

Стимулювання системи протеїназа-інгібітор протеїназ у результаті імерсійної гіпотермії

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

Вивчали вплив імерсійної гіпотермії (ІГ) на активність протеолізу у дорослих самців щурів, яку здійснювали за 0°C протягом 5 хв у тесті «вимушене плавання», температура тіла знижувалася до $27,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$. У сироватці крові та без'ядерних фракціях гомогенатів тканин кори мозку, гіпоталамуса, мозочка, стовбура мозку, легенів, серця, печінки та нирок визначали загальну активність протеїназ (ЗАП), нетрипсиноподібних протеїназ (НТПП), таких як хімаза, калікреїн III або про-статспецифічний антиген, частково тонін, калікреїн rK9, активність α -1-інгібітора протеїназ (α -1-ІП) та α -2-макроглобуліну (α -2-МГ) високочутливими (10^{-9} – 10^{-10} г) ензиматичними методами. Відзначено, що ІГ призводила до збільшення ЗАП у всіх вивчених тканинах (у 4–84 разів), що відповідає ефектам психоемоційного впливу та феномену гормезису. Через 24 год ЗАП знижувалася, залишаючись вищою від контрольного рівня, а у нирках підвищувалася (у 90 разів). Активність НТПП у результаті ІГ збільшувалася у сироватці крові та мозочку, знижувалася у гіпоталамусі, через 24 год підвищувалася у сироватці крові (у 7 разів), мозочку, серці. Активність α -1-ІП також збільшувалася у стовбурі мозку, легенях, серці та нирках, через 24 год знижувалася, причому у сироватці крові нижче за контрольний рівень, а у стовбурі мозку залишалася високою, захищаючи від протеолітичної атаки. Активність α -2-МГ підвищувалась у гіпоталамусі, серці, корі мозку, особливо у стовбурі мозку (у 2–5 разів), через 24 год – більш істотно (у 24 рази), але відсутні були зміни у мозочку, де його вихідний рівень найбільший. Таким чином, розвиток ІГ у результаті плавання у холодній воді протягом 5 хв при 0°C має стимулюючий ефект на організм, призводить до значної активації реакцій лімітованого протеолізу.

Ключові слова: імерсійна гіпотермія; плавання у холодній воді; загальна активність протеїназ; нетрипсиноподібні протеїнази; α -1-інгібітор протеїназ; α -2-макроглобулін.

ВСТУП

Вплив холоду є одним із найсильніших фізіологічних та психологічних стресорів навколишнього середовища [1, 2]. Організм людини пристосовується до низьких температур за допомогою терморегуляції, дезактивує глибокі чутливі рецептори та уповільнюючи провідність сенсорних волокон [1]. Холод вважається найсильнішим анальгетиком. Плавання в холодній воді (ПХВ) може послабити стрес-реакцію [3–6]. Щотижневе плавання у відкритій (холодній) воді призводить до поліпшення настрою після кожного запливу [3, 7], стійкого та поступо-

вого зменшення симптомів депресії, а потім припинення прийому ліків [7].

Але існує загроза, пов'язана з ПХВ, яка розглядається з точки зору гіпотермії або глибокого зниження температури тіла нижче від 35°C [8]. Занурення в холодну воду створює особливий стан, відомий як імерсійна гіпотермія (ІГ). Вона розвивається набагато швидше, ніж звичайна гіпотермія, оскільки вода проводить тепло, яке відходить від тіла у 25 разів швидше, ніж повітря. Слід відзначити, що холодною вважається вода, температура якої нижча за 15°C . З особливими ризиками пов'язують чотири етапи

занурення: початкове (перші 3 хв), коли відбувається охолодження шкіри; короткочасне (3 хв і більше, поверхнєве нервово-м'язове охолодження); тривале (30 хв і більше, глибоке охолодження тканин – гіпотермія) та рятувальний колапс (*circum-rescue collapse*), який виникає безпосередньо перед, під час або незабаром після порятунку.

Занурення в холодну воду широко використовується для прискорення процесу відновлення м'язів завдяки протизапальним та знеболюючим ефектам [3, 9]. При цьому знижується вироблення реактивних речовин, відновлюється окисно-відновлювальний баланс, підвищується життєздатність клітин [9]. Але занадто тривале перебування у зоні зниженої температури викликає деградацію клітин, зміни у роботі серцево-судинної, нервової, м'язової та імунної систем [1]. Спостерігають знижений системний вміст амінокислот, що пов'язують із пригніченням протеолізу або підвищенням поглинання та використання амінокислот тканинами [5].

