

УДК 612.82:615.832.9:612.015.13:577.151.042

В.В. Ломако<sup>1\*</sup>, Л.М. Самохіна<sup>2</sup>

## Стан системи протеїназа- $\alpha$ -2-макроглобулін за умов імерсійної та краніоцеребральної гіпотермії

UDC 612.82:615.832.9:612.015.13:577.151.042

V.V. Lomako<sup>1\*</sup>, L.M. Samokhina<sup>2</sup>

## Proteinase- $\alpha$ -2-Macroglobulin Balance Under Immersion and Craniocerebral Hypothermia

**Ключові слова:** імерсійна гіпотермія, краніоцеребральна гіпотермія, протеїнази,  $\alpha$ -2-макроглобулін, щури.

**Key words:** immersion hypothermia, craniocerebral hypothermia, proteinases,  $\alpha$ -2-macroglobulin, rats.

Холодна вода, низька температура, як і інші фактори навколишнього середовища, залежно від тривалості можуть надавати позитивного, так і негативного впливу на теплокровний організм. Занурення в холодну воду — це надзвичайно великий стрес для організму, оскільки існує ризик швидкої загибелі через холодовий шок або розвиток імерсійної гіпотермії (ІГ). Незважаючи на існування достатньої доказової бази для обґрунтування переваг чи недоліків плавання у холодній воді або використання методів керованої гіпотермії [3–7], дослідження даної проблеми мають продовжуватися, особливо у напрямку розшифровки тонких механізмів, задіяних у реалізації відповідних реакцій організму. Відомо, що протеїнази, активність яких регулюється специфічними і неспецифічними інгібіторами, зокрема  $\alpha$ -2-макроглобуліном ( $\alpha$ -2-МГ), беруть участь у реалізації багатьох клітинних процесів в організмі. Протеоліз контролює рівень основних біорегуляторів, активність яких обумовлює ключові процеси метаболізму. Один з найбільш багатофункціональних протеїнів —  $\alpha$ -2-МГ — синтезується практично всіма клітинами, швидко вступає в реакцію комплексоутворення з протеїназами і сприяє виведенню активних протеїназ із крові через печінку та нирки [8]. Розрахунок протеолітичних коефіцієнтів (ПК) дозволяє оцінити функціональну рівновагу

Cold water, low temperature, as well as other environmental factors may either positively or negatively affect homoiotherms, depending on the duration. Cold-water immersion may be extremely stressful for the body due to a risk of rapid death caused by cold shock or immersion hypothermia (IH) development. Despite a sufficient evidence to justify the advantages or disadvantages of cold-water swimming or controlled hypothermia [2, 5–7], further studies are needed to elucidate the subtle mechanisms involved in body response implementation. The proteinases, the activity of which is regulated by specific and non-specific inhibitors, in particular  $\alpha$ -2-macroglobulin ( $\alpha$ -2-MG), are known as participating in many cellular processes in the body. The proteolysis controls the level of main bioregulators, whose activity determines the key metabolic processes. One of the most multifunctional proteins:  $\alpha$ -2-MG is synthesized by almost all the cells, being able to rapidly enter into a reaction of complex formation with proteinases and promote the active proteinase removal of blood through liver and kidneys [8]. Calculation of proteolytic coefficients (PCs) allows the assessment of a proteinase/proteinase inhibitor functional balance. Therefore, we herein aimed to comparatively explore the proteinase/ $\alpha$ -2-macroglobulin balance in rat tissues under immersion and craniocerebral hypothermia.

<sup>1</sup> Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

<sup>2</sup> ДУ «Національний інститут терапії імені Л.Т. Малої НАМН України», Харків, Україна

**\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:**

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;  
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52  
електронна пошта: victoria0regia@gmail.com

Надійшла 23.07.2022

Прийнята до друку 27.02.2023

<sup>1</sup> Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

<sup>2</sup> GI 'L.T. Mala National Institute of Therapy of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine', Kharkiv, Ukraine

**\*To whom correspondence should be addressed:**

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952  
e-mail: victoria0regia@gmail.com

Received 23, July, 2022

Accepted 27, February, 2023

у системі протеїназа–інгібітор протеїназ. Тому метою роботи було порівняльне дослідження балансу в системі протеїназа– $\alpha$ -2-макроглобулін у тканинах щурів за умов імерсійної та краніоцеребральної гіпотермії.

