

УДК 612.82:615.832.9:612.015.13:577.151.042

В.В. Ломако^{1*}, Л.М. Самохина², А.В. Шило¹, Г.А. Бабийчук¹

Краниocereбральная гипотермия стимулирует реакции ограниченного протеолиза в тканях крыс

UDC 612.82:615.832.9:612.015.13:577.151.042

V.V. Lomako^{1*}, L.M. Samokhina², A.V. Shylo¹, G.A. Babijchuk¹

Craniocerebral Hypothermia Stimulates Reactions of Limited Proteolysis in Rat Tissues

Реферат: Изучали влияние умеренного режима краниocereбральной гипотермии (КЦГ) 32°C на общую протеолитическую активность (ОПА), активность нетрипсиноподобных протеиназ (НТПП), а также их ингибиторов (α -1-ингибитора протеиназ (α -1-ИП) и α -2-макроглобулина (α -2-МГ)) в тканях центральной нервной системы (кора мозга, гипоталамус, мозжечок), периферических органов (сердце, легкие, печень, почки) и сыворотке крови крыс. Установлено, что при КЦГ во всех изученных образцах резко повышалась ОПА (на один-два порядка) и активность НТПП (в разы). При этом на фоне неизменного уровня α -1-ИП динамика активности α -2-МГ имела разнонаправленный и тканеспецифический характер, повышаясь в сыворотке крови, гипоталамусе, сердце, снижаясь в мозжечке и почках, а в остальных тканях она не изменялась. Через 24 ч высокий уровень ОПА сохранялся, активность НТПП в большинстве образцов возвращалась к исходной, α -1-ИП – снижалась только в коре мозга и гипоталамусе, а α -2-МГ – в гипоталамусе, мозжечке и почках, повышаясь в сердце и печени, в остальных образцах был исходный уровень. Резкая активация протеиназ при КЦГ, сохраняющаяся через 24 ч, сдвиг динамического равновесия между энзимами и ингибиторами могут отражать значительные перестройки в системах организма, направленные на реализацию защитных и терапевтических механизмов.

Ключевые слова: краниocereбральная гипотермия, общая протеолитическая активность, нетрипсиноподобные протеиназы, α -1-ингибитор протеиназ, α -2-макроглобулин, крысы.

Реферат: Вивчали вплив помірного режиму краниocereбральної гіпотермії (КЦГ) 32°C на загальну протеолітичну активність (ЗПА), активність нетрипсиноподібних протеїназ (НТПП), а також їх інгібіторів (α -1-інгібітора протеїназ (α -1-ІП) і α -2-макроглобуліну (α -2-МГ)) у тканинах центральної нервової системи (кора мозку, гіпоталамус, мозочок), периферичних органів (серце, легені, печінка, нирки) та сироватці крові щурів. Встановлено, що при КЦГ у всіх вивчених зразках різко підвищувалася ЗПА (на один-два порядки) і активність НТПП (у рази). При цьому на тлі незмінного рівня α -1-ІП динаміка активності α -2-МГ мала різноспрямований і тканинспецифічний характер, підвищуючись у сироватці крові, гіпоталамусі, серці, знижуючись у мозочку і нирках, а в інших тканинах вона не змінювалася. Через 24 години високий рівень ЗПА зберігався, активність НТПП у більшості зразків поверталася до початкової, α -1-ІП – знижувалася тільки в корі мозку та гіпоталамусі, а α -2-МГ – у гіпоталамусі, мозочку і нирках, підвищуючись у серці та печінці, в інших зразках спостерігався початковий рівень. Різка активація протеїназ, яка зберігається через 24 години після проведення КЦГ, зсув динамічної рівноваги між ензимами та інгібіторами можуть відображати значні перебудови в системах організму, спрямовані на реалізацію захисних і терапевтичних механізмів.

Ключові слова: краниocereбральна гіпотермія, загальна протеолітична активність, нетрипсиноподібні протеїнази, α -1-інгібітор протеїназ, α -2-макроглобулін, щури.

Abstract: The effect of moderate craniocerebral hypothermia (CCH) (32°C) on total proteinase activity (TPA), the activity of non-trypsin-like proteinases (NTLP) and their inhibitors (α -1-proteinase inhibitor (α -1-PI) and α -2-macroglobulin (α -2-MG) in the tissue samples of CNS (brain cortex, hypothalamus, cerebellum), peripheral organs (heart, lungs, liver, kidneys) and serum blood in rats was studied. In all the samples studied a sharp increase in the TPA (by one to two orders) and the NTLP activity (in several times) under CCH were observed. At the same time, against the background of constant α -1-PI activity the dynamics of the α -2-MG activity were multidirectional and tissue-specific: it was increased in blood serum, hypothalamus and heart, decreased in kidneys and cerebellum, and did not change in other tissues. Twenty four hours after the CCH application, the TPA remained at the same high activity level, the NTLP activity returned to baseline levels in the most samples, the activity of α -1-PI decreased only in the brain cortex and hypothalamus; the α -2-MG activity decreased in hypothalamus, cerebellum and kidneys, increased in liver and heart and returned to the baseline levels in other samples. The sharp proteinases activation, shift of the dynamic balance between enzymes and their inhibitors under CCH and in the recovery phase may indicate crucial changes in the organism systems aimed at implementation of protective and therapeutic mechanisms.

Key words: craniocerebral hypothermia, total proteinases activity, non-trypsin-like proteinases, α -1-proteinases inhibitor, α -2-macroglobulin, rat.

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

²ГУ «Национальный институт терапии имени Л.Т. Малой НАМН Украины», г. Харьков

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:

ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52,
электронная почта: victoria0regia@gmail.com

Поступила 31.05.2016

Принята в печать 29.06.2016

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2016. – Т. 26, №3. – С. 238–248.
© 2016 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

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

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

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavskaya str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 3737435, fax: +380 57 373 5952,
e-mail: victoria0regia@gmail.com

Received May, 31, 2016

Accepted June, 29, 2016

Probl Cryobiol Cryomed 2016; 26(3): 238–248.

© 2016 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

Комбинация нейровегетативной блокады и общего охлаждения организма (метод гибернотерапии), впервые использованная А. Лабори и П. Гюенаром в середине прошлого века [7], позволила существенно повысить эффективность лечения шоковых состояний и обеспечить время, необходимое для терапевтических мероприятий с целью предотвращения или уменьшения поражения центральной нервной системы (ЦНС) при тотальной ишемии и травме.

Общая гипотермия, кроме положительных (адекватное снижение уровня метаболизма и кровотока, защита тканей и клеток от гипоксии, предотвращение накопления или высвобождения эксайтотоксических аминокислот и др.), имеет и побочные эффекты (вторичные инфекции, аритмии, гипокалиемия, коагулопатия и реперфузионные повреждения органов при восстановлении температуры тела (ТТ), которые могут снижать и даже нивелировать ее лечебное действие [5, 18, 19, 22, 23, 27, 31].

Управляемая краниocereбральная гипотермия (КЦГ) – один из методов локального (регионального) охлаждения – рассматривается как альтернативный способ терапевтического охлаждения и имеет ряд неоспоримых преимуществ по сравнению с общей гипотермией. При КЦГ в первую очередь форсированно снижается температура наиболее чувствительных к кислородному голоданию церебральных структур, тогда как температура «ядра» тела остается в пределах, безопасных для функционирования сердечно-сосудистой системы, так как при адекватном проведении КЦГ снижение ТТ, артериального давления и сердечного ритма происходит одновременно. Терапевтические режимы КЦГ (35 и 32°C) применяются при поражениях мозга (постишемических и посттравматических), коматозных состояниях и ишемии мозга, вызванных остановкой сердца, при инсультах, инфарктах, повреждениях спинного мозга, печени и других органов, асфиксии новорожденных, субарахноидальной геморрагии, а также при некоторых нейро- и кардиохирургических операциях [2, 14, 23, 26, 31].