Отже, вплив ПХВ може варіювати від корисного до шкідливого залежно від взаємодій таких факторів, як: тривалість та інтенсивність впливу холодної води, тривалість часу після плавання, ступень гіпертермії [8]. При цьому, незважаючи на існування достатньої доказової бази переваг чи недоліків ПХВ, вивчення проблеми повинно продовжуватися, особливо у бік розшифровки механізмів, задіяних у реалізації відповідних реакцій організму. Потрібно більше досліджень, щоб краще вивчити коротко- та довгострокові наслідки для здоров'я цієї важливої рекреаційної діяльності [4]. До того ж слід враховувати гендерні особливості [2, 10, 11], оскільки показано, що самиці щурів краще пристосовані до змін температурних умов навколишнього середовища завдяки здатності активувати не тільки морфологічні, а й антиоксидантні механізми захисту [10]. У жіночому організмі адаптаційні зміни більш виражені. Питання розвитку стрес-реакції на холодний вплив виникають у самців. Крім

того, органи старіючих самців щурів мають знижену здатність підвищувати метаболічну відповідь на дію низьких температур порівняно з самицями.

Мета роботи – вивчити активність протеолізу у результаті імерсійної гіпотермії дорослих самців щурів.

МЕТОДИКА

Робота виконана на 6-місячних білих безплідних аутбредних щурах-самцях, отриманих методом стадної рандомбредної системи розведення, яких до початку експерименту утримували в умовах віварію при світловому природному режимі на стандартному раціоні *ad libitum*.

ІГ проводили за 0°C протягом 5 хв у тесті «вимушене плавання» [12], за цих умов у щурів температура тіла знижувалася до $27,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Температуру тіла вимірювали електронним термометром за допомогою ректального датчика. Тварини були поділені на 3 групи по 6 щурів у кожній. До контрольної групи ввійшли інтактні тварини, до дослідних – тварини, яких піддавали впливу ІГ за допомогою ПХВ, та через 24 год після ПХВ. 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). Тварин виводили з експерименту за допомогою декапітації.

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 упродовж 5–10 хв. Тканини кори мозку, гіпоталамуса, мозочка, стовбура мозку, легень, серця, печінки та нирок (300 мг) подрібнювали та гомогенізували у 3 мл 0,2 М Na-фосфатного буфера (pH 7,2) при

4–6°C. Гомогенати тканин центрифугували протягом 10 хв при 5000g на центрифугі РС-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 гомогенатів тканин визначали загальну активність протеїназ (ЗАП), нетрипсиноподібних протеїназ (НТПП), до складу яких входять хімаза, калікреїн III або простатспецифічний антиген, частково тонін, калікреїн rK9, та активність α -2-макроглобуліну (α -2-МГ) і трипсинінгібіторну активність (ТІА) α -1-інгібітора протеїназ (α -1-ІП) високочутливими (10^{-9} – 10^{-10} г) ензиматичними методами. Останні ґрунтуються на розщепленні комплексу маркерного ензиму (пероксидази хрому) та протеїнового субстрату, іммобілізованого на поверхні полістиролу [13]. У результаті протеолітичної реакції відбуваються розщеплення та десорбція субстрату з поверхні полістиролу разом із молекулами зв’язаного з ним маркерного ензиму. Для оцінки ЗАП, активності НТПП, α -1-ІП як субстрат використовували альбумін сироватки бика, для визначення активності 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-ІП визначали після проведення реакції утворення комплексу протеїназа–інгібітор протеїназ. 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’язу-

вання вільних протеїназ і розрахунків проводили за залишковою активністю 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 хрому 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 хрому, 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

Відзначено, що ПХВ упродовж 5 хв при 0°C (короткочасне занурення) призводить до збільшення ЗАП порівняно з контролем у всіх вивчених зразках тканин, особливо у серці, печінці, нирках, гіпоталамусі та корі мозку (у 84, 64, 61, 47 та 42 рази відповідно), менше – у решті тканин у 4–22 рази (рис. 1).

Найменше підвищення ЗАП спостерігали у мозочку та стовбурі мозку (у 10 та 4 рази відповідно), де її вихідний рівень був максимальним порівняно з іншими тканинами. Через 24 год ЗАП у більшості вивчених зразків знижувалася, залишаючись вищою від контрольного рівня, крім серця, печінки (без істотних змін) та нирок, де спостерігалася її подальше підвищення (у 90 разів). Найменше зниження ЗАП відзначено у мозочку та стовбурі мозку.

