

Ефективність ритмічних холодових впливів на активність протеїназ та їх інгібіторів у щурів з алкогользалежною гіпертензією

Л.М. Самохіна¹, В.В. Ломако²

¹ДУ «Національний інститут терапії імені Л.Т. Малої НАМН України», Харків;

²Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків;

e-mail: lub.samokhina@gmail.com

Мета роботи – вивчити ефективність ритмічних холодових впливів (РХВ; $5 \pm 1^\circ\text{C}$, частота 0,1 Гц, 65 хв) на активність протеїназ, нетрипсиноподібних протеїназ (НТПП), трипсинінгібітору активності (ТІА) α -1-інгібітора протеїназ (α -1-ІП) та α -2-макроглобуліну (α -2-МГ) у сироватці крові, тканинах мозку та внутрішніх органів щурів самців з алкогользалежною гіпертензією (АЗГ) з використанням високочутливих (10^{-9} – 10^{-10} г) ензиматичних методів. АЗГ моделювали за допомогою хронічної (10 міс) алкоголізації щурів «двопляшковим» методом. Відзначено, що при АЗГ активність протеїназ знижується в тканинах, максимально в легенях, нирках та серці (у 6, 7 та 10 разів відповідно). РХВ сприяє активації протеїназ, найбільш виражено у сироватці крові, нирках та печінці (у 20, 8 та 5 разів відповідно), у інтактних щурів – у легенях (у 5 разів). Активність НТПП при АЗГ знижується в печінці в 10 разів і менше в нирках, що може бути зумовлено порушенням біосинтезу протеїнів, а в сироватці крові та тканинах мозку підвищується (у корі мозку в 10 разів). РХВ призводить до активації НТПП: при АЗГ у 2–4 рази, у інтактних щурів – у 10 і більше разів. Активність α -2-МГ при АЗГ знижується, особливо в гіпоталамусі, легенях, нирках (у 100 разів) і менш у серці. РХВ сприяє активації α -2-МГ: при АЗГ на рівні нижче від контрольного, в інтактних щурів – у тканинах мозку та нирках, що може бути зумовлено участю син- та кататоксичних адаптивних механізмів. Активність α -1-ІП знижується при АЗГ і на тлі РХВ, що пов'язано зі зміщенням балансу в системі протеїназ/інгібітор протеїназ. Таким чином, РХВ призводять до зворотнеспрямованих змін, спричинених АЗГ, сприяють активації протеїназ, НТПП, α -2-МГ, що пов'язано з функціонуванням регуляторних систем організму, розвитком гормезису, формуванням високої стійкості організму до зовнішніх і внутрішніх стресових факторів, розширенням адаптаційних можливостей. При цьому низька ТІА α -1-ІП сприяє активації протеїназ, НТПП.

Ключові слова: ритмічні холодові впливи; активність протеїназ; нетрипсиноподібні протеїнази; α -1-інгібітор протеїназ; α -2-макроглобулін; алкогользалежна гіпертензія.

ВСТУП

Низькі температури впливають на біологічні реакції в організмі, які опосередковуються активацією гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної та симпатичної нервової систем, разом з підвищеною секрецією кортизолу та катехоламінів, і не завжди призводять до сприятливих біохімічних змін [1]. Ритмічні холодові впливи (РХВ) або переривчасте подання холодного повітря $5 \pm 1^\circ\text{C}$ (частота 0,1 Гц, 65 хв) суттєво покращують функцію

імунної системи, сприяють посиленню адаптації організму до дії негативних факторів [2]. Одним із таких факторів є алкоголь, який сам по собі може по-різному впливати на здоров'я людини [3]. Спочатку його вживання викликає розгальмовування, за яким настає ейфорія і потім депресія [4]. Помірне споживання етанолу забезпечує сприятливу модуляцію настрою та протизапальний ефект [3]. Однак надмірне його вживання призводить до імуносупресії, пошкодження органів і тканин, небезпечних для життя захворювань,

таких як алкогольний гепатит, кардіоміопатія, гіпертонія та інсульт, неврологічні порушення [3–5]. У чоловіків середнього віку (56–66 років) помірне вживання алкоголю (9–28 напоїв за 14 днів) пов'язують із покращенням стану білої речовини головного мозку, особливо мікроструктури, тоді як значне (більш як 28 напоїв за 14 днів) – з мікро- та макроструктурним ушкодженням білої речовини [6]. Надмірне споживання алкоголю відстає тільки від куріння та ожиріння серед трьох провідних причин передчасних смертей у США [7]. У чоловіків помірне чи надмірне споживання алкоголю пов'язують із високим артеріальним тиском (АТ) [8].

Незважаючи на широке споживання алкоголю у суспільстві та побічні ефекти, механізми його дії залишаються складними для аналізу [3]. Основними загальними факторами ризику зловживання алкоголем вважають окисний стрес та ацетальдегід [5]. Етанол в організмі піддається окисному метаболізму завдяки наявності спеціальної ензиматичної системи його окиснення [9]. Під дією алкогольдегідрогенази етанол перетворюється на ацетальдегід – найсильніший окисник, і під дією ацетальдегіддегідрогенази – на оцтову кислоту. Всі ці перетворення супроводжуються збільшенням продукції активних форм кисню та його накопиченням в організмі. Розвиток окисного стресу пов'язують із активацією у системі протеїназа–інгібітор протеїназ [10]. Особливу роль у розвитку алкогользалежної гіпертензії (АЗГ) відіграють протеїнази, що беруть участь у тканинному утворенні вазоконстрикторного пептиду – ангіотензину II (АП), а саме: хімотрипсинподібна протеїназа – хімаза (ЕС 3.4.21.39), тонін (ЕС 3.4.21.35), що має і трипсин-, і хімотрипсинподібну активність, а також калікреїн гК9, який на 84% ідентичний гК2 [2]. Крім того, прискореному розвитку вазоконстрикторних змін сприяє активність Ca^{2+} -залежних протеїназ – кальпаїнів (ЕС 3.4.22.17).

