

ХІМАЗА, ТОНІН І КАЛЬПАЇНИ ЗА УМОВ ПРИРОДНОЇ ГІБЕРНАЦІЇ У ХОМ'ЯКІВ

ДУ «Інститут терапії імені Л. Т. Малої НАМН України», Харків,

*Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, Харків

Зимова сплячка, або природна гібернація (ПГ), тварин характеризується зниженням метаболізму, потреби в кисні та різким уповільненням серцевого ритму, що розглядають як елементи адаптаційного механізму управління вегетативним балансом усього організму [1]. Важливу роль у підтримці гомеостазу організму відіграють протеолітичні ферменти. Особливий інтерес становлять вивчення ферментів, які беруть участь у реалізації скоротливої функції міокарда, вазоактивних процесів.

Один із найпотужніших вазоконстрикторів ангіотензин II (АII) утворюється як з ангіотензину I (АI) за допомогою ангіотензин-перетворюючого ферменту, так і альтернативними шляхами з АI за участі хімази, тканинного активатора плазміногену (ТАП), катепсину G, тоніну або з ангіотензиногену за участі ТАП, катепсину G, тоніну.

Дослідження активності хімази, тоніну у дорослих хом'яків-самців за умов штучного гіпометаболічного стану (ШГМС) дозволило виявити різнонаправлені та тканиноспецифічні їх зміни [2]. Зменшення активності тоніну спостерігали в тканинах головного мозку, легень, серця, печінки, нирок, що обумовлювали його витрачанням і пов'язували зі зменшенням інтенсивності синтезу білка, пригніченням протеолізу, ефектом зниження температури тіла. Зрос-

тання активності хімази спостерігали в печінці та пов'язували з її синтезом або вивільненням, що може сприяти підвищенню її активності в нирках, де хімаза у хом'яків здатна брати участь в утворенні АII з АI. Ці зміни частково нормалізуються через 2 год перебування тварин у нормальних температурних умовах, тобто на ранньому етапі відновлення організму після ПГ.

Регуляція життєво важливих клітинних функцій, різноманітний спектр процесів клітинного метаболізму залежать від нагромадження Ca^{2+} у клітинах. Зміни концентрації кальцію є індикатором участі різних його джерел (зовнішньої і внутрішньоклітинних) в активації стискання шлуночків серця як індекс місткості саркоплазматичного ретикулума (джерело внутрішньоклітинного кальцію) [3]. Рівень кальцію безпосередньо впливає і на активність кальціезалежних цистеїнових протеїназ — кальпаїнів. При ШГМС у хом'яків активність кальпаїнів зростає у СМ, але на ранньому етапі відновлення організму їх активність підвищується в легенях, через 24 год — у серці [2].

Характер прояву активності хімази, тоніну та кальпаїнів за умов ПГ лишається не з'ясованим. Дослідження у цьому напрямі сприятимуть розширенню знань щодо основних механізмів, які лежать в основі ПГ.

Мета роботи — визначити активність хімази, тоніну та кальпаїнів у хом'яків за умов ПГ та на етапі відновлення.

Матеріали та методи дослідження

Об'єктом дослідження обрали хом'яки, які є факультативними гібернаторами. Дорослих — (8 ± 2) міс. хом'яків-самців утримували в умовах віварію на стандартному раціоні з додаванням насіння соняшнику та пшениці. За умов перебування при $4-7^\circ\text{C}$ у неосвітленій камері з нормальним постачанням кисню хом'яки впадали в стан ПГ, знаходились у торпідному стані 3–3,5 доби, потім пробуджувались і знову впадали в сплячку. На 2–4-му бауті (епізоді сплячки) проводили декапітацію і відбирали матеріал для дослідження (група I). В експерименті також були задіяні групи тварин на ранньому (група II) і пізньому (група III) етапах відновлення — через 2 та 24 год після виходу з ПГ і контрольна група ($n=6$ в кожній групі). Дослідження проведені відповідно до загальних етичних принципів експериментів на тваринах, схвалених першим Національним конгресом з біоетики (20 вересня 2001 р., Київ, Україна).