Активність НТПП у результаті ПХВ істот-

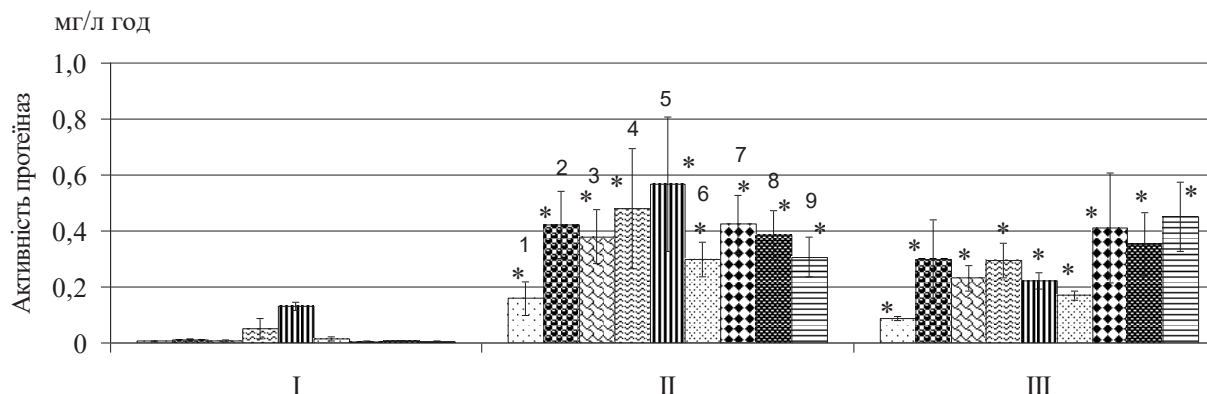


Рис. 1. Загальна активність протеїназ в тканинах шурів після плавання у холодній воді: I – контроль, II – плавання у холодній воді, III – через 24 год після плавання у холодній воді; 1 – сироватка крові, 2 – кора мозку, 3 – гіпоталамус, 4 – мозочок, 5 – стовбур мозку, 6 – легені, 7 – серце, 8 – печінка, 9 – нирки. * $P < 0,05$ порівняно з контролем

но збільшувалася у сироватці крові і менш у мозочку, а у гіпоталамусі знижувалася (рис. 2). Через 24 год вона підвищувалася й далі, у сироватці крові (у 7 разів), мозочку та серці. Враховуючи різницю у зміні ЗАП та НТПП, можна говорити про суттєвий внесок трипсиноподібних ензимів у активацію протеолізу. При цьому слід зазначити, що вихідна активність НТПП була найнижчою у сироватці крові, де спостерігали максимальний ефект ПХВ. Більш високий вихідний рівень активності НТПП виявлено у стовбурі мозку, як і ЗАП.

Активність інгібіторів протеїназ також змінювалася тканиноспецифічно (рис. 3; 4). ТІА α -1-ІП у результаті ПХВ підвищувалася в тканинах стовбура мозку, легенів, серця та нирок, а через 24 год знижувалася, причому у сироватці крові нижче за контрольний рі-

вень, а у стовбурі мозку залишалася вищою за нього. Слід зазначити, що вихідне значення активності α -1-ІП було мінімальним у стовбурі мозку на фоні вищих показників ЗАП та НТПП, вказуючи на локальну активацію реакцій лімітованого протеолізу. Активність α -2-МГ була найбільш високою у мозочку та нирках, низькою – у сироватці крові та стовбурі мозку. У результаті ПХВ вона підвищувалася у гіпоталамусі, серці, корі мозку, особливо у стовбурі мозку (у 2–5 разів). Через 24 год підвищення було більш виражене у стовбурі мозку (у 24 рази), менше у легенях і серці (у 11 та 10 разів), у сироватці крові, корі мозку та гіпоталамусі (у 9 разів), у печінці та нирках (у 6 та 3 рази відповідно). Відсутність змін через 24 год зазначили у мозочку, де його локальний вихідний рівень був найбільш високим.