Несмотря на возросший интерес к использованию локальной гипотермии, молекулярные механизмы ее защитного действия остаются малоизученными. Изменение ТТ может вызывать нарушение гомеостаза организма, а гипотермия, как известно, – сдвиги на всех уровнях организации (молекулярном, клеточном, системном) [2, 6, 18, 23, 27]. Наиболее выраженные эффекты гипотермии осуществляются на уровне клеточных сигнальных путей, систем регуляции генов и клеточных структур [22].

Известно, что протеиназы играют важную роль в реализации многих клеточных процессов на

The combination of neurovegetative blockade and general cooling of the body (hybernotherapy method), for the first time used by H. Laborit and P. Huguenard in the middle of the last century [12] enabled a crucial increase in the efficiency of treating the shock states and provided the time needed for therapeutic interventions either to prevent or reduce an injury of the central nervous system (CNS) during total ischemia and trauma.

General hypothermia, in addition to positive (adequate slowing-down of metabolism and blood flow, protecting the tissues and cells against hypoxia, preventing an accumulation or release of excitotoxic amino acids, *etc.*) has the side effects (secondary infections, arrhythmia, hypokalemia, coagulopathy and reperfusion damage in organs during recovery of the body temperature (BT), which can reduce or even neutralize its therapeutic effect [1, 2, 8–10, 26, 31].

Controlled craniocerebral hypothermia (CCH) is a method of local (regional) cooling, it is considered as an alternative to therapeutic cooling, and has numerous advantages if compared to the general hypothermia. During the CCH there is primarily a fast reduction in the temperature of the most hypoxia sensitive cerebral structures, while the temperature of the body 'core' remains within the limits safe for the functioning of cardiovascular system, since the adequate CCH is accompanied with simultaneous decrease in BT, blood pressure and heart rate. Therapeutic regimens of CCH (35 and 32°C) are used in treating brain injuries (post-ischemic and traumatic), coma and brain ischemia, caused by heart failure, as well as for stroke, heart attack, injuries of spinal cord, liver and other organs, newborn asphyxia, subarachnoid hemorrhage and for certain neuro- and cardiac surgeries [4, 10, 24, 25, 31].

Despite an increased interest to use local hypothermia, the molecular mechanisms of its protective action are still unclear. Change in BT can disturb body homeostasis and a hypothermia causes the shifts through all the levels (molecular, cellular, system) [1, 4, 10, 26]. The most pronounced effects of hypothermia are implemented at the level of cellular signaling pathways, gene regulation systems and cellular structures [8].

It is known that proteinases play an important role in many cellular processes at different functional levels (from molecular to physiological) in norm and under pathological conditions, and their activity is controlled by specific and nonspecific inhibitors. Limited proteolysis is a key molecular mechanism for the formation, inactivation and modification of various peptides.

In this context, the aim of this work was to study the activity of proteinases and their inhibitors in blood serum, tissue structures of central nervous system and peripheral organs of rats during craniocerebral hypothermia and following recovery.



различных функциональных уровнях (от молекулярного до физиологического) в норме и при патологии, при этом их активность контролируется специфическими и неспецифическими ингибиторами. Ограниченный протеолиз является основным молекулярным механизмом образования, инактивации и модификации различных пептидов.

В этой связи целью настоящей работы было изучение активности протеиназ и их ингибиторов в сыворотке крови, тканях структур центральной нервной системы и периферических органов крыс при краниocereбральной гипотермии и на этапе восстановления.

Материалы и методы

Эксперименты проведены в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными V Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2013) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных 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*.

Для проведения нейровегетативной блокады животных наркотизировали (смесь тиопентала натрия и оксибутирата натрия из расчета 30 и 100 мг/кг массы соответственно). Известно, что целью наркоза при КЦГ является подавление специфических реакций организма на холод, в частности мышечной дрожи и вазоконстрикции, сопровождающихся активацией обменных процессов. Это недопустимо при терапевтической гипотермии, так как препятствует снижению ТТ и противоречит основной цели применения КЦГ – обеспечению снижения метаболизма, особенно в головном мозге. Управляемую КЦГ проводили на установке для программного охлаждения (производство СКТБ с ОП Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины [16]) в течение 60 ± 10 мин до достижения ректальной температуры 32°C (умеренный режим гипотермии), которую измеряли электронным термометром. Животных распределили на четыре группы ($n = 5$ в каждой): 1 – контроль; 2 – наркоз; 3 – КЦГ; 4 – через 24 ч после КЦГ. Из эксперимента крыс выводили путем декапитации. Кровь собирали в пробирки, отстаивали 10 мин при комнатной температуре и центрифугировали 15 мин при 5000g на MPW-331 («Mechanika Precyzyjna», Польша). Печень перфузировали охлажденным физиологическим раствором. Образцы тканей (300 мг) промывали охлажденным физиологическим раст-

Materials and methods

Experiments were carried out in accordance with the General Principles of Experiments in Animals, approved by the 5th National Congress in Bioethics (Kiev, 2013) and consistent 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 before the experiment housed in the animal facility with natural light/dark cycle and a standard diet *ad libitum*.

To carry-out the neurovegetative blockade the animals were anesthetized (mixture of sodium thiopental and sodium hydroxybutyrate: 30 and 100 mg per kg of animal mass, correspondingly). Anesthesia at the CCH is needed to suppress the specific responses to cold, such as muscle tremors and vasoconstriction, accompanied by the activation of metabolic processes. This is unacceptable in therapeutic hypothermia as it prevents BT lowering and is inconsistent to the basic purpose of the CCH application, *i. e.* ensuring a metabolism slowing down, especially in brain. The controlled CCH was performed by means of the unit for programmable cooling (produced by the Special Constructing and Technical Bureau with Experimental Unit of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine [11]) during 60 ± 10 min up to reaching the rectal temperature of 32°C (moderate hypothermic regime), measured with an electronic thermometer. The animals were divided into four groups ($n = 5$ in each): 1 – control; 2 – anesthesia; 3 – CCH; 4 – 24 hrs later the CCH. The rats were sacrificed by decapitation. Blood was collected into tubes, left for 10 min at room temperature and centrifuged for 15 min at 5000g with MPW-331 device (Mechanika Precyzyjna, Poland). The liver was perfused with a cold physiological saline. Tissue samples (300 mg) were washed with cold physiological saline and homogenized in 3 ml of Na-phosphate buffer pH 7.4 at $4 \dots 6^\circ\text{C}$, then centrifuged for 10 min at 5000g with PC-6 device (Dastan, Kazakhstan) at 4°C . The samples of blood serum and tissue homogenate aliquots prior to the analysis were stored at -20°C .

