

Активность протеиназ и их ингибиторов при искусственном гипометаболическом состоянии у крыс.

А.В. Шило¹, В.В. Ломако¹, Л.М. Самохина², Г.А. Бабийчук¹

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

²Институт терапии им. Л.Т. Малой АМН Украины, г. Харьков

Proteinases and Its Inhibitor Activity at Artificial Hypometabolic State in Rats

SHILO A.V.¹, LOMAKO V.V.¹, SAMOKHINA L.M.², BABIYCHUK G.A.¹

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

²Institute of Therapy named after L.T. Malaya of the Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkov

Исследовали активность протеиназ, нетрипсиноподобных протеиназ (НТПП), α -1-ингибитора протеиназ (α -1-ИП) и α -2-макроглобулина (α -2-МГ) в сыворотке крови, тканях коры и ствола мозга, гипоталамуса, мозжечка, легких, сердца, печени и почек крыс при искусственном гипометаболическом состоянии (ИГМС), достигаемом методом Анджуca-Бахметьева-Джайя. Выявлены разнонаправленные изменения показателей активности системы протеиназа-ингибитор протеиназ: общая активность протеиназ незначительно повышалась, α -1-ИП оказался устойчивым к воздействию, в то время как НТПП и α -2-МГ проявили высокую чувствительность к факторам, вызывающим ИГМС. Наблюдаемая при ИГМС активация протеолиза происходит в основном за счет увеличения активности НТПП и снижения уровня α -2-МГ во всех изученных тканях. Через 24 ч после воздействия уровень исследуемых показателей возвращается к исходному, исключение составляют органы, возможно, претерпевающие максимальную нагрузку в процессе развития ИГМС.

Ключевые слова: искусственное гипометаболическое состояние, протеиназы, ингибиторы протеиназ, мозг, периферические ткани.

Досліджували активність протеїназ, нетрипсиноподібних протеїназ (НТПП), α -1-інгібітора протеїназ (α -1-ІП) і α -2-макроглобуліну (α -2-МГ) у сироватці крові, тканинах кори і стовбура мозку, гіпоталамуса, мозочка, легень, серця, печінки і нирок щурів при штучному гіпометаболічному стані (ШГМС), що досягається методом Анджуca-Бахметьева-Джайя. Виявлено різноспрямовані зміни показників активності системи протеїназа-інгібітор протеїназ: загальна активність протеїназ незначно підвищувалася, α -1-ІП виявився стійким до впливу, у той час як НТПП і α -2-МГ проявили високу чутливість до факторів, що викликають ШГМС. Активация протеолізу, що спостерігається при ШГМС, відбувається в основному за рахунок збільшення активності НТПП і зниження рівня α -2-МГ у всіх вивчених тканинах. Через 24 г після впливу рівень досліджуваних показників повертається до вихідного, за виключенням органів, що, можливо, перетерплюють максимальне навантаження в процесі розвитку ШГМС.

Ключові слова: штучний гіпометаболічний стан, протеїнази, інгібітори протеїназ, мозок, периферичні тканини.

The proteinases, nontrypsin-like proteinases (NTLP), α -1-proteinase inhibitor (α -1-IP) and α -2-macroglobulin (α -2-MG) activities in serum, tissues of cerebral cortex, brain stem, hypothalamus, cerebellum, lung, heart, liver and kidneys in rats under the artificial hypometabolic state (AHMS) attained by Andjus-Bakhmetiev-Giaja methods have been studied. Multidirectional changes of the indices of proteinase-inhibitor proteinase activity were revealed: total activity of proteinases slightly increased, the α -1-IP activity were stable to the influence, while the NTLP and α -2-MG activities demonstrated high sensitivity to the AHMS induced factors. Observing at AHMS the proteolysis activation mainly connected to increasing non-trypsin-like enzymes and α -2-MG level reducing in all examined tissues. In 24 hrs after AHMS the levels of the studied indices in general turned to initial levels with exception in organs which may have the maximum loading at AHMS development.

Key-words: artificial hypometabolic state, proteinases, inhibitors of proteinases, brain, peripheric tissues.

Гипометаболические состояния (ГМС), характеризующиеся обратимым снижением обменных процессов, широко распространены в природе. К триггерным факторам развития естественных ГМС относят: понижение температуры, изменение газового состава окружающей среды, уменьшение длительности светового периода суток, изменение пищевого режима и др. [6]. Изучение особенностей биохимических процессов при таких состояниях, а также на этапе восстановления представляет

Hypometabolic states (HMS) which are characterized by a reversible suppression in metabolic processes are widely found in nature. Such factors as the temperature fall, alteration of the gas content in environment, lessening of light period of a day, change of meals schedule etc. [6] may be related to trigger factors of natural HMS state development. Studying the peculiarities of biochemical processes at such states, as well as at the stage of recovery is known to be one of the current cryobiology problems. Creation

Адрес для корреспонденции: Шило А.В., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 772-29-35, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Shilo A.V., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7722935, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

одну из наиболее актуальных проблем криобиологии. Создание же способов достижения состояний с глубоким подавлением метаболизма гомеотермного организма с резким снижением пластических и энергетических затрат, но в то же время легко обратимых, безопасных, без патологических последствий имеет как общебиологическое, так и практическое значение.

Известно, что при угнетении метаболизма могут происходить разнонаправленные изменения, в частности, скорости ферментативных реакций, процессов синтеза и распада белков. В реализации этих процессов особую роль играют протеолитические ферменты, которые не только участвуют в гидролизе белковых молекул до аминокислот, но и образуют активные формы ферментов из неактивных предшественников (ограниченный протеолиз), благодаря чему с помощью каскадного механизма регулируются многие важнейшие процессы в организме (свертывание крови, фибринолиз, образование и распад биопептидов, контролирующая тонус сосудов, артериальное давление, деятельность мозга и др.) [2]. Обладая высокой активностью, протеолитические ферменты могут представлять и потенциальную опасность для белковых структур органов и тканей, поэтому наличие специфических ингибиторов протеолиза является одним из важных, хотя и не единственным, способом контроля активности протеиназ.

Существующее в норме динамическое равновесие между протеолитическими ферментами и их ингибиторами может нарушаться при развитии патологических состояний, старении организма, влиянии экстремальных факторов [5, 7, 10-12, 18]. При этом меняется активность как обоих компонентов равновесия, так и отдельных его составляющих: например, эмоциональный стресс вызывает активацию протеолитических процессов без изменения уровня ингибиторов в крови [14], старение организма приводит к снижению интенсивности протеолиза и росту ингибиторного потенциала [10].

Цель работы – изучение интенсивности реакций ограниченного протеолиза в системе протеиназа-ингибитор протеиназ при ИГМС у крыс.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на 7-8-месячных крысах-самцах линии Вистар массой 180-200 г в зимний период времени. Животных содержали в условиях вивария, где они получали стандартный рацион с добавлением зерен пшеницы и семян подсолнечника. Гипометаболическое состояние у крыс вызывали по методу Анджуза-Бахметьева-Джайя [8, 15]: в течение 3 ч выдерживали в герметично закрытом сосуде (объемом 3 дм³),

of the methods of reaching the states with a deep metabolism suppression of homoiothermal organism with a dramatic decrease of plastic and energetic expenditures, which are easily reversible, safe, with no pathological complications is at the same time of both fundamental and practical value.

