

УДК 591.111-932.932.34:591.543.42+591.543.42+591.543.42.084.1

О.В. Шило\*, В.В. Ломако, О.Ю. Семенченко

## Гель-хроматографічне дослідження сироватки крові щурів і хом'яків за умов штучної та природної гібернації

UDC 591.111-932.932.34:591.543.42+591.543.42+591.543.42.084.1

O.V. Shylo\*, V.V. Lomako, O. Yu. Semenchenko

## Gel Chromatographic Examination of Serum of Rats and Hamsters Under Artificial and Natural Hibernation

**Реферат:** У хом'яків і щурів методом гельпроникальної хроматографії вивчали склад молекул у крові за умов природної (ПГ) і штучної (ШГ) гібернації. У контрольній групі було п'ять фракцій молекул у хом'яків та сім у щурів. Фракції, що збігалися (м. м. 530, 1140 і 3300 Да), відрізнялися тільки площами під піками (більше у щурів). За умов ПГ з'являлися нові фракції 1350, 2350 і 6350 Да, збільшувалися площі контрольних фракцій 1140 і 1980 Да. За ШГ у щурів площа фракції 1140 Да була більшою, фракція 530 Да – меншою і зникала фракція з м. м. 1290 Да, з'являлися нові – 650, 830, 950, 2350 і 5110 Да. Через 2 години після ШГ фракції 1140 і 1520 Да були більшими, фракція 530 Да – меншою (як і при ШГ); 650, 2350 і 5110 Да – зникли, з'являлися знову 1290 Да й нова 4030 Да; через 24 години відзначали нові фракції 5820 і 6530 Да. У хом'яків за ШГ збільшувалися фракції 1140, 1600 і 3330 Да, з'являлася нова фракція 5280 Да, як у щурів контрольної групи та через 24 години після ШГ.

**Ключові слова:** гібернація, гіпометаболізм, білки, кров, хом'яки, щури.

**Abstract:** In this study, molecular composition of hamster and rat blood was studied by gel permeation chromatography under natural (NH) and artificial hibernation (AH). The control group was represented by 5 fractions of molecules in hamsters and 7 in rats. The areas under peaks of the fractions similar in molecular weight in hamsters and rats were larger in rats. NH was characterized by appearance of new fractions (1,350, 2,350, and 6,350 Da) and an increase in areas under peaks of the control fractions (1,140 and 1,980 Da). Artificial hibernation in rats led to an increase in areas under peaks of 1,140 Da fraction, a decrease in that of 530 Da, and disappearance of 1290 Da, as well as the appearance of new fractions (650, 830, 950, 2350, and 5110 Da). Two hrs of later AH, the areas under peaks of 1,140 and 1,520 Da fractions were greater and that of 530 Da was lesser; 650, 2,350 and 5,110 Da fractions disappeared, 1,290 Da reappeared and new fraction of 4,030 Da appeared. New fractions of 5,820 and 6,530 Da were found 24 hrs later. In hamsters under AH, the areas under peaks of 1,140, 1,600, and 3,330 Da increased; as well as a new peak in 5,280 Da appeared, both in the control rats and those in 24 hrs after AH.

**Key words:** hibernation, hypometabolism, proteins, blood, hamsters, rats.

Адаптація до холоду супроводжується значними перебудовами метаболічних процесів й утворенням безлічі сполук, а також їх проміжних продуктів, які з'являються у крові, інтерстиціальній, спинномозковій та інших рідинах і стимулюють/пригнічують активність задіяних ланок регуляції організму. Увесь комплекс таких речовин достовірно відображає перебудови в організмі та активно вивчається за допомогою технологій геноміки, протеоміки та метаболоміки [13, 25, 27, 40]. Мета такого підходу полягає в максимальному визначенні у біологічному зразку всього набору молекул, зокрема й молекулярні маси (м. м.) яких не відповідають м. м. визначених/відомих сполук, що беруть участь у пев-

Adaptation to cold is accompanied by significant metabolic rearrangements and formation of a large number of compounds, as well as their intermediates, which appear in blood, interstitial, cerebrospinal and other fluids and stimulate/suppress the activity of involved components of body regulation. The whole complex of such substances significantly reflects the rearrangements in the body and is actively studied using genomic, proteomic and metabolomic technologies [8, 24, 27, 40]. This approach aims to maximally detect in biological sample the whole set of molecules, including the molecular weights (MW) of those molecules, differed from MW of the defined / known compounds involved in certain biochemical reactions [27, 40]. Elucida-

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

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

\*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: oleksandr.v.shylo@gmail.com

\*To whom correspondence should be addressed:

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

Надійшла 06.08.2019

Прийнята до друку 31.08.2021

Received August, 06, 2019

Accepted August, 31, 2021

© 2021 O.V. Shylo, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

них біохімічних реакціях [27, 40]. З'ясування фізіологічної та діагностично-прогностичної ролі цих речовин є перспективним фундаментально-прикладним напрямком комплексних досліджень, оскільки вони можуть слугувати біологічними маркерами для оцінки нормальних і патологічних процесів в організмі [27, 29].

Найбільш виражені й добре узгоджені між собою перебудови метаболічної активності відзначаються у гетеротермних тварин у циклі природної гібернації (ПГ). За допомогою геномних і протеомних підходів виявлено зміни мРНК для генів, відповідальних за процеси гліколізу, глюконеогенезу, апоптозу та обміну жирів, а також пов'язаних із процесами клітинного росту і циркадними ритмами. Крім того, визначено молекули-«кандидати», які характеризують гібернаційний фенотип і відіграють роль у реалізації індукованих гібернацією захисних реакцій за екстремальних фізіологічних перебудов в організмі протягом циклу торпор–пробудження [24, 33]. Результати дослідження метаболому гібернаторів показали наявність виражених сезонних і залежних від стадій зимової сплячки змін активності кофакторів метаболізму, катаболізму амінокислот, пуринового, піримідинового та ліпідного метаболізму [14, 26].

Існує думка, що в діапазоні м. м. 400–12 000 Да зазвичай групуються молекули (зокрема, протеїни, пептиди та їхні посттрансляційні модифікації): одна частина з них бере участь у регуляції кров'яного тиску і метаболізмі кісткової тканини, захисті від оксидативного стресу тощо [13], інша – представлена токсинами [9]. До цього діапазону також входять похідні глюконових кислот, поліаміни, кініни, продукти деградації фібриногену, альбуміну та інші поліпептидні сполуки, окремі компоненти яких мають широкий спектр біологічної активності, а саме: пригнічують клітинний імунітет, неспецифічну реактивність, еритропоез, а також активність ряду ферментів [1]. Крім того, у вказаному діапазоні м. м. представлено молекули, які сприяють зануренню/виходу з гібернації та активації певних захисних механізмів у організмі [11].

Адаптація до холоду проявляється у зміні загальних характеристик геному та активності генів, продукти яких забезпечують пристосування організмів до певних умов. Передбачається, що у гетеротермних тварин для індукції стану гібернації й активації захисних стратегій відбувається диференціальна експресія такого набору генів, який наявний й у більшості гоміотермних організмів [35]. Стан ПГ поєднує потужне приг-

tion of physiological and diagnostic-prognostic role of these substances is a promising fundamental and applied trend in the integrated research due to the possibility to use them as biological markers to estimate normal and pathological processes in the body [27, 29].

