

Вплив природного і різних видів штучного гіпометаболізму на активність системи протеїназа – інгібітор протеїназ у хом'яків і щурів

UDC 591.543.42:577.15.042.2

V.V. LOMAKO^{1*}, L.M. SAMOKHINA², O.V. SHYLO¹

Effect of Natural and Various Artificial Hypometabolism on Activity of Protease – Protease Inhibitor System in Hamsters and Rats

Вивчали особливості впливу природного у хом'яків і різних видів штучного (гіпоксично-гіперкапічного і аміназинового) гіпометаболізму (ГМ) у щурів на активність системи протеїназа – інгібітор протеїназ. У сироватці крові та без'ядерних фракціях 10%-х гомогенатів тканин кори мозку, легень, серця, печінки та нирок визначали загальну активність протеїназ (ЗАП), нетрипсиноподібних протеїназ (НТПП) та їх інгібіторів (α -1-інгібітору протеїназ (α -1-ІП) і α -2-макроглобуліну (α -2-МГ)) високочутливими (10^{-9} – 10^{-10} г) ферментативними методами. Впливи різних видів штучного і природного ГМ викликають схожі зміни: на фоні незмінної активності α -1-ІП підвищується ЗАП. На відміну від природного, при вивчених видах штучного ГМ знижується активність α -2-МГ (при природному не змінюється). Виявлено найбільш різноспрямовані розбіжності в динаміці активності НТПП: якщо при природному ГМ не змінюється (окрім нирок), то при гіпоксично-гіперкапічному ГМ – знижується, а при аміназиновому, навпаки, зростає (крім печінки, легень та кори мозку). Отримані дані укладаються в концепцію, що розвиток гіпометаболізму, зокрема природного, полягає в перебудові певних молекулярних механізмів, ніж у наявності спеціалізованих генів, тобто відбувається перепрограмування існуючих біохімічних процесів (наприклад, активності системи протеїназа – інгібітор протеїназ).

Ключові слова: гіпометаболізм, активність протеїназ, хом'яки, щури.

Изучали особенности влияния естественного у хомяков и различных видов искусственного (гипоксическо-гиперкапнического и аминазинового) гипометаболизма (ГМ) у крыс на активность системы протеиназа – ингибитор протеиназ. В сыворотке крови и безъядерных фракциях 10%-х гомогенатов тканей коры мозга, легких, сердца, печени и почек определяли общую активность протеиназ (ОАП), нетрипсиноподобных протеиназ (НТПП) и их ингибиторов (α -1-ингибитора протеиназ (α -1-ИП) и α -2-макроглобулина (α -2-МГ)) высокочувствительными (10^{-9} – 10^{-10} г) ферментативными методами. Естественный и различные виды искусственного ГМ вызывают сходные изменения: на фоне неизменной активности α -1-ИП повышается ОАП. В отличие от естественного, при изученных видах искусственного ГМ происходит снижение активности α -2-МГ (при естественном не изменяется). Выявлены наиболее разнонаправленные изменения в динамике активности НТПП: при естественном ГМ не изменяется (кроме почек), при гипоксическо-гиперкапническом ГМ – снижается, а при аминазиновом, наоборот, растет (кроме печени, легких и коры мозга). Полученные данные укладываются в концепцию о том, что развитие гипометаболизма, в частности естественного, обуславливается перестройкой определенных молекулярных механизмов, а не наличием специализированных генов, т. е. происходит перепрограммирование существующих биохимических процессов (например, активности системы протеиназа – ингибитор протеиназ).

Ключевые слова: гипометаболизм, активность протеиназ, хомяки, крысы.

There were studied the peculiarities of the effect of natural in hamsters and different types of artificial (hypoxic-hypercapnic and aminasin induced) hypometabolism (HM) in rats on activity of protease – protease inhibitor system. In blood serum and nuclear-free fractions of 10% homogenates of the tissues of brain cortex, lungs, heart, liver and kidneys there was measured protease total activity (PTA), non-trypsin-like proteases (NTPP) and their inhibitors (α -1-protease inhibitor (α -1-PI)) and α -2-macroglobulin (α -2-MG) using highly sensitive (10^{-9} – 10^{-10} g) enzyme methods. Effects of various types of artificial and natural HM cause similar changes: the PTA increases on the background of unchanged activity of α -1-PI. In contrast to natural HM during artificial one the activity of α -2-MG increase (during natural HM it does not change). The most versatile differences in the dynamics of NTPP activity have been revealed: during natural HM it does not change (except kidneys), at hypoxic-hypercapnic HM it reduces and during aminasin induced one it *vice versa* rises (except liver, lungs and brain cortex). The findings are in the accordance with the concept that hypometabolism development, in particular natural one, is rather stipulated with the re-arrangements of certain molecular mechanisms, but not with the presence of specialized genes, *i. e.* re-programming of existing biochemical processes (for example, activity of protease – protease inhibitor system) takes place.

Key words: hypometabolism, activity of proteases, hamsters, rats.

¹Інститут проблем криобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

²Інститут терапії ім. Л.Т. Малої НАМН України, м. Харків

* Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію: вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015; тел.: (+38 057) 372-74-35, факс: (+38 057) 373-30-84, електронна пошта: victorial2003@list.ru

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²L.T. Malaya Institute of Therapy of the Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 372 7435, fax: +380 57 373 3084, e-mail: victorial2003@list.ru

Гіпометаболізм (ГМ) – особливий функціональний стан зниженої життєздатності організму із стабілізованим теплообмінним гомеостазом. При ГМ багатократно знижуються кисневі та енергетичні потреби організму, зменшується навантаження на органи, при цьому затримується і розвиток захворювання, завдяки чому у медиків з'являється необхідний резерв часу як для первинної допомоги, так і радикального втручання. Тому вивчення природного і розробка способів досягнення штучного ГМ – актуальні напрямки фундаментальної біології та медицини.

Відомо, що ссавці здатні впадати в різні за глибиною і тривалістю гіпометаболічні стани: від поверхневого циркадного ГМ у гомойотермних тварин (сон), коли температура тіла (ТТ) знижується на 0,5–2,0°C, а метаболізм – на 20%, до глибокого тривалого ГМ і гіпотермії у представників 3-х підкласів гетеротермних ссавців, коли ТТ знижується до 4°C, а обмін речовин – до 2–3% від норми (зимовий сон, денний торпор, естивація і гібернація) [5, 14, 16, 19, 20, 22, 23, 28]. Природний ГМ – генетично детермінована здатність зворотно знижувати рівень обміну речовин і ТТ, яка набута в ході еволюції для переживання екстремальних умов (холод, спека, посуха, відсутність їжі). При гібернації, як найбільш вираженому ГМ, тварини стійкі до фатальних доз отруйних речовин та іонізуючого опромінення; інфекційні захворювання не розвиваються навіть при штучному зараженні [5, 12].

Таке широке розповсюдження ГМ в природі дало підставу групі дослідників для припущення, що гени, які залучені до розвитку подібних станів, – загальні для всіх ссавців [31]. Це робить перспективною можливість індукувати ГМ у гомойотермних ссавців (насамперед, у людини), яким така здатність не притаманна.

