

ДУ «Національний інститут терапії
ім.Л.Т.Малої НАМН України», Інститут проблем
кріобіології і кріомедицини НАН України, м.Харків

Л.М.Самохіна, В.В.Ломако

ВПЛИВ ІМЕРСІЙНОЇ ГІПОТЕРМІЇ НА ПРОЦЕСИ ПРОТЕОЛІЗУ

17 листопада 2022 р., м. Харків

IV науково-практична internet-конференція з міжнародною участю
«Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна
корекція»



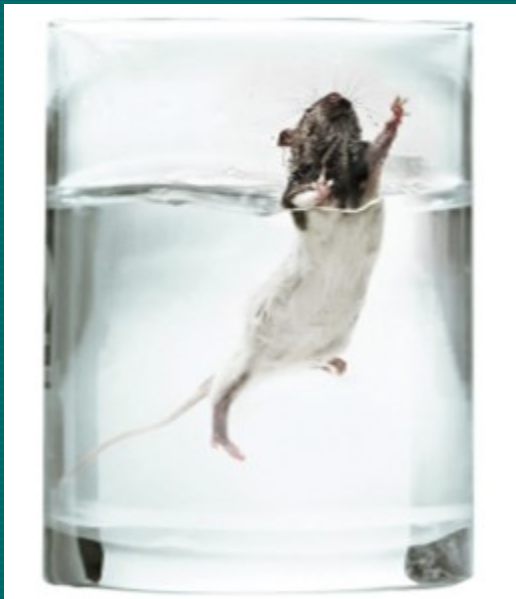
- Занурення у холодну воду стимулює роботу шкірних рецепторів, що викликає **вазоконстрикторні зміни**, звуження судин (через симпатичні волокна), **зменшення набряку та запалення** внаслідок уповільнення метаболізму та вироблення метаболітів, тим самим обмежуючи ступінь пошкодження та покращуючи відновлення нервової та м'язової тканин.
- Плавання у холодній воді, температура якої нижче від 15 ° С, використовують для прискорення процесу відновлення м'язів завдяки **протизапальним та знеболюючим ефектам**.
- При цьому **знижується вироблення реактивних речовин**, відновлюється окисно-відновлювальний баланс, **підвищується життєздатність клітин**, але дуже швидко також розвивається особливий стан, відомий як **імерсійна гіпотермія (ІГ)**, оскільки вода проводить тепло у 25 разів швидше, ніж повітря.
- Занадто тривале перебування у зоні зниженої температури викликає деградацію клітин, зміни у роботі основних систем організму.
- **Знижується системний вміст амінокислот, що пов'язують із пригніченням протеолізу або підвищеним поглинанням та використанням амінокислот тканинами.**

- Важливим у формуванні відповідної реакції організму на зовнішній вплив є участь хімотрипсинподібної протеїнази - **хімази**, яка у щурів розщеплює вазоконстрикторний пептид - ангіотензин II (АII), сприяє вазодилатації, вона утворює АII лише за умов високих концентрацій ангіотензину I.

При цьому у підтримці вазопресорної функції можуть приймати участь **тонін, калікреїн гК9**, який у 100 разів менш активний, ніж тонін щодо утворення АII, а також катепсин G.

- У пригніченні надлишкової активності протеїназ важливу роль грає **α -2-макроглобулін (α -2-МГ)**, який першим серед інгібіторів включається у реакцію з протеїназами, зв'язується зі шкідливими для організму пептидазами ендогенного походження, ензимами згортання крові, пошкодження тканин. Він сприяє виведенню протеїназ із організму.

- **Мета.** Вивчити активність нетрипсиноподібних протеїназ та **α -2-макроглобуліна за умов імерсійної гіпотермії у щурів**