Heterotherms in natural hibernation (NH) demonstrate the most pronounced and well-coordinated rearrangements in metabolic activity. Genomic and proteomic approaches have identified the mRNA changes for genes responsible for glycolysis, gluconeogenesis, apoptosis, and fat metabolism, as well as for those, associated with cell growth and circadian rhythms. In addition, the 'candidate' molecules, characterizing the hibernation phenotype and playing a role in hibernation-induced protective responses under extreme physiological rearrangements in the body during torpor-arousal cycle, have been identified [23, 33]. The findings on hibernator metabolome showed the presence of pronounced seasonal and hibernation stage-dependent changes in the activity of cofactors of metabolism, amino acid catabolism, purine, pyrimidine and lipid metabolisms [12, 26].

It is believed that within the range of 400–12,000 Da there are usually grouped the molecules (particularly, proteins, peptides and their posttranslational modifications), a part of which is involved into regulation of blood pressure, bone metabolism, protection against oxidative stress *etc.* [11], another is the toxins [6]. This range also includes the derivatives of glucuronic acids, polyamines, kinins, fibrinogen degradation products, albumin and other polypeptide compounds. Some components of these substances have a wide range of biological activity, specifically they suppress cell immunity, non-specific reactivity, erythropoiesis, and the activity of certain enzymes as well [9]. In addition, within this range of MW, there are the molecules promoting the entry into hibernation / arousal and activation of certain protective mechanisms in the body [8].

The adaptation to cold is manifested in changes in general characteristics of genome and gene activity, the products of which ensure the adaptation of organisms to certain conditions. Heterotherms are assumed to have differential expression of such a set of genes, which is present in most homeotherms, to induce hibernation and activate protective strategies [35]. The NH state combines a strong inhibition of metabolic rate with a selective increase in key gene expression and synthesis of specific proteins to ensure the required level of metabolic processes [3]. Today, the question whether the factors (hunger, cold, daylight



нічення швидкості обміну речовин із селективним збільшенням експресії ключових генів та синтез специфічних білків для забезпечення необхідного рівня метаболічних процесів [6]. На сьогодні питання можливості факторів (голод, холод, тривалість світлового дня, газовий склад навколишнього середовища тощо), які сприяють зануренню тварин у ПГ, активувати подібні метаболічні шляхи у негібернуючих тварин потребує ґрунтовного вивчення. Моделювання подібних до ПГ станів у гомойотермних організмів є актуальним для подальшого використання отриманих результатів у практичній медицині та для дослідження космосу [8].

Мета роботи – порівняльне вивчення фракційного складу поліпептидних сполук із м. м. 100–10 000 Да у сироватці крові гетеро- (хом'яки) і гомойотермних (щури) тварин за умов природної та штучної гібернації.

### Матеріали і методи

Експерименти проведено відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) з дотриманням вимог комітету з біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, погоджених із положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Роботу виконували в осінньо-зимовий період на самцях золотистих хом'яків (*Mesocricetus auratus*) і безпородних білих щурів (*Rattus norvegicus*) (масою 85–95 та 220–280 г відповідно). До початку експерименту тварин утримували в умовах віварію за природного світлового режиму на стандартному раціоні *ad libitum* із додаванням зерен пшениці та насіння соняшнику.

Хом'яки були розділені на 3 групи: контроль (інтактні тварини); занурення у природну (ПГ) і штучну гібернацію (ШГ). Щури були розділені на 4 групи: контроль (інтактні тварини); занурення у ШГ; через 2 і 24 години після виходу із ШГ ( $n = 3$  у кожній групі).

Хом'яків перед зануренням у ПГ розсаджували в індивідуальні клітки, з раціону виключали соковиту їжу, забезпечували гніздовим матеріалом (деревна тирса, сіно) і переносили в темне приміщення з температурою повітря ( $5 \pm 2$ )°C (промислова холодильна камера об'ємом 20 м<sup>3</sup> із автоматичним регулюванням температури). Хом'яки занурювалися в сплячку через 10–14 діб. Середня тривалість бауту становила ( $3 \pm 0,5$ ) доби, температура тіла (ТТ) знижувалася до ( $8 \pm 1$ )°C.

hours, gas composition of the environment, *etc.*), contributing to animal entering the NH, can activate the similar metabolic pathways in non-hibernators, should be thoroughly studied. Simulating the NH-like states in homeotherms is relevant to enrol the obtained results into practical medicine and for space research [5].

The purpose herein was a comparative study of fractional composition of polypeptide compounds with MW 100–10,000 Da in serum of hetero- (hamsters) and homeotherms (rats) under natural and artificial hibernation.

### Materials and methods

The experiments were carried out in accordance with the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals Against Cruelty' (№ 3447-IV of February 21, 2006) in compliance with the requirements of the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, agreed with the provisions of the 'European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes' (Strasbourg, 1986). The research was conducted in the autumn-winter period in male golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) and outbred white rats (*Rattus norvegicus*) (weighing 85–95 and 220–280g, respectively). Prior to experiment the animals were housed in animal facility with natural light/dark cycle and a standard diet *ad libitum*, supplemented with wheat and sunflower seeds.

Hamsters were divided into 3 groups: control (intact animals); those entering natural (NH) and artificial hibernation (AH). Rats were divided into 4 groups: control (intact animals); animals entering AH; those in 2 and 24 hrs after arousal from AH, ( $n = 3$  in each group).

Hamsters before entry into NH were placed into individual cages, the diet was deprived of juicy food. The animals were provided with nesting material (sawdust, hay) and then transferred to a dark room with air temperature ( $5 \pm 2$ )°C (industrial cooling chamber of 20 m<sup>3</sup> volume with automatic temperature control). The hamsters entered hibernation after 10–14 days. The average bout duration was ( $3 \pm 0.5$ ) days, body temperature (BT) decreased down to ( $8 \pm 1$ )°C.

Artificial hibernation (AH) was simulated by the 'closed vessel' method [19, 25]. Animals in a sealed vessel (3 and 2 dm<sup>3</sup> volume for rats and hamsters, respectively) were placed into an industrial cooling chamber at 2–5°C. Animals, being in the dark, under reduced temperature and increasing hypoxia-hypercapnia entered gradually (within ( $171.9 \pm$



Стан ШГ моделювали методом «закритої посудини» [2, 3]. Тварин у герметично закритій посудині (об'єм для щурів – 3 дм<sup>3</sup> і для хом'яків – 2 дм<sup>3</sup>) розміщували у промисловій холодильній камері за температури 2–5°C. Тварини в умовах темряви, зниженої температури і наростаючої гіпоксії-гіперкапнії поступово (щури – протягом (171,9 ± 9,9) хв і хом'яки – (175,0 ± 25,1) хв) занурювалися в подібний до ПГ стан, який характеризувався зниженням ТТ, зменшенням частоти серцевих скорочень (ЧСС) і дихання.

Зразки крові тварин отримували після декапітації (у рамках проведення комплексного забору матеріалу для біохімічних і морфологічних досліджень) при досягненні гіпометаболічного стану (ПГ і ШГ) і через 2 і 24 години після переміщення тварин в умови кімнатної температури (22°C) і нормального газового складу навколишнього середовища.