Гомойотермний організм занурити в ГМ складно і можливо лише на обмежений час. У тварин-негібернаторів ГМ моделюють за допомогою впливу сірководню [15], комбінації гіпоксичних і гіперкапічних газових середовищ, зниження ТТ, голоду [3, 7, 10, 12], а також шляхом введення фармакологічних речовин. Серед останніх – аміназин, який входить до складу літичних сумішей, що застосовуються для досягнення штучного ГМ (ШГМ) [10, 11]. Він належить до класу транквілізаторів і впливає на діяльність нервової системи (має антипсихотичний і виразний седативний ефект з одночасним зменшенням рухової активності і тону скелетних м'язів; пригнічує центр терморегуляції, внаслідок чого знижується ТТ), пригнічує активність серцево-судинної системи (знижується артеріальний тиск, головним чином за рахунок пригнічення гіпоталамічних центрів, компенсаторних судинно-звужуючих рефлексів, сили серцевих скорочень, альфа-адрено-

Hypometabolism (HM) is a special functional state of a reduced viability of an organism with stabilized heat exchange homeostasis. During HM the oxidative and energetic needs of an organism decrease many times, the loadings to the organs are reduced, herewith the disease development impedes as well, due to this health professionals receive the necessary time reserve for first aid and medical intervention. Therefore the study of natural HM and development of the methods to reach artificial HM are actual trends of fundamental biology and medicine.

It is known that mammals are able of falling into hypometabolic states differing on depth and duration: from shallow circadian HM in homoiothermal animals (sleep) when body temperature (BT) reduces by 0.5–2°C and metabolism by 20%, to deep long HM and hypothermia in representatives of 3 subclasses of heterothermal mammals, when BT decreases down to 4°C, and metabolism down to 2–3% of the norm (winter sleep, daily torpor, aestivation and hibernation) [5, 14, 16, 19, 20, 22, 23, 28]. Natural HM is a genetically determined ability of reversible decrease of metabolism rate and BT, acquired during evolution to survive extreme conditions (cold, heat, drought, food absence). During hibernation as the most manifested HM the animals are resistant to fatal doses of poisoning substances and ionizing radiation, infection diseases do not develop even during artificial contamination [5, 12].

Such a frequent occurrence of HM in nature allowed the group of researchers to speculate that the genes involved into the development of such states are common for all the mammals [31]. This makes possible the inducing of HM in homoiothermal mammals (first of all, humans) for those this ability is not inherent.

It is difficult to induce HM in homoiothermal organism and this is possible only for a limited time period. In non-hibernating animals HM is induced by the effect of hydrogen sulphide [15], combination of hypoxic and hypercapnic gas composition, reduction of BT, hunger [3, 7, 10, 12] as well as by means of administration of pharmacological substances. Among the latter is aminasin, as a component of lytic mixtures used to induce an artificial HM (AHM) [10, 11]. It belongs to the class of tranquilizers and affects the activity of nervous system (is of anti-psychotic and manifested sedative effect with simultaneous reduction in motor activity and tonus of skeletal muscles; suppresses the thermoregulation center that results in BT reduction), suppresses the activity of cardiovascular system (arterial pressure decreases mainly due to the inhibiting of hypothalamic centers, compensatory vasoexcitatory reflexes, heart force, alpha-adrenoblocking and spasmolytic effect), suppresses the muscle contraction [13, 29]. There is a notion that combination of physical and chemical compounds could induce even high-temperature HM [10, 11].

блокуючої і спазмолітичної дії), пригнічує скоротливість м'язів [13, 29]. Вважають, що за допомогою комбінації фізичних та хімічних сполук можна викликати навіть високотемпературний ГМ [10, 11].

Але незалежно від способів досягнення ГМ в основі ініціації цього стану лежить зниження метаболічної активності – метаболічна депресія, яка досягається за рахунок координованого пригнічення енергетично затратних клітинних функцій, зокрема, підтримки трансмембранного градієнта іонів та синтез білка [32].

Саме синтез протеїнів активно гальмується при розвитку природного ГМ (ПГМ) [32]. При цьому для уникнення неконтрольованого розщеплення білків відповідним чином уповільнюються і процеси розпаду білкових молекул, де особливу роль відіграють протеїнази, які не тільки беруть участь в деградації білків, але й утворюють їх активні форми [18]. Відомо, що протеїнази активно задіяні в регуляції багатьох найважливіших процесів в організмі та забезпечують його швидку фізіологічну відповідь на вплив ендо- і екзогенних факторів [1, 2, 18]. Серінові протеїнази найбільш розповсюджені та виявлені практично у всіх субклітинних фракціях різних типів клітин [1, 2]. Лімітований протеоліз зимогенів та інших білкових субстратів високоспеціалізованими серіновими протеїназами дозволяє досягти швидкої генералізованої відповіді організму, в результаті часткової протеолітичної деградації утворюється ряд гормонів і нейропептидів з різними фізіологічними функціями [2]. Особливого значення набувають нетрипсиноподібні протеїнази (НТПП) (зокрема, хімаза і тонін), які беруть участь в утворенні вазоконстрикторного пептиду АП в тканинах [24]. Важливу роль у регуляції протеолізу відіграють інгібітори протеолітичних ферментів (серпіни), їх участь в контролі реакцій лімітованого протеолізу розглядають як основний механізм функціонування захисних систем організму [1, 18].

Мета роботи – визначити особливості впливу природного і різних видів штучного (гіпоксично-гіперкапічного і аміназинового) гіпометаболізму на активність системи протеїназа – інгібітор протеїназ у тканинах хом'яків і щурів.

Матеріали і методи

Роботу проведено на самцях 6–7-місячних щурів та 6–10-місячних золотавих хом'яків (*Mesocricetus auratus*) масою 200–250 і 85–95 г відповідно у зимовий період згідно з “Загальними принципами експериментів на тваринах”, схваленими III Національним конгресом з біоетики (Київ, 2007) і узгодженими з положеннями “Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей”

However, independently on the ways of reaching HM the basis of this state is the reduced metabolic activity, *i. e.* metabolic depression, achieved due to coordinated suppression of cell energy-loss functions, in particular, maintainance of a transmembrane gradient of ions and protein synthesis [32].

Namely synthesis of proteins is actively inhibited during the development of natural HM (NHM) [32]. Herewith to avoid a non-controlled proteolysis, the decay processes of protein molecules slowed down in a correspondent way, where a special role is played by proteases, which participate in degradation of proteins and generate their active forms as well [18]. It is known that proteases are actively involved into regulation of many the most important processes in an organism and provide its rapid physiological response to the effect of endo- and exogenous factors [1, 2, 18]. Serine proteases are the most wide-spread and revealed almost in all the subcellular fractions of different cell types [1, 2]. Limited proteolysis of zymogenes and other protein substrates with highly specialized serine proteases enables the reaching of rapid generalized response of an organism, and partial proteolytic degradation results in a formation of several hormones and neuropeptides with various physiological functions [2]. Non-trypsin-like proteases (NTLP) (in particular, chymase and tonin), participating in the formation of peptide AII in tissues, are of a special value [24]. An important role in proteolysis regulation is played by inhibitors of proteolytic enzymes (serpins), their participation in the controlling of the reaction of limited proteolysis is considered as main mechanism of an organism protective system function [1, 18].

The research aim was to examine the peculiarities of the effect of natural and various types of artificial (hypoxic-hypercapnic and aminasin induced) hypometabolism on the activity of the protease – protease inhibitor system in the tissues of hamsters and rats.

