

Хімаза, тонін та кальпаїни за умов штучного гіпометаболічного стану у хом'яків

UDC 577.156.5:616.379-008.9-056.7:591.2(076.5)

L.M. SAMOKHINA¹, V.V. LOMAKO², A.V. SHILO^{2*}

Chymase, Tonin and Calpains under Artificial Hypometabolic State in Hamsters

У хом'яків при штучному гіпометаболічному стані (ШГМС) (метод Анджу́са-Бахметьєва-Джайя) у сироватці крові, без'ядерних фракціях гомогенатів тканин гіпоталамуса, кори і стовбура мозку, мозочка, легень, серця, печінки і нирок визначали активність ферментів альтернативних шляхів утворення ангіотензину II (хімази, тоніну) і кальційзалежних протеїназ (кальпаїнів) ферментативним (10^{-9} – 10^{-10} г) методом. Показано, що органами-мішенями при розвитку ШГМС і на етапі самовідігрівання є легень, серце, печінка і нирки, а також структури мозку, відповідальні за регуляцію функцій життєзабезпечення. Розвиток ШГМС може призводити до вазоконстрикторних змін за рахунок активації хімази та витрачення тоніну. Активація кальпаїнів може стимулювати розвиток клітинного та тканинного ушкодження, що обумовлює локальне зниження активності тоніну. Зазначені зміни нормалізуються переважно через 24 години після впливу.

Ключові слова: хімаза, тонін, кальпаїни, гіпометаболічний стан, хом'яки.

У хомяков при искусственном гипометаболическом состоянии (ИГМС) (метод Анджу́са-Бахметьєва-Джайя) в сыворотке крови, безъядерных фракциях гомогенатов тканей гипоталамуса, коры и ствола мозга, мозжечка, легких, сердца, печени и почек определяли активность ферментов альтернативных путей образования ангиотензина II (химазы, тонина) и кальцийзависимых протеиназ (кальпаинов) ферментативным (10^{-9} – 10^{-10} г) методом. Показано, что органами-мишенями при ИГМС и на этапе самоотогрева являются легкие, сердце, печень и почки, а также структуры мозга, ответственные за регуляцию функций жизнеобеспечения. Развитие ИГМС может приводить к вазоконстрикторным изменениям за счет активации химазы и расхода тонина. Активация кальпаинов может стимулировать развитие клеточного и тканевого повреждения, что обуславливает локальное снижение активности тонина. Отмеченные изменения нормализуются преимущественно через 24 ч после воздействия.

Ключевые слова: химаза, тонин, кальпаины, гипометаболическое состояние, хомяки.

The activity of enzymes of alternative ways of angiotensin II formation (chymase, tonin) and calcium-dependent proteinases (calpains) in hamsters serum, nuclear-free fractions of tissue homogenates of cerebral cortex, brain stem, hypothalamus, cerebellum, lung, heart, liver and kidneys under artificial hypometabolic state (AHMS) (Andjus-Bakhmetev-Giaja method) with enzymatic (10^{-9} – 10^{-10} g) method have been studied. It has been shown that lung, heart, liver, kidneys and brain structures, which are critical for vital function were the most susceptible to AHMS development and at the self-rewarming stage. Increased chymase activity in liver and kidneys on the background of decreased tonin activity and elevated calpains activity may indicate vasoconstriction development and stimulation of cell and tissue damage, correspondingly. All the changes found were mainly normalized after 24 h.

Key-words: chymase, tonin, calpains, hypometabolic state, hamsters.

У природі широко розповсюджені гіпометаболічні стани (ГМС), які характеризуються зворотним зниженням обмінних процесів. До тригерів розвитку природних ГМС відносять зниження температури, зміну газового складу навколишнього середовища (гіпоксія, гіперкапнія), затемнення та інш. [2]. Вивчення особливостей біохімічних процесів при ГМС, а також на етапі відновлення є однією з актуальних проблем кріобіології і має практичне значення для медицини та ветеринарії.

Відомо, що адаптація до екологічно низьких температур індукує зміни в продукції енергії і концентрації реактивних форм кисню [13]. Останні сприяють розвитку оксидативного стресу і пош-

In nature hypometabolic states (HMSs), characterizing reversible reduction of metabolic processes, are quite widely spread. Temperature reduction, change of environmental gas composition (hypoxia, hypercapnia), darkness etc. are referred [2] to the triggers of the development of natural HMSs. The studying of peculiarities of biochemical processes at HMSs as well as at the recovery stage is one of actual tasks of cryobiology and is of practical value for medicine and veterinary.

It is known that adaptation to ecologically low temperatures induces the changes in energy production and concentration of reactive oxygen forms [13]. The latter contributes to the development of oxidative stress

¹Інститут терапії ім. Л.Т. Малої АМН України, м. Харків

²Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

* Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію: вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015; тел.: +38 (057) 372-74-35, факс: +38 (057) 373-30-84, електронна пошта: cryo@online.kharkov.ua

¹Institute of Therapy named by L.T. Malaya of the Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 372 7435, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

коженню клітинного гомеостазу, і ця реакція є тканиноспецифічною. Розвиток оксидативного стресу супроводжується активацією ферментів альтернативних шляхів утворення вазоконстрикторного пептиду ангіотензину II (АІІ): хімази, тоніну [6]. Один з найсильніших вазоконстрикторів АІІ утворюється як з ангіотензину I (АІ) за допомогою ангіотензин-перетворюючого ферменту, так і альтернативними шляхами з АІ за участю хімотрипсинподібної протеїнази – хімази, тканинного активатора плазміногену (ТАП), катепсину G, тоніну або з ангіотензиногену за участю ТАП, катепсину G, тоніну [4]. Активація альтернативних шляхів утворення АІІ має місце у серці, нирках і може призводити до реструктуризації цих органів-мішеней з наступною органною дисфункцією [28].

Вивільнення ферментів утворення АІІ із клітин при оксидативному стресі обумовлюють дією вільних кисневих радикалів і пов'язують з окисною модифікацією білків, лабілізацією мембранних систем клітин [16]. Зростання концентрації АІІ може у свою чергу стимулювати вивільнення реактивного кисню і генетичну експресію різних субодиниць білків NAD(P)H-оксидази [24].