Кріотерапія пригнічує інтенсивність вивільнення активних форм кисню, ефек-

тивна щодо зниження окисного стресу, але може ослабити реакції антиоксидантної системи [11]. РХВ (4–6°C) з частотою 0,1–0,2 Гц протягом 90 хв відновлюють порушення, викликані емоційно-больовим стресом, дією алкоголю, призводять до протилежно спрямованих змін еластазоінгібіторної активності (ЕІА) α -1-інгібітора протеїназ (α -1-ІП), яка підвищується у місцях синтезу цього інгібітора (легені, печінка) [2]. Відомо, що зміни ЕІА α -1-ІП безпосередньо зумовлені ступенем окиснення МЕТ-активного центру в результаті окисного стресу. Але ЕІА займає малу частину інгібіторного потенціалу α -1-ІП, на його частку припадає 90% трипсингібіторної активності (ТІА) сироватки крові людини. Крім того, важливу роль у регуляції протеолізу відіграє α -2-макроглобулін (α -2-МГ), у комплексі з яким протеїнази можуть виводитися з організму.

Мета нашого дослідження – вивчити вплив РХВ на активність протеїназ, нетрипсиноподібних протеїназ (НТПП), ТІА α -1-ІП та α -2-МГ у сироватці крові, тканинах мозку та внутрішніх органів щурів-самців із АЗГ.

МЕТОДИКА

Робота виконана на білих безпородних аутбредних щурах, отриманих методом стадної рандомбредної системи розведення, яких до початку експерименту утримували в умовах віварію при світловому природному режимі на стандартному раціоні *ad libitum*. У дослідженні задіяні 4 групи самців щурів, 2 дослідні групи: з АЗГ і з АЗГ, яким здійснювали РХВ, група порівняння – інтактні тварини під дією РХВ, інтактні тварини – контроль, по 6 щурів у кожній групі. Вік тварин, у яких моделювали АЗГ, становив 7–8 міс, груп порівняння та контролю – 17–18 міс. Експерименти проведено відповідно до «Загальних принципів роботи на тваринах, схвалених III Національним конгресом з біоетики» (Київ, 2007) та узгоджених з положеннями «Європейської Конвенції про захист хребетних тварин», що

використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

АЗГ моделювали «двопляшковим» методом, за наявності вільного вибору між водою та розчином етанолу. Перший тиждень щури отримували 5%-й розчин етанолу, 2-й – 10%-й, а 3-й і до кінця експерименту – 15%-й. Загальний термін алкоголізації – 10 міс. Після закінчення цього терміну проводили контроль систолічного тиску з використанням медичного тонометра, манжету накладали на хвіст. РХВ здійснювали з частотою 0,1 Гц протягом 65 хв, для цього використовували охолоджувальний пристрій з програмним управлінням, створений в Інституті проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, пристосований для переривчастої подачі хладоагента (холодне повітря з температурою $5 \pm 1^\circ\text{C}$, раз за 10 с). Тварин виводили з експерименту декапітацією.

Кров збирали у пробірки, відстоювали 10 хв при кімнатній температурі та центрифугували 15 хв при 5000g на центрифугі MPW-331 (“Mechanika Precyzyjna”, Польща). Печінку перфузували охолодженим фізіологічним розчином 5–10 хв. Тканини кори мозку, гіпоталамуса, легень, серця, печінки та нирок (300 мг) подрібнювали та гомогенізували у 3 мл 0,2 М Na-фосфатного буфера рН 7,2 при $4-6^\circ\text{C}$. Гомогенати тканин центрифугували протягом 10 хв при 6000 об/хв на центрифугі PC-6 (“Dastan”, Казахстан) при 4°C . Проби сироватки крові та аліквоти 10 % гомогенатів тканин до аналізу зберігали при -20°C .

У сироватці крові та без’ядерних фракціях 10% гомогенатів тканин визначали загальну активність протеїназ, НТПП (хімаза, калікреїн III або простатспецифічний антиген, частково тонін, калікреїн gK9), ТІА α -1-ІІІ та α -2-МГ високочутливими (10^{-9} – 10^{-10} г) ензиматичними методами. Останні ґрунтуються на розщепленні комплексу маркерного ензиму (пероксидази хрону) та протеїнового субстрату, іммобілізованого на поверхні полістиролу [2, 10, 12, 13]. У результаті протеолітичної реакції відбуваються розщеплення

та десорбція субстрату з поверхні полістиролу разом із молекулами пов’язаного з ним маркерного ензиму. Для оцінки загальної активності протеїназ, НТПП, а також α -1-ІІІ як субстрат використовували альбумін сироватки бика, для визначення α -2-МГ – протамінсульфат. Перед аналізом активності НТПП попередньо окремо проводили реакцію пригнічення трипсину, плазміну, сироваткового калікреїну, частково тоніну (має трипсин- і хімотрипсинподібну активність), а також хімотрипсинподібного катепсину G, додаванням 1:1 за об’ємом соєвого інгібітора трипсину 0,01 мкг/мл та інкубували 5 хв при 37°C . Активність α -1-ІІІ визначали після проведення реакції утворення комплексу протеїназа-інгібітор протеїназ [10, 12]. Для цього до досліджуваних зразків додавали надлишок трипсину 1:1 (розчин із концентрацією 8 мкг/мл) для зв’язування з інгібіторами протеїназ, інкубували 15 хв при 20°C . Для визначення активності α -2-МГ після реакції утворення комплексу протеїназа-інгібітор протеїназ до реакційної суміші додавали 1:1 за об’ємом соєвий інгібітор трипсину в концентрації 150 мкг/мл і інкубували 5 хв при 37°C для зв’язування вільних протеїназ [10, 13]. Активність α -2-МГ у досліджених зразках розраховували за залишковою активністю пов’язаного з ним трипсину. Як контроль використовували розчини трипсину. Далі проводили реакцію розщеплення іммобілізованого ензимсубстратного комплексу. Активність протеїназ та їх інгібіторів розраховували за змінами активності маркерного ензиму – пероксидази хрону в реакції з ортофенілендіаміном. Оптичну щільність зразків вимірювали при 490 нм. Активність протеїназ та їх інгібіторів виражали в міліграмах на 1 л трипсину за годину.

