

Влияние ритмического холодого воздействия на активность эластаз у самок крыс с алкогользависимой гипертензией

UDC 616.12-008.331.1:612.393.1:615.832.9

L.M. SAMOKHINA^{1*}, N.F. STARODUB², G.A. BABYCHUK³, V.V. LOMAKO³

Rhythmic Cold Effect on Activity of Elastases in Female Rats with Alcohol-Dependent Hypertension

Под влиянием ритмических холодогов воздействий (РХВ) у самок крыс с алкогользависимой гипертензией отмечено угнетение активности эластаз различного происхождения в тканях коры мозга, легких, сердца, печени и почек ниже контрольного уровня. РХВ приводят к противоположно направленным изменениям эластазоингибиторной активности (ЭИА) α -1-ингибитора протеиназ (α -1-ИП), вызванным действием алкоголя, а именно – к повышению во всех исследуемых тканях, кроме почек, в которых наблюдали снижение. При этом по сравнению с контролем ЭИА α -1-ИП повышалась только в легких и печени, т. е. в местах возможного синтеза данного ингибитора. Отсутствие стимулирования ингибиторного потенциала в коре мозга и сердце согласуется с локальным снижением ЭИА α -1-ИП в контроле и может быть обусловлено тем, что ингибитор не поступает из мест синтеза.

Ключевые слова: ритмическое холодое воздействие, алкогользависимая гипертензия, эластаза, металлоэластаза, эластазоподобная активность цистеиновых протеиназ, α -1-ингибитор протеиназ, самки.

Під дією ритмічних холодогов впливів (РХВ) у самок шурів з алкогользалежною гіпертензією відзначено пригнічення активності еластаз різного походження в тканинах кори мозку, легень, серця, печінки і нирок нижче контрольного рівня. РХВ призводять до протилежно направлених змін еластазоінгібіторної активності (ЕІА) α -1-інгібітора протеїназ (α -1-ІП), викликаних дією алкоголю, а саме до її підвищення у всіх досліджених тканинах, окрім нирок, в яких спостерігали зниження. При цьому порівняно з контролем ЕІА α -1-ІП зростала лише в легенях і печінці, тобто в місцях можливого синтезу даного інгібітору. Відсутність стимулювання інгібіторного потенціалу в корі мозку і серці узгоджується з локальним зниженням ЕІА α -1-ІП в контролі і може бути обумовлено тим, що інгібітор не надходить з місць синтезу.

Ключові слова: ритмічний холодогов вплив, алкогользалежна гіпертензія, еластаза, металоеластаза, еластазоподібна активність цистеїнових протеїназ, α -1-інгібітор протеїназ, самки.

Under the influence of rhythmic cold exposures (RCEs) in female rats with alcohol-dependent hypertension there was found a suppressed activity of elastases of different origin in tissues of brain cortex, lungs, heart, liver and kidneys lower than the control level. RCEs lead to oppositely directed changes in elastase-inhibitory activity (EIA) of α -1- proteinase inhibitor (α -1-PI) caused by alcohol effect and namely to the rise in all the studied tissues except kidneys wherein there was found a decrease. Herewith if compared to the control EIA α -1-PI increased only in lungs and liver, *i. e.* in the sites of possible synthesis of this inhibitor. The absence of stimulating an inhibitory potential in brain cortex and heart is in accordance with local decrease of EIA α -1-PI in the control and may be stipulated with the fact that inhibitor does not enter from the synthesis sites.

Key words: rhythmic cold exposure, alcohol-dependent hypertension, elastase, metalloelastase, elastase-like activity of cysteine proteinases, α -1- proteinase inhibitor, females.

В последние десятилетия значительно увеличались первичная заболеваемость алкоголизмом, а также смертность от отравления алкоголем [9].

Употребление алкоголя вызывает 5–25% всех гипертензивных состояний, причем умеренное его потребление 20–34 г в сутки повышает риск развития артериальной гипертензии на 40%, а потребление 35 г и более – на 90% [6, 24].

Механизмы формирования артериальной гипертензии при потреблении алкоголя включают разви-

During recent decades primary alcoholism morbidity as well as mortality from poisoning with alcohol has significantly increased [9].

The alcohol consumption causes 5–25% of all hypertensive states, herewith its moderate consumption (20–34 g) per day increases the risk of development of arterial hypertension by 40% and the ingestion of 25 g and more by 90% [6, 24].

The mechanisms of forming the arterial hypertension when consuming alcohol comprise the develop-

¹ГУ «Институт терапии им. Л.Т. Малой АМН Украины», г. Харьков

²Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, г. Киев

³Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: просп. Постышева, 2-а, г. Харьков, Украина 61039; тел.: (+38 057) 373-90-97, факс: (+38 057) 370-28-18, электронная почта: lub.samokhina@yandex.ua

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

²National University of Bioresources and Environmental Management of Ukraine, Kiev, Ukraine

³Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 2-a, Postysheva ave., Kharkov, Ukraine 61039; tel.:+380 57 373 90 97 , fax: +380 57 370 28 18, e-mail: lub.samokhina@yandex.ua

тие дисфункции эндотелия, что обусловлено увеличением продукции свободных радикалов, окислительным стрессом [24]. Эти процессы непосредственно связаны с активацией нейтрофилов, которые высвобождают свободные радикалы и протеиназы, особую роль среди которых играет сериновая эластаза (EC 3.4.21.37) [5, 27]. С аккумуляцией сериновой эластазы в гладкомышечных клетках связывают одно из патогенетических звеньев развития и прогрессирования гипертензивных изменений в сосудах [34, 35].

Ранее нами было показано [17], что у самок крыс при алкогользависимой гипертензии (АЗГ) повышается общая активность эластаз, представленная в основном нейтрофильной сериновой эластазой. Кроме того, в большинстве органов повышается эластазаподобная активность цистеиновых (или тиоловых) протеиназ (EC 3.4.22) эндотелиального происхождения, активность макрофагальной металлоэластазы (EC 3.4.24.65) уменьшается. Эти изменения на фоне снижения эластазоингибиторной активности α -1-ингибитора протеиназ (ЭИА α -1-ИП) могут обуславливать повреждение органов, в частности развитие деструктивных процессов.

Эффективным средством коррекции патологических изменений в организме являются ритмические холодовые воздействия (РХВ) [2, 3], которые существенно улучшают функцию иммунной системы, способствуют усилению адаптации организма к действию неблагоприятных факторов. Применение РХВ ($-4...-6^{\circ}\text{C}$) с частотой 0,1–0,2 Гц в течение 90 мин восстанавливает нарушения, вызванные эмоционально-болевым стрессом, позволяет направленно корректировать патологические процессы, нормализует уровень гормонов у самок крыс [8]. Проведение РХВ у крыс со стимулированной эмоционально-болевым стрессом гипертензией способствует нормализации активности отдельных ферментов, повышению активности ингибиторов протеиназ, что предотвращает возможность участия эластаз в процессах повреждения органов [16].

Цель исследования – изучить влияние РХВ на активность эластаз и α -1-ИП в тканях различных органов самок крыс с АЗГ.

Материалы и методы

В исследовании задействованы 4 группы самок крыс, из них 2 опытные: АЗГ, АЗГ + РХВ; группа сравнения – РХВ; интактные – контроль, $n = 5$ в каждой группе. Начальный возраст животных, которым моделировали АЗГ, составил 7–8 месяцев, групп сравнения и контроля – 17–18 месяцев.

Исследования проведены в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными III Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2007) и согласованными с положе-

ment of dysfunction of endothelium, which is stipulated with the rise in the production of free radicals, oxidative stress [24]. These processes are directly related to the activation of neutrophils, releasing free radicals and proteinases, among those the special role belongs to serine elastase (EC 3.4.21.37) [5, 27]. One of pathogenetic links in development and progressing of hypertensive changes in vessels is associated with accumulation of serine elastase in smooth muscle cells [34, 35].