Materials and methods

The research was carried-out in 6–7-month-old rats and 6–10-month-old golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) of 200–250 and 85–95 g, correspondingly in winter period according to General Principles of Experiments in Animals approved by the 3rd National Congress in Bioethics (Kyiv, 2007) and coordinated with the statements of European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986). The animals were kept in vivarium on the standard diet with adding wheat grains and sun flower seeds.

The following experimental groups were used in the study: hamsters – control and animals in NHM state; rats – control, the animals in hypoxic-hypercapnic and aminasin induced AHM.

(Страсбург, 1986). Тварин утримували в віварії на стандартному раціоні з додаванням зерен пшениці і насіння соняшника.

Представлено такі експериментальні групи: хом'яки – контроль та тварини в стані ПГМ; щури – контроль, тварини в стані гіпоксично-гіперкапічного та аміназинового ШГМ.

Природний ГМ розвивався в умовах перебування в неосвітленій камері при 4–7°C з нормальним складом повітря, де хом'яки гібернували, знаходячись у торпідному стані 3–3,5 доби, періодично пробуджуючись й знову впадаючи у сплячку. Матеріал для досліджень забирали на 2–4-му бауті (епізоді) сплячки.

Гіпоксично-гіперкапічний ШГМ у щурів викликали за методом Анджуса-Бахмет'єва-Джайя [3, 7]: тварин у герметично закритій посудині (3 дм³) поміщали на 3 години у темну холододову камеру (3–5°C).

Аміназиновий ШГМ досягали шляхом внутрішньочеревного введення 2,5%-го аміназину по 0,2 мл 1 раз у 3 доби протягом 2 тижнів. Температуру тіла реєстрували за допомогою мідь-константаної термопари, приєднаної до вольтметра В7-21А (ЗИП, СРСР). Контрольна група представлена інтактними тваринами.

Тварин з експерименту виводили шляхом декапітації. У сироватці крові та без'ядерних фракціях 10%-х гомогенатів тканин кори мозку, легень, серця, печінки та нирок визначали загальну активність протеїназ (ЗАП), НТПП та їх інгібіторів (α -1-інгібітору протеїназ (α -1-ІП) і α -2-макроглобуліну (α -2-МГ)) високочутливими (10^{-9} – 10^{-10} г) ферментативними методами [9], принцип яких полягає у використанні в якості субстрату протеолітичної реакції іммобілізованого на поверхні полістиролу маркерного ферменту (пероксидази хрону), який був наперед кон'югований із субстратом білкової природи. Для визначення активності протеїназ, НТПП, α -1-ІП субстратом був альбумін сироватки бика, α -2-МГ – протамінсульфат. Після проведення реакції утворення комплексу протеїназа –інгібітор протеїназ до реакційної суміші додавали 1:1 за об'ємом соєвий інгібітор трипсину (СІТ) у концентрації 150 мкг/мл та інкубували 5 хв при 37°C для зв'язування вільних протеїназ. Рівень α -2-МГ у досліджених зразках розраховували по залишковій активності пов'язаного з ним трипсину.

Для визначення НТПП окремо проводили реакцію пригнічення таких ферментів, як трипсин, плазмін, сироватковий калікреїн, тонін (має трипсин- і хімотрипсинподібну активність) доданням 1:1 за об'ємом СІТ у концентрації 0,01 мкг/мл та інкубували 5 хв при 37°C. Далі проводили реакцію розщеплення іммобілізованого комплексу маркерного ферменту і альбуміну сироватки бика.

Показники оцінювали за зміною активності маркерного ферменту і виражали в мг/л трипсину, а

Natural HM developed under the conditions of staying in dark chamber at 4–7°C with normal air composition, where the hamsters hibernated being in torpid state during 3–3.5 days with periodic arousal and again entering the hibernation. The research material was collected in 2–4 hibernation bouts (episodes).

Hypoxic-hypercapnic AHM in rats was initiated by Bakhmet'ev-Anjus-Giaja method [3, 7]: the animals in hermetically closed tank (3 dm³) were placed for 3 hrs into dark cold chamber (3–5°C).

Aminasin AHM was achieved by intraperitoneal introduction of 2.5% aminasin by 0.2 ml once in 3 days for 2 weeks. Body temperature was recorded by means of copper-constantan thermocouple, adjusted to В7-21А voltmeter (Russia). Control group represented the intact animals.

The animals were sacrificed by decapitation. In blood serum and nuclear-free fractions of 10% tissue homogenates of brain cortex, lungs, heart, liver and kidneys there was measured a protease total activity (PTA), NTLP and their inhibitors (α -1-protease inhibitor (α -1-PI)) and α -2-macroglobulin (α -2-MG) using highly sensitive (10^{-9} – 10^{-10} g) enzymatic methods [9]. The principle of these methods consists in the use as the substrate of proteolytic reaction of polystyrol-surface-immobilized marker enzyme (horse radish peroxidase), which was pre-conjugated with the substrate of protein origin. To examine the activity of proteases, NTLP and α -1-PI, bovine serum albumin served as a substrate and protamine sulfate was the substrate for α -2-MG. After the reaction of protease – protease inhibitor complex formation the reaction mixture was supplemented 1:1 (v/v) with soybean trypsin inhibitor (STI) in concentration of 150 μ g/ml and incubated for 5 min at 37°C to bind free proteases. The level of α -2-MG in the studied samples was calculated on the residual activity of the bound trypsin.

To examine NTLP the inhibition reaction of such enzymes as trypsin, plasmin, serum kallikrein, tonin (possessing both trypsin and chymotrypsin-like activities) was performed by adding 1:1 (v/v) STI in concentration of 0.01 μ g/ml and incubation for 5 min at 37°C. Later there was performed the reaction on dissociation of immobilized complex of marker enzyme and bovine serum albumin.

The indices were assessed by the change in the activity of marker enzyme and expressed in mg/l of trypsin and then re-calculated in microequivalents (μ Eq) of involved chemical bonds per minute, because the substrate is a polymer and enzyme "attacks" more than one chemical bond (1 μ Eq corresponds to the activity of 1 mg/l trypsin).

In the study there were used horse radish peroxidase, bovine serum albumin, protamine sulfate, trypsin (Spofa, Czech Republic), STI (Reanal, Hungary), polystyrol plates (Linbro, UK), reagents of ukrainian production, as well as universal photometer (StatFax, USA).

потім перераховували в мікроеквівалентах (мкЕкв) задіяних хімічних зв'язків за хвилину тому, що субстратом є біополімер і фермент "атакує" більш ніж один хімічний зв'язок (1 мкЕкв відповідає активності 1 мг/л трипсину).

У дослідженнях використовували пероксидазу хрону, альбумін сироватки бика, протамінсульфат, трипсин ("Sprofa", Чехія), СІТ ("Reanal", Угорщина), реагенти вітчизняного виробництва, а також полістиролові плашки ("Linbro", Великобританія), фотометр загального призначення ("StatFax", США).

Статистичну обробку проводили за методом Стьюдента-Фішера з використанням програмного забезпечення Excel та непараметричної статистики Крускала-Уолліса.

Результати та обговорення

Обидва використані нами способи досягнення ШГМ характеризувалися наступними фізіологічними змінами в організмі експериментальних тварин.

При гіпоксично-гіперкапнічному ШГМ у щурів спостерігалися нерухливість, тактильна і больова нечутливість, істотне зменшення частоти серцевих скорочень (ЧСС) (з 360 до 80 уд/хв) та ТТ (до $16,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$), біоелектрична активність (БЕА) мозку не реєструвалась (дані не наводяться).