Прояв активності хімази видоспецифічний: у людини, приматів, собак та хом'яків хімаза утворює АІІ з АІ, у щурів і мишей вона частіше розщеплює АІІ [16, 25], участь хімази в утворенні АІІ у щурів і мишей відзначають лише при високих концентраціях АІ [19].

Тонін відрізняється від хімази тим, що здатний утворювати АІІ не тільки з АІ, але й з ангіотензиногену. Тонін – калікреїнподібна серінова протеїназа, яка присутня в таких органах, як мозок, нирки, інш. [14]. Його функціонування призводить до зростання тиску крові з одночасним зростанням серцевої активності [11] і не є видоспецифічним.

Дослідження, проведені на щурах, дозволили виявити, що розвиток оксидативного стресу сприяє активації кальційзалежних протеїназ – кальпаїнів [3, 12]. Активні метаболіти кисню опосередковано активують кальпаїни, які залучаються до процесів деградації цитоскелету, пошкодження клітин, індукції апоптозу. Крім того, показано, що при гіпоксії кальпаїни залучаються до реалізації механізму клітинної смерті за некротичним шляхом, а інгібування кальпаїнів переключає його на апоптичний шлях.

Характер прояву активності хімази, тоніну та кальпаїнів за умов ГМС не з'ясовано.

Мета роботи – визначити активність ферментів альтернативних шляхів утворення АІІ (хімази, тоніну) та кальпаїнів за умов штучного ГМС (ШГМС) у хом'яків.

Матеріали і методи

Штучний ГМС викликали у дорослих хом'яків-самців узимку за методом [5, 9] таким чином:

and damage of cell homeostasis and this reaction is tissue-specific. The development of oxidative stress is accompanied with activation of such enzymes of alternative formation pathways of vasoconstrictor peptide angiotensin II (AII) as chymase and tonin [6]. One of the strongest vasoconstrictors AII is formed both from angiotensin I (AI) by means of angiotensin-transforming enzyme and by alternative ways with AI due to participation of chemotrypsin-like proteinase, chymase, tissue activator of plasminogen (TAP), cathepsin G, tonin or angiotensinogenesis with TAP participation, cathepsin G, tonine [4]. Activation of alternative ways of AII formation takes place in heart, kidneys and may lead to the restructuring of these target organs with following organ dysfunction [28].

Release of enzymes of AII formation out of cells at oxidative stress is stipulated by the action of oxygen free radicals and associated with oxidative modification of proteins, labilization of cell membrane systems [16]. Increased concentration of AII may, in its turn, stimulate a release of reactive oxygen and genetic expression of different subunits of proteins NAD(P)H-oxidase [24].

The manifestation of chymase activity is species-specific: in humans, primates, dogs and hamsters chymase forms AII with AI, in rats and mice it frequently cleaves AII [16, 25], chymase participation in formation of AII in rats and mice is found only under high AI concentrations [19].

Tonin differs from chymase by the ability to form AII not only from AI, but also from angiotensinogen. Tonin is kallikrein-like serine proteinase, present in such organs as brain, kidneys etc [14]. Its functioning results in an increased blood pressure with simultaneous rise in cardiac activity [11] and is not species-specific.

Researches carried out in rats enables the revealing of the contribution of developing oxidative stress to activation of calcium-dependent proteinases – calpains [3, 12]. Oxygen active metabolites indirectly activate calpains, involved in the processes of cytoskeleton degradation, cell impairments, apoptosis induction.

In addition, under hypoxia calpains are shown as taking part in realization of the cell death mechanism on a necrotic pathway, and inhibition of calpains switch it to apoptotic path.

The manifestation character of the activities chymase, tonin and calpains under HMS is not revealed.

The research aim was to examine the activity of enzyme alternative pathways of AII formation (chymase, tonin) and calpains under artificial HMS (AHMS) in hamsters.

Materials and methods

Artificial HMS (AHMS) was induced in adult male hamsters in winter by the method [5, 9] in such a way: the animals were kept for 3 hrs in insulated closed tank (2 dm² volume), placed into a dark cold chamber

тварин тримали протягом 3 годин у герметично закритій судині (об'ємом 2 дм³), яку поміщали в темну холодову камеру при температурі 3–5°C. Під впливом гіперкапнії, гіпоксії й в умовах низької температури середовища у тварин розвивається ШГМС, подібний за фізіологічними показниками (нерухливість, нечутливість до тактильних і болючих стимулів, зниження температури тіла, різке уповільнення частоти серцевих скорочень, пригнічення біоелектричної активності мозку) до природної гібернації. Потім тварин вилучали із судини і переводили в умови з нормальним газовим складом повітря і температурою 22–24°C.

Досліджено 4 групи тварин: контроль (n=8), ШГМС, через 2 та 24 години після ШГМС (ранній і пізній етапи відновлення) (в дослідних групах n=5).

Дослідження були проведені відповідно до загальних принципів експериментів на тваринах, схвалених III Національним конгресом з біоетики (м. Київ, 2007) і узгоджених з положеннями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1985 р.).

Тварин декапітували. У сироватці крові, без'ядерних фракціях гомогенатів тканин гіпоталамусу, кори мозку (КМ), стовбуру мозку (СМ), мозочку, легень, серця, печінки і нирок визначали активність хімази, тоніну, кальпаїнів високочутливим (10⁻⁹–10⁻¹⁰ г активного ферменту) ферментативним методом [9]. Принцип методу засновано на використанні як субстрату протеолітичної реакції іммобілізованого на поверхні полістиролу маркерного ферменту (пероксидаза хрону), який наперед кон'югований із субстратним білком.

Активність хімази визначали попередньо пригнічуючи такі трипсиноподібні ферменти, як трипсин, сироватковий калікреїн, плазмін, частково тонін (має трипсин- і хімотрипсинподібну активність) доданням 1:1 за об'ємом соєвого інгібітору трипсину (СІТ) у концентрації 0,01 мкг/мл, інкубували 5 хв при 37°C. Для визначення активності тоніну перед протеолітичною реакцією пригнічували активність калікреїноподібних ферментів в дослідних зразках доданням 1:1 за об'ємом апротиніну (20 мкг/мл) і інкубували 5 хв при 37°C.

Як субстрат для визначення активності хімази використовували фрагмент 4-8 АІІ, тоніну – протамінсульфат.