During metabolism suppression the various alterations are known to occur, in particular, the rates of enzymic reactions, the processes of degradation and protein synthesis. In the realization of these processes the main role is known to be played by proteolytic enzymes, which participate in hydrolysis of protein molecules to amino acids, but also form active enzyme forms from inactive precursors (a limited proteolysis), due to this the majority of important processes in an organism (blood coagulation, fibrinolysis, biopeptide formation and degradation) are regulated by a cascade mechanism which control the vessels tonus, blood pressure, brain activity etc. [2]. Proteolytic enzymes possessing a high activity may be potentially dangerous for protein structures, organs and tissues, and therefore, the presence of specific inhibitors of proteolysis is thought to be one of the important, but not a single way to control the proteinase activity.

The present in norm equilibrium between proteolytic enzymes and their inhibitors may be impaired during pathological state's development, an organism aging, under the effect of extreme factors [5, 7, 10-12, 18]. Thereat the activity of both equilibrium components and changes in some its parts, for example, the emotional stress was noted to cause the activation of proteolytic processes with no changes in the level of inhibitors in blood [14], an organism aging results in a decrease of proteolysis intensity and growth of inhibitory potential [10].

The aim of the work is studying the reactions intensity of a limited proteolysis in proteinase-inhibitor system during an AHMS in rats.

Materials and methods

Experiments were carried-out in 7-8 months' Wistar male-rats with the weight of 180-200g during winter period. The animals were kept under vivarium conditions and had their standard meals with adding wheat grain and sunflower seeds. Hypometabolic state in rats was induced according to Andjus-Bakhmetiev-Giaja method [8, 15] by keeping them in a sealed tank (3dm³) during 3 hrs placed into a dark cold chamber under the temperature of 3-5°C. Under the effect of developing hypercapnia, hypoxia and under low temperature conditions AHMS similar to natural hibernation on some physiological indices (movelessness, insensitivity to tactile and pain stimuli, body temperature decrease, dramatic heart rate slowing down, brain bioelectrical activity suppression) were noted to develop in the animals. Animals were removed

помещенном в темную холодную камеру, при температуре 3-5°C. Под влиянием развивающейся гиперкапнии, гипоксии и в условиях низкой температуры среды у животного развивалось ИГМС, сходное по ряду физиологических показателей (обездвиживание, нечувствительность к тактильным и болевым стимулам, снижение температуры тела, резкое замедление частоты сердечных сокращений, угнетение биоэлектрической активности мозга) с естественной гибернацией. Затем животное извлекали из сосуда и переводили в условия с нормальным газовым составом воздуха и температурой 22-24°C. Последующий контроль за состоянием животного осуществляли по показателям температуры тела, а также кардио- и энцефалографии, которые через электроэнцефалограф BST-1 и аналогово-цифровой преобразователь записывались на жесткий диск персонального компьютера в режиме on-line для визуального мониторинга и последующей обработки (данные не приводятся). Через 2 ч состояние и поведение животного по ряду показателей (груминг, двигательная активность, пищедобывательный рефлекс) не отличались от контрольных.

Животные были разбиты на 4 группы (в каждой группе по 6 крыс): 1 – контроль; 2 – ИГМС (через 3 ч пребывания в герметичном сосуде на холоде); 3 – ранний этап восстановления (через 2 ч после ИГМС); 4 – поздний этап восстановления (через 24 ч после ИГМС).

Эксперименты были проведены в соответствии с “Общими этическими принципами экспериментов на животных”, одобренными Первым национальным конгрессом по биоэтике (20 сентября 2001 г., Киев, Украина) и согласованными с положениями “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1985 г.), а также согласно рекомендациям раздела “Принципы использования животных” из “Руководства к дотациям и контрактам Национального института здравоохранения США” (1975 г.).

Забой животных осуществляли путем декапитации. В сыворотке крови, гомогенатах тканей гипоталамуса, коры мозга и ствола мозга, мозжечка, легкого, сердца, печени и почек определяли общую активность протеиназ (ОАП), активность нетрипсиноподобных протеиназ (НТПП), уровень α -1-ингибитора протеиназ (α -1-ИП) и α -2-макроглобулина (α -2-МГ) высокочувствительным (10^{-9} - 10^{-10} г) ферментативным методом, разработанным в Институте терапии АМН Украины [12]. Уровень исследуемых показателей оценивали по изменению активности маркерного фермента (пероксидаза хрена) и рассчитывали в микроэквивалентах задействован-

out of the tank afterwards and put under the conditions with normal air gas content and the temperature of 22-24°C. Further control over the animals' state was accomplished according to the body temperature indices, as well as cardio- and encephalogram, the data of those were recorded to computer via BST-1 encephalographer and an analogue-digital converter in an online regimen for visual monitoring and further processing (data not presented). In 2 hrs the animal's state and behavior according to the series of the data (grooming, moving activity, food procuring reflex) were noted to be the same as in the control.

The animals were divided into 4 groups (6 rats in each group): control animals made the 1st group; the 2nd one was composed of AHMS animals (in 3 hrs of staying in a sealed tank in cold); the 3rd group was made of the animals with early recovery stage (in 2 hours after AHMS); the 4th group comprised the animals with late recovery stage (in 24hrs following AHMS).

Experiments were performed according to the “General Ethical Principles for Experiments in Animals” approved at the 1st National Congress on Bioethics (September, the 20th, 2001, Kiev, Ukraine) and consistent with the Notions of the “European Convention on Vertebrates Protection used for experimental and other research purposes” (Strasbourg, 1985), as well as according to recommendations of the Section “Principles for the use of animals” “Instructions for Grants and Contracts of the National Institute of Health care of the USA (1975)”.

The animals were decapitated. There was determined the total proteinase activity (TPA) in blood serum, tissue homogenates of hypothalamus, brain cortex and stem, cerebellum, lungs, heart, liver and kidneys, as well as the activity of non-trypsin-like proteinases (NTLP), the level of α -1-proteinase inhibitor (of α -1-PI) and of α -2-macroglobulin (of α -2-MG) using highly sensitive (10^{-9} - 10^{-10} g) enzymic method elaborated at the Institute for Therapy of the Academy of Medical Sciences of Ukraine [12]. The level of the indices studied was evaluated on the activity change of the marker enzyme (horse radish peroxidase) and calculated in microequivalents of the chemical bonds used [4] during 1 min. When carrying-out the investigations there were used polystyrene stripe plates (Russia) and Stat Fax mono-channel microspectrophotometer (USA).

Statistical processing was accomplished on Student-Fisher's method.

Results and discussion

Development of AHMS caused by a combined effect of hypoxia, hypercapnia, decreased temperature and darkness, results in a dramatic temperature fall in animal body down to $16.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$. In this case there is

ных химических связей [4] за 1 мин. При проведении исследований использовали полистироловые стриповые планшеты (Россия) и одноканальный микроспектрофотометр Stat Fax (США).

Статистическая обработка проведена по методу Стьюдента-Фишера.