У щурів з аміназиновим ШГМ ТТ знижувалась на $3,5 \pm 1,5^\circ\text{C}$, на енцефалограмі реєструвались зміни (дані не наводяться), характерні для стану глибокого природного сну. На поведінковому рівні введення аміназину приводило до значного послаблення рухової активності, потреби в їжі та воді, відсутності грумінгу, тактильної і частково больової реакції та проявів апатії, загальмованості, млявості.

Деякі наведені вище фізіологічні зміни збігаються з такими, що спостерігаються при природному ГМ. Так, у хом'яків при ПГМ відзначали нерухливість, нечутливість до больового і тактильного подразнення, характерну позу (скручувались у "клубочок"), різке зниження ЧСС (з 360 до 7–8 уд/хв), ТТ (з 39 до $8-10^\circ\text{C}$), БЕА мозку не реєструвалась (дані не наводяться).

Щодо змін активності системи протеїназа-інгібітор протеїназ, то при ПГМ відбувається підвищення ЗАП у всіх вивчених зразках, активності НТПП – тільки в нирках, а в інших тканинах – вона не змінювалась (табл. 1). Активність інгібіторів α -1-ІП і α -2-МГ залишалась незмінною у всіх досліджених тканинах (табл. 2).

На занурення у гіпоксично-гіперкапнічний ГМ система протеїназа-інгібітор протеїназ реагує наступним чином: у всіх вивчених зразках тканин підвищується ЗАП, особливо в серці і нирках, а активність НТПП, навпаки, знижується, окрім сироватки крові, де вона не змінюється (табл. 3); активність

Statistical processing was done by Student-Fisher's method using Excel software and one-way analysis Kruskal-Wallis' test.

Results and discussion

Both ways of reaching AHM we used were characterized with following physiological changes in an organism of experimental animals.

During hypoxic-hypercapnic AHM the rats were immobile, tactile and pain non-sensitive, as well as a significant decrease of heart rate (HR) (from 360 to 80 beats/min) and BT (down to $16.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$) was found, bioelectrical activity (BEA) of brain was not recorded (data are not shown).

In rats with aminasin induced AHM the BT reduced by $3.5 \pm 1.5^\circ\text{C}$, the encephalogram had changes (data are not shown), characteristic for the state of a deep natural sleep. At behavioral level the administration of aminasin resulted in a significant weakening of movement activity, need in food and water, absence of grooming, tactile and, partially, pain reaction, as well as manifested apathy, retarding, atonia.

Some above mentioned physiological changes correspond to those observed at natural HM. For example, hamsters during NHM represented immobility, non-sensitivity to pain and tactile irritation, characteristic posture (curling into a ball) a sharp reduction of HR (from 360 down to 7–8 beats/min), and BT from 39 down to $8-10^\circ\text{C}$, BEA of brain was not recorded (data are not shown).

Regarding the changes in the activity of protease – protease inhibitor system, in should be noted that NHM is accompanied with a rise in PTA in all the studied samples, activity of NTLP was elevated only in kidneys, and in other tissues it was not changed (Table 1). The activity of inhibitors of α -1-PI and α -2-MG remained unchanged in all the studied tissues (Table 2).

Entering the hypoxic-hypercapnic HM was responded by the protease – protease inhibitor system as follows: in all the studied tissue samples PTA increased, especially in heart and kidneys, and NTLP activity *vice versa* reduced except blood serum, wherein it does not change (Table 3); the activity of one of main inhibitors of proteolytic enzymes, α -1PI, does not change, meanwhile α -2-MG decreases, except blood serum and lungs (no changes) (Table 4).

In response to the effect of aminasin, TPA rises in all the studied tissue samples of rats, the activity of NTLP also increases (especially in kidneys and blood serum), except brain cortex (see Table 3). There was also revealed a strong reduction in the activity of α -2-MG in all the investigated samples, except blood serum (rise), likely pointing to its removal from tissues (Table 4). The mentioned changes take place on the background of the absence of changes in α -1-PI activity.

Таблиця 1. Активність протеїназ в тканинах хом'яків при природному гіпометаболізмі ($\mu\text{Кв} \times 10^3 / \text{хв}$)
Table 1. Protease activity in hamster tissues during natural hypometabolism ($\mu\text{Eq} \times 10^3 / \text{min}$)

Біологічний зразок Biological sample	Загальна протеолітична активність General proteolytic activity		Активність нетрипсиноподібних протеїназ Non-trypsin-like protease activity	
	Контроль Control	ПГМ NHM	Контроль Control	ПГМ NHM
Сироватка крові Blood serum	0,254 ± 0,092	0,671 ± 0,124*	0,377 ± 0,096	0,224 ± 0,035
Кора мозку Brain cortex	0,214 ± 0,07	0,686 ± 0,279*	0,644 ± 0,137	0,767 ± 0,374
Легені Lungs	0,134 ± 0,035	0,706 ± 0,242*	0,599 ± 0,119	0,754 ± 0,305
Серце Heart	0,334 ± 0,135	0,52 ± 0,18	0,667 ± 0,172	0,768 ± 0,396
Печінка Liver	0,643 ± 0,331	0,713 ± 0,165	0,594 ± 0,089	1,37 ± 1,067
Нирки Kidney	0,367 ± 0,129	0,736 ± 0,234	0,393 ± 0,071	0,83 ± 0,293*

Примітка: * – відмінності достовірні в порівнянні з контрольною групою ($p < 0,05$).

Note: * – the differences are statistically significant as compared to the control group ($p < 0.05$).

одного з основних інгібіторів протеолітичних ферментів α -1-ІІІ не змінюється, тоді як α -2-МГ – знижується, окрім сироватки крові та легенів (не змінюється) (табл. 4).

У відповідь на дію аміназину підвищується ЗАП у всіх досліджених зразках тканин щурів, активність НТПП також зростає (особливо в нирках та сироватці крові), окрім кори мозку (див. табл. 3). Виявлено також істотне зниження активності α -2-МГ в усіх досліджених зразках, окрім сироватки крові (підвищення), що може вказувати на його видалення з тканин (табл. 4). Відзначені процеси відбуваються на фоні відсутності змін активності α -1-ІІІ.

Аналіз результатів показав, що вплив як штучного, так і природного ГМ викликає підвищення ЗАП на тлі незмінної активності α -1-ІІІ. На відміну від ПГМ спостерігається зниження активності α -2-МГ (при ПГМ не змінюється). Крім того, виявляються найбільші розбіжності в динаміці активності НТПП: якщо при ПГМ вона не змінюється (окрім нирок), то при гіпоксично-гіперкапічному ШГМ знижується, а при аміназиновому ШГМ, навпаки, зростає (крім печінки, легенів та кори мозку).

The analysis of the results has shown that the effect of both artificial and natural HM causes the rise in PTA on the background of unchanged activity of α -1-PI. In contrast to NHM there was observed the decrease in the activity of α -2-MG (no changes during NHM). In addition, there are found the biggest differences in the dynamics of NTLP activity: during NHM it does not change excluding kidneys, but during hypoxic-hypercapnic AHM it reduces and during aminasin induced AHM *vice versa* rises (except liver, lungs and brain cortex).

During AHM the activity of NTLP changes maximally, likely pointing to either special role of these proteases in the development of hypometabolic states or specific sensitivity to the applied effects.