Previously we have shown [17] that in female rats at alcohol-dependent hypertension (ADH) total activity of elastase represented mainly with neutrophil elastase increases. In addition in the majority of organs the elastase-like activity of cysteine (or thiol) proteinases (EC.3.4.22) of endothelial origin enhances and the activity of macrophage metalloelastase (EC 3.4.24.65) decreases. These changes on the background of reducing elastase-inhibitory activity of α -1- proteinase inhibitor (EIA α -1-PI) may stipulate the lesion of organs in particular development of destructive processes.

An effective way to correct the pathological changes in an organism are rhythmic cold exposures (RCEs) [2, 3] which significantly improve the function of immune system, contribute to the strengthening of organism adaptation to the effect of unfavorable factors. Application of RCEs ($-4...-6^{\circ}\text{C}$) with 0.1–0.2 Hz frequency for 90 min eliminates the disorders caused by emotional-pain stress, normalizes the hormonal level in female rats [8]. The RCEs in the rats with stimulated by emotional-pain stress hypertension contribute to normalized activity of certain enzymes, rise in the activity of proteinase inhibitors, preventing the possible involvement of elastases into organs' lesions [16].

The research aim was to investigate the RCEs on activity of elastases and α -1-PI in tissues of different organs of female rats with ADH.

Materials and methods

In this research there were used 4 groups of female rats, 2 of them were experimental: ADH; ADH + RCE; the group of comparison was RCE; intact represented the control, $n = 5$ in each group. Initial age of animals in which ADH was modeled made 7–8 months, for the groups of comparison and control it was 17–18 months.

The studies were performed in accordance with 'General principles of experiments in animals' approved by the 3rd National Congress in Bioethics (Kiev, 2007) and coordinated with the statements of 'European convention about the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes' (Strasbourg, 1986).

The animals were kept in vivarium with the standard diet. The ADH was modeled with 'two bottle choice method' (free choice between water and ethanol solu-

ниями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Животных содержали в виварии на стандартном рационе. Моделирование АЗГ проводили «двухбутылочным» методом (при свободном выборе между водой и раствором этанола) [1]. Крысы получали раствор этанола 1-ю неделю 5%-й, 2-ю – 10%, 3-ю и до конца эксперимента – 15%. Общий срок алкоголизации – 10 месяцев.

Для проведения РХВ с частотой 0,1 Гц в течение 65 мин использовали охлаждающее устройство с программным управлением, созданное в ИПКиК НАНУ, приспособленное для прерывистой подачи хладагента (холодный воздух с температурой $5 \pm 1^\circ\text{C}$).

Контроль систолического давления осуществляли медицинским тонометром, манжету накладывали на хвост. Из эксперимента животных выводили декапитацией.

Печень перфузировали охлажденным 0,15 М раствором NaCl. Навески тканей коры мозга, легкого, сердца, печени и почек (300 мг) отмывали охлажденным физиологическим раствором и гомогенизировали в 3 мл Na-фосфатного буфера pH 7,4 на холоде, затем центрифугировали 10 мин при 5000 g на центрифуге PC-6 при температуре 4°C . Хранили при -20°C до анализа.

Активность эластаз и ЭИА α -1-ИП в безядерных фракциях указанных тканей исследовали высокочувствительным ферментативным методом, разработанным в Институте терапии им. Л.Т. Малой АМН Украины [18, 20]. Принцип метода основан на использовании в качестве субстрата протеолитической реакции иммобилизованного на поверхности полистирола комплекса маркерного фермента (пероксидазы хрена) и аланил-аланина (Ala-Ala). В результате реакции происходит расщепление субстрата Ala-Ala и его десорбция с поверхности полистирола вместе с молекулами связанного с ним маркерного фермента. Контролем были растворы эластазы активностью от 0,0005 до 0,5 Ед/мг белка.

Оценка активности различных по происхождению эластаз основана на их отличии по чувствительности к ингибиторам [7]. Для определения эластазоподобной активности цистеиновых протеиназ (ЭПАЦП) перед протеолитической реакцией подавляли активность сериновых и металлопротеиназ добавлением к исследуемым образцам 1:1 ингибиторного раствора, содержащего 0,02%-й фенилсульфонилфлюорид и 6%-й этилендиаминтетраацетат [18, 20]. Для определения активности металлоэластазы перед протеолитической реакцией подавляли активность сериновой эластазы и ЭПАЦП добавлением к исследуемым образцам

(tion) [1]. The rats received the ethanol solution as follows: first week 5%, 10% for 2nd one, 15% during the 3rd one and to the end of experiment. Total term of alcoholization was 10 months.

To perform RCEs with 0.1 Hz frequency for 65 min we have used a cooling device with programmable control, designed at IPC&C of the National Academy of Sciences of Ukraine, adjusted for discontinuous supply of coolant (cold air with temperature of $5 \pm 1^\circ\text{C}$).

Systolic pressure was controlled with medical blood pressure gauge, the cuff was put on a tail. The animals were slaughtered by decapitation.

The liver perfusion was performed with cooled 0.15 M NaCl solution. The tissue samples of brain cortex, lung, heart, liver and kidneys (300 mg) were washed with cooled physiological solution and homogenized in 3 ml Na-phosphate buffer pH 7.4 with cold, then centrifuged for 10 min at 5000g with PC-6 centrifuge at 4°C . They were stored at -20°C prior to analysis.

The activity of elastases and EIA α -1-PI in nuclear-free fractions of the mentioned tissues was studied with highly sensitive enzyme method, designed at L.T. Malaya Institute of Therapy of Academy of Medical Sciences of Ukraine [18, 20]. The principle of this method is based on using complex of marker enzyme (horseradish peroxidase) and alanyl-alanyl (Ala-Ala) immobilized on the surface polystyrol as a substrate of proteolytic reaction. As a result of the reaction the Ala-Ala substrate cleavage and its desorption from the surface of polystyrol along with the molecules of bound with it enzyme take place. The control was the solutions of elastase with the activity from 0.005 to 0.5 units/mg protein.

The assessment of activity of different by origin elastases is based on their different sensitivity to inhibitors [7]. To examine cysteine proteinases elastase-like activity (CPELA) prior to proteolytic reaction the activity of serine and metalloproteinases was suppressed by adding to the studied samples of 1:1 inhibitory solution containing 0.02% phenyl sulfonyl fluoride and 6% ethylene diamine tetraacetate [18, 20]. To study the activity of metalloelastase prior to proteolytic reaction the activity of serine elastase and CPELA was suppressed by adding to the studied samples and incubation of 0.04% phenylsulfonyl fluoride and 0.1% monoiodoacetate for 5 min at 37°C . Total activity of elastases was studied without reaction with inhibitors.

To examine EIA α -1-PI prior to proteolytic reaction to the investigated samples there was added the surplus of elastase (solution with the activity of 0.5 units/mg protein) 1:1 for binding with inhibitor, incubated for 15 min at 20°C .

After proteolytic reaction the products of reaction were removed by washing-out and there was found

0,04%-го фенилсульфонилфлюорида и 0,1%-го моноиодацетата. Инкубировали 5 мин при 37°C. Общую активность эластаз исследовали без реакции с ингибиторами.

Для определения ЭИА α -1-ИП перед протеолитической реакцией к исследуемым образцам добавляли избыток эластазы (раствор активностью 0,5 Ед/мг белка) 1:1 для связывания с ингибитором, инкубировали 15 мин при 20°C.

После протеолитической реакции отмыванием удаляли продукты реакции и определяли остаточную активность пероксидазы в реакции с перекисью водорода и ортофенилендиамином. По измерениям оптической плотности контрольных образцов рассчитывали активность эластаз и ЭИА α -1-ИП в исследуемых пробах в Ед/мл, с учетом концентрации белка в пробах – в Ед/мг белка. Концентрацию белка определяли методом Бредфорда [21].