Blood serum and nucleus-free fractions of 10% tissue homogenates of cortex, hypothalamus, cerebellum, lung, heart, liver and kidneys were used to examine the total proteolytic activity (TPA), activity of non-trypsin like proteinase (NTLP) and their inhibitors (alpha-1-proteinase inhibitor (α -1-PI) and α -2-macroglobulin (α -2-MG) by highly sensitive (10^{-9} – 10^{-10} g) enzymatic methods developed at the L.T. Malaya National Institute of Therapy of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine. The methods are based on cleavage of the marker enzyme complex (horseradish peroxidase) immobilized on the polystyrene surface and



вором и гомогенизировали в 3 мл Na-фосфатного буфера pH 7,4 при 4...6°C, затем центрифугировали 10 мин при 5000g на PC-6 («Dastan», Казахстан) при 4°C. Пробы сыворотки крови и аликвоты гомогенатов тканей до анализа хранили при -20°C.

В сыворотке крови и безъядерных фракциях 10%-х гомогенатов тканей коры мозга, гипоталамуса, мозжечка, легких, сердца, печени и почек определяли общую протеолитическую активность (ОПА), активность нетрипсиноподобных протеиназ (НТПП) и их ингибиторов (α -1-ингибитора протеиназ (α -1-ИП) и α -2-макроглобулина (α -2-МГ) высокочувствительными (10^{-9} – 10^{-10} г) энзиматическими методами, разработанными в ГУ «Национальный институт терапии имени Л.Т. Малой НАМН Украины». Методы основаны на расщеплении иммобилизованного на поверхности полистирола комплекса маркерного энзима (пероксидазы хрена) и протеинового субстрата [17]. В результате реакции происходят расщепление субстрата и его десорбция с поверхности полистирола вместе с молекулами связанного с ним маркерного энзима. Для оценки активности протеиназ, НТПП, α -1-ИП в качестве субстрата был использован альбумин сыворотки быка, α -2-МГ – протаминсульфат. Трипсинингибиторную активность α -1-ИП оценивали после проведения реакции образования комплекса протеиназа-ингибитор протеиназ в течение 15 мин при 20°C. При определении α -2-МГ после реакции образования комплекса протеиназа – ингибитор протеиназ к реакционной смеси добавляли 1:1 по объему соевый ингибитор трипсина (СИТ) в концентрации 150 мкг/мл и инкубировали 5 мин при 37°C для связывания свободных протеиназ. Активность α -2-МГ в исследованных образцах рассчитывали по остаточной активности связанного с ним трипсина. Для определения активности НТПП отдельно проводили реакцию подавления таких энзимов, как трипсин, плазмин, сывороточный калликреин, тонин (обладает трипсин- и химотрипсинподобной активностью) добавлением 1:1 по объему СИТ в концентрации 0,01 мкг/мл и инкубировали 5 мин при 37°C. Далее проводили реакцию расщепления иммобилизованного энзим-субстратного комплекса. Показатели оценивали по изменению активности маркерного энзима и выражали в мг/л трипсина. В исследованиях использовали пероксидазу хрена («ICN», США), трипсин («Sprofa», Чехия), СИТ («Reanal», Венгрия), альбумин сыворотки быка («ICN»), протаминсульфат («ICN»), другие реагенты производства «Харьковреакхим» (Украина); многоканальные полистироловые планшеты («KIMA», Италия), а также фотометр-анализатор иммуноферментный «Humareader» («Human», Германия).

the substrate protein [22]. The reaction results in the substrate cleavage and its desorption from the polystyrene surface together with molecules of marker enzyme bound with it. To evaluate the activity of proteinases, NTLP and α -1-PI the bovine serum albumin was used as the substrate and for α -2-MG there was applied protamine sulfate. Trypsin inhibitory activity of α -1-PI has been evaluated after the formation of the proteinase-proteinases inhibitor complex during 15 min at 20°C. To determine α -2-MG activity the formation of the proteinase-proteinases inhibitor complex was followed by supplementation of the reaction mixture with the soybean trypsin inhibitor (STI) in ratio of 1:1 v/v, 150 mg/ml concentration, and incubated for 5 min at 37°C to bind free proteinases. The activity of α -2-MG in the samples was found from the residual activity of the bound trypsin. To determine the activity of NTLP we performed the reaction of suppressing the enzymes such as trypsin, plasmin, serum kallikrein, tonin (has both trypsin- and chymotrypsin-like activities) by addition 1:1 v/v STI with 0.01 mg/ml concentration and incubated for 5 min at 37°C. Later the cleavage of immobilized enzyme-substrate complex was performed. The indices were assessed by the change in activity of marker enzyme and expressed in mg per liter of trypsin. The research was performed using horseradish peroxidase (ICN, USA), trypsin (Sprofa, Czech Republic), STI (Reanal, Hungary), bovine serum albumin (ICN), protamine sulfate (ICN) and other agents produced by Kharkovreakhim (Ukraine); multichannel polystyrene plates (KIMA, Italy), and the photometer Immunoassay Analyzer Humareader (Human, Germany).

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

Results and discussion

Analysis of the results demonstrated that anesthesia and CCH performed on its background, led to a sharp increase in the TPA in all the tissue samples, kept even 24 hrs later the CCH (Table 1). Activity of NTLP under the influence of anesthesia significantly decreased in blood serum and increased in cerebellum, liver and kidneys; during the CCH the activity of NTLP increased in all the tissue samples, but not as dramatically as for TPA. In 24 hrs after the CCH the activity of NTLP remained elevated only in blood serum and kidneys, in the cerebral cortex *vice versa* it dropped and in other tissues it approached the control values (Table 1).

An activity of α -1-PI both during anesthesia and CCH was not significantly changed, indicating a neglective involvement of this inhibitor into suppressing an excessive proteinase activity. In 24 hrs after the



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

Результаты и обсуждение

Анализ полученных результатов показал, что наркоз и КЦГ, проводимая на его фоне, приводили к резкому повышению ОПА во всех образцах тканей, сохраняющемуся и через 24 ч после КЦГ (табл. 1). Активность НТПП под действием наркоза значительно снижалась в сыворотке крови и повышалась в мозжечке, печени и почках; при КЦГ повышалась активность НТПП во всех образцах тканей, но не так резко, как ОПА. Через 24 ч после КЦГ активность НТПП оставалась повышенной только в сыворотке крови и почках, в коре мозга, напротив, снижалась, а в остальных тканях – приближалась к контрольным значениям (табл. 1).

Активность α -1-ИП как при наркозе, так и при КЦГ значительно не изменялась, что указывает на незначительное участие этого ингибитора в подавлении избыточной активности протеиназ. Через 24 ч после КЦГ активность α -1-ИП снижалась только в образцах тканей коры мозга и гипоталамуса, которые относятся к областям ЦНС, участвующим в контроле и реализации терморегуляторных реакций, и в печени, также задействованной в процессах терморегуляции (табл. 2).

При экстремальных воздействиях α -1-ИП связывается со стрессорными белками [3], что может определять его функциональную активность при гипотермии, хотя экспрессия одного из основных белков теплового шока (БТШ70) при гипотермии может претерпевать разнонаправленные изменения и даже не меняться [31]. Кроме того, в печени, являющейся одним из основных источников ингибиторов протеиназ, при стрессе нарушается транспорт синтезированного ингибитора из эндоплазматического ретикулума, поэтому функцию подавления избыточной активности протеиназ берут на себя другие ингибиторы [3].

CCH an activity of α -1-PI decreased only in the samples of brain cortex tissues and hypothalamus from the CNS regions, controlling and implementing thermoregulatory responses, as well as in liver, participating in thermoregulation as well (Table 2).