У дослідженнях використовували пероксидазу хрону, соєвий інгібітор трипсину, протамінсульфат, альбумін сироватки бика (“ICN”, США), трипсин (“Spofa”, Чехія) та інші реагенти (“Reaxim”, Україна); полістиролові планшети (“KIMA”, Італія), а

також фотометр-аналізатор імуноензимний Humanreader ("Human", Німеччина). Статистичну обробку результатів проводили з використанням критерію t Стюдента та програмного забезпечення Excel 11.8412.8405 SP3 ("Microsoft", США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Рівень систолічного АТ у алкоголізованих щурів становив $176,70 \pm 20,68$ мм рт. ст. щодо $130,00 \pm 12,25$ мм рт. ст. у контролі. Це вказує на формування АЗГ. У щурів з АЗГ, яким здійснювали РХВ цей показник сягав $125,0 \pm 10,5$ мм рт. ст., при РХВ у контролі – $127,00 \pm 13,35$ мм рт. ст. Слід зазначити відсутність можливого впливу абстинентного синдрому, який формується в період 6–48 год після останнього вживання алкоголю, майже не виявляється через кілька діб після припинення алкоголізації та триває від 2–3 днів до 2–3 тиж. Відсутність змін АТ під дією РХВ можна пов'язати з реакцією серцево-судинної системи на холодний стрес, яка є проявом зниження чутливості холодних і больових рецепторів [14].

Зазначено, що тривале споживання алкоголю призводить до зниження активності протеїназ порівняно з контролем практично у всіх досліджуваних зразках (крім сироватки крові), найбільш виражено у легенях (у 6

разів), серці (у 10 разів), нирках (у 7 разів; рис. 1).

РХВ сприяли активації протеїназ як у контролі, так і у щурів з АЗГ у всіх досліджених зразках, найбільш виражено у щурів з АЗГ, яким здійснювали РХВ, у сироватці крові (у 20 разів), нирках (у 8 разів) та печінці (у 5 разів), при РХВ у контролі – в легенях (у 5 разів). Активність НТПП під дією алкоголю знижувалася порівняно з контролем в печінці (у 10 разів) і менш виражено у нирках, а в сироватці крові та тканинах мозку підвищувалася, в корі мозку у 10 разів, залишаючись без змін у легенях та серці (рис. 2). РХВ сприяли активації НТПП як у контролі, так і у алкоголізованих тварин, причому якщо в останніх у 2–4 рази, то у контролі – у 10 і більше разів, особливо в гіпоталамусі, приблизно у 30 разів. Активність α -2-МГ під впливом алкоголю достовірно знижувалася порівняно з контролем у всіх досліджених зразках, найбільше в гіпоталамусі, легенях та нирках, більш ніж у 100 разів, у серці приблизно у 50 разів (рис. 3). РХВ сприяло підвищенню активності α -2-МГ у щурів з АЗГ, хоча його рівень залишався нижчим за контрольний у всіх досліджених зразках.

Відзначено суттєве підвищення активності α -2-МГ під дією РХВ у тканинах гіпоталамуса, легень, серця та нирок, де її зниження під дією алкоголю було більш вираженим.

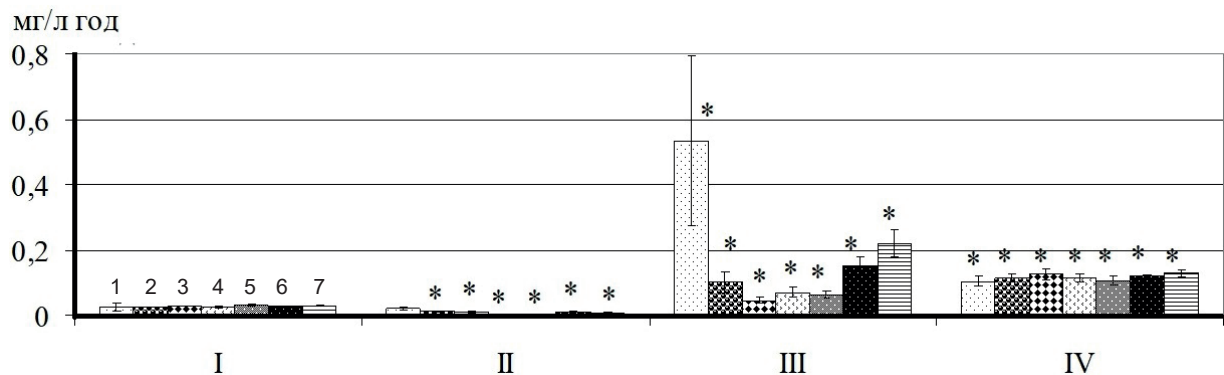


Рис. 1. Активність протеїназ у щурів з алкогользалежною гіпертензією під дією ритмічних холодних впливів: I – контроль, II – алкогользалежна гіпертензія, III – алкогользалежна гіпертензія з ритмічними холодними впливами, IV – ритмічні холодні впливи; 1 – сироватка крові, 2 – кора мозку, 3 – гіпоталамус, 4 – легені, 5 – серце, 6 – печінка, 7 – нирки. *P < 0,05 порівняно з контролем