В работе использовали пероксидазу хрена, эластазу, фенилсульфонилфлюорид, моноиодацетат («ICN», США), Ala-Ala («Fluka», Германия), этилендиаминтетраацетат, бычий сывороточный альбумин, полистироловые планшеты (Россия) и фотометр-анализатор иммуноферментный «Humanreader 2106-1709» («Human», Германия).

Статистическую обработку данных проводили по методу Стьюдента-Фишера с использованием программного обеспечения «Excel».

Результаты и обсуждение

Уровень систолического артериального давления у алкоголизованных крыс составил $176,70 \pm 20,68$ мм рт. ст. (контроль $130,00 \pm 12,25$ мм рт. ст.), что указывает на формирование гипертензии, в результате РХВ при АЗГ – $125,0 \pm 10,5$ мм рт. ст., в группе сравнения – $127,00 \pm 13,35$ мм рт. ст.

Исследование группы животных с АЗГ позволило выявить, что общая активность эластаз повышается существенно во всех исследуемых тканях в 8–12 раз, а в почках – в 100 раз (табл. 1). Достоверное увеличение ЭПАЦП наблюдали в коре мозга, легких, сердце, хотя и менее выраженное, по сравнению с активностью эластаз. Активность металлопротеиназы, в отличие от эластаз и ЭПАЦП, при АЗГ снижалась во всех исследуемых тканях, кроме почек, наиболее выраженное снижение (в сотни раз) отмечено в сердце.

Выявленные нами более низкие значения общей активности эластаз в контроле по сравнению с металлэластазой и ЭПАЦП, обусловлены тем, что при определении «общей» активности протеиназ имеет место конкуренция за субстрат, а при подавлении конкурентных эластаз уровень активности отдельных «частных» протеиназ возрастает.

a residual activity of peroxidase in the reaction with hydrogen peroxide and orthophenylenediamine. On the measurements for optical density of the control samples there was calculated the activity of elastases and EIA α -1-PI in the investigated assays in units/ml with taking into account the protein concentrations in the samples, in units/mg protein. Protein concentration was found by Bradford method [21].

In the work there were used horseradish peroxidase, elastase, phenylsulfonyl fluoride, monoiodacetate (ICN, USA), Ala-Ala (Fluka, Germany), ethylenediaminetetraacetate, bovine serum albumin, polystyrol strip plates (Russia) and immune-enzyme photometer-analyser Humanreader 2106-1709 (Human, Germany).

The data were statistically processed with Student-Fisher method using Excel software.

Results and discussion

The level of systolic arterial pressure in alcoholized rats made 176.70 ± 20.68 mm Hg (control 130.00 ± 12.25 mm Hg) pointing to the formation of hypertension, as the result of RCEs at ADH was 125 ± 10.5 mm Hg in the comparison group this was 127.00 ± 13.35 mm Hg.

The study of the group of animals with ADH enabled the revealing that total activity of elastases increased in all the investigated tissues in 8–12 times and in kidneys in 100 times (Table 1). Statistically significant rise in CPELA was observed in brain cortex, lungs, heart, though it was less manifested if compared with the activity of elastases. The activity of metalloproteinase in contrast to elastases and CPELA at ADH reduced in all the studied tissues except the kidneys, the most manifested reduction (in hundreds times) was found in heart.

The revealed by us much lower values of total activity of elastases in the control if compared with metalloelastase and CPELA are stipulated with the fact that when examining total activity of proteinases the competition for the substrate takes place, and when suppressing the competitive elastases the level of activity of certain particular proteinases increases.

Herewith EIA α -1-PI in the majority of the studied tissues reduced if compared with the control except kidneys in them the increase was observed (Table 2).

The findings were in accordance with the changes of activity of elastases and EIA α -1-PI at ADH, described previously [17]. The activation of elastases was mainly associated with the development of oxidative injury. Systematic formation of excessive amount of acetaldehyde during alcohol addiction leads to oxidative stress, and development of hypertension [24]. The presence of the most significant activation of elastases in kidneys is rather related to local accumulation of toxic substances. A special role at alcohol intoxication belongs to CPELA, since its activation may

При этом ЭИА α -1-ИП в большинстве исследованных тканей снижается по сравнению с контролем, кроме почек, в них наблюдается ее повышение (табл. 2).

Полученные данные согласуются с изменениями активности эластаз и ЭИА α -1-ИП при АЗГ, описанными ранее [17]. Активацию эластаз связывают, в основном, с развитием оксидативного повреждения. Систематическое образование избыточного количества ацетальдегида при злоупотреблении алкоголем приводит к оксидативному стрессу, развитию гипертензии [24]. Наличие наиболее значимой активации эластаз в почках связано, скорее всего, с локальным накоплением токсических веществ. Особая роль при алкогольной интоксикации принадлежит ЭПАЦП, так как ее активация может быть связана с развитием морфофункциональных нарушений структуры сосудов и характера протекающих метаболических процессов. Известно, что эндотелиоциты способны синтезировать и высвобождать эластазу [25, 26, 33]. Изменения ее активности, очевидно, являются следствием сосудистой дисциркуляции, застойных явлений, возникающих за счет нарастания венозного полнокровия на фоне обеднения капиллярной сети [10]. Достоверный характер изменений ЭПАЦП в тканях коры мозга, легких и сердца указывает на возможность ее локального участия в развитии деструктивных процессов и нарушении функционирования этих органов при АЗГ. Снижение активности металлоэластазы, в свою очередь, связывают с ее расходом в процессах деградации экстрацеллюлярного матрикса [17]. Наиболее выраженное снижение ее активности в сердце может свидетельствовать о существенном локальном тканевом повреждении, развитии деструктивных процессов. Введение этанола в организм приводит к эскалации сосудистых нарушений в сердце, дистрофическим изменениям в субклеточных структурах, формированию очагов распада миоцитов [31].

Защищенность тканей от избыточной активации эластаз при АЗГ может обеспечиваться повышением ЭИА α -1-ИП. Усиление ЭИА α -1-ИП лишь в почках может быть связано с чрезмерной локальной активацией эластаз (табл. 2).

Таблица 1. Активность эластаз у самок крыс с алкогользависимой гипертензией под влиянием РХВ ($n = 5$), ($M \pm m$), Ед $\times 10^{-3}$ /мг белка

Table 1. Activity of elastases in female rats with alcohol-dependent hypertension at RCE ($n = 5$), ($M \pm m$) Units $\times 10^{-3}$ /mg protein