У сироватці крові, без'ядерних фракціях гомогенатів тканин гіпоталамуса, кори мозку (КМ), стовбура мозку (СМ), мозочка, легень, серця, печінки і нирок визначали актив-

ність хімази, тоніну, кальпаїнів високочутливим (10^{-9} – 10^{-10} г активного ферменту) ферментативним методом [2; 4]. Активність хімази, тоніну розраховували в Е (мкмоль субстрату за 1 хв), кальпаїнів — у мікроеквівалентах задіяних хімічних зв'язків за 1 хв (1 мкекв. відповідає активності 1 мг/л трипсину за 1 хв). В експериментах використовували СІТ виробництва “Reanal” (Угорщина), пероксидазу хрому, фрагмент 4–8 АІІ, апротинін фірми “ICN” (США), трипсин фірми Spofa (Чехія), хлорид кальцію, цистеїн, БСА, протамінсульфат, ЕДТА, полістиролові плашки стріпові (Росія), фотометр-аналізатор імуноферментний Humareader, “Human” (Німеччина). Статистичну обробку отриманих даних проводили за методом Стьюдента — Фішера з використанням програмного забезпечення Excel.

Результати дослідження та їх обговорення

В умовах ПГ відзначено зниження активності хімази в гіпоталамусі та сироватці крові, що можна розглядати як елемент формування гіпометаболічного стану і як показник вазодилатації, підвищення в легенях, що може свідчити про розвиток вазоконстрикції легневих судин і є, скоріше за все, віддзеркаленням впливу холоду, тому що саме в легені безпосередньо потрапляє холодне повітря (табл. 1). У гру-

пі II активність хімази зростає у більшості досліджених тканин (у гіпоталамусі та сироватці крові не вивчали), окрім мозочку, де її рівень знижується. Це зниження вказує на можливість витрачання хімази без надходження з циркуляції. А зростання активності хімази свідчить про розвиток зворотного ефекту, викликаного ПГ, тобто попереднім зниженням її активності. У групі III активність хімази перевищує контрольний рівень у КМ, гіпоталамусі, СМ і печінці (основне джерело опасистих клітин, що вивільняють хімазу), знижується — у сироватці крові. Наближення її рівня до контрольного відзначено в мозочку, легенях, серці та нирках, що може вказувати на нормалізацію діяльності дихальної, серцево-судинної та видільної систем.

За умов ПГ виявлена активація тоніну в сироватці крові та її зниження в серці, що свідчить про зменшення вазоконстрикції, можливо, за рахунок локального вивільнення тоніну в кров (табл. 2). Відзначений ефект може сприяти послабленню серцевої діяльності. У групі II активність тоніну знижується порівняно з контролем у гіпоталамусі, але зростає в КМ і сироватці крові. Активація тоніну може бути пов'язана, як і хімази, з розвитком зворотного ефекту, викликаного ПГ, який сприяє відновленню активності метабо-

лічних процесів у організмі. Наявність нормального рівня тоніну в печінці може свідчити про відсутність впливу ПГ та відповідь організму на синтез і вивільнення тоніну.

Активність кальпаїнів за умов ПГ зростає порівняно з контролем у СМ, легенях, печінці та нирках, в інших досліджених тканинах (окрім серця) лишається без змін (табл. 3). Активація кальпаїнів може бути пов'язана зі зменшенням використання кисню і розвитком клітинного ушкодження [5]. Активація кальпаїнів опосередковується участю активних метаболітів кисню, це є характеристикою оксидативного стресу, рівень якого мінімальний за умов зимової сплячки [6]. Протеоліз кальпаїнами, як і збільшена генерація реактивних форм кисню, ранне порушення плазматичної мембрани тощо є ознаками контрольованих процесів, що характеризують розвиток некрозу [7]. Кальпаїни руйнують структуру (Na(+)/Ca(2+))-обмінника, це призводить до порушення гомеостазу кальцію, затримки та перевантаження кальцієм і, як наслідок, до загибелі клітин. Особливе значення має зростання активності кальпаїнів у СМ, тому що ці зміни можуть впливати на структури (пейсмейкери) дихального, серцево-судинного центрів, на більшість сенсорних шляхів, усі рухові шляхи, що передають сигнали управління від

