. Theoretical and practical aspects of modern cryobiology. *Proc Int Correspond Sci Pract Conf*; 2014 March 24; Syktyvkar, Russian; 2014: 373–382.
29. Samokhina L.M., Lomako V.V., Shylo O.V. Chymase, tonin and calpains under conditions of natural hibernation in hamsters. *Dosyagnennya Biologii ta Medytsyny* 2010; (2): 29–32.
30. Samokhina L.M., Lomako V.V., Shylo A.V. Influence of cold exposure on the activity of chymase and tonin in the tissues of rats. *Biofizika Zhyvov Kletki*; 2014; 10: 180–182.
31. Samokhina L.M., Starodub N.F., Babychuk G.A., Lomako V.V. Rhythmic cold effect on activity of elastases in female rats with alcohol-dependent hypertension. *Probl Cryobiol* 2012; 22(1): 49–60.
32. Schechter N.M., Plotnick M., Selwood T. et al. Diverse effects of pH on the inhibition of human chymase by serpins. *The J Biol Chem* 1997; 272: 24499–24507.
33. Shimizu M., Tanaka R., Uchida M. et al. Effect of Angiotensin II Type 1 receptor blocker on cardiac angiotensin-converting enzyme and chymase-like activities, and cardiac fibrosis in cardiomyopathic hamsters. *J Vet Med Sci* 2006; 68(3): 227–233.
34. Shiraha H., Glading A., Chou J. et al. Activation of m-calpain (calpain II) by epidermal growth factor is limited by protein kinase A phosphorylation of m-calpain. *Mol Cell Biol* 2002; 22(8): 2716–2727.
35. Starodub N.F., Samokhina L.M., Koval S.N., Snegurskaya I.A. Calpains: general characteristics and their role in various states of the organism. *Ukr Biochem J* 2014; 86(1): 5–20.
36. Suzuki K., Hata S., Kawabata Y., Sorimachi H. Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes* 2004; 53(1): S12–S18.
37. Szczygieł J., Mazurek J., Swiatkowski A. et al. The neuroprotective effect of mild therapeutic hypothermia after out-of-hospital cardiac arrest with successful reanimation – a case report. *Pol Merkur Lekarski* 2016; 40(237): 177–181.
38. Takai S., Jin D. Improvement of cardiovascular remodelling by chymase inhibitor. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2016; 43: 387–393.
39. Takai S., Shiota N., Sakaguchi M. et al. Characterization of chymase from human vascular tissues. *Clin Chim Acta* 1997; 265(1): 13–20.
40. Turk E.E. Hypothermia. *Forensic Sci Med Pathol* 2010; 6(2): 106–115.
41. Wang J., Xiong W., Yang Z. et al. Human tissue kallikrein induces hypotension in transgenic mice. *Hypertension* 1994; 23(2): 236–243.
42. Yildiz-Unal A., Korulu S., Karabay A. Neuroprotective strategies against calpain-mediated neurodegeneration. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2015; 11: 297–310.