Експерименти схвалені комітетом з біоетики Інституту та узгоджені з основними положеннями Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№3447-IV від 21.02.2006) та «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Роботу проводили на 6–7-місячних самцях білих безпородних щурів.

Здійснювали ІГ у тесті «вимушене плавання» протягом 5 хв у холодній воді за температури 0°C [4], за цих умов температура тіла (Тт) знижувалася до (27,5 ± 0,5)°C. Керовану краніоцеребральну гіпотермію (КЦГ) проводили наркотизованим шурам (суміш тіопенталу натрію та оксибутирату натрію із розрахунку 30 і 100 мг/кг маси відповідно) на установці для програмного охолодження [1] протягом (60 ± 10) хв до досягнення Тт 32°C (помірний режим гіпотермії). Вимірювали Тт ректально за допомогою тарованої мідь-константанової термопари та електронного вольтметра В7-21 («Радіоприлад», Україна) з перерахунком мікрвольтів у градуси Цельсія.

Щурів розділили на групи ( $n = 5$  у кожній): контроль (інтактні тварини), контроль на дію наркозу, одразу після досягнення стану гіпотермії (ІГ і КЦГ) та через 24 години. Тварин виводили з експерименту шляхом декапітації. У сироватці крові (СК) та без'ядерних фракціях 10%-х гомогенатів тканин кори мозку (КМ), гіпоталамуса, мозочку, стовбура мозку (СМ), легень, серця, печінки та нирок визначали загальну активність протеїназ (ЗАП), активність нетрипсиноподібних протеїназ (НТПП) (хімаза, калікреїн III або простатспецифічний антиген, частково тонін і калікреїн rK9) та їх інгібітора  $\alpha$ -2-МГ високочутливими ( $10^{-9}$ – $10^{-10}$  г) ензиматичними методами [2]. Останні ґрунтуються на розщепленні комплексу маркерного ензиму (пероксидази хрону) та протеїнового субстрату, іммобілізованого на поверхні полістиролу. Далі розраховували ПК — відношення ЗАП/ $\alpha$ -2-МГ і НТПП/ $\alpha$ -2-МГ.

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

Гіпотермія, яка розвивається внаслідок занурення у холодну воду, тобто ІГ, є одним із найне-

The experiments were approved by the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine and agreed with the main provisions of the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals against Cruelty' (No. 3447-IV of February 21, 2006) and the 'European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes' (Strasbourg, 1986). The research was carried out in 6–7-month-old white outbred male rats.

The IH was conducted in the forced swim test for 5 min in cold water at 0°C [1], under these conditions the body temperature (Tb) decreased down to (27.5 ± 0.5)°C. Controlled craniocerebral hypothermia (CCH) was performed in anaesthetized rats (sodium thiopental and sodium oxybutyrate mixture, assumed as 30 and 100 mg/kg of body weight, respectively) using the device for programmable cooling [3] for (60 ± 10) min until reaching Tb of 32°C (moderate hypothermia). The Tb was measured rectally with calibrated copper-constantan thermocouple and B7-21 electronic voltmeter (Radioprylad, Ukraine) by converting microvolts to degrees Celsius.

The rats were divided into groups ( $n = 5$  each): control (intact animals), control for anaesthesia effect, immediately after reaching hypothermic state (IH and CCH) and after 24 hrs. Animals were sacrificed by decapitation. The total proteinase activity (TPA), activity of non-trypsin-like proteinases (NTLP) (chymase, kallikrein III or prostate-specific antigen, partly tonin and kallikrein rK9) and their inhibitor  $\alpha$ -2-MG were assessed in blood serum (BS) and denucleated fractions of 10% tissue homogenates of brain cortex (BC), hypothalamus, cerebellum, brainstem, lungs, heart, liver and kidneys, using highly sensitive ( $10^{-9}$ – $10^{-10}$  g) enzymatic methods [4]. The latter is based on splitting the marker enzyme (horseradish peroxidase) complex and protein substrate, immobilized on polystyrene surface. Next, the PCs, ratio of TPA/ $\alpha$ -2-MG and NTLP/ $\alpha$ -2-MG, were calculated.