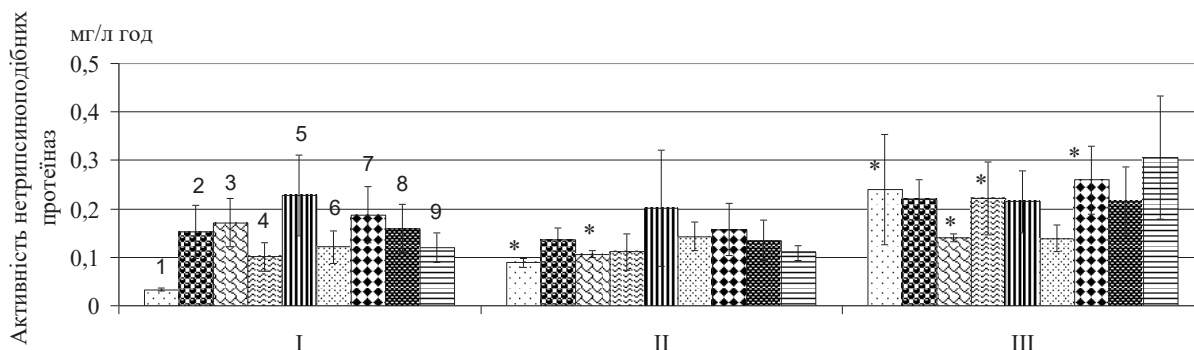


Рис. 2. Активність нетрипсиноподібних протеїназ у тканинах шурів після плавання у холодній воді: I – контроль, II – плавання у холодній воді, III – через 24 год після плавання у холодній воді; 1 – сироватка крові, 2 – кора мозку, 3 – гіпоталамус, 4 – мозочок, 5 – стовбур мозку, 6 – легені, 7 – серце, 8 – печінка, 9 – нирки. * $P < 0,05$ порівняно з контролем

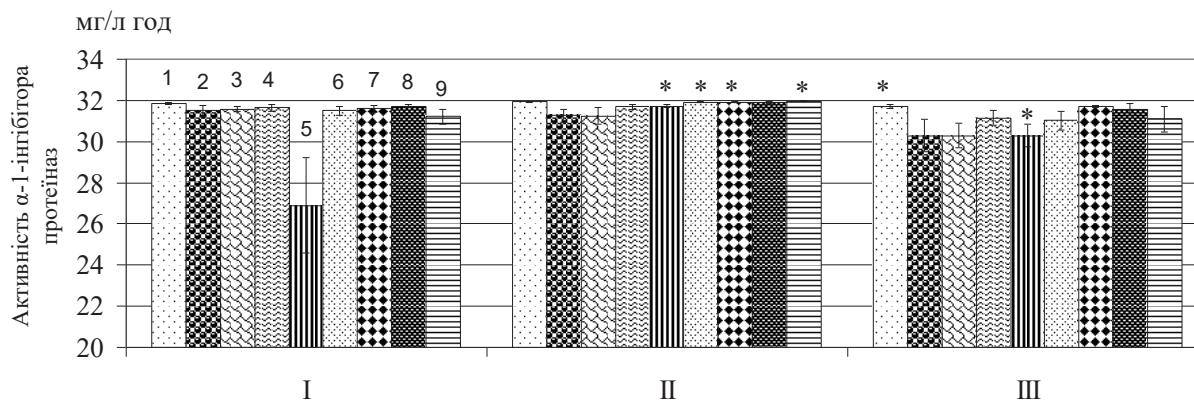


Рис. 3. Активність α -1-інгібітора протеїназ у тканинах щурів після плавання у холодній воді: I – контроль, II – плавання у холодній воді, III – через 24 год після плавання у холодній воді; 1 – сироватка крові, 2 – кора мозку, 3 – гіпоталамус, 4 – мозочок, 5 – стовбур мозку, 6 – легені, 7 – серце, 8 – печінка, 9 – нирки. * $P < 0,05$ порівняно з контролем

Таким чином, ПХВ сприяє активації реакцій лімітованого протеолізу у системі протеїназа–інгібітор протеїназ. Більше виражені зміни спостерігаються в системі протеїназа– α -2-МГ, що пов'язано, швидше за все, з виведенням зазначених комплексів із організму, зокрема нирками. При цьому високий рівень інгібіторного потенціалу у стовбурі мозку (довгастий мозок, варолів міст, середній мозок) може бути асоційований з його функціональною активністю, захистом від протеолітичної атаки.

Враховуючи можливість оцінки впливу стрес-факторів на організм за рахунок ЗАП та ТІА α -1-ІІ у сироватці крові [14], очевидно, що ПХВ упродовж 5 хв при 0°C має психоемоційний вплив (збільшення ЗАП відносно норми). Виявлене зниження ЗАП та α -1-ІІ

через 24 год вказує на можливість розвитку дистрес-реакції організму.

Значна активація протеолізу є природною реакцією на стрес, який визнається адаптивною реакцією організму на зміни навколишнього та внутрішньоклітинного середовища, спрямованою на відновлення гомеостазу [2, 15]. Відомо, що стрес викликає активацію гіпоталамо-гіпофізарно-адренокортикальної осі і завершується вивільненням адреналіну [15]. Слід зазначити, що ПХВ упродовж 3 хв при 4°C покращує когнітивні функції у щурів [6]. Вважається, що ці, спричинені стресом, поліпшення нейрокогнітивних функцій опосередковані активацією симпатичної нервової системи, посиленням кровотоку та синаптичного вивільнення норадреналіну у головному мозку. При цьому кількість циркулюючих