Активність Са²⁺-залежних нейтральних протеїназ визначали як різницю між активністю протеїназ з додаванням СаСl₂ і цистеїну до отримання кінцевої концентрації 5 мМ та між активністю протеїназ з додаванням етилендіамінтетраацетату (ЕДТА) до отримання кінцевої концентрації 10 мМ.

at 3–5°C. Under the effect of hypercapnia, hypoxia and under low temperature of the environment AHMS developed in the animals, it was similar on physiological indices (immobility, insensitivity to tactile and pain stimuli, reduced body temperature, sharp slowing-down of cardiac contractions, suppressed bioelectrical activity of brain) to natural hibernation. Afterwards the animals were removed from the vessel and transferred to the conditions with normal gas composition of air and temperature of 22–24°C.

There were examined 4 groups of animals: control (n=8), AHMS, in 2 and 24 hrs after AHMS (early and late recovery stages) (in examination groups n=5).

Investigations were performed in accordance with general principles of experiments in animals adopted by the 3rd National Congress of Bioethics (Kyiv, 2007) and approved with the statements of European Convention on the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (Strasbourg, 1985).

The animals were decapitated. In blood serum, nucleus-free fractions of tissue homogenates of hypothalamus, brain cortex (BC), brain stem (BS), cerebellum, lungs, heart, liver and kidneys the activities of chymase, tonin, calpains were examined with highly sensitive (10⁻⁹–10⁻¹⁰ g of active enzyme) enzyme method [9]. The method principle is based on use as a substrate of proteolytic fraction, immobilized on the marker enzyme polystyrol surface (horse radish peroxidase) conjugated with substrate protein.

Chymase activity was determined by preliminary suppression of such trypsin-like enzymes as trypsin, serum kallikrein, plasmin, partially tonin (has both trypsin- and chemotrypsin-like activities) by adding 1:1 (v/v) soy trypsin inhibitor (STI) in concentration of 0.01 mg/ml, incubated for 5 min at 37°C.

For revealing the activity of tonin prior to proteolytic reaction the activity of kallikrein-like enzymes was suppressed in experimental samples by adding of 1:1 (v/v) aprotinin (20 g/ml) and incubated for 5 min at 37°C. As a substrate for examining the activity of chymase the tonin fragment 4-8 АІІ, protamin sulphate was used.

Activity of Са²⁺-dependent neutral proteinases was found as the difference between the one of proteinases with adding СаСl₂ and cystein up to reaching the final concentrations of 5 мМ and that with adding final concentration of 10 мМ.

The activity of calpains was revealed on proteolytic reaction: the studied samples were introduced into wells of polystyrol strip plates with immobilized complex of horse radish peroxidase with bovine serum albumin (BSA) in parallels, then to one СаСl₂ and cystein were added with approaching final concentrations of 5 мМ, to another EDTA with approaching

Для визначення активності кальпаїнів проводили протеолітичну реакцію: досліджувані зразки вносили в лунки полістиролової плашки з іммобілізованим комплексом пероксидази хрому з альбуміном сироватки бика (БСА) в паралелях, потім до однієї додавали CaCl_2 і цистеїн з отриманням кінцевих концентрацій 5 мМ, до другої – ЕДТА з отриманням кінцевої концентрації 10 мМ. Активність кальпаїнів визначали за різницею показників. Для контролю використовували розчини трипсину. Інкубували при 37°C протягом 15 хв і після видалення продуктів реакції визначали оптичну щільність маркерного ферменту за допомогою фотометра-аналізатора імуоферментного Humanreader, ("Human", Німеччина).

Оцінку активності досліджених протеїназ проводили за залишковою активністю маркерного ферменту по відношенню до ортофенілендіаміну в присутності перекису водню, при цьому певній концентрації досліджених протеїназ відповідала певна кількість маркерного ферменту, що залишився на полістиролі після розщеплення субстратних комплексів. Активність хімази, тоніну розраховували в Е (мкМ субстрату за 1 хв). Активність кальпаїнів виражали в мікроеквівалентах задіяних хімічних зв'язків за хвилину (1 мкЕкв відповідає активності 1 мг/л трипсину за 1 хв) [1].

В експериментах використовували СІТ виробництва "Reanal" (Угорщина), пероксидазу хрому, фрагмент 4-8 АІІ, апротинін фірми "ICN" (США), трипсин ("Spofa" (Чехія), хлорид кальцію, цистеїн, БСА, протамінсульфат, ЕДТА, полістиролові плашки стріпові (Росія).

Статистичну обробку отриманих даних проводили за методом Стьюдента-Фішера з використанням програмного забезпечення Excel.

Результати та обговорення

За умов ШГМС у хом'яків виявлено вірогідне зростання порівняно з контролем активності хімази в печінці та нирках, яка досягає початкового рівня після 2-х годин перебування тварин в нормальних температурних умовах, при нормальному кисневому постачанні й освітленні (рис. 1). Щодо активності тоніну відзначено її зниження за умов ШГМС – вірогідно в нирках, через 2 години після ШГМС – у СМ, через 24 години – в печінці і нирках (рис. 2). Показано також, що активність тоніну при ШГМС в більшості досліджених зразків має тенденцію до зниження (окрім КМ, мозочку, СМ), до того ж в гіпоталамусі та сироватці крові знаходиться на нульовому рівні. На ранньому етапі відновлення у мозочку активність тоніну має тенденцію до зростання. Активність кальпаїнів зростає за умов ШГМС у СМ, через 2 години після ШГМС – у СМ і легенях, через 24 години лишається

to final concentration of 10mM was done. The activity of calpains was examined on the differences of indices. As the control trypsin solutes were used. The incubation was performed at 37°C for 15 min and after removal of the reaction products an optical density of marker enzyme was found by means of analyzing immune enzyme photometer Humanreader (Human, Germany).

The activity of studied proteases was evaluated on surplus activity of marker enzyme on the ratio of orthophenylenediamine in hydrogen peroxide presence, thereat to certain concentration of studied proteases corresponded the certain amount of marker enzyme, remained on polystyrol after cleavage of substrate complexes. The activities of chymase, tonin was counted in equivalents (μm of substrate per min). The activity of calpains was expressed in microequivalents of the involved chemical bonds per minute (1 mEquivalent corresponds to the activity of 1 mg/l trypsin per min) [1].

In the experiments there were used CIT ("Reanal", Hungary), horse radish peroxidase, fragment 408 AII, aprotinin (ICN, USA), trypsin (Spofa, Czech Republic), calcium chloride, cystein, BSA, protamin sulfate, EDTA, polystyrol strip plates (Russia).