Результаты и обсуждение

Развитие ИГМС, вызванное сочетанным влиянием гипоксии, гиперкапнии, пониженной температуры и темноты, приводит к значительному падению температуры тела животных до $16,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$. При этом наблюдается тенденция к повышению ОАП во всех изученных тканях, наиболее выражено в сердце, печени и почках (рис. 1). Несколько иная динамика была отмечена при исследовании активности НТПП (рис. 2). Развитие ИГМС приводит к угнетению их активности во всех образцах, кроме сыворотки крови.

Активность α -1-ИП – одного из основных ингибиторов протеиназ – оставалась неизменной как в тканях мозга, так и на периферии (рис. 3), тогда как другого ингибитора – α -2-МГ – снижалась в структурах мозга и печени, не изменяясь в сыворотке крови, легких, почках и сердце (рис. 4).

Для выяснения направленности изменений в системе протеиназа-ингибитор протеиназ рассчитывали различные соотношения: ОАП/ α -1-ИП, НТПП/ α -1-ИП, ОАП/ α -2-МГ и НТПП/ α -2-МГ. Так, оказалось, что изменение соотношения ОАП/ α -1-ИП (кроме ствола мозга) и ОАП/ α -2-МГ (рис. 5, 6) свидетельствует о незначительной активации протеолиза в организме при ИГМС: в первом случае за счет роста ОАП по сравнению с неизменным уровнем активности α -1-ИП и во втором – за счет роста ОАП и угнетения активности α -2-МГ. Анализ соотношения НТПП/ α -2-МГ (рис. 6) позволил выявить активацию протеолиза в печени, гипоталамусе, незначительно в мозжечке, тогда как в других тканях отмечено его угнетение. При этом отношение НТПП/ α -1-ИП (рис. 7) указывает на снижение протеолиза во всех тканях, обусловленное угнетением активности НТПП.

Таким образом, развитие ИГМС ведет к незначительной активации протеолиза за счет увеличения уровня трипсиноподобных протеиназ (уровень ОАП повышается, активность НТПП падает). Наблюдается некоторая спе-

the tendency to TPA in all the studied tissues, especially in heart, liver and kidneys (Fig. 1). Different dynamics was noted when studying NTLP (Fig. 2). AHMS development resulted in their activity suppression in all the samples except blood serum.

Activity of α -1-PI as one of the major proteinase inhibitors remained unchanged both in brain tissues and the periphery (Fig. 3), while of another inhibitor, α -2-MG, it was noted to decrease in brain and liver structures, with no change in blood serum, lungs and heart (Fig. 4).

To reveal the direction of changes in the proteinase-proteinase-inhibitor system there were calculated different ratios: TPA/ α -1-PI, NTLP/ α -1-PI, TPA/ α -2-MG and NTLP/ α -2-MG. The change in the TPA/ α -1-PI and TPA/ α -2-MG ratio was found to testify to a slight proteolysis activation in an organism at AHMS: in the 1st case it occurred due to the TPA growth, in the 2nd one also because of the TPA growth and suppression of the α -2-MG activity. Analysis of the NTLP/ α -2-MG ratio (Fig. 6) allowed to reveal the proteolysis activation in liver, hypothalamus, insignificantly in cerebellum, while in other tissues there was noted its suppression. Thereat NTLP/ α -1-IP ratio (Fig. 7) points to the proteolysis decrease in all the tissues stipulated by the NTLP activity suppression.

Thus the AHMS development results in a slight proteolysis activation because of the increase in the level of trypsin-like proteinases (TPA level was noted to rise, NTLP activity falls). One observes a certain specificity in the reacting of NTLP- α -2-MG system on the factors inducing HMS.

After returning the animals to the conditions with normal gas content and temperature within 2 hrs' spontaneous warming, recovery of the moving activity,

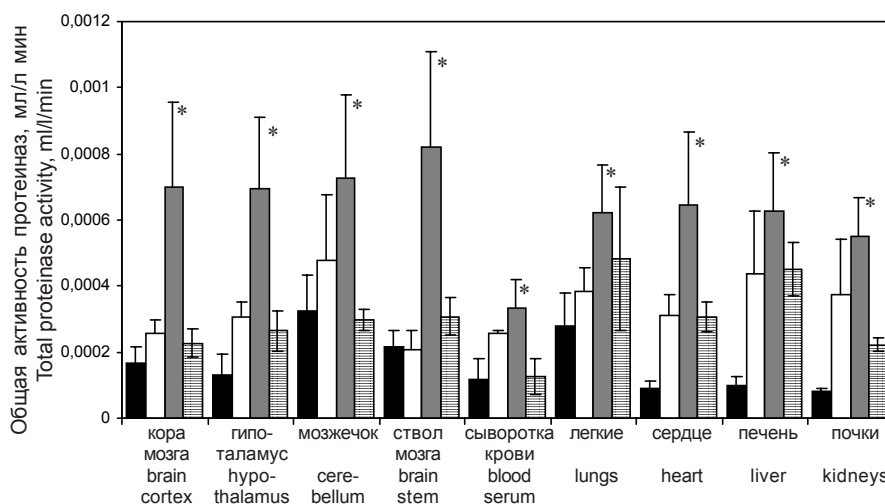


Рис.1. Общая активность протеиназ. ■ – контроль; □ – ИГМС; ▒ – через 2 ч после ИГМС; ▨ – через 24 ч после ИГМС; * – различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Fig. 1. Total proteinase activity. ■ – control; □ – AHMS; ▒ – 2hrs after AHMS; ▨ – 24hrs after AHMS; * – statistically significant changes comparing to the control ($p < 0.05$).

цифичность реагирования системы НТПП- α -2-МГ на факторы, индуцирующие ГМС.

После перевода животных в условия с нормальным газовым составом и температурой в течение 2 ч происходят самопроизвольные отогрев, восстановление двигательной активности, груминга и пищедобывательного рефлекса. Восстановление чувствительности терморегуляторного аппарата приводит к активации процессов несократительного и сократительного термогенеза и повышению температуры тела до $33,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5$.

Наиболее выражено возрастание ОАП в структурах ЦНС (см. рис. 1). Резко возрастает активность НТПП (см. рис. 2) во всех изученных структурах (за исключением ствола мозга), превышая исходный уровень в коре мозга, гипоталамусе и мозжечке. При этом активность α -1-ИП (см. рис. 3) понижается во всех тканях, более выражено в структурах ЦНС, тогда как активность α -2-МГ (см. рис. 4), наоборот, резко повышается, превышая исходные уровни. Недостоверные изменения активности α -2-МГ по сравнению с контролем обнаружены в мозжечке, печени и почках.