Under extreme conditions α -1-PI is bound to stress proteins [28], that can determine its functional activity

Таблица 1. Влияние краниocereбральной гипотермии 32°C на активность протеиназ в тканях крыс (M \pm m), мг/л·ч

Table 1. Effect of craniocerebral hypothermia (32°C) on proteinase activity in rat tissues (M \pm m), mg/l·hr

Образцы тканей Tissue samples	Контроль Control	Наркоз Narcosis	КЦГ CCH	Через 24 ч КЦГ 24 hrs after CCH
Общая протеолитическая активность Total proteolytic activity				
Сыворотка крови Blood serum	0,007 \pm 0,002	0,134 \pm 0,003*	0,243 \pm 0,1*	0,175 \pm 0,065*
Кора мозга Brain cortex	0,01 \pm 0,003	0,177 \pm 0,036*	0,356 \pm 0,162*	0,324 \pm 0,108*
Гипоталамус Hypothalamus	0,008 \pm 0,004	0,304 \pm 0,131*	0,291 \pm 0,099*	0,176 \pm 0,033*
Мозжечок Cerebellum	0,05 \pm 0,036	0,128 \pm 0,029*	0,184 \pm 0,006*	0,324 \pm 0,133*
Легкие Lungs	0,015 \pm 0,006	0,156 \pm 0,027*	0,416 \pm 0,131*	0,521 \pm 0,304*
Сердце Heart	0,005 \pm 0,001	0,315 \pm 0,043*	0,463 \pm 0,104*	0,664 \pm 0,168*
Печень Liver	0,006 \pm 0,002	0,68 \pm 0,046*	0,715 \pm 0,378*	0,64 \pm 0,182*
Почки Kidneys	0,005 \pm 0,000	0,34 \pm 0,04*	0,312 \pm 0,112*	0,357 \pm 0,076*
Нетрипсиноподобные протеиназы Non-trypsin-like proteinases				
Сыворотка крови Blood serum	0,033 \pm 0,003	0,01 \pm 0,003*	0,133 \pm 0,077*	0,143 \pm 0,05*
Кора мозга Brain cortex	0,153 \pm 0,055	0,178 \pm 0,092	0,342 \pm 0,111*	0,056 \pm 0,017*
Гипоталамус Hypothalamus	0,171 \pm 0,05	0,239 \pm 0,108	0,517 \pm 0,107*	0,155 \pm 0,109
Мозжечок Cerebellum	0,101 \pm 0,03	0,458 \pm 0,262*	0,285 \pm 0,069*	0,225 \pm 0,193
Легкие Lungs	0,121 \pm 0,033	0,256 \pm 0,127	0,46 \pm 0,085*	0,221 \pm 0,137
Сердце Heart	0,188 \pm 0,057	0,441 \pm 0,254	0,63 \pm 0,216*	0,214 \pm 0,084
Печень Liver	0,159 \pm 0,05	0,483 \pm 0,126*	0,548 \pm 0,158*	0,243 \pm 0,101
Почки Kidneys	0,12 \pm 0,031	0,239 \pm 0,103*	0,45 \pm 0,16*	0,202 \pm 0,051*

Примечание: * – различия значимы по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$.

Note: * – the differences are significant if compared with the control, $p \leq 0,05$.



Известно, что α -2-МГ превосходит α -1-ИП по скорости реакции комплексообразования с протеиназами [3]. В наших исследованиях его активность изменялась по-разному (табл. 2): под действием наркоза она повышалась в сыворотке крови и печени, мозжечке и почках – снижалась, а в остальных образцах тканей – не изменялась. После проведения сеанса КЦГ активность этого ингибитора повышалась в сыворотке крови, гипоталамусе, сердце, в мозжечке и почках она, напротив, снижалась, а в остальных тканях – не изменялась. Избыточная активность протеиназ при КЦГ была скомпенсирована участием α -2-МГ в сыворотке крови, гипоталамусе и сердце, скорее всего, за счет α -2-МГ макрофагального происхождения. Через 24 ч после КЦГ активность α -2-МГ в части образцов возвращалась к исходному уровню, кроме гипоталамуса, мозжечка и почек (снижалась), а также сердца и печени (повышалась), что указывает на восстановление синтеза α -2-МГ в гепатоцитах (табл. 2).

Таким образом, умеренный режим КЦГ (32°C) способствовал резкой активации ОПА (на один-два порядка) и существенной активации НТПП (в разы) (табл. 1). Следовательно, можно предположить, что умеренный режим КЦГ 32°C приводит к развитию определенной адаптационной реакции (возможно, «реакция активации» [4]), которая в наших экспериментах проявилась как интенсификация ограниченного протеолиза и образования активных форм энзимов, что способствует повышению устойчивости организма к последующему холодовому или другому экстремальному воздействию. Согласно данным Л.Х. Гаркави и соавт. [4], вызывая определенную по характеру и степени резистентности адаптационную реакцию, можно подойти к управлению устойчивостью организма, подтверждением этому, по нашему мнению, являются данные о повышении холодовой устойчивости крыс после проведения КЦГ 32°C [13].

Интенсификация ряда биохимических процессов характерна и при других холодových воздействиях на организм. Так, нами было показано [10, 15], что ритмические холодые

during hypothermia, nevertheless the expression of one of the major heat shock proteins (HSP70) during hypothermia may undergo multidirectional changes or even do not change [31]. Furthermore, stress affects the transport of synthesized inhibitor out of endoplasmic reticulum in liver, which is one of the main sources of proteinases inhibitors; thus the suppressing function of

Таблица 2. Влияние краниocereбральной гипотермии 32°C на активность ингибиторов протеиназ в тканях крыс ($M \pm m$), мг/л·ч

Table 2. Effect of craniocerebral hypothermia (32°C) on proteinase inhibitor activity in rat tissues ($M \pm m$), mg/l·hr

Образцы тканей Tissue samples	Контроль Control	Наркоз Narcosis	КЦГ CCH	Через 24 ч КЦГ 24 hrs after CCH
Трипсин-ингибиторная активность α -1-ингибитора протеиназ Trypsin-inhibitory activity of α -1-inhibitor of proteinases				
Сыворотка крови Blood serum	31,848 \pm 0,069	31,908 \pm 0,082	31,647 \pm 0,127	31,671 \pm 0,102
Кора мозга Brain cortex	31,5 \pm 0,256	31,787 \pm 0,04	31,527 \pm 0,128	30,448 \pm 0,589*
Гипоталамус Hypothalamus	31,583 \pm 0,121	31,316 \pm 0,421	30,966 \pm 0,446	29,608 \pm 1,103*
Мозжечок Cerebellum	31,645 \pm 0,166	31,74 \pm 0,031	31,57 \pm 0,233	31,15 \pm 0,22
Легкие Lungs	31,496 \pm 0,222	31,84 \pm 0,046	31,161 \pm 0,44	31,089 \pm 0,41
Сердце Heart	31,596 \pm 0,167	31,82 \pm 0,06	31,174 \pm 0,434	31,409 \pm 0,271
Печень Liver	31,711 \pm 0,074	31,373 \pm 0,187	30,433 \pm 0,79	30,944 \pm 0,209*
Почки Kidneys	31,208 \pm 0,357	31,803 \pm 0,075	31,258 \pm 0,472	31,51 \pm 0,166
Нетрипсиноподобные протеиназы Non-trypsin-like proteinases				
Сыворотка крови Blood serum	0,033 \pm 0,003	0,01 \pm 0,003*	0,133 \pm 0,077*	0,143 \pm 0,05*
Кора мозга Brain cortex	0,153 \pm 0,055	0,178 \pm 0,092	0,342 \pm 0,111*	0,056 \pm 0,017*
Гипоталамус Hypothalamus	0,171 \pm 0,05	0,239 \pm 0,108	0,517 \pm 0,107*	0,155 \pm 0,109
Мозжечок Cerebellum	0,101 \pm 0,03	0,458 \pm 0,262*	0,285 \pm 0,069*	0,225 \pm 0,193
Легкие Lungs	0,121 \pm 0,033	0,256 \pm 0,127	0,46 \pm 0,085*	0,221 \pm 0,137
Сердце Heart	0,188 \pm 0,057	0,441 \pm 0,254	0,63 \pm 0,216*	0,214 \pm 0,084
Печень Liver	0,159 \pm 0,05	0,483 \pm 0,126*	0,548 \pm 0,158*	0,243 \pm 0,101
Почки Kidneys	0,12 \pm 0,031	0,239 \pm 0,103*	0,45 \pm 0,16*	0,202 \pm 0,051*