These changes may be caused by different levels of BT reduction during the studied hypometabolic states, and during hypoxic-hypercapnic AHM this may be various proportions of O_2 and CO_2 in gas composition, rising respiratory acidosis, under which proteolytic activity rises [8]. It has been established recently [7] that hypercapnia stipulates the changes in pH, level of PCO_2 and HCO_3^- in tissues and namely this phenomenon has

Таблиця 2. Активність інгібіторів протеїназ в тканинах хом'яків при природному гіпометаболізмі ($\mu\text{Кв} \times 10^3 / \text{хв}$)

Table 2. Activity of protease inhibitors in hamster tissues during natural hypometabolism ($\mu\text{Eq} \times 10^3 / \text{min}$)

Біологічний зразок Biological sample	Загальна протеолітична активність General proteolytic activity		Активність нетрипсиноподібних протеїназ Non-trypsin-like protease activity	
	Контроль Control	ПГМ NHM	Контроль Control	ПГМ NHM
Сироватка крові Blood serum	2,727 ± 1,575	2,189 ± 1,925	533,01 ± 0,2	515,76 ± 31,94
Кора мозку Brain cortex	3,509 ± 1,912	2,529 ± 1,18	524,31 ± 4,69	519,51 ± 14,19
Легені Lungs	2,84 ± 0,998	3,021 ± 2,09	532,57 ± 0,45	532,65 ± 0,33
Серце Heart	5,758 ± 3,31	3,613 ± 1,79	532,08 ± 0,95	532,08 ± 0,95
Печінка Liver	7,459 ± 3,478	2,28 ± 1,158	532,72 ± 0,27	532,72 ± 0,27
Нирки Kidney	5,276 ± 2,436	3,947 ± 1,881	527,87 ± 12,15	523,82 ± 0,21

Примітка: * – відмінності достовірні в порівнянні з контрольною групою ($p < 0,05$).

Note: * – the differences are statistically significant as compared to the control group ($p < 0.05$).

Таблиця 3. Активність протеїназ в тканинах щурів при різних видах штучного гіпометаболізму (мкЕкв x 10³/хв)
Table 3. Protease activity in rat tissues during different types of natural hypometabolism (μEq x 10³/min)

Біологічний зразок Biological sample	Загальна протеолітична активність General proteolytic activity			Активність нетрипсиноподібних протеїназ Non-trypsin-like protease activity		
	Контроль Control	Аміназиновий ГМ Aminasin induced HM	Гіпоксично-гіперкапічний ГМ Hypoxic-hypercapnic HM	Контроль Control	Аміназиновий ГМ Aminasin induced HM	Гіпоксично-гіперкапічний ГМ Hypoxic-hypercapnic HM
Сироватка крові Blood serum	0,118 ± 0,006	4,10 ± 0,95*	0,26 ± 0,008*	0,55 ± 0,005	14,66 ± 0,46*	0,40 ± 0,051*
Кора мозку Brain cortex	0,166 ± 0,005	3,90 ± 0,68*	0,30 ± 0,04*	2,547 ± 0,922	4,36 ± 1,61	0,70 ± 0,10*
Легені Lungs	0,28 ± 0,101	4,06 ± 0,83*	0,38 ± 0,74	2,013 ± 1,233	6,84 ± 2,92	0,88 ± 0,074
Серце Heart	0,009 ± 0,002	3,55 ± 1,10*	0,31 ± 0,062*	3,331 ± 0,09	8,68 ± 3,83*	0,78 ± 0,12*
Печінка Liver	0,1 ± 0,028	4,65 ± 1,50*	0,40 ± 0,20*	2,653 ± 1,86	7,2 ± 3,85	0,90 ± 0,30
Нирки Kidney	0,08 ± 0,009	5,16 ± 1,68*	0,38 ± 0,17*	2,0 ± 0,52	21,53 ± 6,62*	0,48 ± 0,10*

Примітка: * – відмінності достовірні в порівнянні з контрольною групою ($p < 0,05$).

Note: * – the differences are statistically significant as compared to the control group ($p < 0.05$).

При ШГМ максимально змінюється активність НТПП, що може вказувати на особливу роль цих протеїназ у розвитку гіпометаболічних станів або особливу чутливість до використаних впливів.

Причиною таких змін можуть бути різні рівні падіння ТТ при вивчених нами видах гіпометаболічних станів, а при гіпоксично-гіперкапічному ШГМ – різні пропорції O₂ і CO₂ у газовому середовищі, наростаючий респіраторний ацидоз, при якому підвищується протеолітична активність [8]. Встановлено, що гіперкапія обумовлює зміни рН, рівня PCO₂ і HCO₃⁻ в тканинах і саме їй належить важлива роль у розвитку і підтримці гіпоксично-гіперкапічного ШГМ [7].

Отже, при обох способах досягнення ШГМ відбувається різноспрямована зміна вивчених показників: ЗАП підвищувалася, активність α-1-ІІ виявилася стійкою до впливу фізичних факторів гібернації (гіпоксії, гіперкапнії та гіпотермії) та аміназину і не змінювалася, тоді як активність НТПП і α-2-МГ виявилася чутливою до дії цих факторів, тобто зниження активності НТПП і α-2-МГ відбувається односпрямовано і може обумовлюватися більшою специфічністю α-2-МГ саме до НТПП (зокрема, хімази опасистих клітин). Активація протеолітичних процесів відбувається в основному за рахунок підвищення активності трипсиноподібних ферментів і зниження α-2-МГ у всіх вивчених тканинах, окрім сироватки крові при аміназиновому ШГМ.

Інгібітор α-2-МГ визначає протеолітичну активність ферментів каскаду згортання крові, фібринолітичної і кінінової систем [1, 2]. Розвиток ГМ супроводжується зниженням кров'яного тиску [28],

an important role in the development and maintenance of hypoxic-hypercapnic AHM.

So, both ways of reaching AHM resulted in a multidirectional changes in the studied indices: PTA increased, the activity of α-1-PI occurred to be resistant to the effect of hibernation factors (hypoxia, hypercapnia and hypothermia) and aminasin, and did not alter, whilst the activity of NTLP and α-2-MG occurred to be sensitive to the effect of these factors, *i. e.* the reduction in the activity of NTLP and α-2-MG takes place monodirectionally and might be stipulated by higher specificity of α-2-MG namely to NTLP (in particular, chymase of mast cells). The activation of proteolytic processes occurs mainly due the rise in the activity of trypsin-like enzymes and reduction of α-2-MG in all the studied tissues, excluding blood serum during aminasin induced AHM.

Inhibitor of α-2-MG determines proteolytic activity of blood coagulation cascade enzymes, fibrinolytic and kinin systems [1, 2]. Development of HM is accompanied with the reduction in blood pressure [28], therefore the changes in the activity of α-2-MG (when it does not decrease during natural and hypoxic-hypercapnic HM and significantly increases during aminasin induced HM) may be considered as adaptive ones. The changes in the activity of NTLP in kidneys could be characterized in a similar way, because NTLP comprises chymase which is one of main proteolytic enzymes of mast cells and participates in local formation of vasoconstrictor peptide AII in kidneys [24].