The obtained data were statistically processed by Student-Fisher's method using Excel software.

Results and discussion

Under AHMS in hamsters there was found a statistically significant increase if compared with the control of chimase activity in liver and kidneys, approaching to initial level after 2 hrs' staying of animals under normal temperatures with normal oxygen supply and light (Fig. 1). As for tonin activity its reduction is noticed under AHMS, statistically significant was found in kidneys, in 2hrs after AHMS in BS, in 24 hrs in liver and kidneys (Fig. 2). It has been also shown that tonin activity at AHMS in the majority of studied samples has a tendency to reduction (excluding BC, BS and cerebellum), in addition in hypothalamus and blood serum its level is zero. At early stage of recovery in cerebellum the tonin activity has a tendency to an increase. The activity of calpains enhances at AHMS in BS, in 2 hrs after AHMS in BS and in lungs in 24 hrs it remains increased in lungs (Fig. 3). It should be noted that activity of calpains at recovery stage increases in heart if compared with AHMS.

Thus, target organs during the formation of AHMS and warming of animals are lungs, heart, liver, kidneys, as well as brain structures, wherein the controlling links of vitally important functions of an organism are located.

Chymase increased activity in liver points to its possible synthesis or release. It may stipulate an increase

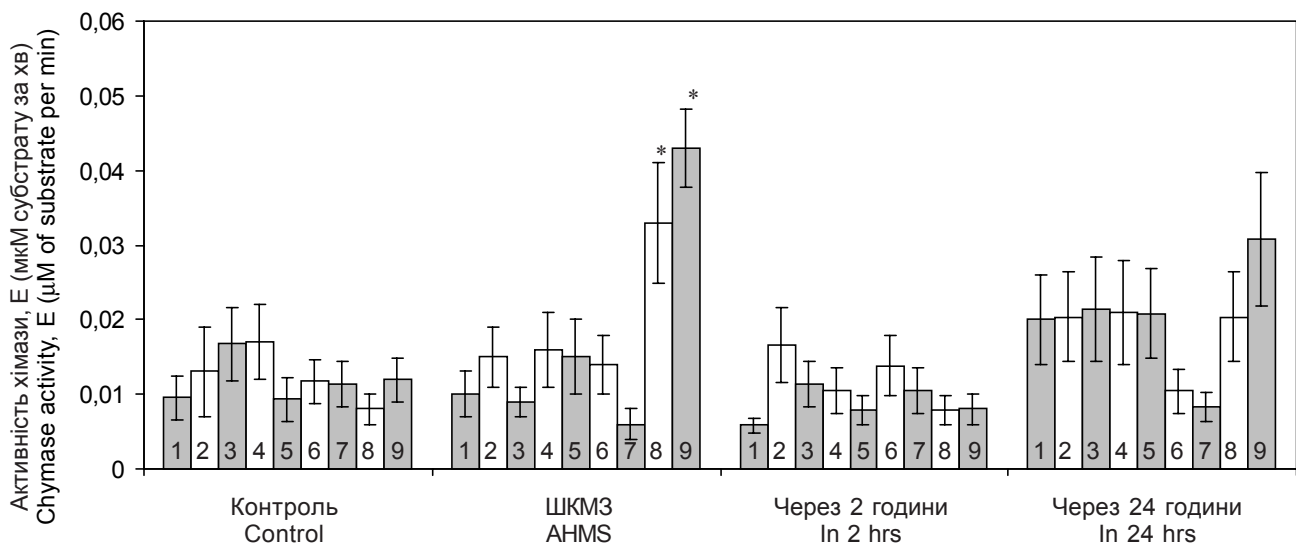


Рис. 1. Активність хімази при ШГМС у хом'яків: 1 – кора мозку; 2 – гіпоталамус, 3 – мозочок; 4 – стовбур мозку; 5 – сироватка крові; 6 – легені; 7 – серце; 8 – печінка; 9 – нирки; * – ступінь вірогідності відмінностей порівняно з контролем, $<0,05$.

Fig. 1. Activity of chymase at AHMS in hamsters: 1 – brain cortex; 2 – hypothalamus; 3 – cerebellum; 4 – brain stem; 5 – blood serum; 6 – lungs; 7 – heart; 8 – liver; 9 – kidneys; * – the probability of differences in respect of the control, <0.05 .

ся підвищеною в легенях (рис. 3). Слід зазначити, що активність кальпаїнів на етапі відновлення зростає в серці порівняно з ШГМС.

Таким чином, органами-мішенями у процесі формування ШГМС та відігрівання тварин є легені, серце, печінка, нирки, а також структури мозку, в яких розташовані ланки управління життєво важливими функціями організму.

Зростання активності хімази в печінці вказує на можливість її синтезу або вивільнення. Це може обумовлювати підвищення її активності в інших органах, а саме в нирках, де хімаза хом'яків здатна приймати участь в утворенні АІІ з АІ і призводить до розвитку вазоконстрикторних ефектів [16, 25]. Відносно зростання середнього артеріального тиску (АТ) спостерігали у хом'яків при холодовій аклімації порівняно з гострим охолодженням, яке викликало суттєве зменшення АТ [15]. Характер змін при ШГМС після перебування в герметичній камері на холоді 3 години вказує на можливу потенційну близькість механізмів розвитку ШГМС та холодової аклімації стосовно вазоконстрикторних ефектів.

Зростання активності хімази, яке сприяє розвитку вазоконстрикції, відбувається на фоні зменшення участі тоніну у формуванні вказаного ефекту і може бути обумовлено витрачанням тоніну без включення синтетичних процесів або специфічності прояву активності опасистих клітин, які містять хімазу. Можна також припустити, що при ШГМС відбувається активація альтернативного шляху утворення АІІ не з ангіотензиногену, а з АІ, де саме хімаза проявляє свою активність.

У гібернаторів зниження активності ферментів, що обумовлене впливом низької температури,

of its activity in other organs, namely in kidneys, where chymase of hamsters is capable of taking part in the formation of АІІ from АІ and resulting, in the development of vasoconstrictor effects [16, 25]. Relative increase in average arterial pressure (AP) was observed during cold acclimation of hamsters if compared with an acute cooling leading to significant decrease of AP [15]. Character of changes at AHMS, caused by maintenance in insulated chamber on cold for 3 hrs, points to possible potential closeness of developmental mechanisms of AHMS and cold acclimation in respect of vasoconstrictor effects.