Примечание: * – различия значимы по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$.

Note: * – the differences are significant if compared with the control, $p \leq 0,05$.

воздействия (РХВ) также способствуют резкому повышению как ОПА, так и активности различных по происхождению эластаз в образцах тканей ЦНС и периферических органов. Другими исследователями [21] также показано, что холодовое воздействие способствует сенсбилизации нейроиммунной реактивности в головном мозге крыс, усилению метаболизма в органах (печень, скелетные мышцы, бурая жировая ткань и сердце), участвующих в реализации терморегуляторных процессов. На начальных этапах формирования холодной адаптации активацию ферментов в тканях органов крыс отмечали и другие авторы [29, 30].

В природе для некоторых организмов характерна эволюционно детерминированная стратегия погружения в обратимые гипометаболические состояния (сопровождающиеся гипотермией), и для получения оптимальной скорости реакции они способны регулировать активность имеющихся энзимов или синтезировать их *de novo*. Кроме того, у них есть энзимы, адаптированные к функционированию в экстремальных условиях обитания. Как известно, гипотермия сопровождается изменениями в организме на молекулярном, клеточном и системном уровнях, защищает нейроны от повреждения, предотвращая активацию глиальных клеток (особенно микроглии), ослабляет эндотелиальную дисфункцию гематоэнцефалического барьера [2, 6, 18, 19, 23, 24, 27, 30].

Гипотермия вызывает изменения во многих внутриклеточных сигнальных каскадах и системах, как подавляя, так и активируя их. Примером могут служить серин/треонинспецифическая протеинкиназа, обладающая митогенной активностью, а также киназа-1/2, участвующая в регуляции внеклеточной сигнализации, активация которых была установлена при гипотермии [22].

Известно, что, кроме температурного фактора, активность энзимов зависит от концентрации субстратов, pH, ионно-солевого баланса, но при гипотермии эти параметры могут изменяться одновременно. Установлено, что гипотермия способствует сдвигу pH (метаболический ацидоз) и водно-солевого баланса. Развивающийся на фоне гипотермии оксидативный стресс [18, 19] также приводит к активации энзимов. При гипотермии могут изменяться концентрация субстратов и сродство к ним, конфигурация активного центра энзима и самой его молекулы, взаимоотношения энзимов с базовыми белками и фосфолипидами [28], при охлаждении происходит тканеспецифическая модуляция метаболических процессов [20]. Кроме того, активность энзиматических систем может зависеть от глубины гипотермии, интенсив-

excessive proteinase activity is undertaken by other inhibitors [28].

It is known that α -2-MG exceeds α -1-PI by the rate of reaction of forming the complex with proteinases [28]. In our studies its activity varied in different ways (Table 2), in particular under the anesthesia it was increased in blood serum and liver, in kidneys and cerebellum this was decreased and in other tissue samples this index did not change. After the CCH session the activity of this inhibitor increased in blood serum, hypothalamus, heart; dropped in cerebellum and kidneys, and was not changed for the remaining tissues. Excessive proteinase activity during CCH was compensated due to the function of α -2-MG in blood serum, hypothalamus and heart rather, and the α -MG-2 was of macrophage origin. In 24 hrs after the CCH the activity of α -2-MG returned to the baseline in some samples, except hypothalamus cerebellum and kidneys (where it was decreased), as well as in heart and liver (increased), indicating the recovery of α -2-MG synthesis in hepatocytes (Table 2).

Thus, moderate CCH (32°C) contributed to a sharp activation of TPA (by one to two orders) and significant activation of NTLP (multi-fold) (Table 1). Consequently, it can be assumed that moderate CCH at 32°C leads to the development of specific adaptive response (*e. g.* 'activation reaction' [5]), which in our experiments was manifested both as an intensification of the limited proteolysis and formation of active forms of enzymes, thereby contributing to a rise in the organism resistance to the subsequent cold exposure or other extreme conditions. As reported by L. Garkavi *et al.* [5], causing an adaptive response varying by character and extent could allow the control of the organism resistance. We believe that this can be confirmed by the data on increased cold resistance of rats after the CCH at 32°C [20].

The intensification of several biochemical processes is also intrinsic for other cold effects on the organism. In particular, we have reported [16, 23], that the rhythmical cold exposures (RCE) also contributed to a sharp rise in both TPA and in activity of elastases of various origin in the tissue samples of CNS and peripheral organs as well. Other investigators [7] also showed that cold exposure promoted a sensibilization of neuroimmune reactivity in rat brain, accelerated metabolism in organs (liver, skeletal muscle, brown adipose tissue and heart), involved in the thermoregulatory processes. Initial stages of developing cold adaptation were accompanied by an activation of enzymes of the rat organ tissues, as reported by other scholars [29, 30].

In nature, some organisms possess an evolution-determined strategy of entering the reversible hypometabolic states (accompanied by hypothermia), and an optimal reaction rate could be controlled by changing activity of present enzymes or synthesizing them



ности, кратности, периодичности и длительности холодового воздействия. Применение лечебных режимов охлаждения при патологии отдельно или в сочетании с био- и фармпрепаратами также может существенно влиять на активность протеиназ и их ингибиторов. Гипотермия оказывает влияние на метаболизм, клиренс и свойства фармпрепаратов, применяемых в комплексной терапии различных заболеваний, что может способствовать повышению их концентрации в плазме крови. Особенности протекания различных фаз фармакодинамики и фармакокинетики лекарственных средств при гипотермии могут способствовать как усилению, так и ослаблению ее терапевтического эффекта [22]. Так, нами [9, 11, 12] и другими авторами [8] было показано, что сочетание лечебных режимов охлаждения (КЦГ, аэрокриотерапия, РХВ) и био-препаратов (из кордовой крови, эмбриональной нервной ткани, тканей фетоплацентарного комплекса и др.), содержащих стволовые клетки, более эффективно для коррекции патологических состояний, смоделированных в экспериментах на животных (депрессия, гипотиреоз, деменция, последствия хронического стресса), чем их отдельное применение.