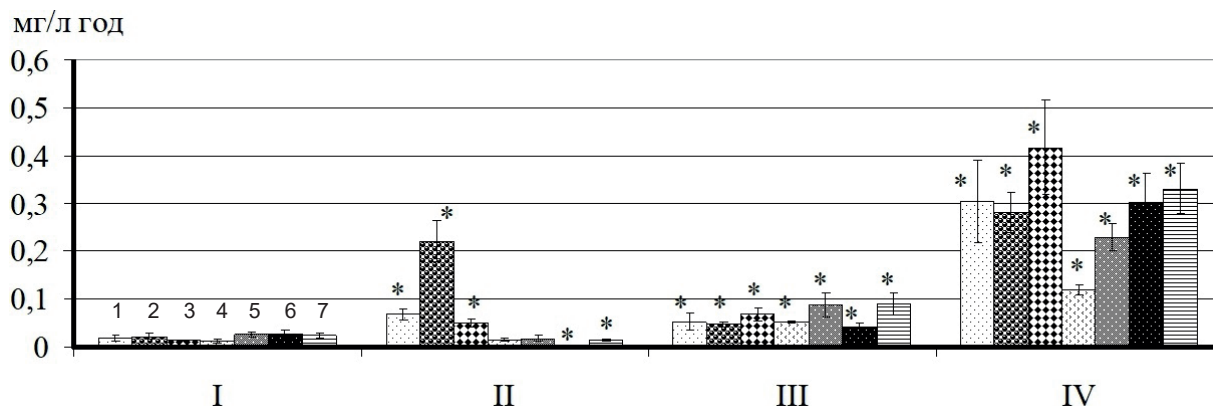


Рис. 2. Активність нетрипсиноподібних протеїназ у щурів з алкогользалежною гіпертензією під дією ритмічних холододових впливів: I – контроль, II – алкогользалежна гіпертензія, III – алкогользалежна гіпертензія з ритмічними холододовими впливами, IV – ритмічні холододові впливи; 1 – сироватка крові, 2 – кора мозку, 3 – гіпоталамус, 4 – легені, 5 – серце, 6 – печінка, 7 – нирки. *P < 0,05 порівняно з контролем

Цікаво відзначити, що ефект РХВ в контролі у інтактних щурів мав неоднозначний характер: у тканинах мозку та нирках активність α -2-МГ порівняно з контролем підвищувалася, а в сироватці крові – знижувалася, в інших досліджених зразках змін не було.

Активність α -1-ІІІ знижувалася порівняно з контролем під дією алкоголю тільки в тканинах мозку, у щурів з АЗГ, яким здійснювали РХВ, – у всіх досліджених зразках крім кори мозку, у щурів з РХВ у контролі – у всіх досліджених зразках (рис. 4).

Зниження загальної активності протеїназ під дією алкоголю швидше за все зумовлене зменшенням активності еластаз нейтрофільного (ЕС 3.4.21.37), ендотеліального (ЕС 3.4.22; у корі мозку та нирках) та макрофагального походження (ЕС 3.4.24.65; у корі мозку, легенях та нирках) [2]. І, як наслідок, це зниження може бути пов'язане з пригніченням функціональної активності нейтрофілів, клітин ендотелію судин, деградацією екстрацелюлярного матриксу та призводити до розвитку та прогресування

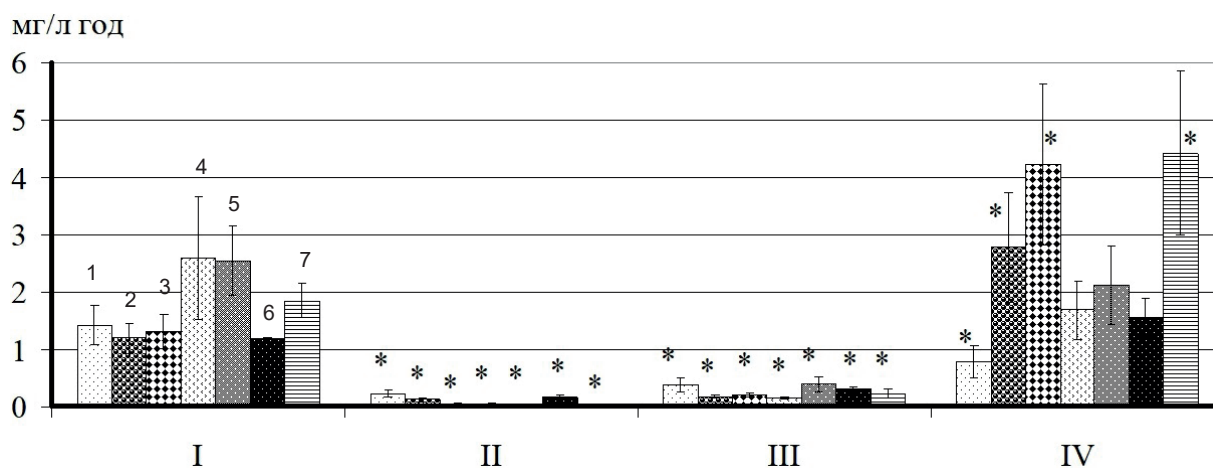


Рис. 3. Активність α -2-макроглобуліну у щурів з алкогользалежною гіпертензією під дією ритмічних холододових впливів: I – контроль, II – алкогользалежна гіпертензія, III – алкогользалежна гіпертензія з ритмічними холододовими впливами, IV – ритмічні холододові впливи; 1 – сироватка крові, 2 – кора мозку, 3 – гіпоталамус, 4 – легені, 5 – серце, 6 – печінка, 7 – нирки. *P < 0,05 порівняно з контролем