Образцы тканей Tissue samples	Контроль Control	АЗГ ADH	АЗГ + РХВ ADH + RCE	РХВ RCE
Активность эластаз (общая активность) Elastase activity (total activity)				
Кора мозга Brain cortex	0,885 \pm 0,221	9,624 \pm 2,293 ³	0,10 \pm 0,02*	70,7 \pm 2,4 ³
Легкие Lungs	0,402 \pm 0,134	6,293 \pm 1,840 ³	0,018 \pm 0,006 ²	53,2 \pm 17,1 ³
Сердце Heart	0,664 \pm 0,221	5,387 \pm 1,354 ³	0,016 \pm 0,005 ²	102,3 \pm 33,8 ³
Печень Liver	0,499 \pm 0,138	4,590 \pm 1,028 ³	0,019 \pm 0,006 ¹	242,8 \pm 74,7 ³
Почки Kidneys	0,080 \pm 0,023	8,571 \pm 3,023 ²	0,013 \pm 0,004 ²	83,2 \pm 27,3 ³
Эластазоподобная активность цистеиновых протеиназ Cysteine proteinase elastase-like activity				
Кора мозга Brain cortex	2,268 \pm 0,553	4,436 \pm 1,165 ¹	0,068 \pm 0,012 ²	5,66 \pm 0,40*
Легкие Lungs	0,906 \pm 0,234	4,48 \pm 1,12 ¹	0,129 \pm 0,023 ¹	4,35 \pm 1,80 ²
Сердце Heart	0,619 \pm 0,177	3,483 \pm 0,870 ¹	0,066 \pm 0,012 ²	7,26 \pm 0,90 ²
Печень Liver	0,585 \pm 0,138	0,876 \pm 0,304	0,063 \pm 0,014 ²	6,48 \pm 1,52 ²
Почки Kidneys	0,445 \pm 0,118	1,295 \pm 0,299	0,071 \pm 0,019*	3,67 \pm 1,04 ²
Активность металлоэластазы Metalloelastase activity				
Кора мозга Brain cortex	6,585 \pm 2,324	0,714 \pm 0,187 ¹	0,036 \pm 0,012 ²	27,5 \pm 4,8 ¹
Легкие Lungs	2,483 \pm 0,604	0,986 \pm 0,240 ¹	0,023 \pm 0,007 ²	18,9 \pm 5,5 ¹
Сердце Heart	2,833 \pm 0,929	0,009 \pm 0,003 ²	0,008 \pm 0,003 ²	14,85 \pm 4,12 ¹
Печень Liver	2,468 \pm 0,776	0,304 \pm 0,076 ²	0,024 \pm 0,004 ³	20,6 \pm 8,3 ¹
Почки Kidneys	1,188 \pm 0,297	1,694 \pm 0,232	0,019 \pm 0,006 ²	24,0 \pm 4,8 ³

Примечание: ^{1,2,3} – степень вероятности различий по сравнению с контролем, $p < 0,05$, $< 0,01$, $< 0,001$ соответственно.

Notes: ^{1,2,3} – probability of significant differences comparing with the control, $p < 0.05$, < 0.01 , < 0.001 , correspondingly.

be related to the development of morphofunctional impairments of the structure of vessels and the character of proceeding metabolic processes. It is known that endotheliocytes are capable to synthesize and release elastase [25, 26, 33]. The changes in its activity are likely the result of vascular discirculation, stagnant phenomena appearing due to increased congestion on the background of capillary network depletion [10].

Применение РХВ при АЗГ способствовало существенному угнетению активности эластаз, металлоэластазы и ЭПАЦП во всех исследуемых образцах ниже контрольного уровня (см. табл. 1). Снижение уровня активности эластаз и ЭПАЦП может быть обусловлено формированием повышенной устойчивости организма к негативным факторам и феноменом перекрестной адаптации к стрессорным воздействиям [11, 19]. Данное предположение согласуется с результатами исследований других авторов, указывающих, что экстремальная криотерапия у алкоголизованных крыс способствует снижению венозной напряженности и увеличению площади капиллярного русла [9, 10]. Последнее, возможно, вызывает и снижение активности макрофагальной металлоэластазы.

В большинстве исследуемых образцов тканей в группе АЗГ + РХВ, как и в контроле, выявленный нами уровень активности металлоэластазы и ЭПАЦП выше по сравнению с «общей» активностью эластаз, что связано, как указано выше, со снижением конкуренции за субстрат при подавлении отдельных эластаз.

Наблюдаемое нами уменьшение активности эластаз в группе АЗГ + РХВ взаимосвязано с увеличением эластазоингибиторной активности α -1-ИП, изменения которой имели противоположно направленный характер по сравнению с вызванными действием алкоголя, а именно: повышение в тканях коры мозга, легких, сердца, печени и снижение в почках (табл. 2).

Следует отметить, что в группе АЗГ + РХВ активность эластаз в легких, сердце и печени, ЭПАЦП в коре мозга снижались более чем в 20 раз, а активность металлоэластазы – в сотни раз практически во всех исследуемых тканях, кроме почек, в которых выявлено уменьшение ее уровня в 55 раз. Большая степень выраженности подавления активности металлоэластазы в группе АЗГ + РХВ, по сравнению с эластазами и ЭПАЦП, может свидетельствовать о существенном вкладе макрофагов в развитие ответной реакции на РХВ при АЗГ. При этом меньшее снижение активности металлоэластазы в почках, по сравнению с другими исследованными тканями, по-видимому, связано с наличием защищенности данного органа от негативного проявления активности эластаз за счет исходного локального повышения ЭИА α -1-ИП при АЗГ. Более существенное снижение активности эластаз в легких, сердце и печени, по срав-

Таблица 2. Эластазоингибиторная активность α -1-ингибитора протеиназы у самок крыс с алкогользависимой гипертензией под влиянием РХВ ($n = 5$), ($M \pm m$), Ед $\times 10^{-3}$ /мг белка

Table 2. Elastase-inhibiting activity of α -1-inhibiting proteinases in female rats with alcohol-dependent hypertension at RCE ($n = 5$), ($M \pm m$) Units $\times 10^{-3}$ /mg protein

Образцы тканей Tissue samples	Контроль Control	АЗГ ADH	АЗГ + РХВ ADH + RCE	РХВ RCE
Кора мозга Brain cortex	550,5 \pm 1,3	375,9 \pm 0,3 ¹	393,6 \pm 2,1 ³	373,3 \pm 7,2 ²
Легкие Lungs	334,4 \pm 0,9	266,5 \pm 0,4 ¹	458,1 \pm 3,0 ¹	456,9 \pm 2,3 ²
Сердце Heart	441,8 \pm 0,8	322,4 \pm 0,6 ¹	409,3 \pm 2,1 ¹	400,1 \pm 6,1 ¹
Печень Liver	275,7 \pm 1,0	190,4 \pm 0,5 ¹	488,7 \pm 1,4 ²	484,2 \pm 3,4 ²
Почки Kidneys	296,8 \pm 0,5	332,2 \pm 0,2 [*]	320,7 \pm 2,1 ¹	306,1 \pm 6,8 ¹

Примечание: ^{1,2,3} – степень вероятности различий по сравнению с контролем, $p < 0,05$, $< 0,01$, $< 0,001$ соответственно.

Notes: ^{1,2,3} – probability of significant differences comparing with the control, $p < 0.05$, < 0.01 , < 0.001 , correspondingly.

Statistically significant character of the changes in CPELA in tissues of brain cortex, lungs and heart points to the possibility of its local involvement into the development of destructive processes and disordered functioning of these organs at ADH. Reduced activity of metalloelastase in its turn is associated with its expenditure during degradation of extracellular matrix [17]. The most manifested decrease of its activity in heart may testify to a significant local tissue lesion, development of destructive processes. Administration of ethanol into organism leads to escalation of vascular impairments in heart, dystrophic changes in subcellular structures, formation of myocytes' decay foci [31].

Defence of the tissues from excessive activation of elastases at ADH can be provided with the rise in EIA α -1-PI. Strengthening of EIA α -1-PI only in kidneys may be related to redundant local activation of elastases (Table 2).

Application of RCEs at ADH contributed to a strong suppression of activity of elastases, metalloelastases and CPELA in all the studied samples below the control level (see Table 1). The reduced level of activity of elastases and CPELA can be stipulated with the formation of an increased resistance of an organism to negative factors and phenomenon of cross-adaptation to stress effects [11, 19].

This supposition is in accordance with the reported data of other authors, demonstrating that extreme cryotherapy in alcoholized rats contributed to a reduced venous tension and rise in the capillary bed area [9, 10]. The latter likely caused the decrease in activity of macrophagal metalloelastases as well.

нению с другими тканями, может быть связано с активностью метаболических процессов в этих органах. Известно, что активность нейтрофилов, высвобождающих сериновую эластазу, во многом определяется внутрисосудистой окружающей средой [37].