Оцінку фракційного складу сироватки крові тварин проводили методом гелі-проникної хроматографії. Петельним інжектором вводили 0,2 мл сироватки крові в колонку довжиною 400 мм і внутрішнім діаметром 16 мм, заповнену полівініловим гелем «TSK-Gel Toyopearl HW-40 Fine» («Toyo Soda Manufacturing Co», Японія), який дозволяє розділяти поліпептидні молекули в діапазоні м. м. 100–10 000 Да. Здатний до елюації фосфатно-сольовий буферний розчин (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 30 ммоль/л, NaCl 100 ммоль/л, рН 7,4) подавався в колонку через петельний інжектор за допомогою перистальтичного насоса («Microperpex LKB 2132», Швеція). Швидкість потоку становила 1,6–1,7 мл/хв і оцінювалася за часом наповнення каліброваної піпетки об'ємом 5,0 мл. Оптичну щільність елюату реєстрували УФ-монітором («Uvicord SII LKB 2238», Швеція) за довжини хвилі 254 нм. Сигнал монітора записувався у вигляді хроматограми двоканальним потенціометром («Recorder LKB 2210», Швеція) і одночасно подавався на інтегратор («Waters 746 Data Module», США), який визначає час утримування, площі під піками і процентний вміст кожної фракції. Попереднє калібрування проводили стандартними розчинами пептидів із вказаною м. м. Для побудови калібрувального графіка використовували залежності логарифма м. м. і величини  $V_e/V_0$ , де  $V_e$  – об'єм утримування стандартної речовини, мл;  $V_0$  – «мертвий» об'єм колонки (мл), який визначається за часом утримування блакитного декстрану (м. м. 2 000 кДа).

Пошук речовин із м. м., близькими за значенням до виявлених нами фракцій молекул,

± 9.9) and (175.0 ± 25.1) min for rats and hamsters, respectively) the NH-like state, characterized by a decreased BT, reduced heart rate (HR) and respiration.

Following decapitation of animals, the blood samples were taken (as a part of integrated sampling for biochemical and morphological studies) upon achieving hypometabolic state (NH and AH) and 2 and 24 hrs after transferring animals under room temperature conditions (22°C) and natural gas composition of the environment.

The fractional composition of animal serum was assessed by gel permeation chromatography. Using loop injector, 0.2 ml of serum was introduced into a column of 400 mm length and 16 mm inner diameter, filled with polyvinyl gel 'TSK-Gel Toyopearl HW-40 Fine' (Toyo Soda Manufacturing Co, Japan), which allowed separating polypeptide molecules within the MW range of 100–10,000 Da. Elutable phosphate-buffered saline (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 30 mmol/l, NaCl 100 mmol/l, pH 7.4) was supplied to the column through a loop injector using a peristaltic pump (Microperpex LKB 2132, Sweden). The flow rate was 1.6–1.7 ml/min, which was estimated by the time of filling of 5.0 ml calibrated pipette. The optical density of eluate was registered with UV monitor (Uvicord SII LKB 2238, Sweden) at the 254 nm wavelength. The monitor signal was recorded as a chromatogram with a two-channel potentiometer (Recorder LKB 2210, Sweden) and simultaneously fed to an integrator (Waters 746 Data Module, USA), which determined the retention time, areas under peaks and percentage of each fraction. Preliminary calibration was performed using the standard peptide solutions with the specified MW. To build the calibration graph we used the dependences of MW logarithm and  $V_e/V_0$  values, where  $V_e$  was the retention volume of the standard substance, ml;  $V_0$  was the 'dead' column volume (ml), determined by the retention time for blue dextran (MW 2,000 kDa).

The substances with MW close by value to the detected by us molecular fractions were found using the PubChem and The Human Metabolome Database (HMDB).

The nonparametric Mann-Whitney test was used for statistical data processing.

## Results and discussion

Gel filtration of serum samples from the intact animals (control group) within the range of MW 100–10,000 Da enabled detecting five molecular fractions in hamsters (MW 530, 1,140, 1,600, 1,980, and 3,300 Da) and seven fractions in rats (MW 530, 1,140, 1,290, 1,520, 1,880, 3,330 and 5,280 Da),



проводили за допомогою баз даних «PubChem» (США) та «The Human Metabolom Database» (Канада).

Для статистичної обробки даних використували непараметричний критерій Манна-Уїтні.

### Результати та обговорення

Гель-фільтрація зразків сироватки крові інтактних тварин (контрольна група) у діапазоні м. м. 100–10 000 Да дозволила виявити п'ять фракцій молекул у хом'яків (із м. м. 530, 1140, 1600, 1980 та 3300 Да) і сім фракцій у щурів (із м. м. 530, 1140, 1290, 1520, 1880, 3330 та 5280 Да), причому три фракції (із м. м. 525, 1140 і 3300 Да) збігалися у обох видів тварин, але відрізнялися тільки площею під піками, яка була більшою у щурів (таблиця).

Занурення у ПГ хом'яків (зниження ТТ із  $(37,5 \pm 0,5)$  до  $(8 \pm 1)^\circ\text{C}$ ) супроводжувалося появою у крові трьох нових фракцій молекул – із м. м. 1350, 2350 і 6350 Да, а також збільшенням площ, виявлених у контролі фракцій із м. м. 1140 і 1980 Да, в чотири і два рази відповідно (таблиця).

Розвиток ШГ у щурів (зниження ТТ із  $(38 \pm 1)$  до  $(17 \pm 1)^\circ\text{C}$ ) призводив до збільшення площі фракції 1140 Да, значного зменшення фракції 530, зникнення піку 1290 і утворення нових фракцій із м. м. 650, 830, 950, 2350 і 5110 Да. Площа фракції 1140 Да збільшувалася у шість разів, а 530 Да – зменшувалася майже вдвічі. Через 2 години після виходу з ШГ фракції 650, 2350 і 5110 Да не визначалися, але знову з'являлася фракція 1290 і утворювався новий пік із м. м. 4030 Да. Площі під піками 1140 і 1520 Да збільшувалися у 2,5 і 1,4 рази відповідно, фракція 530 Да зменшувалася вдвічі (як і за ШГ). Через 24 години після ШГ також з'являлися нові фракції із м. м. 5280 і 6530 Да.

У хом'яків ШГ (зниження ТТ до  $(16 \pm 1)^\circ\text{C}$ ) сприяла появі тільки однієї нової фракції із м. м. 5280 Да й збільшенню площі фракцій 1140, 1600 і 3330 Да. Фракція 5280 Да була також й у щурів – у контрольній групі та через 24 години після ШГ (таблиця).

Таким чином, три фракції (із м. м. 530 1140 і 3300 Да) у зразках сироватки крові були «загальними» для обох видів тварин: визначалися як у контрольній групі, так за вивчених станів. Ще дві фракції також були знайдені в контрольній групі та за умов гібернації, але мали невелику різницю м. м.: 1520 і 1600 та 1880 і 1980 Да у щурів і хом'яків відповідно. Найбільш лабільною виявилася фракція 1140 Да: відзначалося значне збільшення її площі за ПГ у хом'яків і ШГ у обох

moreover three fractions (MW 525, 1,140 and 3,300 Da) coincided for both animal species, but differed in area under peaks only, which was larger in rats (Table).

When hamsters entered the NH (BT decreased from  $(37.5 \pm 0.5)$  down to  $(8 \pm 1)^\circ\text{C}$ ), three new molecular fractions with MW 1,350, 2,350 and 6,350 Da appeared in blood, and the areas of fractions, detected in the control with MW 1,140 and 1,980 Da increased four times and twice, respectively (Table).