Increase of chymase activity, contributing to the development of vasoconstriction takes place on the background of reduced involvement of tonin in the formation of the mentioned effect, that may be stipulated by the loss of tonin without triggering of synthetic processes or specific manifestation of the activity of mass cells, containing chymase. It could be also supposed that at AHMS there is the activation of alternative pathway of АІІ formation not due to angiotensinogen, but АІ, where the chymase manifests its activity.

In hibernators the reduced activity of enzymes, resulted from the effect of low temperatures, is associated to the decrease in intensity of protein synthesis, proteolysis suppression [2]. Taking into account, that reduced activity of tonin at AHMS found by us in blood serum and inner organs of hamsters being a facultative hibernators has no manifested tissue-specific effect in contrast to chimase activity, the mentioned changes of tonin activity may be referred to the very effect of temperature in hibernators.

The found tendency to the increase of tonin activity in cerebellum at early stage of recovery coincides with

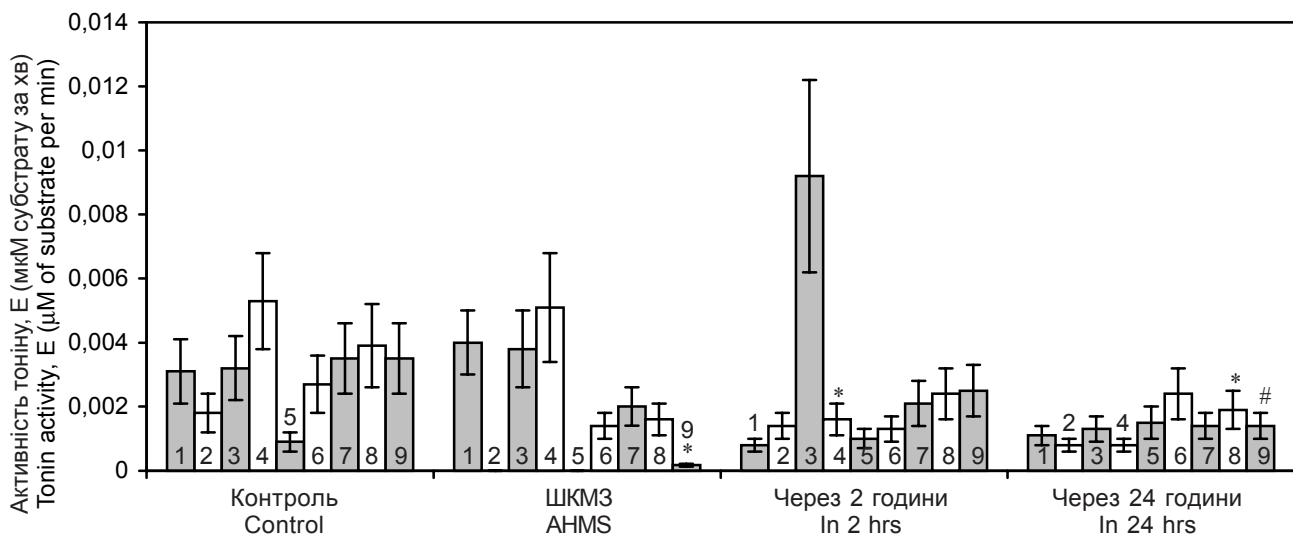


Рис. 2. Активність тоніну при ШГМС у хом'яків: 1 – кора мозку; 2 – гіпоталамус, 3 – мозочок; 4 – стовбур мозку; 5 – сироватка крові; 6 – легені; 7 – серце; 8 – печінка; 9 – нирки; *, # – ступінь вірогідності відмінностей порівняно з контролем, <0,05, <0,001 відповідно.

Fig. 2. Activity of tonin at AHMS in hamsters: 1 – brain cortex; 2 – hypothalamus; 3 – cerebellum; 4 – brain stem; 5 – blood serum; 6 – lungs; 7 – heart; 8 – liver; 9 – kidneys; *, # – the probability of differences in respect of the control. <0.05, <0.001, correspondingly.

пов'язують зі зменшенням інтенсивності синтезу білка, пригніченням протеолізу [2]. Враховуючи, що зниження активності тоніну при ШГМС, відзначене нами у сироватці крові і внутрішніх органах хом'яків, які є факультативними гібернаторами, не має виразного тканиноспецифічного ефекту, на відміну від активності хімази. Вказані зміни активності тоніну можна пов'язати саме з ефектом зниження температури у гібернаторів.

Виявлена тенденція до зростання активності тоніну в мозочку на ранньому етапі після ШГМС співпадає з відновленням рухомої і поведінкової активності, що може бути пов'язано з відносною нормалізацією АТ [15].

Підвищення активності кальпаїнів, можливо, обумовлене розвитком гіпоксії і клітинного ушкодження [26]. Відомо, що протеоліз кальпаїнами і катепсинами, як і мітохондріальна дисфункція, збільшена генерація реактивних форм кисню, виснаження пулу аденозинтрифосфату, раннє порушення плазматичної мембрани є ознаками контрольованих процесів, які характеризують розвиток некрозу [18]. Кальпаїни руйнують структуру $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника, що призводить до порушення гомеостазу кальцію, затримки та перевантаження кальцієм і потім до смерті клітин [10]. Таким чином, зростання активності кальпаїнів за умов ШГМС може бути пов'язане не тільки з індукцією апоптозу, що обумовлено розвитком оксидативного стресу [3, 13], але й з участю кальпаїнів у розвитку некрозу [18].

Зростання активності кальпаїнів у СМ при ШГМС може впливати на структури (пейсмейкери)

that of motory and behavioral activities, probably related to relative AP rise [15].

Rise in activity of calpains may be related to the development of hypoxia and cell damage [26]. It is known that proteolysis with calpains and cathepsins as well as mitochondrial dysfunction, increased generation of reactive oxygen forms, exhaustion of adenosinetriphosphate pool, early impairment of plasma membrane are the signs of controlled process, characterizing necrosis development [18]. Calpains destroy the structure of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger, that leads to disorder in calcium homeostasis, delay and overloading with calcium and afterwards to cell death [10]. Thus, rise in activity of calpains at AHMS may be related not only to induction of apoptosis, resulted from the development of oxidative stress, but also to participation of calpains in necrosis development [18].