Полученные результаты согласуются с данными других исследователей, свидетельствующими о том, что мягкая гипотермия ингибирует адгезию, активацию и аккумуляцию нейтрофилов [28, 36]. Охлаждение также нарушает процесс миграции нейтрофилов и степень этого нарушения меняется в зависимости от локализации [22]. Кроме того, гипотермия влияет на функцию эндотелия и активность макрофагов, значительно снижает эндотелиальную экспрессию молекул адгезии и инфильтрацию лейкоцитами (моноцитами) [36]. Выраженный характер снижения ЭПАЦП в коре мозга может быть связан с эффектом РХВ на ультраструктуру астроглии, особенно это касается отростков астроцитов, окружающих терминальные сосуды [12]. Применение РХВ приводит к существенным изменениям в ультраструктуре эндотелиоцитов, их плотных контактов и окружающей сосуд базальной мембраны.

Следует отметить, что в результате РХВ у крыс с АЗГ (группа АЗГ + РХВ) ЭИА α -1-ИП остается на уровне ниже контрольного значения в коре мозга и сердце, что указывает на недостаточный эффект применяемого нами режима РХВ. Повышение ЭИА α -1-ИП в других исследуемых тканях свидетельствует об их защищенности в результате РХВ от деструктивных процессов, протекающих с участием эластаз. Наличие повышенного уровня α -1-ИП в легких и печени обеспечивается возможностью его синтеза и высвобождения клетками печени и макрофагами легких. Можно предполагать, что РХВ у крыс с АЗГ стимулирует высвобождение α -1-ИП, повышение активности которого приводит к значительному снижению уровня эластаз. При этом в коре мозга и сердце наблюдается его расхождение без необходимой компенсации, что, возможно, определяется недостаточным поступлением данного ингибитора из мест синтеза.

В группе сравнения по оценке влияния РХВ на организм интактных крыс наблюдали активацию всех исследуемых эластаз по сравнению с контролем (см. табл. 1). Наиболее существенные изменения выявили при исследовании активности эластаз: в коре мозга увеличение в 87 раз, легких – в 130 раз, сердце – в 170 раз, печени – в 600 раз, почках – в 1000 раз. Эти результаты значительно отличаются от изменений ЭПАЦП, максимальное усиление которой отмечено нами в сердце и печени (в 12 раз), и металлоэластазы, наибольшую активность которой наблюдали в почках – в 21 раз. В то же

In the majority of the studied tissue samples in the group ADH + RCE as well as in the control the revealed by us level of activity of metalloelastases and CPELA was higher if compared with 'total' activity of elastases, related as above mentioned to reduced competition for substrate when suppressing certain elastases.

The observed by us decrease in the activity of elastases in the group ADH + RCE was interrelated with a rise in EIA α -1-PI which changes had a directed character if compared with those caused by alcohol, and namely: increase in tissues of brain cortex, lungs, heart, liver and decrease in kidneys (Table 2).

It should be noted that in the group ADH + RCE the activity of elastases in lungs, heart and liver, CPELA in brain cortex reduced more than 20 times and the one of metalloelastases did in hundreds times virtually in all the studied tissues, in addition there was found a decrease of its level in 55 times. Higher manifestation rate of metalloelastase activity suppression in the group ADH + RCE if compared with elastases and CPELA may testify to significant contribution of macrophages into the response to RCEs at ADH. Herewith, less reduction in the activity of metalloelastase in kidneys if compared with other studied tissues can be likely related with the presence of defence of this organ from negative manifestation of elastases due to initial local rise in EIA α -1-PI at ADH. More significant reduction in the activity of elastases in lungs, heart and liver if compared with other tissues can be related to the activity of metabolic processes in these organs. Activity of neutrophils, releasing serine elastase is known to be mainly determined by intra-vascular environment [37].

The findings are in accordance with the data of other researchers, reported that mild hypothermia inhibited adhesion, activation and accumulation of neutrophils [28, 36]. Cooling also impaired the migration of neutrophils and the degree of this disorder altered depending on localization [22]. Moreover, hypothermia affected endothelium function and activity of macrophages, strongly reduced endothelial expression of adhesion molecules and infiltration of leucocytes (monocytes) [36]. Manifested character of CPELA decrease in brain cortex may be related to RCEs on ultrastructure of astroglia, especially it concerns astrocytes' processes surrounding terminal vessels [12]. Application of RCEs leads to significant changes in ultrastructure of endotheliocytes, their dense contacts and surrounding the vessel basal membrane.

It should be noted that as a result of RCEs in the rats with ADH (group ADH + RCE) the EIA α -1-PI has remained at the level below the control value in brain cortex and heart, pointing to insufficient effect of the applied by us RCE regimen. Increased EIA α -1-PI in other studied tissues testify to caused by RCEs resistance to destructive processes occurring with the involvement of elastases. The presence of in-

время ЭИА α -1-ИП снижалась в коре мозга и сердце, повышалась в легких, печени, менее – в почках (табл. 2).

Указанные изменения свидетельствуют о значительной активации при РХВ реакций ограниченного протеолиза с участием эластаз как за счет повышения их активности, так и снижения ЭИА α -1-ИП. Следует также отметить, что РХВ, как стресс-воздействие, может приводить к значительной активации регуляторных функциональных систем организма [19], в частности гематоэнцефалического барьера [11]. При этом активация эластаз может способствовать расширению адаптационных возможностей, повышению устойчивости к влиянию внешних и внутренних стрессовых факторов [15, 16]. Наблюдаемую нами активацию всех исследуемых эластаз при РХВ можно рассматривать и как элемент гормезиса. Известно, что явление гормезиса наблюдается при кратковременных воздействиях низких температур [4]. Применяемые в наших экспериментах РХВ выступают в роли стимулятора, причем температура их воздействия находится в положительном диапазоне (около 5°C) и значительно меньше уровня, вредного для организма.

Наблюдаемое нами при РХВ более существенное повышение активности эластаз, по сравнению с ЭПАЦП и металлоэластазой, может быть обусловлено активацией циркулирующих нейтрофилов и опосредовано стимуляцией высвобождения таких цитокинов, как интерлейкин-1, интерлейкин-8, фактор некроза опухоли α [30]. При этом возникает вопрос о возможном усилении тканеповреждающего эффекта. В этом аспекте интересно отметить результаты другого исследования, свидетельствующие о повышении экспрессии нейтрофильных интегринов CD11b и CD11c [29]. Считают, что активация этих молекул адгезии способствует притуплению нейтрофилопосредованного повреждения тканей.

Повышение ЭПАЦП является естественной реакцией организма в ответ на стресс-воздействие [26]. Можно предполагать, что значительное повышение ЭПАЦП при РХВ происходит за счет увеличения общего количества ферментов, локализованных в эндотелиоцитах. Увеличение ЭПАЦП, возможно, оказывает влияние на течение эндотелий-зависимых процессов, включающих тонус, проницаемость сосудов, и приводит к развитию структурных изменений в сосудах [13]. В данном случае эти изменения могут проявляться в увеличении эластичности волокон, обеспечивающих противодействие растяжимости сосудов, снижении их жесткости. Полученные результаты указывают на важность этих процессов в первую очередь для тканей сердца и печени, активная деятельность ко-

increased level of α -1-PI in lungs and liver is provided with its possible synthesis and release by liver cells and macrophages of lungs. It is possible to suppose that RCEs in the rats with ADH stimulate the release of α -1-PI, increased activity of which results in significant reduction of the level of elastases. Herewith in brain cortex and heart there is observed its expenditure with no necessary compensation which is likely determined with insufficient entering of this inhibitor from the synthesis sites.

In the group of comparison on the assessment of RCE influence on intact rats the activation of all the studied elastases compared to the control was observed (see Table 1). The strongest changes were revealed when investigating the activity of elastases in brain cortex in 87 times, in 130 and 170 times for lungs and heart, correspondingly, for liver in 600 times and kidneys in 1,000 times. These results differ significantly from the changes of CPELA, maximum strengthening of which was noted by us in heart and liver (in 12 times) and metalloelastase the highest activity of which was seen in kidneys (in 21 times). At the same time EIA α -1-PI reduced in brain cortex and heart, and increased in lungs, liver, in less extent in kidneys (Table 2).