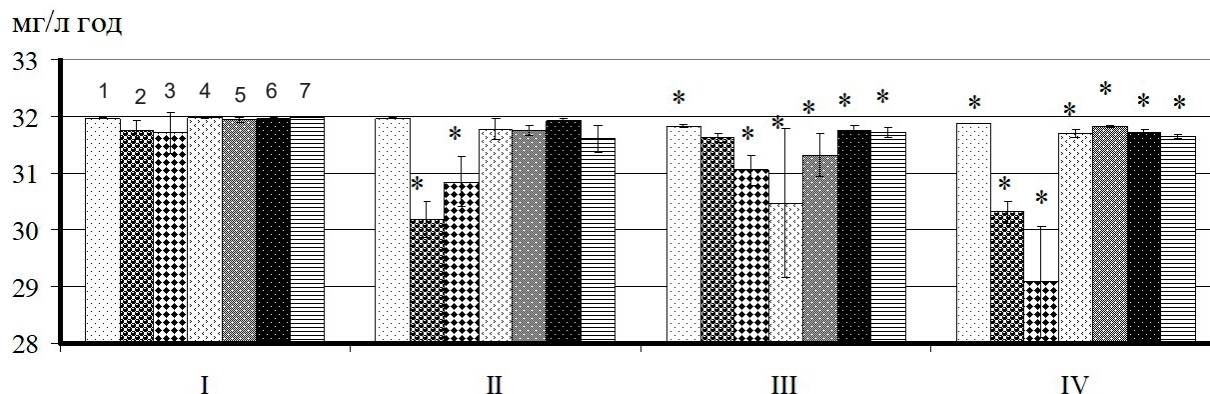


Рис. 4. Активність α -1-інгібітора протеїназ у щурів з алкогользалежною гіпертензією під дією ритмічних холодових впливів: I – контроль, II – алкогользалежна гіпертензія, III – алкогользалежна гіпертензія з ритмічними холодовими впливами, IV – ритмічні холодові впливи; 1 – сироватка крові, 2 – кора мозку, 3 – гіпоталамус, 4 – легені, 5 – серце, 6 – печінка, 7 – нирки. * $P < 0,05$ порівняно з контролем

фіброзу [2, 15]. Існують відомості щодо зниження хемотаксису нейтрофілів, отриманих від осіб з хронічним алкоголізмом [16]. Крім того, алкогольна інтоксикація (тобто, коли алкоголь є в організмі) погіршує імунну відповідь. Коротколанцюгові спирти, такі як етанол, пропанол та ізопропанол, мають одну і ту саму властивість пригнічувати запальні реакції клітин *in vitro*; найбільше страждають моноцити та нейтрофіли, і саме етанол, а не його похідні чи метаболіти, викликає пригнічення імунітету [3]. Основним механізмом, за допомогою якого алкогольна інтоксикація може впливати на запальні/імунні реакції, вважають зміну передачі сигналів Toll-подібних рецепторів, які є рецепторами розпізнавання чужорідних молекул макрофагами та іншими клітинами вродженої імунної системи [16]. Вони беруть участь як у прямій цитотоксичній, так і ефекторній відповідях макрофагів і є ключовими ранніми ініціаторами імунної відповіді.

Підвищення активності протеїназ у алкоголізованих тварин після РХВ у всіх досліджених зразках може бути зумовлено формуванням високої стійкості організму до фактора, що спричинив його зниження при АЗГ (феномен перехресної адаптації) [2]. Але активність протеїназ підвищується неспецифічно і в контролі під дією РХВ, що

може бути наслідком розвитку стрес-реакції, зв'язування α -1-ІІІ з протеїнами теплового шоку та зсуву балансу в системі протеїназ–інгібітор протеїназ у бік активації протеолізу [12]. Найбільш виражені зміни під дією РХВ у контролі – підвищення активності протеїназ (у 5 разів) відзначені в легенях, де контакт із холодним фактором має безпосередній характер.

Зниження загальної активності протеїназ під впливом алкоголю може бути частково зумовлене участю Ca^{2+} -залежних протеїназ – кальпаїнів, активність яких, як уже зазначали, пов'язують із можливістю прискореного розвитку вазоконстрикторних змін [2]. Вільні іони кальцію також можуть впливати на активність рецепторів гліцину (GlyR), які є чутливою мішенню для низьких концентрацій етанолу (від 5 до 100 ммоль/л) [4]. Наприклад, підвищення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} викликає швидке збільшення амплітуди гліцинергічних потоків, пропорційно до притоку Ca^{2+} , що пов'язане з відкриванням потенційнозалежних кальцієвих каналів. Зниження активності протеїназ у тканинах мозку та внутрішніх органів на тлі відсутності статистично значущих змін у сироватці крові може бути зумовлене вивільненням кальпаїнів із клітин [2]. Активність кальпаїнів після РХВ у інтактних щурів та

у щурів із АЗГ достовірно підвищується, вказуючи на стимулюючий ефект РХВ, який, швидше за все, пов'язаний із посиленням утилізації недоокиснених продуктів.

Зміни активності НТПП спричинені в основному участю хімази, частково тоніну, а також гК9, який у 100 разів менш активний, ніж тонін (або гК2) щодо утворення АП [17]. При цьому слід враховувати, що хімаза щурів утворює АП лише за умов високих концентрацій АІ [2, 18]. Під впливом алкоголю активність хімази, тоніну знижується у самців щурів порівняно з контролем [2]. Це пов'язували з витрачанням хімази, тоніну на утворення АП. Але активність НТПП під дією алкоголю знижувалася порівняно з контролем тканиноспецифічно: у печінці (у 10 разів), де максимально акумулюються опасисті клітини, що синтезують хімазу, і менш у нирках, де хімаза проявляє свою функціональну активність. Ефект алкоголю на активність НТПП у печінці може бути зумовлений порушенням біосинтезу протеїнів. Оксидативний стрес відіграє важливу роль у розвитку алкогольної хвороби печінки [16]. Особи з хронічним алкоголізмом до 50% своїх добових калорій замінюють на алкоголь, що призводить до дефіциту поживних речовин, як наслідок часто знижується рівень основних молекул антиоксидантів та загальний антиоксидантний статус. Алкоголь викликає пошкодження печінки безпосередньо через окисний стрес, запалення та ендотоксини [15]. Печінка є основним місцем метаболізму алкоголю та органом-мішенню для ушкоджень, спричинених алкоголем [16]. Сприйнятливість печінки до токсичності алкоголю зумовлюють його високими концентраціями в порталній крові та наслідками метаболізму етанолу. Коли орган хронічно пошкоджений, його здатність відновлюватися пригнічується. За таких умов часто відбувається реконструкція органа у відповідь на пошкодження. Навіть у печінці, яка добре відома своєю здатністю до регенерації, ремоделювання (тобто фіброз) є звичайною реакцією на хронічне запалення.