The development of AH in rats (BT decrease from  $(38 \pm 1)$  down to  $(17 \pm 1)^\circ\text{C}$ ) resulted in an increase in 1,140 Da fraction area, a significant decrease in fraction 530, disappearance of peak 1,290 and formation of new fractions with MW 650, 830, 950, 2,350 and 5,110 Da. The area of 1,140 Da fraction augmented six times, but that of 530 Da was almost twice decreased. Two hours after arousal from AH, no fractions of 650, 2,350 and 5,110 Da were revealed, but the fraction 1,290 reappeared and a new peak with MW 4,030 Da was formed. The areas under peaks of 1,140 and 1,520 Da increased by 2.5 and 1.4 times, respectively, the fraction of 530 Da decreased twice (as under AH). In 24 hrs after AH, the new fractions of MW 5,280 and 6,530 Da appeared as well.

In hamsters, the AH (BT decrease down to  $(16 \pm 1)^\circ\text{C}$ ) promoted the appearance of only one new fraction with MW 5,280 Da and an increase in the areas of 1,140, 1,600 and 3,330 Da fractions. The 5,280 Da fraction was also detected in rats, namely in the control group and 24 hrs after AH (Table).

Thus, three fractions (with MW 530, 1,140 and 3,300 Da) in serum samples were 'common' for both animal species, *i. e.* they were revealed both in control group and under studied conditions. Two fractions were also found out in the control group and in animals during hibernation, but they had a small difference in MW: 1,520 and 1,600 in rats, and 1,880 and 1,980 Da in hamsters. The fraction of 1,140 Da occurred to be the most labile, *i. e.* a significant increase in its area during NH in hamsters and under AH in both animal species, as well as 2 hrs after AH in rats, was observed. Among the compounds detected during NH in hamsters (with MW 1,350, 2,350 and 6,530 Da), 1,350 Da fraction only was specific, a small number of molecules with MW 2,350 Da was detected in rats during AH, and the 6,530 Da fraction appeared in rat blood in 24 hrs only after AH.

The endogenous substances, inducing hibernation development ('hibernation triggers') and likely mediating the activation of hibernation-specific neuroprotective mechanisms were first reported



Вміст фракцій поліпептидних молекул з молекулярною масою 100–10 000 Да у сироватці крові хом'яків і щурів за умов природної та штучної гібернації

Content of fractions of polypeptide molecules within MW range of 100–10,000 Da in serum from hamsters and rats under natural and artificial hibernation

Відомі сполуки, г/Моль Known compounds, g/mol	Фракції поліпептидів, Да Polypeptide fractions, Da	Види тварин Animal species							
		Хо'мяки Hamsters			Щури Rats				
		Експериментальні групи Experimental groups							
		Контроль Control	ШГ АН	ПГ НН	Контроль Control	ШГ АН	ШГ 2 години АН 2 hrs	ШГ 24 години АН 24 hrs	
-	6530	-	-	8 ± 6	-	-	-	2,8 ± 0,2	
-	5280	-	31 ± 11	-	4,8 ± 2	-	-	3 ± 0,4	
-	5110	-	-	-	-	13,3 ± 3,5	-	-	
-	4030	-	-	-	-	-	2,2 ± 1	-	
VIP (3300)	3300	3 ± 0,5	27 ± 8,9*	5 ± 0,5	10,2 ± 4	14,8 ± 2,75	17,6 ± 6,1	5,9 ± 1,2*	
-	2350	-	-	8,5 ± 2,5	-	1,6 ± 0,5	-	-	
-	1980	14 ± 7	13,5 ± 3,7	59,5 ± 12,5*	-	-	-	-	
-	1880	-	-	-	20 ± 8	16 ± 4,5	27,7 ± 6,7	16 ± 2,4	
Bombesin (1619.85)	1600	35 ± 11	58,2 ± 12	31,75 ± 12,8	-	-	-	-	
-	1520	-	-	-	56,6 ± 15	41,1 ± 9,8	80,5 ± 11,6	86,7 ± 12,5	
Substance P (1347)	1350	-	-	26 ± 9	-	-	-	-	
Angiotensin I (1296)	1290	-	-	-	169 ± 30	-	157,9 ± 25	142,9 ± 22	
Neuromedin B (1132)/ GRP (18-27) (1120.29)	1140	50 ± 10	173,7 ± 25,8*	114 ± 32*	100,4 ± 24	615 ± 100*	263,9 ± 50*	71,6 ± 17	
Angiotensin A (1002)/ Angiotensin 3 (931)	950	-	-	-	-	20 ± 4,8	99,3 ± 12,7	-	
Angiotensin (1-7) (899)/ Alamandine (855)	830	-	-	-	-	11,5 ± 0,7	16 ± 3,2	-	
-	750	-	-	-	-	-	29,1 ± 5,6	-	
Glutathione Oxidized (612,63)	650	-	-	-	-	5,9 ± 0,8	-	-	
Metenkephalin (500)	530	45 ± 11	34,2 ± 11,1	43,5 ± 12	118,3 ± 26	65,7 ± 12,5*	63,2 ± 10,8*	93,9 ± 22,6	

Примітка: \* – різниця значуща порівняно з відповідним контролем,  $p < 0,05$ .

Note: \* – difference is significant as compared to the corresponding control,  $p < 0.05$ .



видів тварин, а також через 2 години після ШГ у щурів. Серед сполук, виявлених за ПГ для хом'яків (із м. м. 1350, 2350 і 6530 Да), специфічною була тільки фракція 1350 Да, невелика кількість молекул із м. м. 2350 Да визначалася за ШГ у щурів, а фракція 6530 Да з'являлася у крові щурів тільки через 24 години після ШГ.

Перші повідомлення про ендogenous речовини, які індукують розвиток зимової сплячки («тригери гібернації») та, можливо, опосередковують активацію характерних для гібернації нейропротекторних механізмів, з'явилися ще в середині 70-х років минулого століття [4, 11]. Вони виявлені тільки в периферичній крові ховрахів у стані ПГ [18]. Встановлено, що це ендogenous термолабільні опіатні пептиди із м. м. 1000–1400 Да. У 90-х роках описаний більший за м. м. пептид (88 кДа) – НІТ (hibernation induction trigger), який також сприяє зануренню тварин в естивацію. Незважаючи на те, що окремі дослідники поставили під сумнів цей феномен [30, 37], показано, що деякі субстанції крові гібернаторів, зокрема [D-Ala2, D-Leu5]-Enkephalin (DADLE) – опіодна речовина з м. м. 569 Да, мають здатність захищати органи і тканини в процесі зберігання з метою подальшої їх трансплантації [7]. Також описано специфічні властивості інших низькомолекулярних сполук (нейротензин, опіати, бомбесин, нейромедіатори), які певною мірою імітують стан ПГ як у гібернуючих, так і негібернуючих тварин [11, 30]. Крім того, виявлено специфічний комплекс сполук, що пов'язаний із ПГ і складається з чотирьох пептидів (20, 25, 27 і 55 кДа), концентрація якого в крові та центральній нервовій системі (ЦНС) регулюється ендogenous цирканулярним ритмом [20]. Однак гомологічний комплекс знайдено й у гомойотермних тварин, але його експресія пов'язана тільки з сезонними змінами [32].