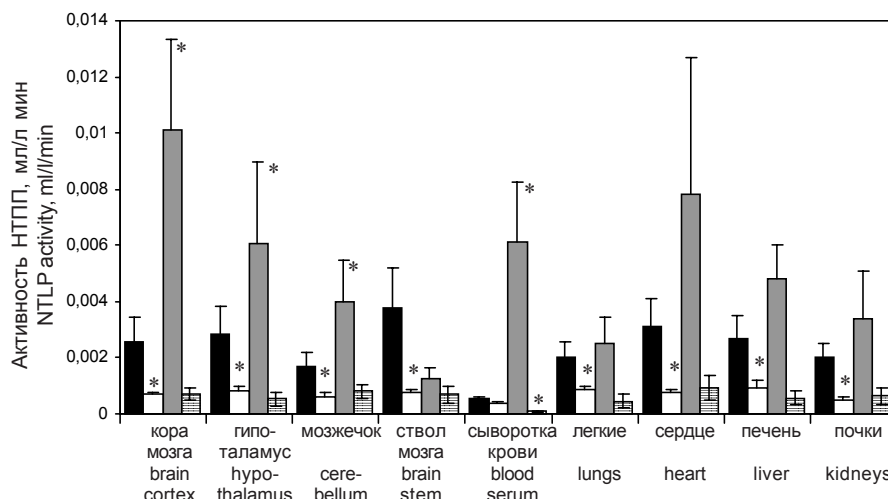


Рис. 2. Активность НТПП. ■ – контроль; □ – ИГМС; ▒ – через 2 ч после ИГМС; ▨ – через 24 ч после ИГМС; * – различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Fig. 2. NTPP activity. ■ – control; □ – AHMS; ▒ – 2hrs after AHMS; ▨ – 24hrs after AHMS; * – statistically significant changes comparing to the control ($p < 0.05$).

grooming and food-procuring reflex were noted to occur. Recovery of the thermoregulatory apparatus sensitivity results in the activation of non-shivering and shivering thermogenesis and the body temperature increase up to $33.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5$. TPA rise was noted to be the most manifested in CNS structures (excluding brain stem), exceeding the initial level in brain cortex, hypothalamus and cerebellum. Thereat the α -1-IP activity (Fig. 3) decreases in all the tissues, more manifestly in CNS structures, while the α -2-MG activity (Fig. 4) in contrast, sharply increases, exceeding the initial levels. Insignificant comparing to the control changes of α -2-MG activity were found in cerebellum, liver and kidneys.

Changes in the TPA/ α -1-IP and NTPP/ α -1-IP ratio (Fig. 5, 7) testify to the proteolysis activation. TPA/ α -2-MG coefficient (Fig. 8) returns to the initial level. The NTPP/ α -2-MG (Fig. 6) changes are tissue-specific: it falls in brain cortex, hypothalamus, brain stem, lungs, heart and liver, and remains unchanged in blood serum and kidneys, slightly increases in cerebellum. In this case if in TPA/ α -1-IP system one notes a slight disbalance (TPA increases, α -1-IP falls) that might explain the rise in proteolytic activity, then the NTPP growth is quite successfully restrained by a simultaneous increase in α -2-MG activity.

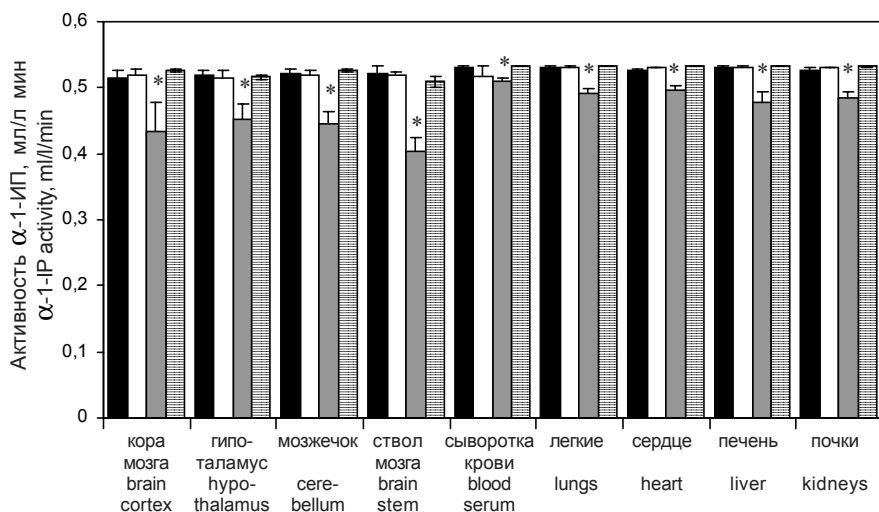


Рис. 3. Активность α -1-ИП. ■ – контроль; □ – ИГМС; ▒ – через 2 ч после ИГМС; ▨ – через 24 ч после ИГМС; * – различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Fig. 3. α -1-IP activity. ■ – control; □ – AHMS; ▒ – 2hrs after AHMS; ▨ – 24hrs after AHMS; * – statistically significant changes comparing to the control ($p < 0.05$).

Изменения соотношений ОАП/ α -1-ИП и НТПП/ α -1-ИП (см. рис. 5, 7) свидетельствуют об активации протеолиза. Коэффициент ОАП/ α -2-МГ (см. рис. 8) возвращается к исходному уровню. Коэффициент НТПП/ α -2-МГ (см. рис. 6) изменяется тканеспецифично: падает в коре мозга, гипоталамусе, стволе мозга, легких, сердце и печени, остается неизменным в сыворотке крови и почках, несколько возрастает в мозжечке.

При этом, если в системе ОАП/ α -1-ИП отмечается незначительная разбалансировка (ОАП растет, α -1-ИП падает), что, по-видимому, и объясняет повышение протеолитической активности, то рост НТПП достаточно хорошо сдерживается одновременным повышением активности α -2-МГ.

Следовательно, через 2 ч после ИГМС происходит частичное истощение ингибиторного потенциала (по сравнению с контролем и гипобиозом), обусловленное участием α -1-ИП, что приводит к дальнейшему росту ОАП и резкому возрастанию НТПП. Ведущая роль в ограничении роста протеолитической активности переходит к α -2-МГ. Характерно, что подобная активация протеолиза отмечена для холодого [12] и адреналового [11] стрессов.

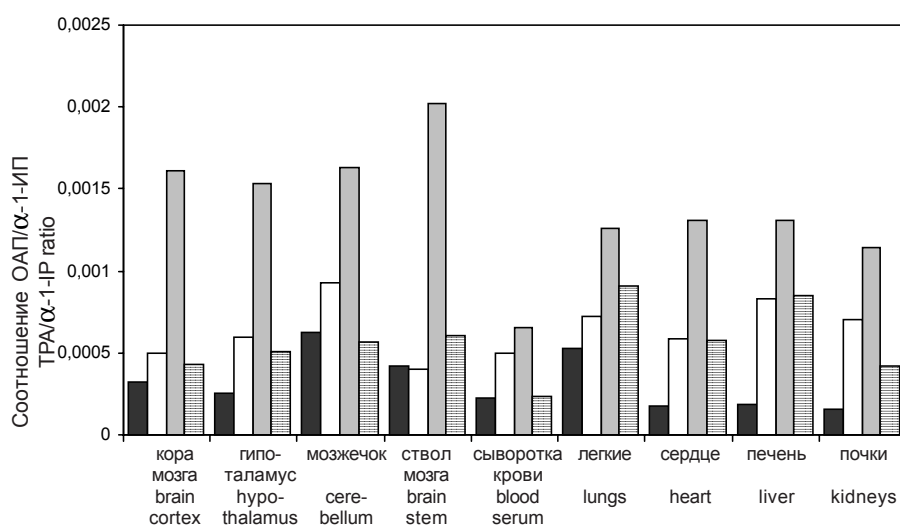


Рис. 5. Изменение соотношения ОАП/ α -1-ИП. ■ – контроль; □ – ИГМС; ▒ – через 2 ч после ИГМС; ▨ – через 24 ч после ИГМС.
Fig. 5. Changes in TPA/ α -1-IP ratio. ■ – control; □ – AHMS; ▒ – 2hrs after AHMS; ▨ – 24hrs after AHMS.