It should be noted that activation of kidney renin-angiotensin system is an important link of hypertension pathogenesis development and damages in kidneys, at

Таблиця 4. Активність інгібіторів протеїназ в тканинах щурів при різних видах штучного гіпометаболізму (мкЕкв x 10³/хв)

Table 4. Activity of protease inhibitors in rat tissues during different types of artificial hypometabolism (μEq x 10³/min)

Біологічний зразок Biological sample	Загальна протеолітична активність General proteolytic activity			Активність нетрипсिनоподібних протеїназ Non-trypsin-like protease activity		
	Контроль Control	Аміназиновий ГМ Aminasin induced HM	Гіпоксично-гіперкапічний ГМ Hypoxic-hypercapnic HM	Контроль Control	Аміназиновий ГМ Aminasin induced HM	Гіпоксично-гіперкапічний ГМ Hypoxic-hypercapnic HM
Сироватка крові Blood serum	3,156 ± 0,655	20,01 ± 6,50*	3,27 ± 0,303	530,0 ± 2,5	525,98 ± 3,83	518,0 ± 15,0
Кора мозку Brain cortex	7,507 ± 2,76	2,23 ± 1,05*	2,1 ± 0,8*	515,0 ± 10,05	518,81 ± 3,31	520,1 ± 8,3
Легені Lungs	5,507 ± 1,902	0,92 ± 0,41*	2,63 ± 1,85	531,7 ± 1,1	530,65 ± 1,77	531,31 ± 11,7
Серце Heart	4,92 ± 1,508	2,96 ± 1,38	1,96 ± 0,74*	525,1 ± 4,3	530,90 ± 0,48	529,87 ± 1,97
Печінка Liver	11,24 ± 4,238	0,58 ± 0,11*	2,4 ± 0,5*	531,2 ± 3,7	531,30 ± 0,98	529,8 ± 2,2
Нирки Kidney	19,53 ± 8,84	0,63 ± 0,11*	4,96 ± 2,36*	526,3 ± 3,7	523,75 ± 4,91	529,77 ± 1,67

Примітка: * – відмінності достовірні в порівнянні з контрольною групою ($p < 0,05$).

Note: * – the differences are statistically significant as compared to the control group ($p < 0.05$).

тому зміни активності α -2-МГ, коли вона не знижується при природному і гіпоксично-гіперкапічному ГМ та значно зростає при аміназиновому ГМ, можна розглядати як адаптивні. Подібним чином можна охарактеризувати і зміни активності НТПП, що виявляються у нирках, тому що НТПП включають до свого складу хімазу, яка є одним з основних протеолітичних ферментів опасистих клітин та бере участь у локальному утворенні вазоконстрикторного пептиду АП в нирках [24].

Слід зазначити, що активація ниркової ренін-ангіотензинової системи – це важлива ланка розвитку патогенезу гіпертензії та пошкодження нирок, в той же час аміназин виводиться з організму нирками [30]. При цьому локальна активація утворення вазоконстрикторного пептиду на тлі гіпотонічного впливу аміназину може розглядатися як компенсаторна реакція організму, яка спрямована на зрівноваження гемодинамічної ситуації. Було показано, що аміназин сприяє зниженню імунітету; призводить до зростання ультрафіолет-стимульованого апоптозу лімфоцитів у щурів і зниження їх мітохондріального потенціалу залежно від дози і тривалості дії [35]; здатен нівелювати дію аденовірусу [17]; викликає морфологічні зміни ракових клітин [27] та впливає на концентрацію гормонів [26].

При порівнянні впливу різних видів ГМ на активність вивчених ферментів та їх інгібіторів було виявлено як подібність, так і відмінність в реакції системи протеїназа-інгібітор протеїназ. Односпрямованість відзначена в змінах ЗАП і активності

the same time aminasin is excreted by kidneys [30]. Herewith local activation of the formation of vasoconstrictor peptide on the background of hypotonic effect of aminasin may be considered as compensatory reaction of an organism, directed to equilibration of hemodynamic state. It has been shown that aminasin contributes to immunity decrease; leads to the rise in UV-stimulated apoptosis of lymphocytes in rats and reduction of their mitochondrial potential depending on the dose and duration of the effect [35]; is capable of elimination of adenovirus action [17]; causes the morphological changes of cancer cells [27] and affects the hormone concentration [26].

Comparing the effect of various type HM on the activity of the studied enzymes and their inhibitors revealed some similarity, as well as the distinctions in the reaction of protease – protease inhibitor system. Monodirectional were the changes of PTA and activity of α -1-PI in response to the development of both studied artificial HM and they coincide with that during natural HM, and exactly PTA rise and absence of changes in α -1-PI activity. This may testify to the activation of proteolysis due to both the rise in the activity of proteases and suppression of α -2-MG.

It should be noted that the changes in the activity of NTLF and α -2-MG during AHM are the most multidirectional and significantly differ from the level of activity during NHM. For example, during hypoxic-hypercapnic and natural HM the changes in the activity of α -2-MG coincide with their direction in blood serum and lungs, as well as the activity of NTLF in lungs.

α -1-ІІІ у відповідь на формування обох вивчених штучних ГМ і вони збігаються з таким при природному ГМ, а саме: зростання ЗАП та відсутність змін активності α -1-ІІІ. Це може свідчити про активацію протеолізу як за рахунок підвищення активності протеїназ, так і пригнічення α -2-МГ.

Слід зазначити, що зміни активності НТПП та α -2-МГ при ШГМ є найбільш різноспрямованими та суттєво відрізняються від рівня активності при ПГМ. Так, при гіпоксично-гіперкапічному та природному ГМ зміни активності α -2-МГ збігаються за напрямком у сироватці крові та легенях, а активності НТПП – у легенях. У той же час природний ГМ має деяку схожість з аміназиновим ГМ за показниками активності НТПП (крім підвищення активності в нирках при ПГМ) та α -2-МГ – не змінюються в легенях. При порівнянні штучних способів досягнення ГМ встановлено, що зміни активності НТПП різноспрямовані: при гіпоксично-гіперкапічному ГМ вона знижується, а при аміназиновому зростає; активність α -2-МГ, навпаки, змінюється односпрямовано – в обох випадках знижується, окрім сироватки крові, де його активність при гіпоксично-гіперкапічному ГМ не змінюється, а при аміназиновому ГМ – значно зростає.

Відомо, що α -2-МГ також здатен транспортувати інтерлейкіни, інтерферони, фактор некрозу пухлини, стимуліни, інгібітори і фактори росту [1, 2, 21, 25] і таким чином регулювати імунологічні реакції, активність цитокінів, рост і диференціацію тканин. Оскільки α -2-МГ пригнічує протеїназолізні реакції, задіяні в імунологічних процесах, його можна розглядати як важливий компонент імунної системи організму [4]. Висловлюється припущення, що характерна для природного ГМ метаболічна депресія складає основу і гіпометаболізму, який спостерігається в результаті нейробіологічних і вегетативних змін у людини при депресивно подібних станах, які розвиваються на тлі активації, у тому числі й імунної системи [33, 34]. До того ж показано, що у щурів з експериментальною моделлю депресії значно підвищується рівень активності α -2-МГ [6].

Таким чином, отримані дані укладаються в концепцію [31], що розвиток гіпометаболізму, зокрема природного, полягає в перебудові певних молекулярних механізмів, ніж у наявності спеціалізованих генів, тобто відбувається перепрограмування існуючих біохімічних процесів (наприклад, активності системи протеїназа – інгібітор протеїназ).