Rise in activity of calpains in BS at AHMS may affect the structures (pacemakers) of respiratory, cardiovascular centers, ascending activating system, responsible for organization of consciousness, the majority of sensor pathways, all motion paths, transmitting the signals from regulators of brain cortex. The mentioned changes in BS may affect the functions of sympathetic and parasympathetic efferent fibers of neurons of non-specific nervous centers, which code the functions of all systems of an organism. The level of activity of calpains in BS at late recovery stage in comparison with the control may point to the fact that 24hrs' staying of animals under normal temperatures and oxygen supply are sufficient for normalization of regulatory processes of functioning of organs (lungs, heart) associated to the participation of calpains in the

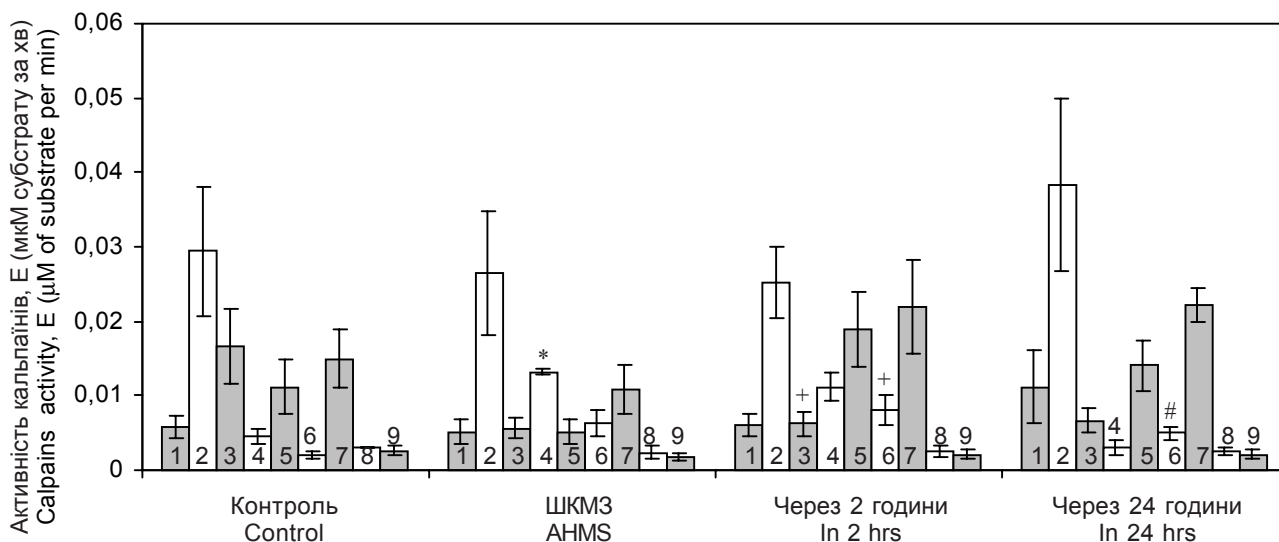


Рис. 3. Активність кальпаїнів при ШГМС у хом'яків: 1 – кора мозку; 2 – гіпоталамус, 3 – мозочок; 4 – стовбур мозку; 5 – сироватка крові; 6 – легені; 7 – серце; 8 – печінка; 9 – нирки; *, #, + – ступінь вірогідності відмінностей порівняно з контролем, <0,05, <0,01, <0,001 відповідно.

Fig. 3. Activity of calpains at AHMS in hamsters: 1 – brain cortex; 2 – hypothalamus; 3 – cerebellum; 4 – brain stem; 5 – blood serum; 6 – lungs; 7 – heart; 8 – liver; 9 – kidneys; *, #, + – the probability of differences in respect of the control. < 0.05, < 0.01, 0.001, correspondingly.

дихального, серцево-судинного центрів, на висхідну активуючу систему, відповідальну за організацію свідомості, більшість сенсорних шляхів, усі рухові шляхи, що передають сигнали управління від регуляторів півкуль головного мозку. Вказані зміни у СМ можуть впливати на активність симпатичних і парасимпатичних еферентних волокон нейронів неспецифічних нервових центрів, які кодують функції усіх систем організму. Рівень активності кальпаїнів у СМ на пізньому етапі відновлення порівняно з контролем може вказувати на те, що 24 години перебування тварин в нормальних умовах температури і кисневого постачання достатні для нормалізації регуляторних процесів функціонування внутрішніх органів (легень, серця), пов'язаних з участю кальпаїнів у розвитку апоптогенних та/або некротичних змін, які виникають при ШГМС.

Зростання активності кальпаїнів у легенях після ШГМС на ранньому та пізньому етапах відновлення обумовлене, скоріше за все, тим, що гіпоксія може призводити до напруженості в діафрагмі. Як наслідок, може змінюватися сила дихальних м'язів, розвиватися втома при збільшеній їх активації [20]. Слід відзначити, що з порушеннями функцій кальпаїнів пов'язують наявність мускульних дистрофій [27], а з активацією кальпаїнів – пошкодження м'язових тканин, спричинене оксидативним стресом [7, 22].

Зростання активності кальпаїнів у серці на ранньому та пізньому етапах відновлення, порівняно з ШГМС, може бути обумовлено участю кальпаїна 1, який необхідний для деградації багатьох білків і залучається до протеосомної деградації міокар-

development of apoptogenic and/or necrotic changes appearing at AHMS.

Increased activity of calpains in lungs after AHMS at early and late stages of recovery is stipulated rather the fact that hypoxia may lead to the tension in diaphragm. As a result the strength of respiratory muscles may alter, fatigue develops at their activation [20]. It should be emphasized that the presence of muscular dystrophies is associated with damaged functions of calpains [27], and impaired tissue of muscles is due to oxidative stress with calpain activation [7, 22].

Enhanced activity of calpains in heart at early and late stages of recovery in comparison with AHMS may be stipulated by the participation of calpain 1 being necessary for degradation of numerous proteins and is involved into proteosome degradation of myocardial proteins [17]. Their abnormal accumulation result in the creation of autophagosomes and degeneration of cardio-myocytes with functional decompensation, resulting in the development of cardiovascular dysfunction [23].