Відомо, що гіпотермія, яка розвивається за умов зимової сплячки, на відміну від штучної гіпотермії гомойотермного організму, є добре контрольованим фізіологічним процесом, розвиток якого відбувається за первинним зниженням метаболічної активності. Рівень зниження метаболізму, ТТ, ЧСС та інших функцій, а також спроможність організму протистояти цим змінам можуть визначати відмінності у спектральному складі сполук, які з'являються у крові за природної та штучної гібернації. У роботі N. Ohwatari та співавт. [28] за порівняльного вивчення гіпотермії до  $(7,2 \pm 0,3)$  і  $(17,1 \pm 0,4)^\circ\text{C}$  у сирійських хом'яків і щурів лінії Вістар відповідно виявлено односпрямовані зміни: збільшення фракцій пептидів із м. м. 17,5; 19, 35 і 43 кДа та змен-

in the mid-1970s [1, 8]. They were identified in peripheral blood of ground squirrels during NH only [16]. This substance was found to be an endogenous thermolabile opiate peptide with MW 1000–1400 Da. In the 1990s, the peptide with higher MW (88 kDa), being HIT (hibernation induction trigger), promoting the entry of animals in estivation, has been described. Although this phenomenon has been questioned by some researchers [30, 37], certain blood substances of hibernators, in particular [D-Ala2, D-Leu5]-Enkephalin (DADLE), being an opioid substance with MW 569 Da, showed the ability to protect organs and tissues during storage for further transplantation [4]. The specific properties of other low molecular weight compounds (neurotensin, opiates, bombesin, neurotransmitters), which to some extent simulate the NH state in both hibernators and non-hibernators, have been also described [8, 30]. In addition, a specific complex of compounds, associated with NH and consisting of four peptides (20, 25, 27 and 55 kDa), the concentration of which in blood and central nervous system (CNS) is regulated by endogenous circannual rhythm, has been outlined [18]. However, a homologous complex has been also revealed in homeotherms, but its expression is associated with seasonal changes only [32].

A hypothermic condition, developing during hibernation, in contrast to artificial hypothermia of a homeotherm, is a well-controlled physiological process, which develops after the primary decrease in metabolic activity. The level of reduction of metabolism, BT, heart rate and other functions, as well as the body's ability to resist these changes, may determine the differences in spectral composition of the compounds that appear in blood during natural and artificial hibernation. A comparative study of hypothermia to  $(7.2 \pm 0.3)$  and  $(17.1 \pm 0.4)^\circ\text{C}$  in Syrian hamsters and Wistar rats, respectively, reported by N. Ohwatari *et al.* [28] showed the unidirectional changes, namely an increase in blood of peptide fractions with MW 17.5, 19, 35 and 43 kDa and a decrease in those with MW 32 and 40 kDa. Our findings testify to the appearance of a different molecular pool with 100–10,000 Da range in blood under NH in hamsters and AH in rats, when the BT decreased down to  $(8 \pm 1)$  and  $(17.0 \pm 1.7)^\circ\text{C}$ , respectively. Moreover, despite the same conditions for hypothermia achievement under AH, as well as the level of BT reduction down to  $(17.0 \pm 1.7)$  and  $(15.3 \pm 2.8)^\circ\text{C}$  in rats and hamsters, respectively, a fractional composition of molecules in their blood was different.

Proceeding from the known features of the processes occurring under development of natural



шення із м. м. 32 і 40 кДа у крові. Отримані нами результати вказують на появу різного пулу молекул діапазону 100–10 000 Да за ШГ у крові хом'яків і за ШГ щурів, коли ТТ знижувалася до  $(8 \pm 1)$  і  $(17,0 \pm 1,7)^\circ\text{C}$  відповідно. Більш того, за однакових умов досягнення гіпотермії при ШГ і рівня зниження ТТ до  $(17,0 \pm 1,7)$  і  $(15,3 \pm 2,8)^\circ\text{C}$  у щурів і хом'яків відповідно, фракційний склад молекул у їхній крові відрізнявся.

Ґрунтуючись на відомих особливостях процесів, що протікають за умов розвитку природних і штучних гіпометаболічних станів [3, 6, 8, 20, 24, 37, 39], а також на збігах м. м., виявлених нами в ході експериментів сполук, із м. м. відомих молекул можна лише з певною часткою ймовірності стверджувати, що ці молекули у крові щурів і хом'яків є тими самими, які беруть участь у забезпеченні адаптивної відповіді організму.

Так, найлегша фракція (530 Да), яка присутня в крові тварин усіх експериментальних груп (таблиця), є близькою за м. м. до DADLE (569,659 г/моль), Met-enkephalin (573,665 г/моль) та Leu-enkephalin (555,632 г/моль). При цьому DADLE – одна з опіоїдних речовин, виявлених у крові гібернуючих тварин, – залежно від способу введення гоміотермним тваринам може викликати гіповентиляцію, знижувати артеріальний тиск (АТ), ЧСС [15] та ТТ (на холоді) [37] або ніяк не впливати на організм. Зокрема, введення лей-енкефаліну в латеральний шлуночок мозку, у *cisterna magna*, або внутрішньовенно підвищує АТ і ЧСС [31]. Опіоїди також сприяють забезпеченню цереброваскулярної вазоділяції, викликаній дією гіпоксії [38]. Можливо, зменшення площі фракції 530 Да за умов ШГ у щурів вказує на участь цієї сполуки в забезпеченні вазоділяції судин мозку.

Як показано в роботі С. Д. Мельничука та співавт. [3], за умов ШГ, крім зниження ТТ, зменшуються рН крові, розвивається респіраторний ацидоз і уповільнюється поглинання кисню тканинами. Вказані зміни можуть збільшувати ймовірність проявів оксидативного стресу, одним із критеріїв якого є зміна співвідношення відновленої та окисленої форм глутатіону (із м. м. 307,32 та 612,63 г/моль відповідно). Поява за ШГ у крові щурів фракції з м. м. 650 Да, яка є близькою до окисленої форми глутатіону, може вказувати на розвиток оксидативного стресу за цих умов.

Виявлені за ШГ у крові щурів фракції молекул із м. м. 830, 950 і 1290 Да можуть відповідати сполукам, що входять до складу ренін-ангіотензин-альдостеронової системи (РААС), яка має декілька сигнальних шляхів і виконує багато функцій в організмі [17]. Так, ангіотензин (А) I (м. м. 1296 г/моль) – попередник АII (1046,18 г/

and artificial hypometabolic states [3, 5, 12, 23, 25, 37, 39], as well as basing on the coincidences of MW values of the compounds we found out during experiments, with those of the known molecules, we most likely assume these molecules in rat and hamster blood to be the same, involved in adaptive responses of a body.

Thus, the lightest fraction (530 Da), which is present in blood of animals of all experimental groups (Table), is close in MW to DADLE (569.659 g/mol), Met-enkephalin (573.665 g/mol) and Leu-enkephalin (555.632 g/mol). In this case, DADLE as one of opioid substances found in blood of hibernators, depending on the method of administration to homeothermic animals can induce hypoventilation, reduce blood pressure (BP), HR [13] and BT (in the cold) [37] or cause no impact on the body. In particular, the introduction of Leu-enkephalin into lateral ventricle of the brain, into *cisterna magna* or intravenously increases BP and HR [31]. Opioids are also involved in providing cerebrovascular vasodilation caused by hypoxia (hypoxic cerebrovasodilation) [38]. A decrease in the area of 530 Da fraction under AH in rats likely indicates the participation of this compound in ensuring vasodilation of cerebral vessels.

S.D. Melnychuk *et al.* [25] showed under AH, in addition to BT decrease, the reduction of blood pH, development of respiratory acidosis and slowing down of oxygen uptake by tissues. These changes may increase the probability of signs of oxidative stress, one of the criteria of which is a change in the ratio of reduced and oxidized glutathione forms (with MW 307.32 and 612.63 g/mol, respectively). The appearance of 650 Da fraction in rat blood under AH, which is close to the oxidized glutathione form, may testify to the oxidative stress development under these conditions.