Висновки

Впливи різних видів штучного і природного ГМ викликають подібні зміни в активності системи протеїназа – інгібітор протеїназ: на фоні незмінної активності α -1-ІІІ підвищується ЗАП. На відміну від природного, при штучних ГМ спостерігається

At the same time, natural HM is similar to aminasin induced HM in terms of NTLP activity indices (excluding the rised activity in kidneys during NHM) and α -2-MG, which are not changed in lungs. Comparing the ways to achieve artificial HM revealed that the changes in NTLP activity are multidirectional: during hypoxic-hypercapnic HM it reduces and during aminasin induced one it increases; and *vice versa* the activity of α -2-MG alters monodirectionally: in both cases it decreases except blood serum, where its activity during hypoxic-hypercapnic HM does not change and during aminasin induced HM it increases significantly.

The α -2-MG is also known to transport interleukines, interferons, tumor necrosis factor, stimulins, inhibitors and growth factors [1, 2, 21, 25] and thereby to regulate immunological reactions, activity of cytokines, growth and differentiation of tissues. Since α -2-MG inhibits proteinase-dependent reactions, involved into immunological processes, it can be considered as an important component of an organism immune system [4]. There is a supposition, that metabolic depression, being inherent for natural HM, underlie the hypometabolism as well, which is observed as a result of neurobiological and vegetative changes in humans during depression-like states, developing on the background of activation of immune system *i.a.* [33, 34]. As well it has been demonstrated that in rats with experimental model of depression the level of α -2-MG activity increases [6].

Thus the findings meet the concept [31] that the development of hypometabolism, in particular natural one, consists rather in the re-arrangement of certain molecular mechanisms, than in the presence of specialized genes, *i. e.* re-programming of existing biochemical processes takes place (*e. g.* activity of protease – protease inhibitor system).

Conclusions

The effects of various types of artificial and natural HM cause similar changes in the activity of protease – protease inhibitor system: on the background of unchanged activity of α -2-PI the PTA rises. Unlike the natural HM during artificial HMs the reduced activity of α -2-MG is found (no changes during natural HM). In addition, the most multidirectional differences in the dynamics of NTLP activity are revealed: during NHM it does not change (except kidneys), but during hypoxic-hypercapnic AHM it reduces, and during aminasin induced one it *vice versa* increases (excluding liver, lungs and brain cortex).

References

1. Veremeyenko K.N. Proteolysis inhibitors are the blood protective proteins // *Vrachebnoye Delo.* – 1987. – N5. – P. 45–48.

зниження активності α -2-МГ (при природному не змінюється). Крім того, виявляються найбільш різноспрямовані розбіжності в динаміці активності НТПП: якщо при ПГМ вона не змінюється (окрім нирок), то при гіпоксично-гіперкапнічному ШГМ – знижується, а при аміназиновому, навпаки, зростає (крім печінки, легенів та кори мозку).

Литература

1. *Веремеенко К.Н.* Ингибиторы протеолиза – защитные белки крови // *Врачебное дело.*– 1987.– №5.– С. 45–48.
2. *Веремеенко К.Н., Кизим А.И., Доценко В.Е.* α -2-макроглобулин: структура, физиологическая роль и клиническое значение // *Лаб. диагностика.*– 2000.– №2.– С. 3–8.
3. *Гордон Р.Я., Игнатьев Д.А., Мельникова Е.В. и др.* Защитный эффект гипотермии для нейронов головного мозга крыс при действии ионизирующей радиации // *Биофизика.*– 2007.– Т. 52, №3.– С. 565–571.
4. *Дроздов В.О., Лянна О.Л.* α -2-Макроглобулин у патогенезі мігрені // *Вісник проблем біології і медицини.*– 2010.– Вип. 3.– С. 129–132.
5. *Калабухов Н.И.* Зимняя спячка млекопитающих.– М.: Наука, 1985.– 264 с.
6. *Ломако В.В., Самохіна Л.М.* Вплив ритмічного охолодження на деякі етологічні та біохімічні показники щурів з експериментальною депресією // *Проблемы криобиологии.*– 2011.– Т. 21, №1.– С. 22–33.
7. *Мельничук С.Д., Мельничук Д.О.* Гіпобіоз тварин. Молекулярні механізми та практичне значення для сільського господарства і медицини.– Київ, 2007.– 220 с.
8. *Раппопорт Э.А., Казарян В.А.* Адаптационно-патологические изменения скелетных мышц при атрофических реакциях и их аппаратурная и фармакологическая коррекция: Тез. докл. Всерос. науч. конф. "Прикладные аспекты исследований скелетных, сердечных и гладких мышц".– Пушино, 1996.– С. 71–72.
9. *Самохіна Л.М., Гольдрін Є.М., Коваль С.М.* Система протеїназа-інгібітор протеїназ у хворих гіпертонічною хворобою під впливом антигіпертензивної терапії // *Медицина хімія.*– 2000.– Т. 2, №3.– С. 11–15.
10. *Тимофеев Н.Н.* Искусственный гипобиоз.– М.: Медицина, 1983.–192 с.
11. *Тимофеев Н.Н., Прокопьева Л.П.* Нейрохимия гипобиоза и пределы криорезистентности организма.– М.: Медицина, 1997.– 208 с.
12. *Чернилевский В.Е.* Проблемы гипобиоза и продления жизни // *Сборник МОИП №41. Секция геронтологии.*– М., 2008.– С. 105–123.
13. *Amobi N., Guillebaud J., Smith I.C.* Contractile actions of L-type Ca^{2+} agonists in human vas deferens and effects of structurally different Ca^{2+} antagonists // *Eur. J. Pharmacol.*– 2010.– Vol. 627, N1–3.– P. 285–294.
14. *Arnold W., Ruf T., Reimoser S. et al.* Nocturnal hypometabolism as an overwintering strategy of red deer (*Cervus elaphus*) // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*– 2004.– Vol. 286, N1.– P. R174–R181.
15. *Blackstone E., Morrison M., Roth M.B.* H_2S induces a suspended animation-like state in mice // *Science.*– 2005.– Vol. 308, N5721.– P. 518.
16. *Carey H., Andrews M., Martin S.* Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature // *Physiol. Rev.*– 2003.– Vol. 83, N4.– P. 1153–1181.
17. *Diaconu I., Cerullo V., Escutenaire S. et al.* Human adenovirus replication in immunocompetent Syrian hamsters can be
2. *Veremeyenko K.N., Kizim A.I., Dotsenko V.Ye.* Alpha-2-macroglobulin: structure, physiological role and clinical value // *Laboratornaya Diagnostika.*– 2000.– N2.– P. 3–8.
3. *Gordon R.Ya., Ignatyev D.A., Melnikova E.V. et al.* Protective effect of hypothermia on brain neurons in rats exposed to ionizing radiation // *Biophysics.*– 2007.– Vol. 52, N3.– P. 565–571.
4. *Drozдов V.O., Lyanna O.L.* Alpha-2-macroglobulin in migraine pathogenesis // *Visnyk Problem Biologii i Medytsyny.*– 2010.– Issue 3.– P. 129–132.
5. *Kalabukhov N.I.* Mammalian hibernation.– Moscow: Nauka, 1985.– 264 p.
6. *Lomako V.V., Samokhina L.M.* Effect of rhythmic cooling on some ethological and biochemical indices in rats with experimental depression // *Problems of Cryobiology.*– 2011.– Vol. 21, N1.– P. 22–33.
7. *Melnichuk S.D., Melnichuk D.O.* Hypobiosis of animals. Molecular mechanisms and practical value for agriculture and medicine.– Kyiv, 2007.– 220 p.
8. *Rapoport E.A., Kazaryan V.A.* Adaptive and pathological changes of skeletal muscles during atrophic reactions and their instrumental and pharmacological correction: Abstracts of All-Russian Scientific Conference "Applicative Aspects of Investigations of Skeletal, Cardiac and Smooth Muscles".– Puschino, 1996.– P. 71–72.
9. *Samokhina L.M., Goldrin Ye.M., Koval S.M.* Protease-protease inhibitor system in patients with hypertensive disease under influence of antihypertensive therapy // *Medychna Khimiya.*– 2000.– Vol. 2, N3.– P. 11–15.
10. *Timofeev N.N.* Artificial hypobiosis.– Moscow: Meditsina, 1983.– 192 p.
11. *Timofeev N.N., Prokopyeva L.P.* Neurochemistry of hypobiosis and limits of organism cryoresistance.– Moscow: Meditsina, 1997.– 208 p.
12. *Chernilevskiy V.Ye.* Problems of hypobiosis and prolongation of life // *Collection of Moscow Society of Naturalists N41. Section Gerontology.*– Moscow, 2008.– P. 105–123.
13. *Amobi N., Guillebaud J., Smith I.C.* Contractile actions of L-type Ca^{2+} agonists in human vas deferens and effects of structurally different Ca^{2+} antagonists // *Eur. J. Pharmacol.*– 2010.– Vol. 627, N1–3.– P. 285–294.
14. *Arnold W., Ruf T., Reimoser S. et al.* Nocturnal hypometabolism as an overwintering strategy of red deer (*Cervus elaphus*) // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*– 2004.– Vol. 286, N1.– P. R174–R181.
15. *Blackstone E., Morrison M., Roth M.B.* H_2S induces a suspended animation-like state in mice // *Science.*– 2005.– Vol. 308, N5721.– P. 518.
16. *Carey H., Andrews M., Martin S.* Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature // *Physiol. Rev.*– 2003.– Vol. 83, N4.– P. 1153–1181.
17. *Diaconu I., Cerullo V., Escutenaire S. et al.* Human adenovirus replication in immunocompetent Syrian hamsters can be attenuated with chlorpromazine or cidofovir // *J. Gene. Med.*– 2010 – Vol. 12, N3.– P. 435–445.
18. *Dickinson D.J.* Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissue in health and diseases // *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*– 2002.– Vol. 13, N3.– P. 238–275.
19. *Geiser F.* Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor // *Annu. Rev. Physiol.*– 2004.– Vol. 66, N1.– P. 239–274.
20. *Geiser F., Ruf T.* Hibernation versus daily torpor in mammals and birds: physiological variables and classification of torpor patterns // *Physiol. Zool.*– 1995.– Vol. 68, N6.– P. 935–966.
21. *Gourin A.V., Gourin V.N., Tesfaigzi Y. et al.* Role of alpha(2)-macroglobulin in fefer and cytokine responses induced by lipopolysaccharide in mice // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*– 2002.– Vol. 283, N3.– P. 218–226.
22. *Heldmaier G., Ortman S., Elvert R.* Natural hypometabolism during hibernation and daily torpor in mammals // *Respiratory*