Results were statistically processed with the non-parametric Kruskal-Wallis test using the Statistica 6.0 software (MatStat Inc., USA).

The hypothermia, caused by cold-water immersion, *i. e.* IH is one of the most dangerous types of natural hypothermia, since the Tb drops very rapidly due to the high heat capacity of water. Under artificial CCH, the Tb decrease is controlled and proceeds gradually against the blockade of thermoregulatory centres by anaesthesia, and furthermore CCH is referred to therapeutic hypothermia [4, 6].

безпечніших видів природної гіпотермії, оскільки зниження  $T_t$  відбувається дуже швидко, що обумовлюється високою теплоємністю води. За умов штучної КЦГ зниження  $T_t$  кероване, відбувається поступово, на тлі блокади центрів терморегуляції наркозом, до того ж КЦГ відносять до методів терапевтичної гіпотермії [2, 4].

Порівняльний аналіз впливу ІГ і КЦГ на ПК у тканинах щурів показав (таблиця), що ЗАП/ $\alpha$ -2-МГ змінювалося односпрямовано за обох режимів гіпотермії, підвищуючись (у 2–130 разів) у всіх вивчених тканинах (окрім СМ, у якому змін не відзначено). Максимальне підвищення ЗАП/ $\alpha$ -2-МГ при ІГ було у печінці та нирках порівняно з контролем та у КМ, гіпоталамусі, печінці та нирках за умов КЦГ. Через 24 години ПК були ще вище (окрім печінки і легень), також підвищувалися й у СМ після КЦГ, але після ІГ знижувалися, залишаючись збільшеними відносно контролю у КМ, гіпоталамусі, серці, печінці та нирках і зменшеними у СМ і легенях, у СК і мозочку — відповідали контрольним значенням.

Динаміка НТПП/ $\alpha$ -2-МГ мала різну спрямованість: одразу після КЦГ у більшості тканин відзначали збільшення (у 2–6 разів), окрім СМ і серця, в яких змін не було, та зниження у СК. За умов ІГ відношення НТПП/ $\alpha$ -2-МГ підвищувалося тільки у СК, печінці та нирках на тлі зменшення у решті тканин (у мозочку і легенях змін не виявлено). Через 24 години після КЦГ відношення НТПП/ $\alpha$ -2-МГ було збільшене у СМ (у 4 рази), СК, мозочку і нирках порівняно з контролем; зменшене у КМ і печінці; у гіпоталамусі, серці і легенях залишалось на рівні контролю, а через 24 години після ІГ знижувалося практично до нульових значень у всіх вивчених тканинах.

Наркоз, на тлі якого проводили сеанси КЦГ [2], призводив також до підвищення ЗАП/ $\alpha$ -2-МГ у всіх вивчених зразках (менш ніж при КЦГ, окрім СМ, легень і нирок), збільшення НТПП/ $\alpha$ -2-МГ тільки у СК і мозочку (більш ніж за умов КЦГ) та зниження у печінці (таблиця). Збільшення ПК указує на інтенсифікацію процесів лімітованого протеолізу у відзначених тканинах, що відображає зсув рівноваги в системі протеїназа- $\alpha$ -2-МГ і свідчить про можливість прискорення процесів утворення активних форм ензимів і гормонів. Через 24 години після КЦГ ефект активації не тільки зберігається, але і підсилюється (особливо в системі ЗАП- $\alpha$ -2-МГ) на відміну від ІГ, за якої значення ПК знижуються, причому у разі НТПП/ $\alpha$ -2-МГ наближаються до нуля у всіх тканинах, що може свідчити про виведення НТПП з організму. Відсутність змін ПК у частини тка-