Таблиця 1

Активність хімази за умов природної гібернації у хом'яків, Е, М±m

Об'єкт дослідження	Контроль	Група I (ПГ)	Група II (+2 год)	Група III (+24 год)
Кора мозку	0,036±0,013	0,028±0,007	0,054±0,015	0,068±0,019
Гіпоталамус	0,017±0,005	0,0081±0,0023	—	0,049±0,010*
Мозочок	0,025±0,009	0,022±0,007	0,0109±0,0033*	0,030±0,009
Стовбур мозку	0,014±0,005	0,024±0,007	0,121±0,040***	0,028±0,007
Сироватка крові	0,007±0,003	0	—	0
Легені	0,012±0,003	0,022±0,007*	0,058±0,017**	0,014±0,004
Серце	0,019±0,008	0,018±0,004	0,052±0,012	0,015±0,005
Печінка	0,013±0,005	0,0109±0,0041	0,040±0,010	0,047±0,012***
Нирки	0,015±0,006	0,021±0,008	0,087±0,016***	0,024±0,007

Примітки. У табл. 1–3: ***, **, * — ступінь вірогідності відмінностей порівняно з контролем становить <0,001, <0,01, <0,05 відповідно.

Активність тоніну за умов природної гібернації у хом'яків, E, M±m

Таблиця 2

Об'єкт дослідження	Контроль	Група I (ПГ)	Група II (+2 год)	Група III (+24 год)
Кора мозку	0,003±0,001	0,003±0,001	0,0095±0,0020*	—
Гіпоталамус	0,003±0,001	0,0041±0,0011	0	—
Мозочок	0,003±0,001	0,0048±0,0029	0,0019±0,0006	—
Стовбур мозку	0,003±0,001	0,0048±0,0013	0,0031±0,0010	—
Сироватка крові	0,0009± ±0,0003	0,0047± ±0,0015	0,0146± ±0,0011**	—
Легені	0,004±0,001	0,0029±0,0007	0,0034±0,0011	—
Серце	0,004±0,001	0,0019± 0,0006***	0,0042±0,0014	—
Печінка	0,004±0,001	0,0050±0,0018	0,0045±0,0015	—
Нирки	0,003±0,001	0,0040±0,0008	0,00301±0,0010	—

Активність кальпаїнів за умов природної гібернації у хом'яків, мкекв/хв, M±m

Таблиця 3

Об'єкт дослідження	Контроль	Група I (ПГ)	Група II (+2 год)	Група III (+24 год)
Кора мозку	0,310±0,081	0,500±0,192	0,842±0,235*	0,543±0,064*
Гіпоталамус	1,219±0,381	2,485±0,807	9,556±3,000	0,704±0,231
Мозочок	0,375±0,112	0,695±0,270	0,741±0,227	—
Стовбур мозку	0,273±0,060	0,945±0,310	2,648±0,652*	0,641±0,191
Сироватка крові	0,673±0,221	0,573±0,145	—	—
Легені	0,160±0,049	0,428±0,130**	0,344±0,110	0,372± ±0,111*
Серце	0,873±0,202	0,386±0,115***	0,747±0,231	0,566±0,107
Печінка	0,089±0,029	0,447±0,134***	0,214±0,071	0,229±0,059
Нирки	0,150±0,032	0,520± ±0,119***	0,619± ±0,052***	0,241±0,093

півкуль головного мозку, тощо. Це може віддзеркалюватися на функціях симпатичних і парасимпатичних еферентних волокон нейронів неспецифічних нервових центрів, які кодують функції усіх систем організму. Отримані дані щодо активності кальпаїнів у СМ узгоджуються з результатами досліджень впливу ШГМС на хом'яків [2].