The mentioned changes testify to a significant activation at RCEs of the reactions of restricted proteolysis with the participation of elastases both due to increase of their activity and reduction of EIA α -1-PI. It should be also noted that RCEs as stress effect can lead to significant activation of regulatory function systems of an organism [19], in particular blood brain barrier [11]. Herewith the activation of elastases can contribute to the extension of adaptive possibilities, rise in the resistance to the effect of external and internal stress factors [15, 16]. The observed by us activation of all the studied elastases at RCEs can be considered also as element of hormesis. It is known that the phenomenon of hormesis is observed at short-term effects of low temperatures [4]. Applied in our experiments RCEs act as stimulators, moreover the temperature of their effect is within the positive range (about 5°C) and considerably lower the level, which is harmful for an organism.

Observed by us at RCEs stronger rise in the activity of elastases if compared to CPELA and metalloelastase can be stipulated by activation of circulating neutrophils and indirectly by stimulation of releasing such cytokines as interleukin-1, interleukin-8, tumor necrosis factor α [30]. Herewith, the question about possible strengthening of tissue injuring effect appears. In this aspect it is interesting to note the results of other study testifying to a rise in the expression of neutrophil integrins CD11b and CD11c [29]. It is believed that activation of these adhesion molecules contributes to an obtusion of neutrophil-mediated tissue damage.

торых непосредственно отражается на функционировании всех систем организма.

Значительное повышение активности металлоэластазы под влиянием РХВ может быть связано с участием макрофагов в развитии противовоспалительных, проангиогенных эффектов, адаптивного ответа, а также в восстановлении иммунитета, нарушенного в результате старения организма [32].

Следует отметить, что повышение активности α -1-ИП в легких и печени в результате РХВ по сравнению с контролем указывает, как уже было отмечено ранее [16], на возможность его синтеза и/или высвобождения. Снижение ЭИА α -1-ИП в коре мозга и сердце под влиянием РХВ, вероятно, обусловлено его расходом на подавление избыточной активности эластаз, а также отсутствием поступления α -1-ИП в данные органы из мест синтеза. Наблюдаемое нами повышение ЭИА α -1-ИП в почках может быть связано с проявлением естественной реакции организма, возникающей в ответ на воздействие стресс-факторов, а также со снижением уровня окислительных метаболитов, в частности супероксида и пероксинитрита, способных подавлять ЭИА α -1-ИП [23]. Активность α -1-ИП направлена на связывание протеиназ, в том числе и эластаз, и выведение их из организма почками. Это особенно важно в условиях влияния РХВ, учитывая максимальную локальную активацию эластаз и металлоэластазы.

Выводы

1. После РХВ у самок крыс с АЗГ существенно угнетается активность эластаз, металлоэластазы и ЭПАЦП в тканях коры мозга, легких, сердца, печени и почек ниже контрольных значений, несмотря на их различный исходный уровень.

2. Применение РХВ приводит к противоположно направленным изменениям ЭИА α -1-ИП, вызванным действием алкоголя: повышению во всех исследуемых тканях, кроме почек, в которых наблюдается снижение. При этом по сравнению с контролем ЭИА α -1-ИП повышается только в легких и печени, т. е. в местах возможного синтеза данного ингибитора.

3. Отсутствие стимулирования ингибиторного потенциала под влиянием РХВ при АЗГ в коре мозга и сердце согласуется с локальным снижением ЭИА α -1-ИП в контроле и может быть обусловлено тем, что ингибитор не поступает из мест синтеза.

Перспективно исследование активности эластаз и ЭИА α -1-ИП при других режимах и видах холодовых воздействий у животных с экспериментальными моделями патологических состояний.

Increase in CPELA is natural response of an organism to stress-effect [26]. It is possible to suppose that a significant rise in CPELA at RCEs occurs due to increase of total number of enzymes, localized in endotheliocytes. The increase in CPELA likely affects the course of endothelium-dependent processes, including tonus, permeability of vessels and leads to the development of structural changes in the vessels [13]. In this case these alterations may be manifested in the rise of elasticity of fibers, providing counteraction to the compliance of vessels, reduction of their rigidity. The findings point to the importance of these processes first of all for the tissues of heart and liver, the activity of those is directly reflected to functioning of all the systems of an organism.

Considerable rise of metalloelastases at RCEs can be related to the involvement of macrophages in development of anti-inflammatory, pro-angiogenic effects, adaptive response as well as in recovery of immunity impaired as a result of organism ageing [32].

It should be noted that increase in the activity of α -1-PI in lungs and liver as a result of RCEs if compared to the control points as it has been already noted [16] to its possible synthesis and/or release. The reduction of EIA α -1-PI in brain cortex and heart at RCEs is likely stipulated by its expenditure for suppressing surplus activity of elastases as well by the absence of entering of α -1-PI to these organs from the synthesis sites. The observed by us rise in EIA α -1-PI in kidneys can be related to the manifestation of natural reaction of an organism in response to the effect of stress factors, as well as with the reduction of level of oxidative metabolites, in particular superoxide and peroxyxynitrite capable to suppress EIA α -1-PI [23]. Activity of α -1-PI is directed to binding the proteinases including elastases and their release from an organism by kidneys. This is especially important under conditions of RCEs, taking into account the maximal local activation of elastases and metalloelastase.

Conclusions

1. After RCEs in female rats with ADH the activity of elastases, metalloelastase and CPELA are significantly suppressed in tissues of brain cortex, lungs, heart, liver and kidneys beyond the control values, in spite of their different initial levels.

2. Application of RCEs leads to oppositely directed changes in EIA α -1-PI, caused by alcohol: rise in all the studied tissues, except kidneys, wherein the decrease is observed. Herewith if compared with the control EIA α -1-PI increases only in lungs and liver, *i. e.* in the sites of possible synthesis of this inhibitor.