A comparative analysis of IH and CCH impacts on PCs in rat tissues showed (Table) a unidirectional change in TPA/ $\alpha$ -2-MG under both hypothermic regimens, by increasing (2–130 times) in all the studied tissues (except brainstem, where no changes were found). The maximum increase in TPA/ $\alpha$ -2-MG under IH was seen in the liver and kidneys vs. the control, and in BC, hypothalamus, liver and kidneys under CCH. After 24 hrs, the PCs were even higher (excepting liver and lungs), they were also elevated in brainstem after CCH, but reduced after IH, remaining augmented relative to the control in BC, hypothalamus, heart, liver and kidneys and decreased in brainstem and lungs, and in BS and cerebellum they corresponded to the control values.

The dynamics of NTLTP/ $\alpha$ -2-MG had a different orientation, *i. e.* immediately after CCH, it was increased (by 2–6 times) in most tissues, excepting brainstem and heart, where no changes were found, and decreased in BS. Under IH, the NTLTP/ $\alpha$ -2-MG ratio augmented only in BS, liver, and kidneys together with a reduction in other tissues (in cerebellum and lungs no changes were seen). In 24 hrs after CCH, the NTLTP/ $\alpha$ -2-MG ratio was increased in brainstem (by 4 times), BS, cerebellum and kidneys vs. the control; decreased in BC and liver; remained at the control level in hypothalamus, heart and lungs, but in 24 hrs after IH it diminished to almost zero values in all the studied tissues.

The anaesthesia, against which the CCH sessions were performed [4], also augmented the TPA/ $\alpha$ -2-MG in all the studied samples (less than at CCH, excepting brainstem, lungs and kidneys), elevated the NTLTP/ $\alpha$ -2-MG in BS and cerebellum only (more than at CCH) and reduced it in the liver (Table). The increased PCs indicated the intensification of limited proteolysis in the mentioned tissues, thus reflecting a shift in the proteinase/ $\alpha$ -2-MG balance and testifying to the possibility of accelerating the formation of enzyme and hormone active forms. In 24 hrs after CCH, the activation effect was not only preserved, but even intensified (especially in TPA/ $\alpha$ -2-MG balance) in contrast to IH, where the PCs decreased, moreover in case of NTLTP/ $\alpha$ -2-MG they approached zero in all the tissues, likely testifying to the NTLTP removal from the body. The absence of changes in PCs in some tissues, particularly in brainstem, may be due to a high local level of inhibitory potential.

Thus, under CCH in the proteinase- $\alpha$ -2-MG and NTLTP- $\alpha$ -2-MG systems, there was a powerful activation of proteolytic processes, which persisted even after 24 hrs; the immersion hypothermia



Протеолітичні коефіцієнти за умов імерсійної та краніоцеребральної гіпотермії у тканинах щурів ( $M \pm SE$ )  
 Proteolytic coefficients under immersion and craniocerebral hypothermias in rat tissues ( $M \pm SE$ )