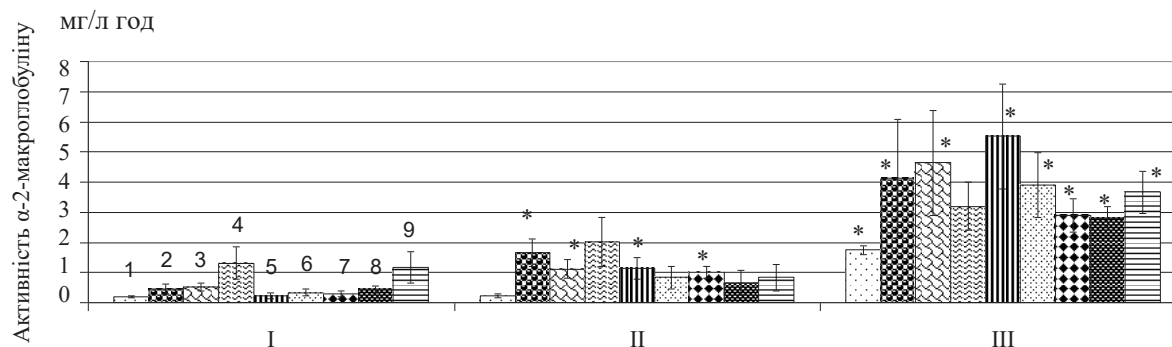


Рис. 4. Активність α -2-макроглобуліну у тканинах щурів після плавання у холодній воді: I – контроль, II – плавання у холодній воді, III – через 24 год після плавання у холодній воді; 1 – сироватка крові, 2 – кора мозку, 3 – гіпоталамус, 4 – мозочок, 5 – стовбур мозку, 6 – легені, 7 – серце, 8 – печінка, 9 – нирки. * $P < 0,05$ порівняно з контролем

ендотеліальних клітин-попередників, стовбурових клітин CD34⁺ та нових кровоносних судин у пошкодженій тканині гіпокампа значно збільшується. ПХВ може сприяти проліферації ендотеліальних клітин-попередників та ангіогенезу у периферичних тканинах та гіпокампі (бере участь у механізмах формування емоцій).

Під дією холоду також підвищується кількість клітин крові, що відображає безпосередню індукцію кровотворення через активацію низки гормональних медіаторів, які регулюють енергетичний обмін та сприяють розвитку холодової адаптації [1]. Вплив холоду може викликати збільшення секреції гормонів щитоподібної залози та тиреотропного гормону (ТТГ), що призводить до посилення метаболізму та вироблення тепла. Індуковане плаванням у крижаній воді збільшення концентрації паратиреоїдного гормону негативно корелює зі вмістом системного кальцію [16]. Занурення у холодну воду впливає на мінеральний склад кісток, зокрема концентрацію Ca²⁺ [2]. Зниження концентрації системного кальцію може бути пов'язане з його надходженням у тканини та функціонуванням Ca²⁺-залежних протеїназ – кальпаїнів, активність яких збільшується при оксидативному стресі [17]. Вплив холоду призводить до посилення переокисного окиснення ліпідів у тканинах [10]. У результаті може відбуватися деполяризація внутрішніх мембран мітохондрій клітин, збільшення утворення H₂O₂ та підвищення чутливості мембран до залізоалежного окиснення ліпідів [17]. Низькі температури впливають на перебіг процесів на клітинному рівні [8]. Це включає швидкість метаболізму, ензиматичну активність, порушення гомеостазу Ca²⁺. Такі процеси можуть спричиняти збільшення активності кальпаїнів і, як наслідок, ЗАП.

Слід зазначити, що реакція на холод пов'язана з тривалістю плавання у крижаній воді (рівень акліматизації) [5, 8, 16]. Навіть у крижаній воді ймовірність переохолодження у дорослих не виникає протягом принаймні

30 хв [8]. Гіпотермія впливає на клітинний метаболізм, кровотік і нервову функцію. Протягом перших 30 хв холодового впливу (4°C) у шурів у кровотік вивільняється аланін (важливе джерело енергії), після чого у наступні години він швидко надходить у тканини разом з іншими амінокислотами [5]. Потенційними факторами, що регулюють амінокислотний баланс при холодовому стресі, є катехоламіни. Під впливом адреналіну протягом перших 30 хв зменшується вивільнення тирозину та лейцину з камбалоподібного м'яза, а через 60 хв після припинення перфузії – збільшується. Вивільнення аланіну, як і лактату, поступово зростає впродовж 90 хв перфузії адреналіну. У разі інтенсивнішої стимуляції холодом (розвиток ІГ), інші класи амінокислот можуть бути аналогічно задіяними в підживленні термогенного процесу. Індукована холодом (15 хв плавання у крижаній воді) активація термогенезу модулює енергетичний обмін [16]. При цьому кров, яка виходить з печінки, приблизно на 1°C тепліша за таку, що надходить до неї; це сприяє зігріванню всього організму [1]. Можливо, вказаний ефект зумовлює зазначену в нашому дослідженні відсутність змін активності α -1-ІП у печінці та підвищення α -2-МГ лише через 24 год.