3. The absence of stimulation of inhibitory potential under RCEs at ADH in brain cortex and heart is in

Литература

1. Анохина И.П., Камерницкий А.В., Станишевская А.В. и др. Экспериментальное исследование действия нового кортико-стероидного соединения на влечение к морфину, кокаину и алкоголю на различных стадиях формирования зависимости // Вопросы наркологии. – 2010. – №1. – С. 41–47.
2. Бабийчук Г.А., Бабийчук В.Г., Мамонтов В.В. Влияние ритмических экстремальных холодовых воздействий на показатели вегетативной регуляции сердечного ритма и содержание цитокинов в сыворотке крови у людей пожилого возраста // Буковинський медичний вісник. – 2009. – Т. 13, №4. – С. 17–20.
3. Бабийчук В.Г. Количественная оценка антиген-специфических клеток в крови человека после ритмических холодовых воздействий // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19, №2. – С. 143–153.
4. Баранов А.Ю., Кидалов В.Н. Лечение холодом. Криомедицина. – СПб: Атон, 1999. – 272 с.
5. Белова Л.А. Биохимия процессов воспаления и поражения сосудов. Роль нейтрофилов // Биохимия. – 1997. – Т. 62, №6. – С. 659–669.
6. Бульда В.І., Корсунська О.Є. Хронічне вживання алкоголю та підвищений артеріальний тиск // Внутрішня медицина. – 2008. – №3. – С. 67–69.
7. Досенко В.Е. Определение различных форм эластазы в аорте при экспериментальном артериосклерозе // Лаб. диагностика. – 1998. – №1. – С. 24.
8. Ершова О.В. Вплив ритмічної краніоцеребральної гіпотермії на нейрогуморальні механізми регуляції циклічних процесів репродуктивної системи: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Харків, 2008. – 20 с.
9. Ломакин И.И. Обоснование методов лечебного охлаждения в терапии хронического алкоголизма // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, №3. – С. 383–385.
10. Ломакин І.І., Луценко Д.Г., Марченко В.С., Марченко Л.М. Функціональна ангіоархітектура мозку при дії низьких температур в умовах експериментальної моделі хронічного алкоголізму // Світ медицини та біології. – 2009. – №3, Ч. 1. – С. 99–105.
11. Марченко В.С., Бабийчук В.Г. Кардиорегуляторная функция гематоэнцефалического барьера при резонансной гипотермии // Проблемы криобиологии. – 2001. – №4. – С. 17–29.
12. Марченко Л.Н., Бабийчук Г.А., Марченко В.С. и др. К механизмам регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера охлажденного мозга // Проблемы криобиологии. – 1995. – №4. – С. 10–19.
13. Меншутина М.А. Сравнительная оценка реактивности сосудов как формы дисфункции эндотелия у больных атеросклерозом и хронической болезнью почек // Нефрология. – 2004. – Т. 8, №3. – С. 56–61.
14. Москвичев В.Г., Цыганков Б.Д., Волохова Р.Ю., Верткин А.Л. Гендерспецифические аспекты алкоголь-обусловленных соматических заболеваний // Трудный пациент (Архив). – 2006. – №9. – С. 57–62.
15. Самохина Л.М., Бабийчук Г.А., Познахарева И.А., Самохин А.А. Система протеиназа – ингибитор протеиназ у крыс разного возраста // Труды науч. конф., посвященной 100-летию со дня рождения акад. Н.И. Буланкина (16–17 января 2001г.) – Харьков, 2001. – С. 154–155.
16. Самохина Л.М. Влияние ритмического холодового воздействия на активность отдельных ферментов у старых крыс со стимулированной гипертензией // Проблемы криобиологии. – 2003. – №1. – С. 20–25.
17. Самохина Л.М., Ломако В.В. Еластази за умов алкоголь-залежної гіпертензії у щурів різної статі // Вісник проблем біології та медицини. – 2011. – Вип. 1. – С. 165–169.
18. Самохина Л.М., Ломако В.В., Шило О.В. Еластази за умов штучного гіпометаболічного стану у щурів // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, №4. – С. 557–560.

accordance with local reduction in EIA α -1-PI in the control and can be stipulated with the fact that the inhibitor does not enter from the synthesis sites.

The study of activity of elastases and EIA α -1-PI at other regimens and types of cold effects in animals with experimental models of pathological states is perspective.

References

1. Anokhina I.P., Kamernitsky A.V., Stanishevskaya A.V. et al. Experimental study of effect of new corticosteroid compound on addiction to morphine, cocaine and alcohol at different stages of dependence formation // Voprosy narkologii. – 2010. – N1. – P. 41–47.
2. Babiychuk G.A., Babiychuk V.G., Mamontov V.V. Influence of rhythmic extreme cold effects on indices of vegetative regulation of cardiac rhythm and content of cytokines in blood serum of aged people // Bukovinsky Medychnyy Visnyk. – 2009. – Vol. 13, N4. – P. 17–20.
3. Babiychuk V.G. Quantitative estimation of antigen-specific cells in human blood after rhythmic cold effects // Problems of Cryobiology. – 2009. – Vol. 19, N2. – P. 143–153.
4. Baranov A.Yu., Kidalov V.N. Treatment with cold. Cryomedicine. – St.-Petersburg, 1999. – 272 p.
5. Belova L.A. Biochemistry of processes of inflammation and joint lesion. Role of neutrophils // Biokhimiya. – 1997. – Vol. 62, N6. – P. 659–669.
6. Bulda V.I., Korsunskaya O.E. Chronic consumption of alcohol and increased arterial pressure // Vnutrishnyaya Meditsyna. – 2008. – N3. – P. 67–69.
7. Dosenko V.Ye. Determination of different forms of elastase in aorta at experimental arteriosclerosis // Lab. Diagnostika. – 1998. – N1. – P. 24.
8. Ershova O.V. Effect of rhythmic craniocerebral hypothermia on neurohumoral mechanisms of regulation of reproductive system cyclic processes: Author's Abstract of Cand. Med. Sciences. – Kharkov, 2008. – 20 p.
9. Lomakin I.I. Substantiation of medical cooling methods in therapy of chronic alcoholism // Problems of Cryobiology. – 2008. – Vol. 18, N3. – P. 383–385.
10. Lomakin I.I., Lutsenko D.G., Marchenko V.S., Marchenko L.M. Functional angioarchitecture of brain at low temperature effect under conditions of experimental model of chronic alcoholism // Svit Meditsyny ta Biologii. – 2009. – N3, Part 1. – P. 99–105.
11. Marchenko V.S., Babiychuk V.G. Cardioregulatory function of blood brain barrier under resonance hypothermia // Problems of Cryobiology. – 2001. – N4. – P. 17–29.
12. Marchenko L.N., Babiychuk G.A., Marchenko V.S. et al. On the mechanisms of regulation of blood brain barrier permeability of the cooled brain // Problems of Cryobiology. – 1995. – N4. – P. 10–19.
13. Menshutina M.A. Comparative estimation of reactivity of vessels as form of dysfunction of endothelium in patients with atherosclerosis and chronic kidney disease // Nefrologiya. – 2004. – Vol. 8, N3. – P. 56–61.
14. Moskvichev V.G., Tsygankov B.D., Volokhova R.Yu., Vertkin A.L. Gender specific aspects of alcohol-stipulated somatic diseases // Trudnyi Patsyent (Archive). – 2006. – N9. – P. 57–62.
15. Samokhina L.M., Babiychuk G.A., Poznakhareva I.A., Samokhin A.A. Proteinase-proteinase inhibitor system in rats of different age // Proc. of Scientific Conference devoted to the 100th Anniversary of Academician N.I. Bulankin (January 16–17, 2001). – Kharkov, 2001. – P. 154–155.
16. Samokhina L.M. Effect of rhythmic cold exposures in activity of certain enzymes in aged rats with stimulated hypertension // Problems of Cryobiology. – 2003. – N1. – P. 20–25.