Биопрепараты, содержащие стволовые клетки, активно используются в клинической практике, однако механизмы миграции, имплантации, пролиферации и дифференциации стволовых клеток остаются малоизученными. Поэтому по аналогии с процессами ангиогенеза, метастазирования, воспаления, сопровождающимся миграцией клеток, можно предположить, что специфические протеиназы, в частности матриксные металлопротеиназы, непосредственно участвуют в реализации эффективной миграции и пролиферации трансплантируемых стволовых клеток [1]. Такие процессы могут происходить и при КЦГ, когда наблюдается резкое усиление общей протеолитической активности в тканях ЦНС и периферических органов. Следует отметить, что активация отдельных специфических протеиназ при отсутствии конкурентного связывания может проявляться еще более выражено, чем общая их активность. Металлопротеиназы расщепляют элементы внеклеточного матрикса и базальных мембран, при этом активация матриксных металлопротеиназ обеспечивается участием макрофагов [24].

Мощная стимуляция реакций ограниченного протеолиза, наблюдаемая при КЦГ, по нашему предположению, может быть одним из факторов взаимного потенцирования эффектов гипотермии и био-препаратов, содержащих стволовые клетки. Это происходит, вероятно, за счет увеличения скорости и эффективности миграции не только

de novo. Furthermore, they have enzymes which are adapted to function under extreme habitat conditions. Hypothermia is known to be accompanied by changes at molecular, cellular and systemic levels of an organism, 'protects' the neurons against injury by preventing the activation of glial cells (especially microglia), reduces endothelial dysfunction of blood brain barrier [1, 2, 4, 10, 13, 21, 26, 30].

Hypothermia causes changes in many intracellular signaling cascades and systems, inhibiting some of them or activating the others. As the examples could serve serine/threonine-specific protein kinase possessing mitogenic activity as well as kinase-1/2, involved in regulation of extracellular signaling, the activation of those has been found during hypothermia [8].

It is known that, in addition to the temperature factor, the activity of enzymes depends on substrate concentration, pH, ion-salt balance, and these parameters can change simultaneously during hypothermia. Hypothermia contributes to pH shift (metabolic acidosis) and water-salt balance. Oxidative stress developing on the background of hypothermia [1, 2] also leads to the activation of enzymes. Hypothermia could be accompanied with changes in the concentration of substrates as well as their affinity, configuration of the enzyme active site and the molecule *per se*, relationship of enzymes with basic proteins and phospholipids [27], in addition there is a tissue-specific modulation of metabolic processes during cooling [6]. Furthermore, the activity of enzymatic systems may depend on the depth of hypothermia, its intensity, multiplicity, frequency and duration of cold exposure. Application of cooling regimens to treat diseases alone or in combination with bio- and pharmaceuticals can also strongly affect the activity of proteinases and their inhibitors. Hypothermia affects the metabolism, clearance and properties of pharmaceuticals used in treatment of various diseases that may enhance their concentration in blood plasma. The features of various phases of pharmacodynamics and pharmacokinetics of drugs during hypothermia can contribute to both strengthening and weakening its therapeutic effect [8]. Thus, we [15, 17, 18] and other authors [14] have shown that the combination of cooling modes (CCH, aerocryotherapy, RCE) and biologicals (derived from cord blood, embryonic neural tissue, tissue fetoplacental *et al.*), containing the stem cells, is more effective to correct pathological conditions modeled in the experiments in animals (depression, hypothyroidism, dementia, consequences of chronic stress) vs. their single application.

Biologicals containing stem cells are widely used in clinical practice, however, the mechanisms of migration, implantation, proliferation and differentiation of stem cells have remained poorly understood. Therefore we could hypothesize the similarity of the



трансплантированных, но и собственных стволовых клеток.

Ранее считалось, что защитный эффект гипотермии обусловлен исключительно замедлением церебрального метаболизма и связанным с ним снижением потребления глюкозы и кислорода [6, 7, 25]. Однако сейчас становится понятно, что в этот процесс вовлекаются и другие механизмы, имеющие, вероятно, гораздо большее значение, чем замедление скорости обмена веществ. Так, в работах N. Alva и соавт. [18, 19] обсуждались данные о состоянии анти- и прооксидантного баланса в организме при гипотермии и была подтверждена гипотеза о роли свободных форм кислорода в реализации терапевтических эффектов гипотермии. На основании установленного нами феномена значительной активации ограниченного протеолиза при КЦГ можно предположить, что протеиназы играют важную роль в осуществлении адекватных перестроек в организме при снижении температуры тела, а также в реализации механизмов нейропротекции и защиты от гипоксии. Тем не менее, значительные метаболические изменения при гипотермии могут быть определяющими в обеспечении защиты тканей и органов, в первую очередь ЦНС, от гипоксии и ишемии [6, 23, 27, 31].

Возросший интерес к потенциалу терапевтической локальной гипотермии, выяснение молекулярных механизмов ее нейропротекторного влияния будут способствовать разработке новых более безопасных и эффективных стратегий коррекции многих расстройств ЦНС, в основе которых лежит либо общая, либо локальная гипоксия мозга.

Выводы

Применение умеренного режима КЦГ (32°C) способствовало резкой активации реакций ограниченного протеолиза в тканях ЦНС (кора мозга, гипоталамус, мозжечок) и периферических органов (сердце, легкие, печень и почки): общая протеолитическая активность повышалась на один-два порядка, активность нетрипсиноподобных протеиназ увеличивалась в разы. При этом на фоне неизменной активности α -1-ингибитора протеиназ при КЦГ активность другого ингибитора – α -2-МГ изменялась разнонаправленно и тканеспецифично: в сыворотке крови, гипоталамусе, сердце она повышалась, в мозжечке и почках, напротив, снижалась, в остальных тканях не претерпевала изменений. Через 24 ч после КЦГ ОПА оставалась на высоком уровне, активность НТПП в большинстве образцов возвращалась к исходным значениям, активность α -1-ИП снижалась только в образцах тканей коры мозга и гипоталамуса. Активность α -2-МГ и через 24 ч после КЦГ менялась разнонаправленно: в гипо-

processes of angiogenesis, metastasis, inflammation, accompanied by the migration of cells and the activity of specific proteinases, particularly matrix metalloproteinases, in terms of their direct participation in providing effective migration and proliferation of transplanted stem cells [3]. These processes can occur under the CCH as well, when a sharp rise in the total proteolytic activity occurs in the tissues of CNS and peripheral organs. It should be noted that the activation of certain specific proteinases in the absence of competitive binding may be manifested even more prominently comparing to their overall activity. Metalloproteinases cleave the elements of extracellular matrix and basal membranes, herewith the activation of matrix metalloproteinases is provided by macrophages [13].

We believe that powerful stimulation of the limited proteolysis reactions observed during the CCH can be one of the factors in mutual potentiation of the effects resulted from hypothermia and stem cell containing biologicals. This is probably due to accelerating the speed and efficiency of migration not only of the transplanted, but also their own stem cells.

Previously it was thought that protective effects of hypothermia were caused exclusively by slowing-down of cerebral metabolism and associated with it reduction in glucose and oxygen consumption [12, 19, 21]. However, today it becomes clear that the process also involves other mechanisms that are probably much more important than slowing-down of metabolic rate. For example, N. Alva *et al.* [1, 2] reported the data on a state of anti- and pro-oxidant balance in the body during hypothermia and there was confirmed the hypothesis about a role of reactive oxygen species in the implementation of hypothermia therapeutic effects. Basing on the established by us phenomenon of a significant activation of the limited proteolysis during CCH it could be assumed that the proteinases play an important role in adequate transformation in an organism while reducing the body temperature, as well as in realization of neuroprotection mechanisms and protection against hypoxia. Nevertheless, significant metabolic changes during hypothermia can be crucial in protecting tissues and organs, especially the CNS, against hypoxia and ischemia [10, 21, 26, 31].