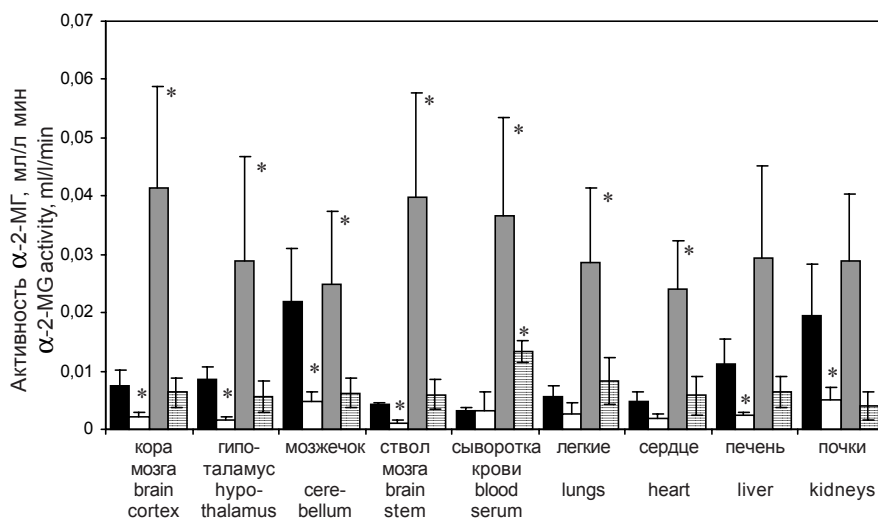


Рис. 4. Активность α -2-МГ. ■ – контроль; □ – ИГМС; ▒ – через 2 ч после ИГМС; ▨ – через 24 ч после ИГМС; * – различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Fig. 4. α -2-MG activity. ■ – control; □ – AHMS; ▒ – 2hrs after AHMS; ▨ – 24hrs after AHMS; * – statistically significant changes comparing to the control ($p < 0.05$).

So in 2 hrs after AHMS a partial depletion of the inhibitory potential occurs (comparing to the control and hypobiosis) stipulated by the α -1-IP participation, that results in the further TPA growth and sharp increase of NTLP. Leading role in the growth limitation of proteolytic activity is passed to α -2-MG. It is characteristic that such a proteolysis activation is noted both under cold [12] and adrenal [11] stresses.

In 24 hrs following experimental effect the system of proteinases and their inhibitors is mainly restored to the initial state, excluding the organs, which might undergo the maximum loading during the AHMS.

Late period of an organism recovery (24 hrs after the effect) is characterised by a stable tendency to normalization of all the indices of proteolytic activity. TPA restores to normal values in brain structures, blood serum and lungs, remaining decreased in a certain degree in heart, liver and kidneys, that might reflect incomplete reparative processes in these organs. TPA/ α -1-IP coefficient (Fig. 5) is approaching to the control values in brain structures and blood serum, but slightly increases the latter on periphery. The values of NTLP/ α -1-IP coefficient (Fig. 7) is getting less than the norm, that, probably, reflects the recovery of the α -1-IP inhibitory potential.

Через 24 ч после экспериментального воздействия система протеиназ и их ингибиторов в основном возвращается к исходному состоянию, исключение составляют органы, которые, возможно, претерпевают максимальную нагрузку в процессе развития ИГМС.

Поздний период восстановления организма (через 24 ч после воздействия) характеризуется устойчивой тенденцией к нормализации всех изученных показателей протеолитической активности. К контрольным величинам ОАП возвращается в структурах мозга, сыворотке крови и легких, оставаясь несколько повышенной в сердце, печени и почках, что, возможно, отражает незавершенность репаративных процессов в этих органах. Коэффициент ОАП/ α -2-ИП (см. рис. 5) приближается к контрольным значениям в структурах мозга и сыворотке крови, но несколько превышает последние на периферии. Значения коэффициента НТПП/ α -1-ИП (см. рис. 7) становятся ниже нормы, что, возможно, отражает восстановление ингибиторного потенциала α -1-ИП.

Активность НТПП также восстанавливается до контрольных величин во всех изученных тканях, за исключением сыворотки крови (см. рис. 2). Возвращаются к исходному уровню и ингибиторы

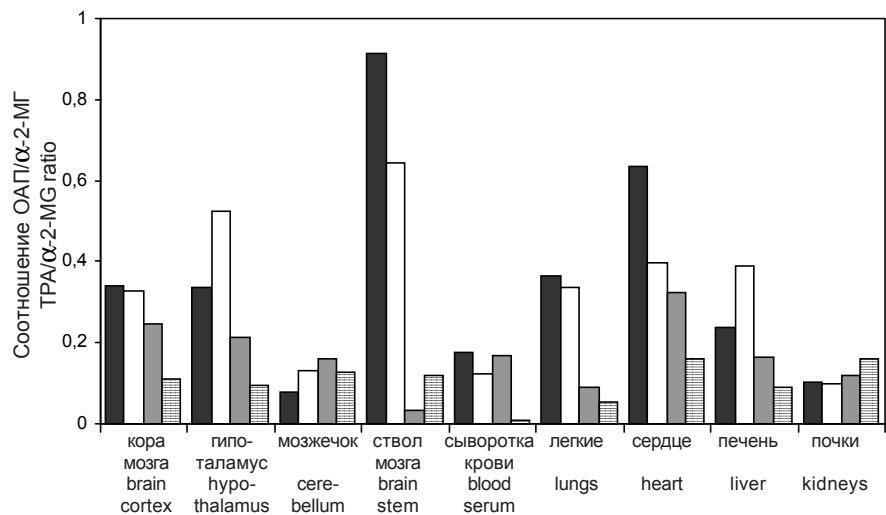


Рис. 6. Изменение соотношения ОАП/ α -2-ИП. ■ – контроль; □ – ИГМС; ▒ – через 2 ч после ИГМС; ▨ – через 24 ч после ИГМС.

Fig. 6. Changes in TPA/ α -2-MG ratio. ■ – control; □ – AHMS; ▒ – 2hrs after AHMS; ▨ – 24hrs after AHMS.

NTLP activity recovered as well up to the control values in all the tissue studied but blood serum (Fig. 2). Proteinase inhibitors are also restoring to the initial level, the only exclusion is α -2-MG in blood serum, which, in contrast, was found to exceed the control level.

Nevertheless, the NTLP/ α -2-MG coefficient (Fig. 6) falls lower than the control values (excluding cerebellum, blood serum and kidneys), that, probably, means that the recovery is not completed yet in this regulation link of NTLP activity.

AHMS in rats achieved by Anjus-Bakhmetiev-Giaia method [8,15] is accompanied by the series of changes in an organism, characteristic for the development of such natural HMS as torpor, hibernation.