19. Судяков К.В. Новые акценты классической концепции стресса // Бюл. эксперим. биол. мед. – 1997. – №2. – С. 124–130.
20. Пат. України №45068 МПК G01N33/48, A61B19/02. Набір для визначення активності ендотеліальної еластази в біологічних рідинах / Л.М.Самохіна, Н.А.Максимова. Заявлено 23.04.2001. Опубл. 15.03.2002. Бюл. №3.
21. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72, Issue 1–2. – P. 248–254.
22. Biggar W.D., Bohn D., Kent G. Neutrophil circulation and release from bone marrow during hypothermia // Infection and Immunity. – 1983. – Vol. 40, №2. – P. 708–712.
23. Cho Y., Jang Y.Y, Han E.S., Lee C.S. The inhibitory effect of ambroxol on hypochlorous acid-induced tissue damage and respiratory burst of phagocytic cells // Eur. J. Pharmacol. – 1999. – Vol. 383, №1. – P. 83–91.
24. Fuchs F.D., Chambless L.E., Whelton P.K. et al. Alcohol consumption and the incidence of hypertension: The atherosclerosis risk in communities study // Hypertension. – 2001. – Vol. 37, №5. – P. 1242.
25. Goericke S.L., Parohl N., Albert J. et al. Elastase-induced aneurysm in Swine: proof of feasibility in a first case. A technical note // Interventional neuroradiology. – 2009. – Vol. 15, №4. – P. 413–416.
26. Hennig T., Mogensen C., Kirsch J. et al. Shear stress induces the release of an endothelial elastase: role in integrin $\alpha(v)\beta(3)$ -mediated FGF-2 release // J. Vasc. Res. – 2011. – Vol. 48, №6. – P. 453–464.
27. Hwang T.L., Wang C.C., Kuo Y.H. et al. The hederagenin saponin SMG-1 is a natural FMLP receptor inhibitor that suppresses human neutrophil activation // Biochem. Pharmacol. – 2010. – Vol. 80, №8. – P. 1190–1200.
28. Kira S., Daa T., Kashima K. et al. Mild hypothermia reduces expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and the accumulation of neutrophils after acid-induced lung injury in the rat // Acta Anaesthesiol. Scand. – 2005. – Vol. 49, №3. – P. 351–359.
29. Le Deist F., Menasche P., Kucharski C. et al. Hypothermia during cardiopulmonary bypass delays but does not prevent neutrophil-endothelial cell adhesion. A clinical study // Circulation. – 1995. – Vol. 92, №9. – P. 354–358.
30. Chello M., Mastroberoberto P., Romano R. et al. Complement and neutrophil activation during cardiopulmonary bypass. A randomized comparison of hypothermic and normothermic Circulation // Eur. J. Cardiothor. Surg. – 1997. – Vol. 11, №1. – P. 162–168.
31. Nuzhnyi V.P., Ugriumov A.I., Beliaeva N.Y. et al. Morphofunctional examination of the heart in rats with the alcohol withdrawal syndrome // Cor. Vasa. – 1989. – Vol. 31, №5. – P. 402–410.
32. Stout R.D., Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments // J. Leukoc. Biol. – 2004. – Vol. 76, №3. – P. 509–513.
33. Theres H., Ulrich P., Torsten G. Shear stress induced integrin V3 activation is dependent on the activity of an endothelial elastase // Acta Physiologica. – 2009. – Vol. 197, Suppl. 675. – P. 208.
34. Tong S., Neboori H.J., Tran E.D., Schmid-Schonbein G.W. Constitutive expression and enzymatic cleavage of ICAM-1 in the spontaneously hypertensive rat // J. Vasc. Res. – 2011. – Vol. 48, №5. – P. 386–396.
35. Yamada E., Hazama F., Kataoka H. Elastase-like enzyme in the aorta of spontaneously hypertensive rats // Virchows Arch. B. Cell. Pathol. Incl. Mol. Pathol. – 1983. – Vol. 44, №2. – P. 241–245.
36. Wang G.J., Deng H.Y., Maier C.M. et al. Mild hypothermia reduces ICAM-1 expression, neutrophil infiltration and microglia/
17. Samokhina L.M., Lomako V.V. Elastases at alcohol-dependent hypertension in rats of different gender // Visnyk Problem Biologii ta Meditsyny. – 2011. – Issue 1. – P. 165–169.
18. Samokhina L.M., Lomako V.V., Shilo A.V. Elastases at artificial hypometabolic state in rats // Problems of Cryobiology. – 2008. – Vol. 18, N4. – P. 557–560.
19. Судяков К.В. New accents of classic concept of stress // Bul. Experim. Biol. Med. – 1997 – N2. – P. 124–130.
20. Patent of Ukraine N45068 IPC G01N33/48, A61B19/02. Kit for determining activity of endothelial elastase in biological fluids/ L.M. Samokhina, N.A. Maksimova. Appl. 23.04.2001. Publ. 15.03.2002. Bul. N3.
21. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72, Issue 1–2. – P. 248–254.
22. Biggar W.D., Bohn D., Kent G. Neutrophil circulation and release from bone marrow during hypothermia // Infection and Immunity. – 1983. – Vol. 40, N2. – P. 708–712.
23. Cho Y., Jang Y.Y, Han E.S., Lee C.S. The inhibitory effect of ambroxol on hypochlorous acid-induced tissue damage and respiratory burst of phagocytic cells // Eur. J. Pharmacol. – 1999. – Vol. 383, N1. – P. 83–91.
24. Fuchs F.D., Chambless L.E., Whelton P.K. et al. Alcohol consumption and the incidence of hypertension: The atherosclerosis risk in communities study // Hypertension. – 2001. – Vol. 37, N5. – P. 1242.
25. Goericke S.L., Parohl N., Albert J. et al. Elastase-induced aneurysm in Swine: proof of feasibility in a first case. A technical note // Interventional neuroradiology. – 2009. – Vol. 15, N4. – P. 413–416.
26. Hennig T., Mogensen C., Kirsch J. et al. Shear stress induces the release of an endothelial elastase: role in integrin $\alpha(v)\beta(3)$ -mediated FGF-2 release // J. Vasc. Res. – 2011. – Vol. 48, N6. – P. 453–464.
27. Hwang T.L., Wang C.C., Kuo Y.H. et al. The hederagenin saponin SMG-1 is a natural FMLP receptor inhibitor that suppresses human neutrophil activation // Biochem. Pharmacol. – 2010. – Vol. 80, N8. – P. 1190–1200.
28. Kira S., Daa T., Kashima K. et al. Mild hypothermia reduces expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and the accumulation of neutrophils after acid-induced lung injury in the rat // Acta Anaesthesiol. Scand. – 2005. – Vol. 49, N3. – P. 351–359.
29. Le Deist F., Menasche P., Kucharski C. et al. Hypothermia during cardiopulmonary bypass delays but does not prevent neutrophil-endothelial cell adhesion. A clinical study // Circulation. – 1995. – Vol. 92, N9. – P. 354–358.
30. Chello M., Mastroberoberto P., Romano R. et al. Complement and neutrophil activation during cardiopulmonary bypass. A randomized comparison of hypothermic and normothermic Circulation // Eur. J. Cardiothor. Surg. – 1997. – Vol. 11, N1. – P. 162–168.
31. Nuzhnyi V.P., Ugriumov A.I., Beliaeva N.Y. et al. Morphofunctional examination of the heart in rats with the alcohol withdrawal syndrome // Cor. Vasa. – 1989. – Vol. 31, N5. – P. 402–410.
32. Stout R.D., Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments // J. Leukoc. Biol. – 2004. – Vol. 76, N3. – P. 509–513.
33. Theres H., Ulrich P., Torsten G. Shear stress induced integrin V3 activation is dependent on the activity of an endothelial elastase // Acta Physiologica. – 2009. – Vol. 197, Suppl. 675. – P. 208.
34. Tong S., Neboori H.J., Tran E.D., Schmid-Schonbein G.W. Constitutive expression and enzymatic cleavage of ICAM-1 in the spontaneously hypertensive rat // J. Vasc. Res. – 2011. – Vol. 48, N5. – P. 386–396.
35. Yamada E., Hazama F., Kataoka H. Elastase-like enzyme in the aorta of spontaneously hypertensive rats // Virchows Arch.

monocyte accumulation following experimental stroke // *Neuroscience*. – 2002. – Vol. 114, №4. – P. 1081–1090.

37. *Wenisch Ch., Narzt E., Sessler D.I. et al.* Mild intraoperative hypothermia reduces production of reactive oxygen intermediates by polymorphonuclear leukocytes // *Anesth. Analg.* – 1996. – Vol. 82, №4. – P. 810–816.

Поступила 18.10.2011

B. Cell. Pathol. Incl. Mol. Pathol. – 1983. – Vol. 44, N2. – P. 241–245.

36. *Wang G.J., Deng H.Y., Maier C.M. et al.* Mild hypothermia reduces ICAM-1 expression, neutrophil infiltration and microglia/monocyte accumulation following experimental stroke // *Neuroscience*. – 2002. – Vol. 114, N4. – P. 1081–1090.

37. *Wenisch Ch., Narzt E., Sessler D.I. et al.* Mild intraoperative hypothermia reduces production of reactive oxygen intermediates by polymorphonuclear leukocytes // *Anesth. Analg.* – 1996. – Vol. 82, N4. – P. 810–816.

Accepted 18.10.2011