Зразок тканини Tissue sample	Експериментальні групи Experimental groups					
	Контроль Control	Контроль на дію наркозу Control to anaesthesia effect	КЦГ CCH	24 години після КЦГ 24 hrs after CCH	ІГ IH	24 години після ІГ 24 hrs after IH
Протеолітичні коефіцієнти Proteolytic coefficients						
ЗАП/ $\alpha$ -2-МГ ТРА/ $\alpha$ -2-MG						
Сироватка крові Blood serum	0,068 $\pm$ 0,015	0,216 $\pm$ 0,077*	0,246 $\pm$ 0,077*	2,499 $\pm$ 0,899*	0,876 $\pm$ 0,213*	0,053 $\pm$ 0,008
Кора мозку Brain cortex	0,014 $\pm$ 0,002	0,949 $\pm$ 0,292*	1,201 $\pm$ 0,542*	1,585 $\pm$ 0,445*	0,261 $\pm$ 0,054	0,073 $\pm$ 0,013*
Гіпоталамус Hypothalamus	0,009 $\pm$ 0,004	0,481 $\pm$ 0,175*	0,619 $\pm$ 0,288*	1,053 $\pm$ 0,343*	0,353 $\pm$ 0,046*	0,123 $\pm$ 0,039*
Мозочок Cerebellum	0,098 $\pm$ 0,035	0,442 $\pm$ 0,240*	0,206 $\pm$ 0,023*	1,028 $\pm$ 0,415*	0,333 $\pm$ 0,099*	0,114 $\pm$ 0,034
Стовбур мозку Brainstem	0,477 $\pm$ 0,044	0,514 $\pm$ 0,225	0,861 $\pm$ 0,396	2,087 $\pm$ 0,677*	0,518 $\pm$ 0,101	0,086 $\pm$ 0,029*
Серце Heart	0,025 $\pm$ 0,010	0,450 $\pm$ 0,087*	0,555 $\pm$ 0,216*	1,209 $\pm$ 0,403*	0,439 $\pm$ 0,089*	0,166 $\pm$ 0,096*
Легені Lungs	0,132 $\pm$ 0,052	0,218 $\pm$ 0,039	0,992 $\pm$ 0,271*	0,457 $\pm$ 0,079*	0,490 $\pm$ 0,117*	0,056 $\pm$ 0,018*
Печінка Liver	0,012 $\pm$ 0,004	0,360 $\pm$ 0,147*	0,604 $\pm$ 0,168*	0,641 $\pm$ 0,204*	0,765 $\pm$ 0,129*	0,135 $\pm$ 0,047*
Нирки Kidneys	0,005 $\pm$ 0,001	0,455 $\pm$ 0,122*	0,457 $\pm$ 0,117*	1,135 $\pm$ 0,456*	1,321 $\pm$ 0,488*	0,156 $\pm$ 0,031*
НТПП/ $\alpha$ -2-МГ NTLP/ $\alpha$ -2-MG						
Сироватка крові Blood serum	0,169 $\pm$ 0,020	1,185 $\pm$ 0,222*	0,079 $\pm$ 0,026*	0,350 $\pm$ 0,061*	0,571 $\pm$ 0,282*	0,004 $\pm$ 0,001*
Кора мозку Brain cortex	0,316 $\pm$ 0,089	0,311 $\pm$ 0,042	1,996 $\pm$ 0,783*	0,201 $\pm$ 0,029*	0,071 $\pm$ 0,018*	0,004 $\pm$ 0,001*
Гіпоталамус Hypothalamus	0,391 $\pm$ 0,035	0,411 $\pm$ 0,183	0,917 $\pm$ 0,430*	0,367 $\pm$ 0,091	0,135 $\pm$ 0,036*	0,003 $\pm$ 0,001*
Мозочок Cerebellum	0,081 $\pm$ 0,006	1,154 $\pm$ 0,002*	0,460 $\pm$ 0,078*	0,614 $\pm$ 0,207*	0,072 $\pm$ 0,025	0,004 $\pm$ 0,001*
Стовбур мозку Brainstem	0,578 $\pm$ 0,149	0,485 $\pm$ 0,143	0,698 $\pm$ 0,212	2,186 $\pm$ 0,649*	0,181 $\pm$ 0,056*	0,004 $\pm$ 0,001*
Серце Heart	0,435 $\pm$ 0,142	0,709 $\pm$ 0,145	0,732 $\pm$ 0,156	0,671 $\pm$ 0,287	0,152 $\pm$ 0,049*	0,004 $\pm$ 0,001*
Легені Lungs	0,482 $\pm$ 0,138	0,592 $\pm$ 0,075	1,131 $\pm$ 0,231*	0,624 $\pm$ 0,252	0,212 $\pm$ 0,073	0,003 $\pm$ 0,001*
Печінка Liver	0,391 $\pm$ 0,087	0,219 $\pm$ 0,049*	0,909 $\pm$ 0,182*	0,130 $\pm$ 0,011*	0,847 $\pm$ 0,327*	0,004 $\pm$ 0,001*
Нирки Lungs	0,139 $\pm$ 0,048	0,170 $\pm$ 0,062	0,641 $\pm$ 0,181*	0,663 $\pm$ 0,189*	1,120 $\pm$ 0,397*	0,005 $\pm$ 0,002*

**Примітка:** \* — відмінності значущі порівняно з контролем,  $p < 0,05$ .

**Note:** \* – differences are significant as compared with the control group,  $p < 0.05$ .



нин, зокрема СМ, може обумовлюватися високим локальним рівнем інгібіторного потенціалу.