Conclusions

Development of AHMS in hamsters results in multidirectional changes of activity of enzymes with alternative pathways of AII formation, chymase, tonin. Chymase activity increases in liver and kidneys on the background of reducing tonin activity, moreover the alterations of tonin activity have no manifested tissue-specific effect. These changes are partially normalized after 2hrs' staying of animals under normal temperature, oxygen supply and light. The activity of calcium-dependent proteinases (calpains) increases due

діальних білків [17]. Їх аномальна акумуляція призводить до утворення аутофагосом і дегенерації кардіоміоцитів з функціональною декомпенсацією, в результаті чого розвивається серцево-судинна дисфункція [23].

Висновки

Розвиток ШГМС у хом'яків призводить до різноспрямованих змін активності ферментів альтернативних шляхів утворення АП – хімази, тоніну. Активність хімази зростає в печінці і нирках на фоні зниження активності тоніну, до того ж зміни активності тоніну не мають виразного тканино-специфічного характеру. Ці зміни частково нормалізуються після 2 годин перебування тварин в нормальних температурних умовах, при достатньому кисневому постачанні й освітленості. Активність кальційзалежних протеїназ (кальпаїнів) зростає за умов ШГМС у СМ і нормалізується через 24 години; активність кальпаїнів залишається підвищеною в легенях через 2 години і в серці через 24 години відновлення.

Література

1. *Виноградова Р.П.* Одиниці вимірювання активності ферментів // Укр. біохім. журн.– 1999.– Т. 71, №2.– С. 96-99.
2. *Калабухов Н.И.* Спячка млекопитающих. – М.: Наука, 1985.– 264 с.
3. *Калиман П.А., Самохин А.А., Самохина Л.М.* Активность Ca^{2+} -зависимых нейтральных протеиназ в органах крыс при введении им хлоридов кобальта и ртути // Укр. біохім. журн.– 2003.– Т. 75, №1.– С. 104-106.
4. *Малая Л.Т., Горб Ю.Г.* Хроническая сердечная недостаточность: достижения, проблемы, перспективы.– Харьков, 2002.– 768 с.
5. *Мельничук С.Д., Мельничук Д.О.* Гіпобіоз тварин (молекулярні механізми та практичне значення для сільського господарства і медицини).– Київ, 2007.– 220 с.
6. *Самохина Л.М., Самохин А.А.* Химазы, тонин и эластаза у крыс при окислительном стрессе, вызванном введением хлорида кобальта // Укр. біохім. журн.– 2001.– Т. 73, №5.– С. 47-51.
7. *Сологуб Л.І., Пашковська І.С., Антопяк Г.Л.* Протеази клітин та їх функції. – Київ: Наук. думка, 1992.– 194 с.
8. *Тимофеев Н.Н., Прокопьева Л.П.* Нейрохимия гипобоза и пределы криорезистентности организма.– М.: Медицина, 1997.– 208 с.
9. *Пат. України №34208 G01N33/48, A61B19/02.* Набір для визначення активності хімази в біологічних рідинах / Л.М.Самохіна; Заявлено 15.06.99; Опубл. 15.12.2003; Бюл. № 12.
10. *Araujo I.M., Carreira B.P., Pereira T. et al.* Changes in calcium dynamics following the reversal of the sodium-calcium exchanger have a key role in AMPA receptor-mediated neurodegeneration via calpain activation in hippocampal neurons // *Cell. Death. Differ.*– 2007.– Vol. 14, N9.– P. 1635-1646.
11. *Araujo R.C., Lima M.P., Lomez E.S. et al.* Tonin expression in the rat brain and tonin-mediated central production of angiotensin II // *Physiol. Behav.*– 2002.– Vol.76, N2.– P. 327-333.

to AHMS in BS normalizes in 24 hrs; activity of calpains remains increased in lungs in 2 hrs and in heart in 24 hrs of recovery.

References

1. *Vinogradova R.P.* Units of measuring enzyme activity// *Ukr. Biochim. Zhurn.*– 1999.– Vol. 71, N2.– P. 96-99.
2. *Kalabukhov N.I.* Mammal's hibernation.– Moscow: Nauka, 1985.– 264 p.
3. *Kaliman P.A., Samokhin A.A., Samokhina L.M.* Activity of Ca^{2+} -dependent neutral proteinases in rat's organs when introducing of cobalt and mercury chlorides to them // *Ukr. Biochim. Zhurn.*– 2003.– Vol. 71, N2.– P. 96-99.
4. *Malaya L.T., Gorb Yu.G.* Chronic cardiac insufficiency: achievements, problems, perspectives.– Kharkov, 2002.– 768 p.
5. *Melnichuk S.D., Melnichuk D.O.* Hypobiosis of animals (molecular mechanisms and practical value for agriculture and medicine).– Kyiv, 2007.– 220 p.
6. *Samokhina L.M., Samokhin A.A.* Chimase, tonin and elastase in rats at oxidative stress caused by introduction of cobalt chloride // *Ukr. Biochim. Zhurn.*– 2001.– Vol. 73, N5.– P. 47-51.
7. *Sologub L.I., Pashkovska I.S., Antonyak G.L.* Proteases of cells and their functions.– Kyiv: Naukova dumka, 1992.– 194 p.
8. *Timofeev N.N., Prokopyeva L.P.* Neurochemistry of hypobiosis and limit of organism cryoresistance.– Moscow: Meditsina, 1997.– 208 p.
9. *Patent of Ukraine N 34208 G01N33/48, A61B19/02.* Kit for testing chimase activity in biological fluids/ L.M. Samokhina, Applied 15.06.99. Publ. 15.12.2003. Bul. 12.
10. *Araujo I.M., Carreira B.P., Pereira T. et al.* Changes in calcium dynamics following the reversal of the sodium-calcium exchanger have a key role in AMPA receptor-mediated neurodegeneration via calpain activation in hippocampal neurons // *Cell. Death. Differ.*– 2007.– Vol. 14, N 9.– P. 1635-1646.
11. *Araujo R.C., Lima M.P., Lomez E.S. et al.* Tonin expression in the rat brain and tonin-mediated central production of angiotensin II // *Physiol. Behav.*– 2002.– Vol.76, N2.– P. 327-333.
12. *Berlett B.S., Stadtman E.R.* Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress // *J. Biol. Chem.*– 1997.– Vol. 272, N33.– P. 20313-20316.
13. *Blagojevic D.R.* Antioxidant systems in supporting environmental and programmed adaptations to low temperatures // *Cryo Letters.*– 2007.– Vol. 28, N3.– P. 137-150.
14. *Borges J.C., Silva J.A., Gomes M.A. et al.* Tonin in rat heart with experimental hypertrophy // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*– 2003.– Vol. 284, N6.– P. H2263-H2268.
15. *Deveci D., Egginton S.* Effects of acute and chronic cooling on cardiorespiratory depression in rodents // *J. Physiol. Sci.*– 2007.– Vol. 57, N1.– P. 73-79.
16. *Fukami H., Okunishi H., Miyazaki M.* Chymase: its pathophysiological roles and inhibitors // *Curr. Pharm. Des.*– 1998.– Vol. 4, N6.– P. 439-453.
17. *Galvez A.S., Diwan A., Odley A.M. et al.* Cardiomyocyte degeneration with calpain deficiency reveals a critical role in protein homeostasis // *Circ. Res.*– 2007.– Vol. 100, N7.– P. 1071-1078.
18. *Golstein P., Kroemer G.* Cell death by necrosis: towards a molecular definition // *Trends. Biochem. Sci.*– 2007.– Vol. 32, N1.– P. 37-43.
19. *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, N3.– P. 525-530.