Molecular fractions with MW 830, 950 and 1,290 Da revealed in rat blood under AH, may correspond to the compounds within the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), having several signaling pathways and implementing many functions in the body [15]. For example, angiotensin (A) I (MW 1296 g / mol), precursor of AII (1046.18 g/mol), has no biological activity, while AIII (931.109 g/mol) and AA (1002,54 g/mol) induce the blood vessel vasoconstriction and BP increase [7]. In addition, A (1–7) (899 g/mol) as a vasodilator, of coronary arteries in particular, in contrast, reduces the probability of ischemia-reperfusion-induced arrhythmias, and improves the myocardial function recovery after ischemia [10]. We should mention another compound: Alamandine (855.011 g/mol), which simulates the regulation of peripheral





моль) – не має біологічної активності, в той самий час як АІІ (931,109 г/моль) і АА (1002,54 г/моль) викликають вазоконстрикцію судин і підвищення АТ [10]. Крім того, А(1–7) (899 г/моль) у ролі вазодилататора, зокрема коронарних артерій, навпаки, зменшує ймовірність появи викликаних ішемією-реперфузією аритмій, а також покращує відновлення функції міокарда після ішемії [12]. Слід відзначити ще одну сполуку – Alamandine (855,011 г/моль), яка моделює регуляцію периферичного і центрального кров'яного тиску, а також кардіоваскулярне ремоделювання. Цю сполуку можна «отримати» з діаметрально протилежних за кінцевою дією каскадів – АА і А (1–7) [17].

Поява фракцій 830 і 950 і «зникнення» фракції 1290 Да, які спостерігали у різні терміни за ШГ (таблиця), можуть вказувати на участь РААС у розвитку гіпометаболічних станів і подальше відновлення функціональної активності, зокрема серцево-судинної системи у щурів.

Фракція 1350 Да, яку виявлено тільки у хом'яків за ШГ (таблиця), збігається з такою за м. м. речовини Р (Substance P, 1350 г/моль). Але цей нейропептид родини тахікінінів широко представлений у ЦНС і активно залучається до запального процесу, вивільняється на початковому етапі гострого пошкодження ЦНС, викликає нейрогенну запальну відповідь, яка відзначається збільшенням проникності гематоенцефалічного бар'єра і розвитком вазогенного набряку [22], що є нехарактерним для нормального перебігу зимової сплячки. Однак показано, що концентрація речовини Р у крові збільшується за умов розвитку депресивних станів [5], а у дослідженнях J. A. Tsiouris [36] виявлена подібність розвитку зимової сплячки і депресивних станів.

Фракція 1600 Да (спостерігається тільки у хом'яків усіх експериментальних груп) збігається із м. м. бомбезину (Bombesin (1619,85 г/моль), а м. м. фракції 1140 Да (виявлена в обох видів тварин усіх груп) є близькою за м. м. до бомбезин-подібних пептидів нейромедину (Neuromedin B (1132 г/моль) і попередника гастрин-вивільнюючого пептиду (Gastrin Releasing Peptide (GRP) (18–27), 1120,29 г/моль). Ці речовини беруть участь у реалізації процесів навчання і пам'яті, регуляції тривожності та страху, терморегуляції, споживанні їжі та формуванні стресових відповідей [23, 34]. Відомо, що бомбезину в організмі ссавців немає, однак його гомологи (GRP (18–27) і нейромедин) широко представлені в периферичній та центральній нервових системах. Цікаво відзначити, що експресія нейромедину в гіпофізі регулюється глюкокортикоїдами

and central blood pressure, as well as cardiovascular remodeling. This compound can be 'obtained' from the cascades, diametrically opposite by final action: AA and A (1–7) [15].

The appearance of fractions of 830 and 950 Da and disappearance of that of 1,290 Da, observed within different time periods under AH (Table), may suggest the participation of RAAS in development of hypometabolic conditions and further recovery of functional activity, particularly cardiovascular system in rats.

The fraction of 1,350 Da, which was found in hamsters under AH only (Table) coincided with that by MW of substance P (Substance P, 1,350 g/mol). But this neuropeptide of tachykinin family, widely present in the CNS, is actively involved in inflammatory process. It is released at the initial stage of acute CNS damage, induces a neurogenic inflammatory response, characterized by an increased permeability of the blood-brain barrier and vasogenic edema development [21], that is not typical for normal course of hibernation. Hence, the concentration of substance P in blood was shown to rise in case of development of depressive states [2], and J. A. Tsiouris [36] found a similarity between the development of hibernation and depressive states.

The fraction of 1,600 Da (only observed in hamsters of all experimental groups) coincides with the MW of bombesin (1619.85 g / mol), and the MW of 1,140 Da fraction (found in both animal species of all the groups) is close by MW to bombesin-like peptides: neuromedin (Neuromedin B (1,132 g/mol) and precursor of gastrin-releasing peptide (Gastrin Releasing Peptide (GRP) (18–27), 1120.29 g/mol). These substances are engaged in learning and memory processes, regulation of anxiety and fear, thermoregulation, food consumption and stress response formation [22, 34]. It is known that bombesin is absent in mammal organism, but its homologues (GRP (18–27) and neuromedin) are widely present in peripheral and central nervous systems. Noteworthy, that the neuromedin expression in pituitary gland is regulated by glucocorticoids and corticotropin-releasing hormone [17]. In addition, its expression is well seen in adipose tissue [14], which is also actively involved in metabolism and thermoregulation. It should be noted that the area under peaks of 1,140 Da fraction changes most pronouncedly when hypometabolic states develop in both animal species (Table).

Vasoactive intestinal polypeptide (VIP, MW 3,300 g/mol) is produced in the intestine, pancreas, as well as in suprachiasmatic nuclei of hypothalamus. It is believed that the release of VIP may have an adaptive and compensatory response, pro-



і кортикотропін-релізінг гормоном [19]. Крім того, його експресія добре представлена в жировій тканині [16], яка також активно залучається до реалізації метаболізму та терморегуляцію. Слід зазначити, що площа під піками фракції 1140 Да зазнає найбільш виражених змін за розвитку гіпометаболічних станів у обох видів тварин (таблиця).

Вазоактивний інтестинальний поліпептид (VIP, м. м. 3300 г/моль) продукується в кишечнику, підшлунковій залозі, а також у супрахіазматичних ядрах гіпоталамуса. Вважається, що вивільнення VIP може мати адаптивну і компенсаторну відповідь, що сприяє вазодилатації та поліпшенню перфузії в життєво важливих органах [21]. Фракцію 3330 Да виявлено у крові тварин усіх експериментальних груп.

### Висновки

Таким чином, гель-фільтрація сироватки крові гетеро- (хом'яки) і гомойотермних (щури) тварин контрольної (інтактної) групи в діапазоні м. м. 100–10 000 Да дозволила виявити п'ять (м. м. 530, 1140, 1600, 1980 та 3300 Да) і сім (530, 1140, 1290, 1520, 1880, 3330, 5280 Да) фракцій поліпептидних сполук відповідно. Занурення тварин у гіпометаболічні стани викликало появу нових фракцій молекул із м. м. 1350, 2350 і 6530 Да за ПГ у хом'яків і 650, 830, 950, 2350 і 5110 Да у щурів, а також фракції 5280 Да у хом'яків за умов ШГ. Через 2 години після ШГ у щурів з'являлися сполуки з м. м. 750 і 4030 Да, а через 24 години відновлювалися площі під піками сімох контрольних фракцій до вихідного рівня, а також з'явилася нова фракція 6530 Да, яка спостерігалася й у хом'яків за ПГ.