Ремоделювання проявляється під час фіброзної фази алкогольної хвороби печінки, характеризується відкладенням позаклітинного матриксу, і, очевидно, безпосередньо зумовлено зниженням активності протеїназ, НТПП.

Більш очевидні патологічні зміни печінки під час дії алкоголю відбуваються в гепатоцитах, оскільки накопичення маркерів окисного стресу (наприклад, перекису ліпідів) є переважно гепатоцелюлярною подією під час прийому алкоголю. Двома основними потенційними джерелами прооксидантів у гепатоцитах є індукований спиртом протеїн із функціональною активністю оксидоредуктаз – СYP2E1 та мітохондрії. Відновлення O_2 до H_2O мітохондріями не є повним, 1-2% споживання O_2 мітохондріями призводить до утворення $\cdot O_2^-$. Вплив алкоголю збільшує вихід O_2 з цього клітинного компонента в печінці. Крім того, алкоголь знижує вміст відновленого глутатіону у мітохондріях, що збільшує відповідь гепатоцитів на апоптотичні стимули. Ключовим компонентом прогресування викликаного алкоголем ураження печінки є запалення, в якому беруть участь як резидентні (наприклад, клітини Купфера), так і рекрутовані (наприклад, нейтрофіли та лімфоцити) запальні клітини. Два основних джерела прооксидантів у цих клітинах включають НАД(Ф)Н-оксидазу та індукцибельну форму NO-синтази (iNOS). Інші джерела АФК у макрофагах включають ксантиноксидазу та мієлопероксидазу. Запалення та окисний стрес можуть запустити замкнуте коло, що призводить до прогресуючого пошкодження тканин.

Активність НТПП у щурів з АЗГ підвищувалася у сироватці крові та тканинах мозку. Оцінка можливих механізмів, які лежать в основі окисного стресу, індукованого 3–9%-м етанолом у самців щурів лінії Вістар протягом 21 дня, показує, що він сприяє активації окисного стресу та підвищенню АТ за допомогою ангіотензин-1-залежних механізмів [19]. Ренін-ангіотензинову систему разом із симпатичною нервовою системою вважають

важливими ендогенними медіаторами серцево-судинних ефектів етанолу, пов'язаними з розвитком гіпертензії та атеросклерозу при хронічному впливі [20]. Підвищення активності НТПП у щурів з АЗГ в тканинах мозку (у корі мозку у 10 разів) може бути зумовлене участю хімотрисипинподібних ензимів, крім хімази та тоніну, активність яких знижується під дією алкоголю, а також катепсину G, який пригнічується під час аналізу. Підвищення активності НТПП у тканинах мозку може бути спричинене участю калікреїну III або простатспецифічного антигена (ПСА), функціонування якого не пов'язане з вазоконстрикторними ефектами, та gK_9 , який, як уже зазначали, приблизно у 100 разів менш активний, ніж тонін – gK_2 щодо утворення АП.

У результаті РХВ зазначені зміни активності НТПП, викликані дією алкоголю в печінці та нирках, коригуються: РХВ призводить до зворотно спрямованих змін, підвищуючи активність НТПП у 2–4 рази. У інтактних тварин ефект більш виражений (активація НТПП у 10 і більше разів, в гіполатамусі – у 30 разів), і зумовлений тим, що РХВ, як стресовий вплив, може призводити до значної активації регуляторних функціональних систем організму, зокрема гематоенцефалічного бар'єра [2]. При цьому НТПП можуть сприяти розширенню адаптаційних можливостей організму, збільшенню адаптації до зовнішніх і внутрішніх стресових факторів. Активацію НТПП у всіх досліджених зразках при РХВ можна розглядати і як елемент гормезису, викликаного короточасними впливами низьких температур (температура впливу значно менше шкідливого для організму рівня). При цьому у самців ця активність, найімовірніше, зумовлена участю калікреїну III або ПСА.

Активність α -2-МГ може свідчити про зміни гуморальної та клітинної імунної відповіді за умов розвитку патології [13]. Алкоголь негативно впливає на всі ланки імунітету, що позначається на зниженні цього показника з вираженими ефектами в гіпоталамусі, легенях, нирках та серці. Наприклад, у

гризунів хронічна дія алкоголю (до 6–8 тиж) пов'язана з підвищенням регуляції прозапальних цитокінів, порушенням нормальних регуляторних сигнальних шляхів, активацією ремоделювання тканин та індукцією окисного стресу; все це сприяє формуванню «алкогольного фенотипу легень» [16]. При цьому велика частина абсорбованого алкоголю метаболізується в печінці, але інші тканини, такі як слизова оболонка шлунково-кишкового тракту, мозок, селезінка та легені, також мають здатність метаболізувати алкоголь. Алкоголь, який не метаболізується у печінці, потрапляє безпосередньо у легені через легеневий кровообіг. Вживаний алкоголь може вільно дифундувати з бронхіального кровообігу та епітелію та випаровуватися у провідні дихальні шляхи. Цікаво, що саме цей випарений спирт повертається назад у рідину вистилки дихальних шляхів і впливає на епітелій. Це створює в'язку рециркуляцію високих концентрацій алкоголю і призводить до його багаторазового впливу на епітелій. Позаклітинний матрикс легенів складається з мережі волокон, які забезпечують такі важливі функції, як структурна стабільність, розділення бар'єрів, збереження факторів росту (наприклад, $TGF\beta 1$) та регуляція багатьох критичних клітинних функцій, включаючи передачу сигналів клітин, проліферацію, апоптоз, загоєння ран та фіброз. Протеолітичні фрагменти позаклітинного матриксу виконують дискретні біологічні функції, найбільш вивченою є хемотаксична активність, що забезпечується фрагментами еластину, колагену, фібрoneктину та ламініну. Порушення фібринолізу та низькі рівні α -2-МГ можуть спричинювати розвиток та прогресування легеневої патології [13].