Developing during this state hypoxia both itself and at simultaneous cold effect is known to cause a significant body temperature decrease [13,17], that may result in adaptive modifications of protein molecules [19], the activity change of different enzymic systems [16,], promote a heat shock protein synthesis (HSP) which may bind to α -1-IP influencing its activity [12]. In addition, under cold effect the inhibitors degradation is known to occur [1]. Intensification of lipid peroxidation processes characteristic for hypothermia and hypoxia development, activation of oxidative stress

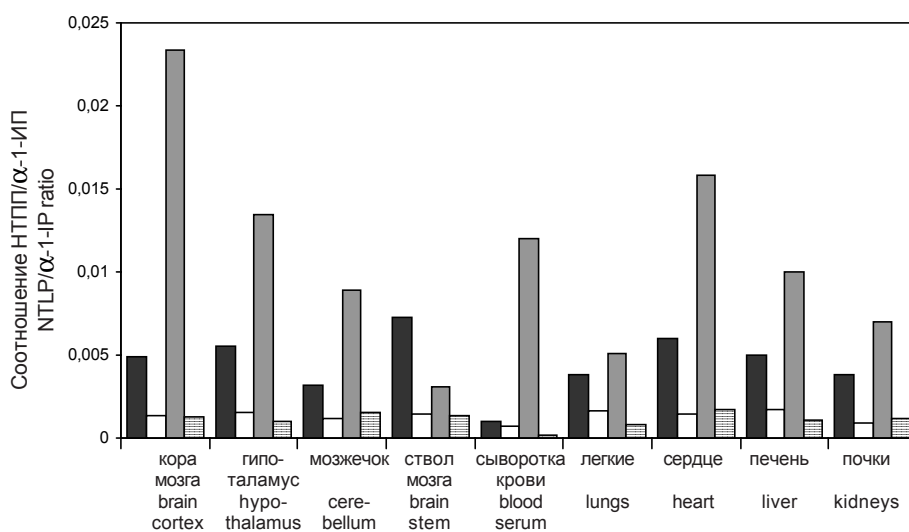


Рис. 7. Изменение соотношения НТПП/ α -1-ИП. ■ – контроль; □ – ИГМС; ▒ – через 2 ч после ИГМС; ▨ – через 24 ч после ИГМС.

Fig. 7. Changes in NTLP/ α -1-IP ratio. ■ – control; □ – AHMS; ▒ – 2hrs after AHMS; ▨ – 24hrs after AHMS.

протеиназ, исключение составляет α -2-МГ в сыворотке крови, который, наоборот, превышает контрольный уровень.

Тем не менее коэффициент НТПП/ α -2-МГ (см. рис. 6) падает ниже контрольных значений (за исключением мозжечка, сыворотки крови и почек), что по-видимому, свидетельствует о незавершенности восстановления этого звена регуляции активности НТПП.

У крыс ИГМС, достигаемое методом Анджуса-Бахметьева-Джайя [8, 15], сопровождается рядом изменений в организме, характерных для развития таких природных ГМС, как торпор, зимняя спячка. Развивающаяся при этом гипоксия сама по себе и при одновременном воздействии холода приводит к значительному снижению температуры тела [13, 17], что может вызывать адаптивные модификации белковых молекул [19], изменение активности различных ферментативных систем [16], способствовать синтезу белков теплового шока (БТШ), которые могут связываться с α -1-ИП, влияя на его активность [12]. Кроме того, как показано в [1], под действием холода происходит разрушение ингибиторов. Усиление процессов перекисного окисления липидов, характерное для развития гипотермии и гипоксии, активация оксидативного стресса, вероятно, являются дополнительной причиной снижения ингибиторной активности, в частности α -2-МГ [7]. Что касается α -1-ИП, то окисление метионина в его активном центре приводит к снижению лишь эластазоингибиторной активности, а трипсин-ингибиторная (определяемая в нашем случае) сохраняется [2].

Снижение активности α -1-ИП после восстановления температуры тела также может быть обусловлено накоплением дефектных молекул, синтезом БТШ и их связыванием с α -1-ИП (в большей степени в структурах мозга).

Известно, что α -2-МГ принимает участие в защитных механизмах, направленных на угнетение, связывание и удаление вредных для организма пептидаз эндогенного происхождения (ферменты каскада свертывания крови, повреждения тканей, очагов воспаления) [3], и является ингибитором, который первым включается в подавление избыточной активности протеиназ. Можно предположить, что указанные факторы непосредственно

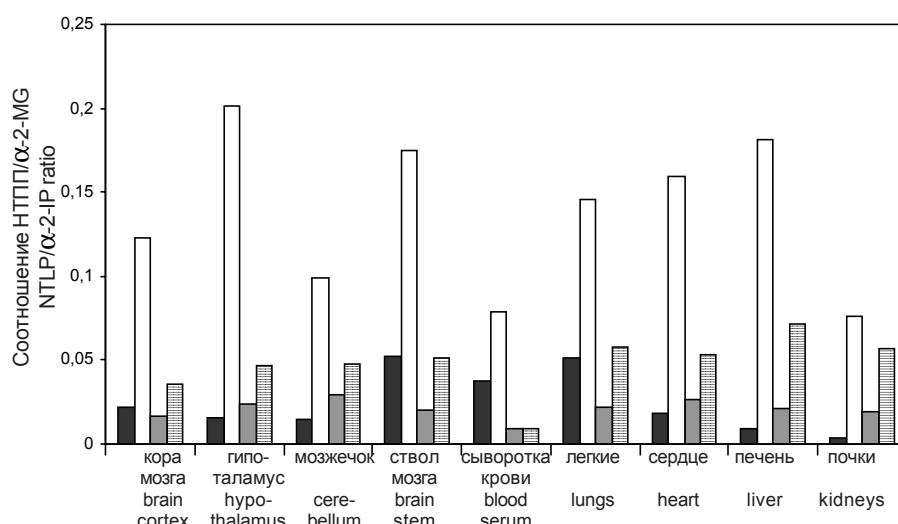


Рис. 8. Изменение соотношения НТПП/ α -1-МГ. ■ – контроль; □ – ИГМС; ▒ – через 2 ч после ИГМС; ▨ – через 24 ч после ИГМС.

Fig. 8. Changes in NTPP/ α -2-MG ratio. ■ – control; □ – AHMS; ▒ – 2hrs after AHMS; ▨ – 24hrs after AHMS.

are thought to be an extra cause of inhibitor activity decrease, in particular, of α -2-MG [7]. In terms of α -1-IP, methionine oxidation in its active center results in the fall of just elastase-inhibitory activity, but trypsin-inhibitory activity is kept [2].

The activity fall of α -1-IP following the body temperature recovery may be also stipulated by the defect molecule accumulation, HSP synthesis and their binding with α -1-IP (mainly in brain structures).

α -2-MG is known to participate in the protective mechanisms directed to the suppression, binding and removal of harmful for an organism peptidases of endogenous origin (enzymes of blood coagulation cascade, tissue damaging, inflammation foci) [3] and to be an inhibitor which is primarily included into the suppression of excessive proteinase activity. The factors mentioned may be supposed to directly stipulate its decrease at AHMS. In addition α -2-MG inhibitor possesses unique characteristic: it does not activate the proteinases completely, but, while binding with make them more resistant to the effect of other inhibitors [1,3]. Absence of remarkable α -1-IP changes at the background of a significant decrease of α -2-MG testifies to the fact that under given conditions α -2-MG itself takes the main role of regulating the proteinase activity.

