

УДК 591.128:591.436:591.543.42

В.В. Ломако*, А.В. Шило

Морфологические изменения в печени гомойо- и гетеротермных животных при искусственном и естественном гипометаболизме

UDC 591.128: 591.436: 591.543.42

V.V. Lomako*, A.V. Shilo

Morphological Changes in Liver of Homeo- and Heterothermic Animals Under Artificial and Natural Hypometabolism

Реферат: Изучали морфологические изменения в печени крыс (*Rattus norvegicus*) и хомяков (*Mesocricetus auratus*) при искусственном (гипоксически-гиперкапническая модель) (ИГМ) и естественном (гибернация) (ЕГМ) гипометаболизме, через 2 и 24 ч после пробуждения. Наблюдались гиперемия сосудов и тромбы в них (при ИГМ у хомяков на всех этапах наблюдения, у крыс – через 24 ч); расширение интерстициальных пространств (у хомяков при ИГМ); гепатоциты с ядрами на разных стадиях некробиоза (кариопикноз, кариорексис и кариолизис) (при ЕГМ, через 2 и 24 ч после ИГМ у обоих видов); признаки белковой дистрофии разного типа и степени выраженности (при ЕГМ и ИГМ у хомяков и через 2 и 24 ч после ИГМ у обоих видов); инфильтрация ткани лейкоцитами (только у хомяков при ИГМ, ЕГМ и через 24 ч после ЕГМ); двоядерные гепатоциты (у крыс при ИГМ и через 24 ч, у хомяков при ЕГМ и через 24 ч). Уровень общего протеина в печени был увеличен при ИГМ и через 24 ч после ИГМ у обоих видов, а также при ЕГМ у хомяков. На этих этапах наблюдали активацию дегенеративно-дистрофических процессов (фанероз) или появление двоядерных гепатоцитов (активация синтеза белка).

Ключевые слова: гибернация, искусственный гипометаболизм, печень, крысы, хомяки.

Реферат: Вивчали морфологічні зміни в печінці щурів (*Rattus norvegicus*) і хом'яків (*Mesocricetus auratus*) при штучному (гіпоксично-гіперкапнічна модель) (ШГМ) і природному (гібернація) (ПГМ) гіпометаболізмі, через 2 і 24 години після пробудження. Спостерегалися гіперемія судин і тромби в них (при ШГМ у хом'яків на всіх етапах спостереження, у щурів – через 24 години); розширення інтерстиціальних просторів (у хом'яків при ШГМ), гепатоцити з ядрами на різних стадіях некробиозу (каріопікноз, каріорексис і каріолізис) (при ПГМ, через 2 і 24 години після ШГМ у обох видів); ознаки білкової дистрофії різного типу та ступеня виразності (при ПГМ і ШГМ у хом'яків та через 2 і 24 години після ШГМ у обох видів); інфільтрація тканини лейкоцитами (тільки у хом'яків: при ШГМ, ПГМ і через 24 години після ПГМ); двоядерні гепатоцити (у щурів при ШГМ і через 24 години, у хом'яків при ПГМ і через 24 години). Рівень загального протеїну в печінці був збільшений при ШГМ і через 24 години після ШГМ у обох видів, а також при ПГМ у хом'яків. Саме на цих етапах спостерегали активацію дегенеративно-дистрофічних процесів (фанероз) або появу двоядерних гепатоцитів (активація синтезу білка).

Ключові слова: гібернація, штучний гіпометаболізм, печінка, щури, хом'яки.