Занурення у холодну воду знижує шкірну, підшкірну, м'язову і іноді навіть ректальну температуру у відповідь на підвищене споживання кисню і метаболізм для підтримки внутрішньої температури [10]. При цьому відбувається стимулювання шкірних рецепторів, що викликає звуження судин (через симпатичні волокна), зменшення набряку та запалення внаслідок уповільнення метаболізму та вироблення метаболітів, тим самим обмежуючи ступінь пошкодження та покращуючи відновлення нервової та м'язової тканин. Звуження/розширення судин може також сприяти виникненню небезпечних серцевих аритмій [18]. Такий конфлікт, характерний для реакції серцево-судинної системи на занурення у холодну воду (у людей), виникає у результаті пов'язаної з фізичними вправами

активації симпатичних волокон серця для збільшення частоти серцевих скорочень у поєднанні зі змінами парасимпатичного тону для їх зниження. Симпатичні серцеві волокна-акселератори та периферичні симпатичні вазомоторні волокна активуються під час занурення у холодну воду, і їх активність підвищується при найнижчій частоті серцевих скорочень, при цьому вазоконстрикція є максимальною, що може бути пов'язане з активацією НТПП у сироватці крові, та викликати напружені кардіореспіраторні реакції. Слід також відзначити, що плавання середньої інтенсивності у прохолодній воді (30 хв) навіть при 25 і 30°C, збільшує жорсткість артерій [19].

У тварин парасимпатичний серцевий тон через блукаючий нерв домінує над симпатичним на всіх фазах занурення, що призводить до брадикардії, тобто аритмії, за якої частота серцевих скорочень становить менше ніж 60 ударів за хвилину [8]. Під час занурення у холодну воду у щурів можуть спостерігатися коливання частоти серцевих скорочень та серцевого ритму, і це доброякісна аритмія. У наших експериментах збільшення активності НТПП у серці спостерігалось лише в 1,4 раза через 24 год після ПХВ. Інтенсивні аеробні вправи покращують стан серцево-судинної системи [1]. Але сприятливий вплив ПХВ на фактори ризику серцево-судинних захворювань може залежати від статі [11], зокрема внаслідок збільшення швидкості метаболізму у самців за участю НТПП – калікреїну ІІІ або простатспецифічного антигену, який розщеплює великі білкові молекули на дрібніші фрагменти. Але підвищення активності НТПП внаслідок ІГ у мозочку очевидно сприятиме розладам статички та координації рухів, а також м'язової гіпотонії та надмірним мимовільним рухам (гіперкінезам). Останнє, ймовірно, зумовлене участю НТПП – хімази, що на тлі відсутності змін інгібіторного потенціалу у результаті ІГ і через 24 год може мати важливе значення.

Цікаво відзначити зниження активності

НТПП у гіпоталамусі у результаті ПХВ та через 24 год після плавання. Аналогічні ефекти спостерігали і за умов утримання щурів упродовж 3 год при 4°C, а саме – суттєве зменшення активності НТПП-хімази у корі мозку, гіпоталамусі, легенях, печінці, нирках, а тоніну або гК2 – у сироватці крові та окремих тканинах, крім серця та стовбура мозку [20]. При цьому слід зазначити, що хімаза щурів швидше розщеплює ангіотензин ІІ (АП), сприяє вазодилатації, вона утворює АП лише за умов високих концентрацій ангіотензину І. А у підтримці вазопресорної функції допускають участь гК9, який у 100 разів менш активний, ніж тонін щодо утворення вазоконстрикторного пептиду – АП.

α -2-МГ першим серед інгібіторів включається у пригнічення надлишкової активності протеїназ, зв'язується зі шкідливими для організму пептидазами ендogenousного походження, ензимами згортання крові, пошкодження тканин. Він не інактивує протеїнази повністю, а сприяє їх виведенню з організму, що може забезпечувати прояв максимальної їх активності через 24 год після ПХВ у нирках. Відомо, що α -2-МГ робить протеїнази стійкішими до дії інших інгібіторів. І менш значущий характер змін α -1-ІІІ на тлі суттєвої активації α -2-МГ (у рази) свідчить про те, що за умов ПХВ саме α -2-МГ бере на себе основну функцію регулювання активності протеїназ. При цьому він, імовірно, забезпечує захист від розвитку тромбозу судин, навантаження на систему кровообігу у результаті ІГ. Зниження активності α -1-ІІІ у сироватці крові після відновлення температури тіла може бути зумовлене накопиченням дефектних молекул, синтезом протеїнів теплового шоку та їх зв'язуванням із цим інгібітором.