- attenuated with chlorpromazine or cidofovir // *J. Gene. Med.*– 2010 – Vol. 12, N3.– P. 435–445.
18. Dickinson D.J. Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissue in health and diseases // *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*– 2002.– Vol. 13, N3.– P. 238–275.
 19. Geiser F. Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor // *Annu. Rev. Physiol.*– 2004.– Vol. 66, N1.– P. 239–274.
 20. Geiser F., Ruf T. Hibernation versus daily torpor in mammals and birds: physiological variables and classification of torpor patterns // *Physiol. Zool.*– 1995.– Vol. 68, N6.– P. 935–966.
 21. Gourin A.V., Gourin V.N., Tesfaigzi Y. et al. Role of alpha(2)-macroglobulin in febrile and cytokine responses induced by lipopolysaccharide in mice // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*– 2002.– Vol. 283, N3.– P. 218–226.
 22. Heldmaier G., Ortman S., Elvert R. Natural hypometabolism during hibernation and daily torpor in mammals // *Respiratory Physiology & Neurobiology.*– 2004.– Vol. 141, N3.– P. 317–329
 23. Heldmaier G., Ruf T. Body temperature and metabolic rate during natural hypothermia in endotherms // *J. Comp. Physiol. B. Biochem. Syst. Environ. Physiol.*– 1992.– Vol. 162, N8.– P. 696–706.
 24. Kobori H., Nangaku M., Navar L.G., Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease // *Pharmacol. Rev.*– 2007.– Vol. 59, N3.– P. 251–287.
 25. Koo P.H. Human alpha2-macroglobulin: a major serum factor cytotoxic for tumor cells // *Cancer Lett.*– 1983.– Vol. 18, N2.– P. 169–177.
 26. Kunimatsu T., Kimura J., Funabashi H. et al. The antipsychotics haloperidol and chlorpromazine increase bone metabolism and induce osteopenia in female rats // *Regul. Toxicol. Pharmacol.*– 2010.– Vol. 58, N3.– P. 360–368.
 27. Li Y., Zhang J., Zhang B. Atomic force microscopy study on chlorpromazine-induced morphological changes of living HeLa cells *in vitro* // *Scanning.*– 2009.– Vol. 31, N6.– P. 259–265.
 28. Lyman C. P. Hibernation in mammals // *Circulation.*– 1961.– Vol. 24, N8.– P. 434–445.
 29. Nsimba S.E. Effects of daily chlorpromazine administration on behavioural and physiological parameters in the rat // *Indian J. Physiol. Pharmacol.*– 2009.– Vol. 53, N3.– P. 209–218.
 30. McIntosh M.P., Leong N., Katneni K. et al. Impact of chlorpromazine self-association on its apparent binding constants with cyclodextrins: Effect of SBE(7)-beta-CD on the disposition of chlorpromazine in the rat // *J. Pharm. Sci.*– 2010.– Vol. 99, N7.– P. 2999–3008.
 31. Srere H.K., Wang L.C., Martin S.L. Central role for differential gene expression in mammalian hibernation // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*– 1992.– Vol. 89, N15.– P. 7119–7123.
 32. Storey K.B., Storey J.M. Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls // *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*– 2004.– Vol. 79, N1.– P. 207–233.
 33. Tsiouris J.A., Mehta P.D., Patti P.J. et al. Alpha2-macroglobulin elevation without an acute phase response in depressed adults with Down's syndrome: implications // *J. Intellect. Disabil. Res.*– 2000.– Vol. 44, N12, Pt. 6.– P. 644–653.
 34. Tsiouris J.A. Metabolic depression in hibernation and major depression: an explanatory theory and an animal model of depression // *Med. Hypotheses.*– 2005.– Vol. 65, N5.– P. 829–840.
 35. Wolnicka-Glubisz A., Fraczek J., Skrzeczynska-Moncznik J. et al. Effect of UVA and 8-methoxypsoralen, 4, 6, 4'-trimethylangelicin or chlorpromazine on apoptosis of lymphocytes and their recognition by monocytes // *J. Physiol. Pharmacol.*– 2010.– Vol. 61, N1.– P. 107–14.

Accepted 06.09.2011

Надійшла 06.09.2011
Рецензент А.Ю. Семенченко