12. Berlett B.S., Stadtman E.R. Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress // *J. Biol. Chem.*– 1997.– Vol. 272, N33.– P. 20313-20316.
13. Blagojevic D.R. Antioxidant systems in supporting environmental and programmed adaptations to low temperatures // *Cryo Letters.*– 2007.– Vol. 28, N3.– P. 137-150.
14. Borges J.C., Silva J.A., Gomes M.A. et al. Tonin in rat heart with experimental hypertrophy // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*– 2003.– Vol. 284, N6.– P. H2263-H2268.
15. Deveci D., Egginton S. Effects of acute and chronic cooling on cardiorespiratory depression in rodents // *J. Physiol Sci.*– 2007.– Vol. 57, N1.– P. 73-79.
16. Fukami H., Okunishi H., Miyazaki M. Chymase: its pathophysiological roles and inhibitors // *Curr. Pharm. Des.*– 1998.– Vol. 4, N6.– P. 439-453.
17. Galvez A.S., Diwan A., Odley A.M. et al. Cardiomyocyte degeneration with calpain deficiency reveals a critical role in protein homeostasis // *Circ. Res.*– 2007.– Vol. 100, N7.– P. 1071-1078.
18. Golstein P., Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition // *Trends. Biochem. Sci.*– 2007.– Vol. 32, N1.– P. 37-43.
19. 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, N3.– P. 525-530.
20. Khoury E.R., O'Halloran K., Bradford A. Effects of chronic hypobaric hypoxia on contractile properties of rat sternohyoid and diaphragm muscles // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*– 2003.– Vol. 30, N8.– P. 551-554.
21. Kim M.J., Oh S.J., Park S.H. et al. Hypoxia-induced cell death of HepG2 cells involves a necrotic cell death mediated by calpain // *Apoptosis.*– 2007.– Vol. 12, N4.– P. 707-718.
22. Kishimoto S., Sakon M., Umeshita K. et al. The inhibitory effect of prostaglandin E1 on oxidative stress-induced hepatocyte injury evaluated by calpain-mu activation // *Transplantation.*– 2000.– Vol. 69, N11.– P. 2314-2319.
23. McCollum A.T., Jafarifar F., Lynn B.C. et al. Inhibition of calpain-mediated cell death by a novel peptide inhibitor // *Exp. Neurol.*– 2006.– Vol. 202, N 2.– P. 506-513.
24. Miyazaki M., Takai S. Tissue angiotensin II generating system by angiotensin-converting enzyme and chymase // *J. Pharmacol. Sci.*– 2006.– Vol. 100.– P. 391-397.
25. 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, N3.– P. 227-233.
26. Tamada Y., Walkup R.D., Shearer T.R., Azuma M. Contribution of calpain to cellular damage in human retinal pigment epithelial cells cultured with zinc chelator // *Curr. Eye. Res.*– 2007.– Vol. 32, N6.– P. 565-573.
27. Tidball J.G., Spenser M.J. Calpains and muscular dystrophies // *Int. J. Biochem. Cell Biol.*– 2000.– Vol. 32, N1.– P. 1-5.
28. Weir M.R., Dzau V.J. The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management // *Am. J. Hypertens.*– 1999.– Vol.12, N3.– P. 205-213.
20. Khoury E.R., O'Halloran K., Bradford A. Effects of chronic hypobaric hypoxia on contractile properties of rat sternohyoid and diaphragm muscles // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*– 2003.– Vol. 30, N8.– P. 551-554.
21. Kim M.J., Oh S.J., Park S.H. et al. Hypoxia-induced cell death of HepG2 cells involves a necrotic cell death mediated by calpain // *Apoptosis.*– 2007.– Vol. 12, N4.– P. 707-718.
22. Kishimoto S., Sakon M., Umeshita K. et al. The inhibitory effect of prostaglandin E1 on oxidative stress-induced hepatocyte injury evaluated by calpain-mu activation // *Transplantation.*– 2000.– Vol. 69, N11.– P. 2314-2319.
23. McCollum A.T., Jafarifar F., Lynn B.C. et al. Inhibition of calpain-mediated cell death by a novel peptide inhibitor // *Exp. Neurol.*– 2006.– Vol. 202, N 2.– P. 506-513.
24. Miyazaki M., Takai S. Tissue angiotensin II generating system by angiotensin-converting enzyme and chymase // *J. Pharmacol. Sci.*– 2006.– Vol. 100.– P. 391-397.
25. 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, N3.– P. 227-233.
26. Tamada Y., Walkup R.D., Shearer T.R., Azuma M. Contribution of calpain to cellular damage in human retinal pigment epithelial cells cultured with zinc chelator // *Curr. Eye. Res.*– 2007.– Vol. 32, N6.– P. 565-573.
27. Tidball J.G., Spenser M.J. Calpains and muscular dystrophies // *Int. J. Biochem. Cell Biol.*– 2000.– Vol. 32, N1.– P. 1-5.
28. Weir M.R., Dzau V.J. The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management // *Am. J. Hypertens.*– 1999.– Vol.12, N3.– P. 205-213.

Accepted in 24.09.2007

Надійшла 24.09.2007