Таким чином, розвиток ІГ у результаті ПХВ упродовж 5 хв при 0°C призводить до збільшення ЗАП у всіх вивчених тканинах, що є природною реакцією на стрес, відповідає ефектам психоемоційного впливу та феномену гормезису. При цьому найменше підвищення зазначено у мозочку та стовбурі

мозку, де вихідний рівень ЗАП максимальний. Через 24 год після ПХВ ЗАП знижується, залишаючись вищою за контрольний рівень, а у нирках підвищується. Активність НТПП у результаті ПХВ зростає у сироватці крові та мозочку, знижується у гіпоталамусі, а через 24 год підвищується й далі у сироватці крові, мозочку та серці, що може бути пов'язано з розвитком вазоконстрикторних ефектів, доброякісної аритмії, м'язової гіпотонії та надмірними мимовільними рухами (гіперкінезами). Трипсинінгібіторна активність α -1-ІП у результаті ПХВ збільшується у тканинах стовбура мозку, легенів, серця та нирок, а через 24 год знижується, причому у сироватці крові нижче за контрольний рівень, а у стовбурі мозку залишається високою, захищаючи від протеолітичної атаки систему рефлекторних центрів, які відповідають за обробку сенсорної інформації та м'язовий тонус. Активність α -2-МГ внаслідок ПХВ підвищується у гіпоталамусі, серці, корі мозку, максимально у стовбурі мозку, а через 24 год після ПХВ – більш суттєво, беручи на себе основну функцію регулювання активності протеїназ, але відсутні зміни у мозочку, де його вихідний рівень є найбільшим. При цьому максимальне значення ЗАП у нирках через 24 год може бути зумовлене функціональною активністю α -2-МГ, який не інактивує протеїнази повністю, а зв'язуючись з ними, сприяє їх виведенню з організму.

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

Автори висловлюють подяку старшому науковому співробітнику Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України канд.біол.наук, с.н.с. О.В.Шилу за консультативну та методичну допомогу.

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

STIMULATION OF THE PROTEINASE-PROTEINASE INHIBITOR SYSTEM AS A RESULT OF IMMERSION HYPOTHERMIA

¹GI "L.T. Malaya Therapy National Institute of the 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 effect of immersion hypothermia (IH) on proteolysis activity in adult male rats, which was performed at 0 °C for 5 min in the "forced swimming" test, studied; the body temperature decreased to $27.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$. In blood serum and non-nuclear fractions of homogenates of cerebral cortex, hypothalamus, cerebellum, brainstem, lungs, heart, liver and kidneys tissues were determined the total proteinase activity (TPA), non-trypsin-like proteinases (NTPs), such as chymase, prostate-specific antigen, partially tonin, kallikrein rK9, as well as trypsin-inhibitory activity of α -1-proteinase inhibitor (α -1-PI), α -2-macroglobulin (α -2-MG) by highly sensitive (10^{-9} – 10^{-10} g) enzymatic methods. It is noted that IH led to the TPA increase in all studied tissues (4-84 times), which corresponds to the psycho-emotional effects and the phenomenon of hormesis. After 24 h, TPA decreased, remaining above the control level, and in the kidneys increased further (90 times). NTP activity as a result of IH increased in blood serum and cerebellum, decreased in the hypothalamus, and after 24 h increased further in serum (7 times), cerebellum, and heart. The activity of α -1-PI also increased in the brainstem, lungs, heart and kidneys, and decreased after 24 h in serum below the control level, and in the brainstem remained high, protecting against proteolytic attack. The activity of α -2-MG increased in the hypothalamus, heart, and cerebral cortex, maximum in the brainstem (2-5 times), and after 24 h - more significantly (24 times), but there were no changes in the cerebellum, where its initial level is the biggest. Thus, the development of IG as a result of swimming in cold water for 5 min at 0°C has a stimulating effect on the body and leads to a significant activation of the reactions of limited proteolysis.

Key words: immersion hypothermia; cold water swimming; total proteinase activity; non-trypsin-like proteinases; α -1-proteinase inhibitor; α -2-macroglobulin.