### Література

1. Ермаков АВ. Диагностические возможности использования метода определения уровня средномолекулярных соединений в практической медицине. Проблемы экспертизы в медицине. 2005; 5(17-1): 27–8.
2. Ломако ВВ, Шило АВ, Коваленко ИФ. Структурно-функциональные изменения в сердце гетеро- и гомойотермных животных при искусственном и естественном гипометаболизме. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2016; 26(4): 308–21.
3. Мельничук СД, Мельничук ДО. Гіпобіоз тварин (молекулярні механізми та практичне значення для сільського господарства і медицини). Київ; 2007. 220 с.
4. Berger S. Extract from blood of hibernation ground squirrels. Fed Proc. 1975; 34(1): 97–102.
5. Bondy B, Baghai TC, Minov C, et al. Substance P serum levels are increased in major depression: preliminary results. Biol Psychiatry. 2003; 53(6): 538–42.

moting vasodilation and improving perfusion in vital organs [20]. Fraction of 3,330 Da was detected in blood of animals from all experimental groups.

### Conclusions

Thus, the gel filtration of serum of hetero- (hamsters) and homeotherms (rats) of the control (intact) group within the range of 100–10,000 Da revealed five (MW 530, 1,140, 1,600, 1,980 and 3,300 Da) and seven (530, 1,140, 1,290, 1,520, 1,880, 3,330, 5,280 Da) fractions of polypeptide compounds, respectively. The entry of animals into hypometabolic states induced the appearance of new molecular fractions with MW 1,350, 2,350 and 6,530 Da under NH in hamsters, and 650, 830, 950, 2,350 and 5,110 Da in rats, as well as fractions of 5,280 Da in hamsters under AH. In 2 hrs after AH in rats, the compounds with MW 750 and 4,030 Da were found, and 24 hrs later the areas under peaks of seven control fractions achieved the initial level, as well as a new fraction of 6,530 Da, observed in hamsters under NH, appeared.

### References

1. Berger S. Extract from blood of hibernation ground squirrels. Fed Proc. 1975; 34(1): 97–102.
2. Bondy B, Baghai TC, Minov C, et al. Substance P serum levels are increased in major depression: preliminary results. Biol Psychiatry. 2003; 53(6): 538–42.
3. Carey HV, Andrews MT, Martin SL. Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. Physiol Rev. 2003; 83: 1153–81.
4. Chien S, Oeltgen PR, Diana JN, et al. Extension of tissue survival time in multiorgan block preparation with a delta opioid DADLE ([D-Ala<sup>2</sup>,D-Leu<sup>5</sup>]-enkephalin). J Thorac Cardiovasc Surg. 1994; 107(3): 964–7.
5. Choukèr A, Bereiter-Hahn J, Singer D, Heldmaier G. Hibernating astronauts –science or fiction? Pflugers Arch. 2019; 471(6): 819–28.
6. Clark WR, Winchester JF. Middle molecules and small-molecular-weight proteins in ESRD: properties and strategies for their removal. Adv Ren Replace Ther. 2003; 10(4): 270–8.
7. Coutinho DCO, Foureaux G, Rodrigues KDL, et al. Cardiovascular effects of angiotensin A: A novel peptide of the renin–angiotensin system. J Renin Angiotensin Aldosterone Sys. 2014; 15(4): 480–6.
8. Dawson TJ. Induction of mammalian hibernation trigger. In: Bligh J, Moore RE, editors. Essays on temperature regulation. Amsterdam: North Holland Publ; 1972. p. 1–18.
9. Ermakov AV. [Diagnostic possibilities investigation of median-mass substances]. Medical examination problems. 2005; 5 (17–1): 27–8. Russian.
10. Ferreira AJ, Jacoby BA, Araújo CA, et al. The nonpeptide angiotensin-(1–7) receptor Mas agonist AVE-0991 attenuates