РХВ у алкоголізованих щурів призводить до пом'якшення змін активності α -2-МГ, її зниження порівняно з контролем стає менш суттєвим. Такі зміни можуть бути зумовлені збільшенням функціональної активності α -2-МГ. А під дією РХВ у інтактних щурів спостерігається суттєве підвищення активності

α -2-МГ у корі мозку та гіпоталамусі. Це може бути спричинено впливом РХВ на ультраструктуру астроглії, особливо відростків астроцитів, що оточують термінальні судини [2]. Крім того, зазначена активація α -2-МГ, імовірно, спричинена розвитком син- та кататоксичних адаптивних механізмів, пов'язаних із функцією мозку, які включаються залежно від сили подразника та реактивності структур центральної нервової системи [13]. Під дією РХВ відбувається включення кататоксичних програм адаптації, яке супроводжується активацією гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної системи, і, як наслідок, активацією α -2-МГ у нирках.

Зниження активності α -1-ІП під впливом алкоголю у тканинах мозку може бути зумовлене тим, що цей інгібітор не надходить із місць синтезу. Такий характер прояву активності α -1-ІП на тлі зниження активності протеїназ вказує на пригнічення системи протеїназа-інгібітор протеїназ у цілому. Відомо, що етанол – це речовина, що пригнічує ЦНС, і в “оп’янюючих” концентраціях (5–100 ммоль/л) змінює більшість функцій мозку [4]. Зниження рівня α -1-ІП під впливом РХВ у інтактних та алкоголізованих тварин може бути зумовлене тим, що інгібітор, як уже вказували вище, зв’язується з протеїнами теплового шоку, котрі вивільняються в результаті фізичного впливу стрес-фактора на організм, втрачаючи свою функціональну активність [12]. І цей ефект сприяє активації протеїназ, НТПП.

Таким чином, тривале споживання алкоголю призводить до зниження активності протеїназ у тканинах щурів самців (крім сироватки крові), при цьому в легенях, нирках та серці в 6, 7 та 10 разів відповідно, і може бути зумовлено участю еластаз, кальпаїнів. РХВ сприяє зворотним змінам, викликаним дією алкоголю, а саме – активації протеїназ, найбільш виражено в сироватці крові, нирках та печінці (у 20, 8 та 5 разів відповідно), а у контролі – у легенях (у 5 разів). Активність НТПП під дією алкоголю знижується порівняно з контролем у печінці в 10 разів і менше у нирках. Це, мабуть, зумовлено порушенням

біосинтезу протеїнів, а в сироватці крові та тканинах мозку підвищується, в корі мозку у 10 разів. Вплив РХВ сприяє активації НТПП, у групі АЗГ – у 2–4 рази, у контролі – у 10 і більше разів, найбільше (у 30 разів) в гіпоталамусі, що спричинено участю хімотрипсиноподібних ензимів, крім хімази, тоніну, катепсину G. Активність α -2-МГ під впливом алкоголю знижується порівняно з контролем, найбільше (у 100 разів) в гіпоталамусі, легенях та нирках, у серці в 50 разів. РХВ сприяють підвищенню активності α -2-МГ у щурів із АЗГ (хоча його рівень залишається нижчим за контрольний), у інтактних тварин – у тканинах мозку та нирках. Це може бути зумовлено участю син- та кататоксичних адаптивних механізмів. Активність α -1-ІП знижується під дією алкоголю в тканинах мозку, що на тлі зменшення рівня протеїназ вказує на пригнічення системи протеїназа-інгібітор протеїназ, та під дією РХВ вона також знижується. Це пов’язано з розвитком стрес-реакції організму, яка призводить до активації протеїназ, НТПП.

Робота виконана в рамках НДР: тема П 05/03, № держреєстрації 0103U001595 та тема № 103, шифр 2.2.6.103, № держреєстрації 0116U003493 (2016–2020).

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

L.M. Samokhina¹, V.V. Lomako²

EFFICIENCY OF RHYTHMIC COLD EXPOSURES ON THE ACTIVITY OF PROTEINASES AND THEIR INHIBITORS IN RATS WITH ALCOHOL-DEPENDENT HYPERTENSION

¹GD L.T. “Malaya National Institute of Therapy of National Academy of Medical Sciences of Ukraine,» Kharkiv;

²Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv; e-mail: lub.samokhina@gmail.com

The aim of the work is to study the efficiency of rhythmic cold exposures (RCEs; $5 \pm 1^\circ\text{C}$, frequency 0.1 Hz, 65 min) on the activities of proteinases, nontrypsin-like proteinases (NTLP), tripsininhibitory activity (TIA) α -1-proteinase inhibitor (α -1-PI) and α -2-macroglobulin (α -2-MG) in blood serum, tissues of the brain and internal organs in male rats with alcohol-dependent hypertension (ADH) by highly sensitive ($10^{-9} - 10^{-10}$ g) enzymatic methods. ADH was modelled by chronic (for 10 months) alcoholization of rats by the «two-bottle» method. It was noted that ADH decreases the proteinases activity in tissues, maximally in the lungs, kidneys and heart (by 6, 7 and 10 times, respectively). RCEs promotes the proteinases activation, it is most pronounced in blood serum, kidneys and liver (20, 8 and 5 times, respectively), in intact rats – in the lungs (5 times). ADH decrease the NTLP activity in the liver by 10 times and less in the kidneys, which may be due to a violation of protein biosynthesis, and in the blood serum and brain tissues it increases, in the cerebral cortex by 10 times. RCEs promotes the NTLP activation, at ADH by 2-4 times, in the intact rats by 10 or more times. The ADH decreased the α -2-MG activity, it is most pronounced in the hypothalamus, lungs, kidneys by 100 times and less in the heart. RCEs promotes the α -2-MG activation: at ADH below the control level, in the intact rats – in the brain tissues and kidneys, which may be due to the participation of syn- and catatotoxic adaptive mechanisms. The α -1-PI activity decreases at ADH and the background of RCEs, which is associated with a shift in the balance in the proteinase-proteinase inhibitor system. Thus, RCEs lead to reverse changes caused by ADH in rats, promote activation of proteinases, NTLP, α -2-MG, which is associated with the functioning of regulatory systems of the body, the development of hormesis, the formation of high resistance to external and internal stressors, expanding adaptive capabilities. At the same time, low TIA α -1-IP promotes activation of proteinases, NTLP.