The increased interest to the potential of therapeutic local hypothermia, identification of the molecular mechanisms of its neuroprotective effects will contribute to the development of new safer and more effective strategies for the correction of many central nervous system disorders, which are based on either general or local hypoxia of the brain.

Conclusions

The use of moderate CCH (32°C) contributed to a sharp activation of the limited proteolysis reactions in



таламусе, мозжечке и почках снижалась, в сердце и печени повышалась, а в остальных образцах была на уровне контрольных значений.

Дальнейшие исследования будут направлены на изучение влияния КЦГ на активность таких специфических протеиназ, как химаза, тонин, кальпаины.

Литература

1. Андриященко П.И. Объект изучения клеточной трансплантологии: металлопротеиназы // Трансплантология. – 2005. – Т. 8, № 1. – С. 38–45.
2. Бабийчук Г.А., Марченко В.С., Ломакин И.И., Белостотский А.В. Нейрофизиологические процессы охлажденного мозга. – К.: Наук. думка, 1992. – 208 с.
3. Веремеенко К.Н., Голобородько О.П., Кизим А.И. Протеолиз в норме и при патологии. – К.: Здоров'я, 1988. – 200 с.
4. Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Уколова М.А. Адаптационные реакции и резистентность организма. – Ростов н/Д, 1990. – 223 с.
5. Каленова И.Е., Шарина И.А., Шевелев О.А., Бутров А.В. Опыт применения терапевтической гипотермии в лечении ишемического инсульта // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2012. – №2. – С. 41–44.
6. Клиническая физиология искусственной гипотермии / Отв. ред. акад. Е.Н. Мешалкин. – Новосибирск: Наука, 1997. – 564 с.
7. Лабори А., Гюенар П. Гибернотерапия (искусственная зимняя спячка) в медицинской практике. – М.: Медгиз, 1956. – 272 с.
8. Ломакин И.И., Кудокоцева О.В., Пурешева В.Ю. Терапевтический эффект препаратов кордовой крови на примере структурных изменений дермы при экспериментальной гипотиреозе и его потенцировании аэрокриотерапией // Криотерапия: безопасные технологии применения: Сб. научн. работ / Под общ. ред. проф. О.А. Панченко. – К.: КВИЦ, 2012. – С. 51–59.
9. Ломакин И.И., Шило О.В., Козлов О.В. та ін. Потенціювання ефекту тканинної терапії в умовах моделювання патологічного старіння мозку у тварин // Трансплантологія. – 2000. – Т. 1, №1. – С. 270–271.
10. 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.
11. Ломако В.В., Шило А.В., Ломако С.В., Бабийчук Г.А. Этологический анализ сочетанного применения холодовой и клеточной терапии у крыс с резерпиновой моделью депрессии // Проблеми криобіології. – 2005. – Т. 15, №3. – С. 471–472.
12. Ломако В.В., Шило А.В., Ломако С.В., Бабийчук Г.А. Холодовое воздействие и кордовая кровь восстанавливают структуру поведения стрессированных крыс // Ветеринарна медицина. – 2008. – Т. 89. – С. 232–237.
13. Марченко В.С., Бабийчук Г.А., Ломако В.В. и др. Общий подход к проблеме повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера и холодовой устойчивости организма // Проблеми криобіології. – 1994. – №1. – С. 24–32.
14. Савельева Г.М., Шалина Р.И., Смирнова А.А. и др. Асфиксия доношенных новорожденных. Комплексная терапия с использованием криоцеребральной гипотермии // Акушерство и гинекология. – 2015. – №4. – С. 19–24.
15. Самохіна Л.М., Стародуб Н.Ф., Бабийчук Г.А., Ломако В.В. Влияние ритмического холодового воздействия на активность эластаз у самок крыс с алкогользависимой гипер-

the CNS tissues (brain cortex, hypothalamus, cerebellum) and peripheral organs (heart, lungs, liver and kidneys): total proteolytic activity was increased by one to two orders, activity of non-trypsin-like proteinases increased multifold. Herewith, along with unchanged activity of α -1-proteinase inhibitor at CCH the activity of another inhibitor α -2-MG varied in different directions and tissue specifically: in blood serum, hypothalamus, heart it increased, in cerebellum and kidneys, in contrast, it decreased and in rest of the tissues no changes were observed. In 24 hrs after CCH the TPA remained high, NTPL activity in most of the samples returned to baseline values, the activity of α -1-PI decreased only in the samples of brain cortex and hypothalamus tissues. The activity of α -2-MG 24 hrs after CCH varied in different directions as well: in hypothalamus, cerebellum and kidneys it decreased, in heart and liver this was increased and in other samples that was at the control values.

Further studies will be aimed to investigate the effect of the CCH on the activity of specific proteinases such as chymase, tonin, calpains.

References

1. Alva N., Palomeque J., Carbonell T. Deep hypothermia protects against acute hypoxia in vivo in rats: a mechanism related to the attenuation of oxidative stress. *Exp Physiol* 2013; 98(6): 1115–1124.
2. Alva N., Palomeque J., Carbonell T. Oxidative stress and antioxidant activity in hypothermia and rewarming: can RONS modulate the beneficial effects of therapeutic hypothermia? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013; Article ID957054, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/957054>.
3. Andryuschenko P.I. Subject of studying of cellular transplantation: metalloproteinases. *Transplantologiya* 2005; 8(1): 38–45.
4. Babijchuk G.A., Marchenko V.S., Lomakin I.I., Belostotskiy A.V. Neurophysiological processes of cooled brain. *Kiev: Naukova dumka*; 1992.
5. Garkavi L.Kh., Kvakina E.B., Ukolova M.A. Adaptive reactions and resistance of the organism. *Rostov-on-Don*; 1990.
6. Gasparetti A. L., de Souza C.T., Pereira-da-Silva M. et al. Cold exposure induces tissue-specific modulation of the insulin-signalling pathway in *Rattus norvegicus*. *J Physiol* 2003; 552(1): 149–162.
7. Girotti M., Donegan J.J., Morilak D.A. Chronic intermittent cold stress sensitizes neuro-immune reactivity in the rat brain. *Psychoneuroendocrinology* 2011; 36(8): 1164–1174.
8. Han H.S., Park J., Kim J.-H., Suk K. Molecular and cellular pathways as a target of therapeutic hypothermia: pharmacological aspect. *Cur Neuropharmacol* 2012; 10(1): 80–87.
9. Kalenova I.E., Sharinova I.A., Shevelev O.A., Butrov A.V. An experience of clinical application of hypothermia in ischemic stroke treatment. *Nevrologia, Neuropsikhiatria, Psikhosomatika* 2012; (2): 41–44.
10. Kees H., Polderman M.D. Therapeutic hypothermia and controlled normothermia in the intensive care unit: Practical considerations, side effects, and cooling methods. *Crit Care Med* 2009; 37(3): 1101–1120.
11. Korolev V.V., Babijchuk 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.