Зниження активності кальпаїнів за умов ПГ у серці може бути обумовлене зменшенням концентрації вільного кальцію та пов'язане з відсутністю активації стискання [3], і як наслідок — з ослабленням серцевої діяльності, яка повністю нормалізується на етапі відновлення. Указані зміни рівня кальпаїнів у серці за умов ПГ

протилежні таким при ШГМС, що свідчить про важливість прояву активності кальпаїнів у розвитку адаптації, регулюванні серцевої діяльності при переході тварин до зимової сплячки. У групі II відзначено, що активність кальпаїнів перевищує контрольний рівень практично в усіх досліджених тканинах, окрім легень і серця (у сироватці крові не вивчено), і лишається підвищеною в групі III в КМ, СМ, печінці, зростає в легнях (у мозочку та сироватці крові не досліджено). Це зростання активності кальпаїнів можна пов'язати з розвитком клітинного ушкодження. При цьому в групі II легені та серце виявилися більш захищеними від негативних наслідків впливу ві-

дігріву. Але у групі III відзначена активація кальпаїнів у легнях, що може впливати на зміну сили дихальних м'язів, розвиток мускульних дистрофій, втоми при збільшенні активації м'язів. Найбільша активність кальпаїнів відзначена в групі II в гіпоталамусі. Це може бути пов'язано з активацією кальцієзалежних механізмів, які грають важливу роль у регуляції клітинних сигнальних шляхів, реконструюванні мембран. Указані зміни мають зворотний характер і можуть залежати від активності кальцієзалежної фосфоліпази 2, яка залучена до продукції арахідонової кислоти (ключового компонента клітинних сигнальних шляхів) і реконструювання мембран [8]. Зважаючи, що при катаболізмі арахідонової кислоти генеруються вільні радикали, можна припустити можливість розвитку клітинного ушкодження. Але нормалізація зазначених змін у групі III вказує на їхній сплесковий характер, що може не призводити до негативних наслідків.

Висновки

1. Розвиток ПГ у дорослих хом'яків-самців призводить до зниження активності хімази в гіпоталамусі та сироватці крові, підвищення — у легнях, але через 2 год відновлення організму вона зростає у більшості досліджених тканин, окрім мозочку, через 24 год — у КМ, гіпоталамусі, СМ і печінці та може сприяти розвитку вазоконстрикції.

2. За умов ПГ активність тоніну зростає в сироватці крові та знижується в серці, що може свідчити про зниження вазоконстрикції, ослаблення серцевої діяльності. Через 2 год відновлення — зростає в КМ, знижується — у гіпоталамусі, що може бути пов'язано з розвитком зворотного ефекту, викликаного ПГ.

3. Активність кальпаїнів за умов ПГ зростає в СМ, леге-

нях, печінці та нирках, що можна розглядати як наслідок оксидативного стресу, рівень якого мінімальний за умов зимової сплячки, знижується в серці, що може призводити до ослаблення серцевої діяльності, яка повністю нормалізується на етапі відновлення організму. Перспективним є дослідження активності хімази на більш пізніх етапах відновлення організму для встановлення терміну ризику розвитку вазоконстрикторних змін, а також вивчення вказаних ферментів при різних гіпо- і гіперметаболических станах для розширення знань щодо основних механізмів, які лежать в основі адаптації.

ЛІТЕРАТУРА

1. Andrews M. T. Advances in molecular biology of hibernation in mammals / M. T. Andrews // *Bioessays*. — 2007. — Vol. 29, N 5. — P. 431–440.
2. Самохіна Л. М. Хімаза, тонін та кальпаїни за умов штучного гіпометаболического стану у хом'яків / Л. М. Самохіна, В. В. Ломако, О. В. Шило // *Проблеми криобіології*. — 2007. — Т. 17, № 4. — С. 346–355.
3. The seasonal peculiarities of force-frequency relationships in active ground squirrel *Spermophilus undulatus ventricle* / O. V. Nakipova, N. M. Zakharova, L. A. Andreeva [et al.] // *Cryobiology*. — 2007. — Vol. 55, N 3. — P. 173–181.
4. Патент № 34208, Україна МПК G01N33/48, A61B19/02 // Набір для визначення активності хімази в біологічних рідинах / Самохіна Л. М. — 2003. Бюл. № 12.