- **Методика**

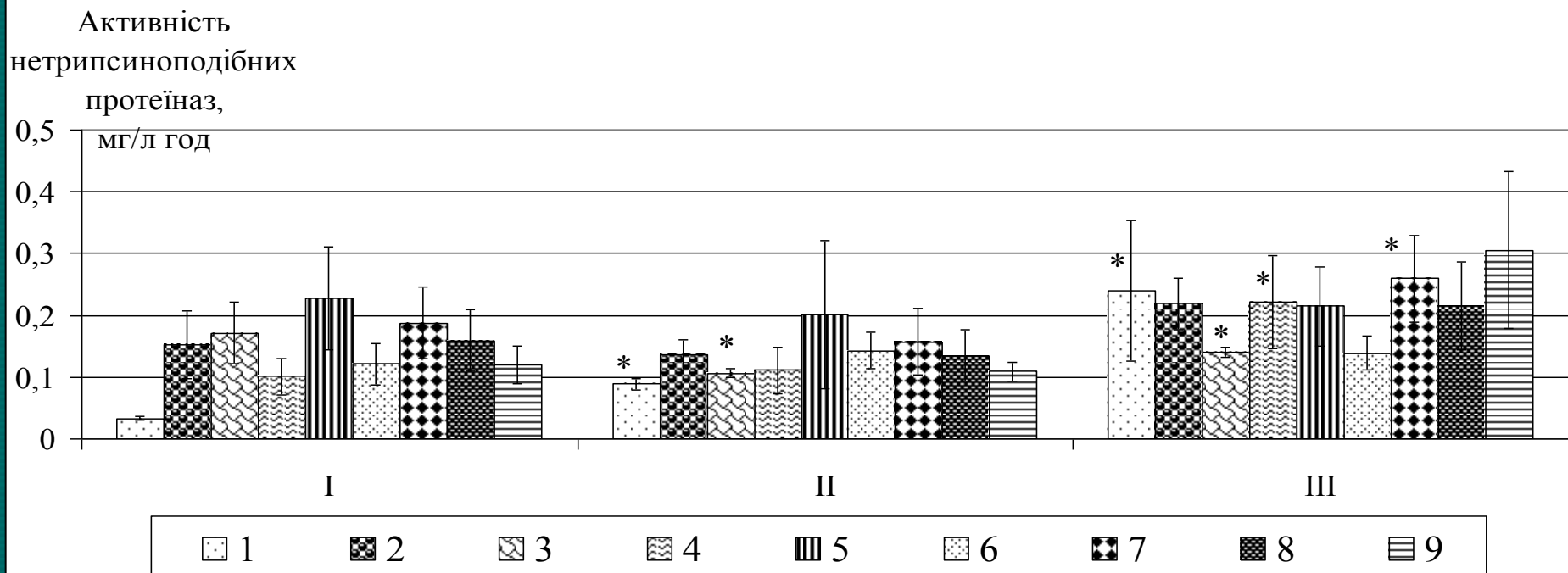
- Робота виконана на 6-тимісячних білих безпородних аутбредних щурах-самцях, отриманих методом стадної рандомбредної системи розведення, яких до початку експерименту утримували в умовах віварію при світловому природному режимі на стандартному раціоні *ad libitum*.

- **Імерсійну гіпотермію** викликали за температури 0 ° С протягом 5 хв у тесті «**вимушене плавання**», за цих умов у щурів температура тіла знижувалася до $27,5 \pm 0,5$ ° С. Температуру тіла вимірювали електронним термометром за допомогою ректального датчика.

У сироватці крові та без'ядерних фракціях 10 % гомогенатів тканин кори мозку, гіпоталамуса, мозочку, стовбура мозку, легень, серця, печінки та нирок визначали активність **нетрипсиноподібних протеїназ (НТПП)** (хімаза, калікреїн III або простатспецифічний антиген, частково тонін і калікреїн гК9, без катепсину G) та їх інгібітора **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. Додатково розраховували протеолітичні коефіцієнти (ПК) – **відношення НТПП/ α -2-МГ**.

У дослідженнях використовували пероксидазу хрону, соєвий інгібітор трипсину, протамінсульфат, альбумін сироватки бика ("ICN", США), трипсин ("Spofa", Чехія) та інші реагенти ("Реахім", Україна); полістиролові планшети ("KIMA", Італія), а також фотометр-аналізатор імуноензимний Humanreader ("Human", Німеччина).

Статистичну обробку результатів проводили за методом непараметричної статистики Крускала-Волліса з використанням програмного забезпечення Statistica 6.0 (MatStat Inc., США).



I – контроль, II – плавання у холодній воді, III – через 24 год після ПХВ;

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

Активність НТПП у результаті імерсійної гіпотермії (ІІ) значуще збільшувалася у сироватці крові і менш у мозочку, а у гіпоталамусі знижувалася.

Через 24 год вона підвищувався далі, значуще у сироватці крові (у 7 разів), мозочку та серці.

При цьому слід зазначити, що вихідна активність НТПП була найнижчою у сироватці крові, де спостерігали максимальний ефект ІІ.

Більш високий вихідний рівень НТПП був виявлений у стовбурі мозку.

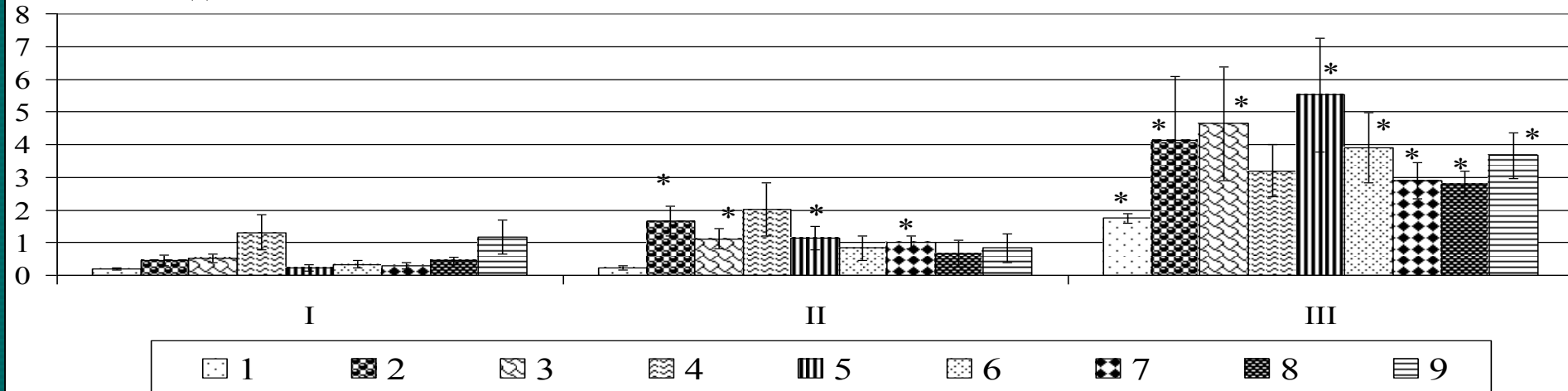
- Занурення у холодну воду знижує шкірну, підшкірну, м'язову і навіть ректальну температуру у відповідь на **підвищене споживання кисню і прискорення метаболізму** для підтримки внутрішньої температури.