- тензией // Проблемы криобиологии. – 2012. – Т. 22, №1. – С. 49–60.
16. 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; заяв. 15.08.78; опубл. 15.02.82, Бюл. № 6.
 17. Пат. 20171 Украина, МПК С 12 Q 1/38. Спосіб визначення активності протеїназ або їх інгібіторів в біологічних рідинах / Л.М. Самохіна, А.А. Дубінін; заявник і патенто-власник Інститут терапії АМН України. – №4654144/SU; заяв. 22.12.97; опубл. 25.12.97, Бюл. № 6.
 18. Alva N., Palomeque J., Carbonell T. Oxidative stress and antioxidant activity in hypothermia and rewarming: can RONS modulate the beneficial effects of therapeutic hypothermia? // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2013. – ID957054.
 19. Alva N., Palomeque J., Carbonell T. Deep hypothermia protects against acute hypoxia in vivo in rats: a mechanism related to the attenuation of oxidative stress // *Exp. Physiol.* – 2013. – Vol. 98, №6. – P. 1115–1124.
 20. Gasparetti A.L., de Souza C.T., Pereira-da-Silva M. et al. Cold exposure induces tissue-specific modulation of the insulin-signalling pathway in *Rattus norvegicus* // *J. Physiol.* – 2003. – Vol. 552, №1. – P. 149–162.
 21. Girotti M., Donegan J.J., Morilak D.A. Chronic intermittent cold stress sensitizes neuro-immune reactivity in the rat brain // *Psychoneuroendocrinology*. – 2011. – Vol. 36, №8. – P. 1164–1174.
 22. Han H.S., Park J., Kim J.-H., Suk K. Molecular and cellular pathways as a target of therapeutic hypothermia: pharmacological aspect // *Current Neuropharmacology*. – 2012. – Vol. 10, №1. – P. 80–87.
 23. Kees H., Polderman M.D. Therapeutic hypothermia and controlled normothermia in the intensive care unit: Practical considerations, side effects, and cooling methods // *Crit. Care Med.* – 2009 – Vol. 37, №3. – P. 1101–1120.
 24. Lees M., Taylor D.J., Wooley D.E. Mast cell proteinases activate precursor forms of collagenase and stromelysin, but not of gelatinases A and B // *Eur. J. Biochem.* – 1994. – Vol. 223, №1. – P. 171–177.
 25. Lyden P.D., Krieger D., Yenari M. et al. Therapeutic hypothermia for acute stroke // *Int. J. Stroke*. – 2006. – Vol. 1, №1. – P. 9–19.
 26. Shankaran S. Hypoxic-ischemic encephalopathy and novel strategies for neuroprotection // *Clin. Perinatol.* – 2012 – Vol. 39, №4. – P. 919–929.
 27. Turk E.E. Hypothermia // *Forensic. Sci. Med. Pathol.* – 2010. – Vol. 6, №2. – P. 106–115.
 28. Tu-Sekine B., Raben D.M. Dual regulation of diacylglycerol kinase (DGK). Polybasic proteins promote activation by phospholipids and increase substrate affinity // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287, №50. – P. 41619–41627.
 29. Xing J.-Q., Zhou Y., Chen J.-F. et al. Effect of cold adaptation on activities of relevant enzymes and antioxidant system in rats // *Int. J. Clin. Exp. Med.* – 2014. – Vol. 7, №11. – P. 4232–4237.
 30. Wang X., Che H., Zhang W. et al. Effects of Mild Chronic Intermittent Cold Exposure on Rat Organs // *Int. J. Biol. Sci.* – 2015. – Vol. 11, №10. – P. 1171–1180.
 31. Yenari M.A., Han H.S. Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia // *Neurosci.* – 2012. – Vol. 13, №4. – P. 267–278.
 12. Laborit H., Huguenard P., Collectif P. *Pratigue de l'hibernotherapie en chirurgie et en medecine*. Editions Masson&Cie; 1956.
 13. Lees M., Taylor D.J., Wooley D.E. Mast cell proteinases activate precursor forms of collagenase and stromelysin, but not of gelatinases A and B. *Eur J Biochem* 1994; 223(1): 171–177.
 14. Lomakin I.I., Kudokotseva O.V., Puryshcheva V.Yu. Therapeutic effect of cord blood preparation at an example of dermal structural changes under experimental hypothyreosis and its potentiation by aerocryotherapy. In: Panchenko O.A., editor. *Cryotherapy: safe technology of application*. Kiev: CPIC; 2012; 51–59.
 15. Lomakin I.I., Shylo O.V., Kozlov O.V. et al. Potentiation of tissue therapy effect in the model of pathological aging of the brain in animals. *Transplantologia* 2000; 1(1): 270–271.
 16. Lomako V.V., Samokhina L.M. Effect of rhythmic cooling on some ethological and biochemical indices in rats with experimental depression. *Problems of Cryobiology* 2011; 21(1): 22–33.
 17. Lomako V.V., Shilo A.V., Lomako S.V., Babijchuk G.A. Ethological analysis of the combined application of cold and cell therapy in rats with reserpine model of depression. *Problems of Cryobiology* 2005; 15 (3): 471–472.
 18. Lomako V.V., Shilo A.V., Lomako S.V., Babijchuk G.A. Cold influence and cord blood restore pattern of behavioral activity in stressed rats. *Veterynarna medytsyna* 2008; 89: 232–237.
 19. Lyden P.D., Krieger D., Yenari M. et al. Therapeutic hypothermia for acute stroke. *Int J Stroke* 2006; 1(1): 9–19.
 20. Marchenko V.S., Babijchuk G.A., Lomako V.V. et al. General approach to the problem of increasing the permeability of hematoencephalic barrier and body cold resistance. *Problems of Cryobiology* 1994; (1): 24–32.
 21. Meshalkin E.N., editor. *Clinical physiology of artificial hypothermia*. Novosibirsk: Nauka, 1997.
 22. Samokhina L.M., Dubinin A.A., inventors. A method for determining the activity of proteases or their inhibitors in biological fluids. Patent of Ukraine Nr. 20171, IPC C 12 Q 1/38. 1997 Dec. 25.
 23. Samokhina L.M., Starodub N.F., Babijchuk G.A., Lomako V.V. Rhythmic cold effect on activity of elastases in female rats with alcohol-depended hypertension. *Problems of Cryobiology* 2012; 22(1): 49–60.
 24. Savel'eva G.M., Shalina R.I., Smirnova A.A. et al. Asphyxia of full-term newborns. Complex therapy with the use of cranio-cerebral hypothermia. *Akusherstvo i Ginekologiya* 2015; (4): 19–24.
 25. Shankaran S. Hypoxic-ischemic encephalopathy and novel strategies for neuroprotection. *Clin Perinatol* 2012; 39(4): 919–929.
 26. Turk E.E. Hypothermia. *Forensic Sci Med Pathol* 2010; 6(2): 106–115.
 27. Tu-Sekine B., Raben D.M. Dual regulation of diacylglycerol kinase (DGK). Polybasic proteins promote activation by phospholipids and increase substrate affinity. *J Biol Chem* 2012; 287(50): 41619–41627.
 28. Veremeyenko K.N., Goloborod'ko O.P., Kizim A.I. *Proteolysis in normal and pathology*. Kiev: Zdorovya; 1988.
 29. Wang X., Che H., Zhang W. et al. Effects of mild chronic intermittent cold exposure on rat organs. *Int J Biol Sci* 2015; 11(10): 1171–1180.
 30. Xing J.-Q., Zhou Y., Chen J.-F. et al. Effect of cold adaptation on activities of relevant enzymes and antioxidant system in rats. *Int J Clin Exp Med* 2014; 7(11): 4232–4237.
 31. Yenari M.A., Han H.S. Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia. *Neurosci* 2012; 13(4): 267–278.