6. Carey HV, Andrews MT, Martin SL. Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. *Physiol Rev.* 2003; 83: 1153–81.
7. Chien S, Oeltgen PR, Diana JN, et al. Extension of tissue survival time in multiorgan block preparation with a delta opioid DADLE ([D-Ala<sup>2</sup>,D-Leu<sup>5</sup>]-enkephalin). *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1994; 107(3): 964–7.
8. Choukèr A, Bereiter-Hahn J, Singer D, Heldmaier G. Hibernating astronauts – science or fiction? *Pflugers Arch.* 2019; 471(6): 819–28.
9. Clark WR, Winchester JF. Middle molecules and small-molecular-weight proteins in ESRD: properties and strategies for their removal. *Adv Ren Replace Ther.* 2003; 10(4): 270–8.
10. Coutinho DCO, Foureaux G, Rodrigues KDL, et al. Cardiovascular effects of angiotensin A: a novel peptide of the renin-angiotensin system. *J Renin Angiotensin Aldosterone Sys.* 2014; 15(4): 480–6.
11. Dawson TJ. Induction of mammalian hibernation trigger. In: Bligh J, Moore RE, editors. *Essays on temperature regulation.* Amsterdam: North Holland Publ; 1972. p. 1–18.
12. Ferreira AJ, Jacoby BA, Araújo CA, et al. The nonpeptide angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist AVE-0991 attenuates heart failure induced by myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 292(2): H1113–H1119.
13. Fischer R, Bowness P, Kessler BM. Two birds with one stone: Doing metabolomics with your proteomics kit? *Proteomics.* 2013; 13(23–24): 3371–86.
14. Gonzalez-Riano C, León-Espinosa G, Regalado-Reyes M, et al. Metabolomic study of hibernating syrian hamster drains: in search of neuroprotective agents. *J Proteome Res.* 2019; 18(3): 1175–90.
15. Haddad GG, Lasala PA. Effect of parasympathetic blockade on ventilatory and cardiac depression induced by opioids. *Respiration Physiology.* 1987; 67(1): 101–14.
16. Hoggard N, Bashir S, Cruickshank M, et al. Expression of neuromedin B in adipose tissue and its regulation by changes in energy balance. *J Mol Endocrinol.* 2007; 39(3): 199–210.
17. Hrenak J, Paulis L, Simko F. Angiotensin A/Alamandine/MrgD axis: another clue to understanding cardiovascular pathophysiology. *Int J Mol Sci [Internet].* 2016 [cited 04.10.2019]; 17(7): E1098. Available from: [https://pdfs.semanticscholar.org/f561/9917b4fe72687231750614400ec55a321274.pdf?\\_ga=2.125118346.1246028778.1632227136-196787233.1632227136](https://pdfs.semanticscholar.org/f561/9917b4fe72687231750614400ec55a321274.pdf?_ga=2.125118346.1246028778.1632227136-196787233.1632227136)
18. Kalter VG, Folk GE. Humoral induction of mammalian hibernation. *Comp Biochem Physiol.* 1979; 63A(1): 7–13.
19. Kameda H, Miyoshi H, Shimizu C, et al. Expression and regulation of neuromedin B in pituitary corticotrophs of male melanocortin 2 receptor-deficient mice. *Endocrinology.* 2014; 155(7): 2492–9.
20. Kondo N, Sekijima T, Kondo J, et al. Circannual control of hibernation by HP complex in the brain. *Cell.* 2006; 125(1): 161–72.
21. Li X, Lu WC, Zhu YJ. [The relation of vasoactive intestinal peptide and acute hypoxia]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi.* 1990; 29(1): 8–10, 59. Chinese.
22. Lorente L, Martín MM, Almeida T, et al. Serum substance P levels are associated with severity and mortality in patients with severe traumatic brain injury. *Crit Care. [Internet]* 2015 Apr 27 [cited 2019 May 5]; 19(1): 192. Available from: <https://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13054-015-0911-z>
23. Majumdar ID, Weber C. Biology of mammalian bombesin-like peptides and their receptors. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2011; 18: 68–74.
24. Martin SL, Epperson LE, Rose JC, et al. Proteomic analysis of the winter-protected phenotype of hibernating ground squirrel intestine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008; 295: R316–28.
25. heart failure induced by myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 292(2): H1113–H1119.
26. Fischer R, Bowness P, Kessler BM. Two birds with one stone: Doing metabolomics with your proteomics kit? *Proteomics.* 2013; 13(23–24): 3371–86.
27. Gonzalez-Riano C, León-Espinosa G, Regalado-Reyes M, et al. Metabolomic study of hibernating syrian hamster brains: in search of neuroprotective agents. *J Proteome Res.* 2019; 18(3): 1175–90.
28. Haddad GG, Lasala PA. Effect of parasympathetic blockade on ventilatory and cardiac depression induced by opioids. *Respiration Physiology.* 1987; 67(1): 101–14.
29. Hoggard N, Bashir S, Cruickshank M, et al. Expression of neuromedin B in adipose tissue and its regulation by changes in energy balance. *J Mol Endocrinol.* 2007; 39(3): 199–210.
30. Hrenak J, Paulis L, Simko F. Angiotensin A/Alamandine/MrgD axis: another clue to understanding cardiovascular pathophysiology. *Int J Mol Sci [Internet].* 2016 [cited 04.10.2019]; 17(7): E1098. Available from: [https://pdfs.semanticscholar.org/f561/9917b4fe72687231750614400ec55a321274.pdf?\\_ga=2.125118346.1246028778.1632227136-196787233.1632227136](https://pdfs.semanticscholar.org/f561/9917b4fe72687231750614400ec55a321274.pdf?_ga=2.125118346.1246028778.1632227136-196787233.1632227136)
31. Kalter VG, Folk GE. Humoral induction of mammalian hibernation. *Comp Biochem Physiol.* 1979; 63A(1): 7–13.
32. Kameda H, Miyoshi H, Shimizu C, et al. Expression and regulation of neuromedin B in pituitary corticotrophs of male melanocortin 2 receptor-deficient mice. *Endocrinology.* 2014; 155(7): 2492–9.
33. Kondo N, Sekijima T, Kondo J, et al. Circannual control of hibernation by HP complex in the brain. *Cell.* 2006; 125(1): 161–72.
34. Li X, Lu WC, Zhu YJ. [The relation of vasoactive intestinal peptide and acute hypoxia]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi.* 1990; 29(1): 8–10, 59. Chinese.
35. Lorente L, Martín MM, Almeida T, et al. Serum substance P levels are associated with severity and mortality in patients with severe traumatic brain injury. *Crit Care. [Internet]* 2015 Apr 27 [cited 2019 May 5]; 19(1): 192. Available from: <https://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13054-015-0911-z>
36. Majumdar ID, Weber HC. Biology of mammalian bombesin-like peptides and their receptors. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2011; 18: 68–74.
37. Martin SL, Epperson LE, Rose JC, et al. Proteomic analysis of the winter-protected phenotype of hibernating ground squirrel intestine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008; 295: R316–28.
38. Melnichuck SD, Melnichuck DS. [Hypobiosis in animals (molecular mechanisms and practical significance for agriculture and medicine)]. Kyiv; 2007. 220 p. Ukrainian.
39. Nelson CJ, Otis JP, Martin SL, Carey HV. Analysis of the hibernation cycle using LC-MS-based metabolomics in ground squirrel liver. *Physiol Genomics.* 2009; 37: 43–51.
40. Newgard CB. Metabolomics and metabolic diseases: where do we stand? *Cell Metab.* 2017; 25(1): 43–56.
41. Ohwatori N, Yamauchi M, Shimazu M, et al. Analysis of body temperature and blood protein in hypothermic Syrian hamsters and rats. In: Milton AS, editor. *Temperature regulation. Advances in pharmacological sciences.* Basel: Birkhäuser; 1994. p. 8792.
42. Rinschen MM, Ivanisevic J, Giera M, Siuzdak G. Identification of bioactive metabolites using activity metabolomics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019; 20(6): 353–67.

25. Martins-de-Souza D. Proteomics, metabolomics, and protein interactomics in the characterization of the molecular features of major depressive disorder. *Dialogues Clin Neurosci.* 2014; 16(1): 63–73.
26. Nelson CJ, Otis JP, Martin SL, Carey HV. Analysis of the hibernation cycle using LC-MS-based metabolomics in ground squirrel liver. *Physiol Genomics.* 2009; 37: 43–51.
27. Newgard CB. Metabolomics and metabolic diseases: where do we stand? *Cell Metab.* 2017; 25(1): 43–56.
28. Ohwatari N, Yamauchi M, Shimazu M, et al. Analysis of body temperature and blood protein in hypothermic Syrian hamsters and rats. In: Milton AS, editor. *Temperature regulation. Advances in pharmacological sciences.* Basel: Birkhäuser; 1994. p. 87–92.
29. Rinschen MM, Ivanisevic J, Giera M, Siuzdak G. Identification of bioactive metabolites using activity metabolomics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019; 20(6): 353–67.
30. Ross AP, Drew KL. Potential for discovery of neuroprotective factors in serum and tissue from hibernating species. *Mini Rev Med Chem.* 2006, 6(8): 875–84.
31. Schaz K, Stock G, Simon W, et al. Enkephalin effects on blood pressure, heart rate, and baroreceptor reflex. *Hypertension.* 1980; 2(4): 395–407.
32. Seldin MM, Byerly MS, Petersen PS, et al. Seasonal oscillation of liver-derived hibernation protein complex in the central nervous system of non-hibernating mammals *J Exp Biol.* 2014; 217(15): 2667–79.
33. Shao C, Liu Y, Ruan H, et al. Shotgun proteomics analysis of hibernating Arctic Ground Squirrels. *Mol Cell Proteomics.* 2010; 9(2): 313–26.
34. Shimizu T, Shimizu S, Higashi Y, et al. A stress-related peptide bombesin centrally induces frequent urination through brain bombesin receptor types 1 and 2 in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 2016; 356(3): 693–701.
35. Srere HK, Belke D, Wang LC, Martin SL. Alpha 2-Macroglobulin gene expression during hibernation in ground squirrels is independent of acute phase response. *Am J Physiol.* 1995; 268 (6, Pt 2): R1507–R1512.
36. Tsiouris JA. Metabolic depression in hibernation and major depression: an explanatory theory and an animal model of depression. *Med Hypotheses.* 2005; 65(5): 829–40.
37. Vybiral S, Janský L. Hibernation triggers and cryogens: do they play a role in hibernation? *Comp Biochem Physiol Part A: Physiology.* 1997; 118(4): 1125–33.
38. Wilderman MJ, Armstead WM. Role of neuronal NO synthase in relationship between NO and opioids in hypoxia-induced pial artery dilation. *Am J Physiol.* 1997; 273 (Heart Circ Physiol. 42): H1807–H1815.
39. Williams DR, Epperson LE, Li W, et al. Seasonally hibernating phenotype assessed through transcript screening. *Physiol Genomics.* 2005; 24: 13–22.
40. Zamboni N, Saghatelian A, Patti GJ. Defining the metabolome: size, flux, and regulation. *Mol Cell.* 2015; 58: 699–706.