REFERENCES

1. Teległów A, Romanovski V, Skowron B, Mucha D, Tota Ł, Rosińczuk J, Mucha D. The Effect of extreme cold on complete blood count and biochemical indicators: a case

- study. *Int J Environ Res Publ Health*. 2021;19(1):424.
2. Bosiacki M, Gutowska I, Piotrowska K, Lubkowska A. Concentrations of Ca, Mg, P, Prostaglandin E2 in bones and parathyroid hormone; 1,25-dihydroxyvitamin D3; 17- β -estradiol; testosterone and somatotropin in plasma of aging rats subjected to physical training in cold water. *Biomolecules*. 2021;11(5):616.
3. Gundle L, Atkinson A. Pregnancy, cold water swimming and cortisol: The effect of cold water swimming on obstetric outcomes. *Med Hypotheses*. 2020 Nov;144:109977.
4. Manolis AS, Manolis SA, Manolis AA, Manolis TA, Apostolaki N, Melita H. winter swimming: body hardening and cardiorespiratory protection via sustainable acclimation. *Current Sports Med Rep*. 2019;18(11):401-15.
5. Kovaničová Z, Karháněk M, Kurdiová T, Baláz M, Wolfrum C, Ukropcová B, Ukropec J. Metabolomic analysis reveals changes in plasma metabolites in response to acute cold stress and their relationships to metabolic health in cold-acclimatized humans. *Metabolites*. 2021;11(9):619.
6. Zhou ZW, Li YD, Gao WW, Chen JL, Yue SY, Zhang JN. Cold water swimming pretreatment reduces cognitive deficits in a rat model of traumatic brain injury. *Neural Regen Res*. 2017;12(8):1322-28.
7. van Tulleken C, Tipton M, Massey H, Harper CM. Open water swimming as a treatment for major depressive disorder. *BMJ Case Rep*. 2018;2018:bcr2018225007.
8. Tipton MJ, Collier N, Massey H, Corbett J, Harper M. Cold water immersion: kill or cure? *Exp Physiol*. 2017;102(11):1335-55.
9. Furtado ABV, Hartmann DD, Martins RP, Rosa PC, da Silva IK, Duarte BSL, Signori LU, Soares FAA, Puntel GO. Cryotherapy: biochemical alterations involved in reduction of damage induced by exhaustive exercise. *Braz J Med Biol Res*. 2018;51(11):e7702.
10. Lubkowska A, Bryczkowska I, Gutowska I, Rotter I, Marczuk N, Baranowska-Bosiacka I, Banfi G. The effects of swimming training in cold water on antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in erythrocytes of male and female aged rats. *Int J Environ Res Publ Health*. 2019;16(4):647.
11. Checinska-Maciejewska Z, Miller-Kasprzak E, Checinska A, Korek E, Gibas-Dorna M, Adamczak-Ratajczak A, Bogdanski P, Krauss H. Gender-related effect of cold water swimming on the seasonal changes in lipid profile, ApoB/ApoA-I ratio, and homocysteine concentration in cold water swimmers. *J Physiol Pharmacol*. 2017;68(6):887-96.
12. Abel EL. Physiological correlates of the forced swim test in rats. *Physiol Behav*. 1993;54(2):309-17.
13. Samokhina LM, Lomako VV. Efficiency of rhythmic cold exposures on the activity of proteinases and their inhibitors in rats with alcohol-dependent hypertension. *Fiziol Zh*. 2022;68(1):34-44. [Ukrainian].
14. Samokhina LM. A method for assessing the influence of stress factors on the body. IPC G 01 N 33/487, A 61 B 10/00 (Ukraine); Application N 97010015 dated 01/03/97; Patent No. 28406 A dated October 16, 2000 - Bull. No. 5-11. [Russian].
15. Feng JH, Sim SM, Park JS, Hong JS, Suh H. Modulation of corticosterone and changes of signal molecules in the HPA axis after cold water swimming stress. *Anim Cells Syst (Seoul)*. 2021;25(1)37-45.
16. Kovaničová Z, Kurdiová T, Baláz M, Štefanička P, Varga L, Kulterer OC, Betz MJ, Haug AR, Burger IA, Kiefer FW, Wolfrum C, Ukropcová B, Ukropec J. Cold exposure distinctively modulates parathyroid and thyroid hormones in cold-acclimatized and non-acclimatized humans. *Endocrinology*. 2020;161(7):bqaa051.
17. Kaliman PA, Samokhin AA, Samokhina LM. Activity of Ca²⁺-dependent neutral proteinases in the organs of rats after administration of cobalt and mercury chlorides. *Ukr Biochem J*. 2003;75(1):104-6. [Russian].
18. Ponganis PJ, McDonald BI, Tift MS, Williams CL. Heart rate regulation in diving sea lions: the vagus nerve rules. *J Exp Biol*. 2017;220(Part 8):1372-81.
19. Hayashi S, Otsuki T. Acute increase in arterial stiffness after swimming in cooler water. *Clin Physiol Funct Imag*. 2021;41(5):426-33.
20. Samokhina LM, Lomako VV, Shilo AV. Effect of cold exposure on the activity of chymase and tonin in rat tissues. *Biophys Living Cell*. 2014;10:180-2. [Russian].

*Матеріал надійшов
до редакції 09.06.2022*