Considerable decrease of α -2-MG is known to possess negative consequences as well during the AHMS prolongation, as this kind of inhibitor participates in blood coagulation control by providing a major part of anti-thrombin potential [3], and the decrease of α -2-MG level may result in vascular thrombosis, loading increase on blood circulation system at AHMS development.

Maximum changes at AHMS development and arousal were noted to occur in the NTPP activity,

обуславливают его снижение при ИГМС. Кроме того, ингибитор α -2-МГ обладает уникальным свойством: он не инактивирует протеиназы полностью, а, связываясь с ними, делает их более устойчивыми к действию других ингибиторов [1, 3]. Отсутствие заметных изменений α -1-ИП на фоне существенного снижения α -2-МГ свидетельствует о том, что в данных условиях именно α -2-МГ берет на себя основную функцию регулирования активности протеиназ.

Значительное снижение активности α -2-МГ имеет и негативные последствия при пролонгировании ИГМС, так как данный ингибитор принимает участие в контроле свертываемости крови, обеспечивая значительную часть антитромбинового потенциала [3], и снижение уровня α -2-МГ может привести к тромбозу сосудов, повышению нагрузки на систему кровообращения при развитии ИГМС.

Максимальные изменения при развитии ИГМС и выходе из него происходят в активности НТПП, что дает основание делать вывод об их особой роли в данных условиях. Синхронные изменения активности протеиназ и их ингибиторов во всех изученных тканях, очевидно, свидетельствуют об общем механизме их вовлечения в данный процесс. Как отмечалось выше, причиной таких изменений могут являться падение температуры тела, изменение концентраций O_2 и CO_2 , развивающийся респираторный ацидоз: при этом в развитии и поддержании ГМС именно гиперкапнии принадлежит важная роль, обуславливающая изменения как pH, так и pCO_2 , HCO_3^- в тканях [8]. На существенную роль ацидоза в повышении протеолитической активности указывают и другие авторы [9].

Сходная динамика снижения активности НТПП и α -2-МГ также свидетельствует об инактивации/выведении НТПП (в частности химазы) из организма и чувствительности к вышеперечисленным условиям ИГМС комплексов НТПП/ α -2-МГ. Хотя нельзя отрицать и тот факт, что это снижение, по видимому, обусловлено большей специфичностью α -2-МГ в подавлении активности именно НТПП (в частности химазы тучных клеток).

Выводы

Таким образом, ИГМС, полученное по методу Анджуса-Бахметьева-Джайя, приводит к разнонаправленному изменению показателей протеолитической активности: ОАП незначительно повышалась, α -1-ИП оказался устойчивым к комбинированному воздействию, тогда как НТПП и α -2-МГ проявили высокую чувствительность к факторам, вызывающим ИГМС. При этом

giving the reason to conclude about their special role under these conditions. Synchronic changes of proteinases and their inhibitors' activity in all the tissue under study are thought to testify to a general mechanism of their involving in this process. As it was mentioned above, a body temperature fall, change of O_2 and CO_2 e concentrations, developing respiratory acidosis may be considered as the cause of such changes: thereat in the development and maintenance of HMS an important role belongs to hypercapnia itself, which stipulates the changes of both pH and CO_2 , and HCO_3^- in tissues [8]. Other authors also point to a strong acidosis role in the increase of proteolytic activity [9].

Similar dynamics of the NTLP and α -2-MG activity reduction is also thought to testify to the inactivation of the NTLP (of chemase, in particular) removal out of an organism and sensitivity to the mentioned above AHMS conditions of NTLP/ α -2-MG complexes. However we should not deny the fact that this fall might be stipulated by a higher specificity of α -2-MG in the suppression of namely NTLP (in particular, of mast cell chemase).

Conclusions

Thus AHMS achieved according to Anjus-Bakhmetiev-Giaja method was noted to cause a multi-directed alteration of the indices of proteolytic activity: TPA slightly increased, α -1-IP was found to be resistant to a combined effect, while NTLP and α -2-MG manifested a high sensitivity to the factors caused AHMS. In this case the proteolysis activation occurs mainly due to the increase of trypsin-like enzymes level and the fall of α -2-MG level.

Single-direction of NTLP and α -2-MG changes is thought to testify to the direct participation of α -2-MG in the NTLP activation control during the AHMS development and arousal. Thereat the reduction of NTLP/ α -2-MG ratio at the background of NTLP and α -2-MG activation as a result of warming may point to the rise of α -2-MG inhibitory activity.

Compensatory activation of α -2-MG at early recovery stage may be caused by the necessity of an organism protection against the excessive NTLP activity, chemase, which is known to possess, in particular, vasoconstrictory characteristics. The increase of NTLP/ α -1-IP ratio and the fall of NTLP/ α -2-MG testifies to the leading role of α -2-MG in the NTLP activity control and their removal out of an organism.

An animal warming within 2 hrs after the AHMS development promotes the rise in proteinase activity in brain tissues, accompanied by the fall of α -1-IP level and the increase of α -2-MG, that proves the reactions intensity of a limited proteolysis and α -1-IP expenditures, which may be the result of the defect molecules' accumulation, HSP synthesis and its binding with

активация протеолиза происходит в основном за счет увеличения уровня трипсиноподобных ферментов и снижения уровня α -2-МГ.

Однонаправленность изменений НТПП и α -2-МГ, вероятно, указывает на непосредственное участие α -2-МГ в контроле активности НТПП при развитии и выходе из ИГМС. При этом снижение соотношения НТПП/ α -2-МГ на фоне активации НТПП и α -2-МГ в результате отогрева может свидетельствовать о повышении ингибиторного потенциала α -2-МГ.

Компенсаторная активация α -2-МГ на раннем этапе восстановления, возможно, обусловлена необходимостью защитить организм от избыточной активности нетрипсиноподобной протеазы-химазы, обладающей, в частности, вазоконстрикторными свойствами. Повышение соотношения НТПП/ α -1-ИП и снижение НТПП/ α -2-МГ указывают на ведущую роль α -2-МГ в контроле активности НТПП и их выведении из организма.

Отогрев животного в течение 2 ч после развития ИГМС способствует повышению активности протеиназ в тканях мозга, сопровождающемся снижением уровня α -1-ИП и повышением α -2-МГ, что указывает на интенсивность реакций ограниченного протеолиза и расходование α -1-ИП, возможно, обусловленное накоплением дефектных молекул, синтезом БТШ и его связыванием с ними, контролирование избыточной активности НТПП-химазы с помощью α -2-МГ.

Однонаправленная тенденция к нормализации активности протеолитических ферментов и их ингибиторов отмечается через 24 ч после ИГМС, что свидетельствует о завершении репаративных процессов в организме.