5. Contribution of calpain to cellular damage in human retinal pigment epithelial cells cultured with zinc chelator / Y. Tamada, R. D. Waikup, T. R. Shearer, M. Azuma // *Curr. Eye. Res.* — 2007. — Vol. 32, N 6. — P. 565–573.

6. Carey H. V. Mammalian Hibernation: Cellular and Molecular Responses to Depressed Metabolism and Low Temperature / H. V. Carey, M. T. Andrews, S. L. Martin // *Physiol. Rev.* — 2003. — Vol. 83. — P. 1153–1181.

7. Golstein P. Cell death by necrosis: towards a molecular definition / P. Golstein, G. Kroemer // *Trends. Biochem. Sci.* — 2007. — Vol. 32, N 1. — P. 37–43.

8. Woods A. K. Cytosolic phospholipase A2 regulation in the hibernating thirteen-lined ground squirrel / A. K. Woods, K. B. Storey // *Cell. Mol. Biol. Lett.* — 2007. — Vol. 12, N 4. — P. 621–632.

UDK 577.156.5

Л. М. Самохіна, В. В. Ломако, О. В. Шило

ХІМАЗА, ТОНІН І КАЛЬПАЇНИ ЗА УМОВ ПРИРОДНОЇ ГІБЕРНАЦІЇ У ХОМ'ЯКІВ

За умов природної гібернації (ПГ) у дорослих хом'яків-самців активність хімази змінюється тканиноспецифічно, через 2 год відновлення організму зростає у більшості тканин, окрім мозочку, через 24 год — у корі мозку (КМ), гіпоталамусі, стовбурі мозку (СМ) та печінці, що може сприяти розвитку вазоконстрикції. Активність тоніну за умов ПГ зростає в сироватці крові, знижується в серці, що може сприяти зменшенню вазоконстрикції, ослабленню серцевої діяльності, через 2 год відновлення зростає в КМ, знижується в гіпоталамусі. Активність кальпаїнів за умов ПГ зростає в СМ, легенях, печінці та нирках, що розглядають як наслідок оксидативного стресу, знижується в серці, що пов'язують із ослабленням серцевої діяльності, яка повністю нормалізується на етапі відновлення організму.

Ключові слова: хімаза, тонін, кальпаїни, природна гібернація, хом'яки.

UDC 577.156.5

L. M. Samokhina, V. V. Lomako, O. V. Shilo

CHYMASE, TONIN AND CALPAINS UNDER CONDITIONS OF NATURAL HIBERNATION IN HAMSTERS

Under hibernation conditions chymase activity in adult hamsters-males changes specifically in tissues, in 2 hrs organism renewal increases in most tissues, except for the cerebellum, in 24 hrs — in the cerebral cortex (CC), hypothalamus, brain stem (BS) and liver, that can favor vasoconstriction development. The tonin activity under hibernation conditions increases in the blood serum, declines in the heart, that can cause the constriction reduction, relaxation of cardiac activity, in 2 hrs of renewal it increases in CC, declines in hypothalamus. Calpains activity to the hibernation are increased in the BS, lungs, liver and kidneys, that is considered as a result of oxidative stress, declines in the heart, that is connected with relaxation of cardiac activity which is fully normalized at the stage of organism renewal.

Key words: chymase, tonin, calpains, hibernation, hamsters.

UDK 617.7:612.13-073.178:515.357-092.9

И. Н. Михейцева

УЧАСТИЕ МЕЛАТОНИНА В ЦИРКАДНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ОФТАЛЬМОТОНУСА

ГУ «Институт ГБиТТ им. В. П. Филатова НАМН Украины», Одесса

Жизнедеятельность организма можно представить как четко скоординированную систему биологических ритмов, начиная с субклеточного и заканчивая организменным уровнем. Многие биологические

процессы характеризуются циркадными ритмами, осуществляющими координацию клеточных функций с изменениями окружающей среды. Циркадные ритмы — это эндогенно опосредованные приблизительно

24-часовые циклы поведенческой и физиологической активности. У высших животных и человека эти ритмы формируются нейронами супрахиазматического ядра (СХЯ) гипоталамуса, выступающего в ка-