Key words: rhythmic cold exposures; proteinase activity; nontrypsin-like proteinases; α -1-proteinase inhibitor; α -2-macroglobulin; alcohol-dependent hypertension.

REFERENCES

- Śliwicka E, Cisoń T, Straburzyńska-Lupa A, Pilaczyńska-Szcześniak Ł. Effects of whole-body cryotherapy on 25-hydroxyvitamin D, irisin, myostatin, and interleukin-6 levels in healthy young men of different fitness levels. *Sci Rep*. 2020;10:61-75.
- Samokhina LM. Stress, hypertension and adaptation: enzymes of vasoconstriction and destruction under stress, hypo- and hypertension: rhythmic cold effects. Saarbrücken, Deutschland: LAP LAMBERT Acad Publ. 2015. [Russian].
- Ng HP, Jennings S, Nelson S, Wang G. Short-chain alcohols upregulate GILZ gene expression and attenuate LPS-induced septic immune response. *Front Immunol*. 2020;11:53.
- Burgos CF, Muñoz B, Guzman JL, Aguayo LG. Ethanol effects on glycinergic transmission: from molecular pharmacology to behavior responses. *Pharmacol Res*. 2015;101:18-29.
- Xie J, Tian X-F, He S-G J, Wei Y-L, Peng B, Wu Z-Q. Evaluating the intoxicating degree of liquor products with combinations of fusel alcohols, acids, and esters. *Molecules*. 2018;23(6):12-39.
- Poznanski P, Lesniak A, Korostynski M, Szklarczyk K, Lazarczyk M, Religa P, Bujalska-Zadrozny M, Sadowski B, Sacharczuk M. Delta-opioid receptor antagonism leads to excessive ethanol consumption in mice with enhanced activity of the endogenous opioid system. *Neuropharmacology*. 2017;118:90-101.
- Simplicio JA, do Vale GT, Gonzaga NA, Leite LN, Hipólito UV, Pereira CA, Tostes RC, Tirapelli CR. Reactive oxygen species derived from NAD(P)H oxidase play a role on ethanol-induced hypertension and endothelial dysfunction in rat resistance arteries. *J Physiol Biochem*. 2017;73(1):5-16.
- Ansari RA, Husain K, Rizvi SA. Role of transcription factors in steatohepatitis and hypertension after ethanol: the epicenter of metabolism. *Biomolecules*. 2016;6(3):E29.
- Bohan NA, Prokopieva VD, Ivanova SA, Vetlugina TP, Epimakhova EV, Plitnikov EV, Yarygina EG, Boiko AS. Oxidative stress and its correction in patients with alcohol dependence: results from research at the mental health research Institute of the Tomsk National Research Medical Center. *Quest Narcology*. 2018;163(3):27-59. [Russian].
- Kaliman PA, Samokhin AA, Samokhina LM. Proteinase-proteinase inhibitor system in rats under oxidative stress induced by the administration of cobalt chloride. *Ukr Biochem. J*. 2000;72(1):89-92. [Russian].
- Siqueira AF, Vieira A, Ramos GVR, de Cássia Marqueti, de Fátima Salvini T, Puntel GO, Durigan JLQ. Multiple cryotherapy applications attenuate oxidative stress following skeletal muscle injury. *Redox Rep*. 2017;22(6):323-9.
- Samokhina LM, Starodub NF. Activity of proteinases and alfa-1-inhibitor proteinases at cold stress in rats. *Ukr Biochem. J*. 1993;65(5):41-6. [Russian].
- Lomako VV, Samokhina LM, Somova KV. α -2-Macroglobulin Activity at Pothology (Depression, Alcoholism, Hipotension). *Ukr J Med Biol Sport*. 2016;1(1):178-81. [Russian].
- Shekh VE, Dubina GD, Shchyrova LS. Ethnic differences of the cardiovascular system and heart rate variability reactivity on cold stimulation in students from different geographic regions. *Fiziol Zh*. 2020;66(1):35-43. [Ukrainian].
- Gitto S, Golfieri L, Caputo F, Grandi S, Andreone P. Multidisciplinary view of alcohol use disorder: from a psychiatric illness to a major liver disease. *Biomolecules*.

- 2016;6(1):11.
16. Massey VL, Beier JJ, Ritzenthaler JD, Roman J, Arteel GE. Potential role of the gut/liver/lung axis in alcohol-induced tissue pathology. *Biomolecules*. 2015;5(4):2477-503.
17. Moreau T, Brillard-Bourdet M, Bouhnik J, Gauthier F. Protein products of the rat kallikrein gene family. Substrate specificities of kallikrein rK2 (tonin) and kallikrein rK9. *J Biol Chem*. 1992;267(14):10045-51.
18. Inoue K, Nishimura H, Kubota J, Kawamura K. Alternative angiotensin II formation in rats arteries occurs only at very high concentrations of angiotensin I. *Hypertension*. 1999;34(3):525-30.
19. McEvoy LK, Fennema-Notestine C, Elman JA, Eyler LT, Franz CE, Hagler DJ, Hatton SN, Lyons MJ, Panizzon MS, Dale AM, Kremen WS. Alcohol intake and brain white matter in middle aged men: Microscopic and macroscopic differences. *NeuroImage Clin*. 2018;18:390-8.
20. Vale do GT, Simplicio JA, Gonzaga NA, Yokota R, Ribeiro AA, Casarini DE, de Martinis BS, Tirapelli CR. Nebivolol prevents vascular oxidative stress and hypertension in rats chronically treated with ethanol. *Atherosclerosis*. 2018;274:67-76.

*Матеріал надійшов
до редакції 15.11.2021*