- При цьому відбувається звуження/розширення судин, що може сприяти виникненню небезпечних серцевих аритмій.

Такий конфлікт, характерний для реакції серцево-судинної системи на занурення у холодну воду, може виникати у результаті 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**.

Активність альфа-2-макроглобуліна, МГ/Л ГОД



- I – контроль, II – плавання у холодній воді, III – через 24 год після ПХВ;
- 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

- Активність α -2-МГ була найбільш високою у мозочку та нирках, низькою – у сироватці крові та стовбурі мозку.
- У результаті імерсійної гіпотермії вона підвищувалася у гіпоталамусі, серці, корі мозку та більше 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.

Протеолітичні коефіцієнти НТПП/α-2-МГ

Зразок тканини	Контроль	ПХВ	24 години після ПХВ
Сироватка крові	0,169 ± 0,020	0,571 ± 0,282*	0,004 ± 0,001*
Кора мозку	0,316 ± 0,089	0,071 ± 0,018*	0,004 ± 0,001*
Гіпоталамус	0,391 ± 0,035	0,135 ± 0,036*	0,003 ± 0,001*
Мозочок	0,081 ± 0,006	0,072 ± 0,025	0,004 ± 0,001*
Стовбур мозку	0,578 ± 0,149	0,181 ± 0,056*	0,004 ± 0,001*
Серце	0,435 ± 0,142	0,152 ± 0,049*	0,004 ± 0,001*
Легені	0,482 ± 0,138	0,212 ± 0,073	0,003 ± 0,001*
Печінка	0,391 ± 0,087	0,847 ± 0,327*	0,004 ± 0,001*
Нирки	0,139 ± 0,048	1,120 ± 0,397*	0,005 ± 0,002*

ПК НТПП/α-2-МГ за умов ІГ підвищувалися **у сироватці крові, печінці та нирках** на тлі **зменшення у решті тканин** (у мозочку і легенях – без змін). Збільшення ПК за умов ІГ вказує на інтенсифікацію процесів лімітованого протеолізу у відзначених тканинах, що відображає зсув рівноваги у системі НТПП-α-2-МГ та свідчить про локальне утворення активних форм ензимів і гормонів (у печінці і нирках), **вивільнення хімази опасистих клітин, тоніну, гК9**. Через 24 год після ІГ ПК знижувалися практично до нульових значень **у всіх вивчених тканинах**, що може свідчити про **виведення НТПП із організму**. Тобто відбуваються локальні **скачки активації/пригнічення** активності НТПП за умов ІГ/через 24 год, що може негативно впливати на організм.

Коливання частоти серцевих скорочень та серцевого ритму, що спостерігаються під час занурення у щурів холодну воду, розглядають як доброякісні аритмії.

У наших експериментах **збільшення активності НТПП у серці спостерігалось лише у 1,4 раз через 24 год після ІГ.**

Але підвищення активності НТПП унаслідок ІГ у мозочку може сприяти розладам статички та координації рухів, а також м'язової гіпотонії та надмірним мимовільним рухам (гіперкінезам).

Останнє ймовірно зумовлене участю НТПП – хімази, тоніну і калікреїну rK9, що на тлі відсутності змін інгібіторного потенціалу у результаті ІГ і через 24 год може мати важливе значення.

ВИСНОВКИ

- Імерсійна гіпотермія, тобто плавання у холодній воді, призводить до зростання активності **нетрипсиноподібних протеїназ у сироватці крові та мозочку**, її зниження у **гіпоталамусі**, а через 24 год – до **підвищення надалі 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).
- Активність α -2-макроглобуліна внаслідок імерсійної гіпотермії підвищувалася **у гіпоталамусі, серці, корі мозку та максимально у стовбурі мозку, а через 24 год – більш суттєво**, беручи на себе функцію регулювання активності нетрипсиноподібних протеїназ, але відсутні зміни у мозочку, де його вихідний рівень є найбільшим.
- Аналіз протеолітичних коефіцієнтів дозволив виявити **істотні зміни** через 24 год, які вказують на виведення нетрипсиноподібних протеїназ із організму, що може сприяти врівноваженню процесів вазоконстрикції/вазодилатації, які відбуваються за участю хімази, тоніну і калікреїну гК9, але вказує на необхідність довгострокових спостережень.