Таким чином, за умов КЦГ у системах протеїназа- $\alpha$ -2-МГ і НТПП- $\alpha$ -2-МГ відбувається потужна активація протеолітичних процесів, яка зберігається і через 24 години; імерсійна гіпотермія (особливо через 24 години) приводить до виведення НТПП з організму, що сприяє врівноваженню вазоконстрикторних процесів за участю хімази, тоніну і калікреїну rK9.

### Література

1. Королев ВВ, Бабийчук ГА, Бегунов ВГ, Микляев ИЮ, Устименко ВВ, изобретатели; ИПКиК НАН УССР, патенто-обладатель. Аппарат для охлаждения и согревания головного мозга. А.с. СССР № 904695. 15.02.1982.
2. Ломако ВВ, Шило АВ, Бабийчук ГА, Самохина ЛМ. Краниocereбральная гипотермия стимулирует реакции ограниченного протеолиза в тканях крыс. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2016; 26(3): 238–48.
3. Abel EL. Physiological correlates of the forced swim test in rats. *Physiol Behav.* 1993; 54(2): 309–17.
4. Ihsan M, Abbiss CR, Allan R. Adaptations to post-exercise cold water immersion: friend, foe, or futile? *Front Sports Act Living.* 2021; 3: 714148.
5. Lundbye J, Badjatia N, Polderman KH, Lyden P. Current advances in the use of therapeutic hypothermia. *Ther Hypothermia Temp Manag.* 2020; 10(1): 2–5.
6. Tipton MJ, Collier N, Massey H, et al. Cold water immersion: kill or cure? *Exp Physiol.* 2017; 102(11): 1335–55.
7. Turk EE. Hypothermia. *Forensic Sci Med Pathol.* 2010; 6(2): 106–15.
8. Vandooren J, Itoh Y. Alpha-2-Macroglobulin in Inflammation, Immunity and Infections. *Front Immunol.* 2021 Dec 14 [cited 30 June 2022]; 12: 803244. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.803244/full>.

(especially after 24 hrs) resulted in NTLP removal from the body, which promoted the balancing of vasoconstrictor processes involving chymase, tonin and kallikrein rK9.

### References

1. Abel EL. Physiological correlates of the forced swim test in rats. *Physiol Behav.* 1993; 54(2): 309–17.
2. Ihsan M, Abbiss CR, Allan R. Adaptations to post-exercise cold water immersion: friend, foe, or futile? *Front Sports Act Living.* 2021; 3: 714148
3. Korolev VV, Babiychuk GA, Begynov VG, Miklyaev IYu, Ustimenko VV. inventors; Institute for problems of cryobiology and cryomedicine of NAS of Ukraine, assignee. [Apparatus for cooling and warming of the brain]. USSR C.A. (certificate of authorship) № 904695. 15.02.1982. Russian.
4. Lomako VV, Shilo AV, Babiychuk GA, Samokhina LM. Craniocerebral hypothermia stimulates reactions of limited proteolysis in rat tissues. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2016; 26(3): 238–48.
5. Lundbye J, Badjatia N, Polderman KH, Lyden P. Current advances in the use of therapeutic hypothermia. *Ther Hypothermia Temp Manag.* 2020; 10(1): 2–5.
6. Tipton MJ, Collier N, Massey H, et al. Cold water immersion: kill or cure? *Exp Physiol.* 2017; 102(11): 1335–55.
7. Turk EE. Hypothermia. *Forensic Sci Med Pathol.* 2010; 6(2): 106–15.
8. Vandooren J, Itoh Y. Alpha-2-macroglobulin in inflammation, immunity and infections. *Front Immunol.* 2021 Dec 14 [cited 30 June 2022]; 12: 803244. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.803244/full>.