Литература

1. Веремеенко К.Н. Ингибиторы протеолиза – защитные белки крови // *Врачебное дело.* – 1987. – №5. – С. 45-48.
2. Веремеенко К.Н., Голобородько О.П., Кизим А.И. Протеолиз в норме и при патологии. – Киев: Здоров'я, 1988. – 200 с.
3. Веремеенко К.Н., Кизим А.И., Колесник Л.А. α -2-макроглобулин и механизм его взаимодействия с протеиназами // *Вестник АМН Украины.* – 1984. – №8. – С. 60-64.
4. Виноградова Р.П. Одиниці вимірювання активності ферментів // *Укр. біохім. журн.* – 1999. – Т. 71, №2. – С. 96-99.
5. Гончаров А.Ю., Кизильштейн А.Л., Цыбульский И.Е., Лукаш А.И. Изменение протеолитической активности тканей при старении // *Укр. биохим. журн.* – 1990. – №2. – С. 47-53.
6. Калабухов Н.И. Спячка млекопитающих. – М.: Наука, 1985. – 264 с.
7. Калиман П.А., Самохин А.А., Самохина Л.М. Система протеиназа-ингибитор протеиназ у крыс при оксидативном стрессе, вызванном введением хлорида кобальта // *Укр. биохим. журн.* – 2000. – №1. – С. 89-92.

them, and controlling the excessive NTLP activity, chemase, by α -2-MG.

Single-directed tendency to the activity normalization of proteolytic enzymes and their inhibitors is noted in 24 hrs following AHMS, that testifies to the completion of reparative processes in an organism.

References

1. Veremeenko K.N. Proteolysis inhibitors as the blood protective proteins // *Vrachebnoe delo.* – 1987. – N5. – P. 45-48.
2. Veremeenko K.N., Goloborod'ko O.P., Kizim A.I. Proteolysis in the norm and pathology. – Kiev: Zdorovya, 1988. – 200 p.
3. Veremeenko K.N., Kizim A.I., Kolesnik L.A. α -2-macroglobulin and the mechanism of its interaction with proteinases // *Vestnik AMNU.* – 1984. – N8. – P. 60-64.
4. Vinogradova R.P. Measuring units of enzyme activity // *Ukr. Biokhim. Zhurnal.* – 1999. – Vol.71, N2. – P. 96-99.
5. Goncharov A.Yu., Kizilstein A.L., Tsybulsky I.E., Lukash A.I. Change of proteolytic activity in tissues during aging // *Ukr. Biokhim. zhurnal.* – 1990. – N2. – P. 47-53.
6. Kalabukhov N.I. Hibernation of mammals. – Moscow: Nauka, 1985. – 264 p.
7. Kaliman P.A., Samokhin A.A. Proteinase-proteinase-inhibitor system in rats during oxidative stress caused by cobalt chloride injection // *Ukr. Biokhim Zhurnal.* – 2000. – N1. – P. 89-92.
8. Melnichuk S.D. Hypercapnia as a factor of metabolism regulation in animals at the state of natural and artificial hypobiosis: Author's thesis abstract for candidate's degree obtaining. – Kiev, 1995. – 16 p.
9. Rappoport E.A., Kazaryan V.A. Adaptational-pathological changes of skeletal muscles at atrophic reactions and their apparatus and pharmacological correction: Abstract to the report at All Union Scientific Conference "Applied aspects of studying of skeletal, cardiac and smooth muscles". – Puschino, 1996. – P. 71-72.
10. Samokhina L.M., Babichuk G.A., Poznakhareva I.A., Samokhin A.A. Proteinase-proteinase inhibitor system in rats of different age: Abstract of the Report "Scientific heritage of Academician I.N. Bulankin and its development in current biochemistry". – Kharkov, 2001. – P. 154-155.
11. Samokhina L.M., Kaliman P.A. Adrenal stress effect on proteinase activity and α -1-proteinase inhibitor in rats // *Ukr. Biokhim. Zhurnal.* – 1994. – N5. – P. 93-96.
12. Samokhina L.M., Starodub N.F. Proteinase activity and α -1-inhibitor at a cold stress // *Ukr. Biokhim. Zhurnal.* – 1993. – Vol. 65, N5. – P. 41-46.
13. Slonim A.D. Heterothermia and physiological homeostasis. Evolutional aspects of hypobiosis and hibernation / Edited by Krebs E.M. – Leningrad: Nauka, 1986. – P. 44-48.
14. Tarasenko L.M., Grebennikova V.F., Tarasenko V.G. et al. Proteinase and α -1-antitrypsin activity in tissues at emotional stress // *Fisiolog. Zhurnal.* – 1992. – Vol.38, N1. – P. 115-117.
15. Timofeev N.N., Prokopyeva L.P. Hypobiosis neurochemistry and the limits of an organism cryoresistance. – Moscow: Meditsina, 1997. – 208 p.
16. *Evolutional Physiology.* Part 1 / Ed. by E.M. Krebs. – Leningrad: Nauka, 1979. – 603 p.
17. Gordon C.J., Fogelson L. Comparative effects of hypoxia on behavioral thermoregulation in rats, hamsters and mice // *Am. J. Physiol.* – 1991. – Vol. 260. – P. R120-R125.

8. Мельничук С.Д. Гиперкапния как фактор регуляции обмена веществ у животных в состоянии естественного и искусственного гипобиоза: Автореф. дис... канд. биол. наук.– Киев, 1995.– 16 с.
9. Раппопорт Э.А., Казарян В.А. Адаптационно-патологические изменения скелетных мышц при атрофических реакциях и их аппаратурная и фармакологическая коррекция: Тез. докл. Всерос. науч. конф. "Прикладные аспекты исследований скелетных, сердечных и гладких мышц".– Пушино, 1996.– С. 71-72.
10. Самохина Л.М., Бабичук Г.А., Познахарева И.А., Самохин А.А. Система протеиназа-ингибитор протеиназ у крыс разного возраста: Тез. докл. "Научное наследие акад. И.Н.Буланкина и его развитие в современной биохимии".– Харьков, 2001.– С. 154-155.
11. Самохина Л.М., Калиман П.А. Влияние адреналового стресса на активность протеиназ и α -1-ингибитора протеиназ у крыс // Укр. биохим. журн.– 1994.– №5.– С. 93-96.
12. Самохина Л.М., Стародуб Н.Ф. Активность протеиназ и α -1-ингибитора при холодовом стрессе // Укр. биохим. журн.– 1993.– Т.65, №5.– С. 41-46.
13. Слоним А.Д. Гетеротермия и физиологический гомеостаз. Эволюционные аспекты гипобиоза и зимней спячки: Сб. трудов / Под ред. Е.М. Кребса.– Л.: Наука, 1986.– С. 44-48.
14. Тарасенко Л.М., Гребенникова В.Ф., Тарасенко В.Г. и др. Активность протеиназ и α -1-антитрипсина в тканях при эмоциональном стрессе // Физиолог. журн.– 1992.– Т. 38, №1.– С. 115-117.
15. Тимофеев Н.Н., Прокопьева Л.П. Нейрохимия гипобиоза и пределы криорезистентности организма.– М.: Медицина, 1997.– 208 с.
16. Эволюционная физиология. Ч. 1. / Под ред. Е.М. Кребса.– Л.: Наука, 1979.– 603 с.
17. Gordon C.J., Fogelson L. Comparative effects of hypoxia on behavioral thermoregulation in rats, hamsters and mice // Am. J. Physiol.– 1991.– Vol. 260.– P. R120-R125.
18. Kotyza J. Proteinases and antiproteinases: biomedical correlations // Bratisl. Lek. Listy.– 2000.– Vol. 101, N8.– P. 445-449.
19. Storey K.B., Storey J.M. Gene Expression and Protein Adaptations in Mammalian Hibernation / Life in the Cold.– Austria, Jungholz, 2000.– P. 303-313.

Accepted in 23.03.2003

Поступила 23.03.2004