Abstract: Morphological changes in liver of rats (*Rattus norvegicus*) and hamsters (*Mesocricetus auratus*) were studied under artificial (hypoxic-hypercapnic model) (AHM) and natural (hibernation) (NHM) hypometabolism and at the recovery stages (2 and 24 hrs after arousal). The following changes in liver morphology were observed: blood vessel hyperemia and blood thrombus formation (under AHM at all the stages in hamsters and 24 hrs after AHM in rats); the interstitial space expansion (in hamsters under AHM); hepatocytes with nuclei at different stages of necrobiosis (karyopyknosis, karyorrhexis and karyolysis) under NHM, in 2 and 24 hrs after AHM in both species; signs of protein dystrophies of various types and severity degrees (under NHM and AHM in hamsters, and 2 and 24 hrs after AHM in both species); tissue leukocyte infiltration (only in hamsters under AHM, NHM and 24 hrs after NHM); binuclear hepatocytes (in rats at AHM and 24 hrs later, in hamsters under NHM and 24 hrs later). The total protein content in liver was increased under AHM and 24 hrs after AHM in both species, as well as under NHM in hamsters. At these stages either the activation of degenerative and dystrophic processes (decomposition) or the appearance of binuclear hepatocytes (activation of protein synthesis) were observed.

Key words: hibernation, artificial hypometabolism, liver, rats, hamsters.

Естественные гипометаболические состояния (ЕГМ), в частности гибернация, свойственные некоторым видам млекопитающих, сопровождаются обратимым подавлением метаболизма, характеризуются длительным сохранением жизнеспособности организма при околонулевых температурах тела (ТТ) и окружающей среды без пищи и

Natural hypometabolic states (NHM), hibernation in particular, inherent in some mammals, are accompanied by a reversible suppression of metabolism, and characterised by a sustained survival of an organism without food and water at near-zero temperatures of body (BT) and environment. The hibernation is a discontinuous process, consisting of the periods of

Отдел криофизиологии, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

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

*Автор, которому необходимо отправлять корреспонденцию:

ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52,
электронная почта: victoria0regia@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:

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

Поступила 21.02.2017

Принята в печать 20.03.2017

Received February, 21, 2017

Accepted March, 20, 2017

© 2017 V.V. Lomako 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.

воды. Гибернация – процесс прерывистый, состоящий из периодов торпидности (гипотермии) и пробуждений, чередование и длительность которых зависят от вида животного и условий среды. При гибернации метаболизм, ТТ, сердечные и дыхательные ритмы, а также другие показатели жизнедеятельности снижаются до уровня, являющегося летальным для гомойотермного организма, поскольку в этом случае глубокая гипотермия необратимо подавляет жизненно важные функции. В период пробуждения функции организма восстанавливаются достаточно быстро, а задействованные при этом механизмы могут затрагивать клеточные и системные регуляторные пути, характерные и для организмов, которые не способны к гибернации [18, 24]. В частности, Т. Oda и соавт. [27] установили, что изменения протеома (совокупность экспрессированных протеинов) в печени у анестезированных крыс при глубокой гипотермии сходны с таковыми в разных клетках у гибернирующих млекопитающих, за исключением шаперонов эндоплазматического ретикулаума.

Особую роль при гипотермии играет состояние органов, непосредственно участвующих в поддержании гомеостаза организма, в том числе температурного. Одним из таких органов является печень. При гибернации печень животного, как и желудочно-кишечный тракт, не испытывает нагрузок, связанных с пищеварением, в этих условиях повышается роль печени как депонирующего и теплопродуцирующего органа с высоким энергетическим потенциалом. На морфологическом уровне это проявляется в кровенаполнении сосудов и прилежащих к ним синусоидов, увеличении запасов гликогена и липидов; при этом паренхима печени находится в состоянии гипобиоза [3, 6, 7]. Кроме того, по данным электронной микроскопии у сусликов (*Citellus undulatus*) при гибернации отмечается активация митохондриального и лизосомального аппаратов гепатоцитов, что рассматривается как важнейший элемент адаптации к холоду [3].

Результаты исследований J.L. Frehn и J.A. Thomas [19] показывают, что физиологические и морфологические изменения у гибернирующих хомяков (*Mesocricetus auratus*) отличаются от таковых у хомяков, подвергшихся холодовой экспозиции, но не погружившихся в состояние гибернации. В частности, митохондриальная активность в печени гибернирующих хомяков снижается, а после холодовой экспозиции – повышается.

Печень гибернирующих сусликов (*Ictidomys tridecemlineatus*) устойчива к действию ишемии-реперфузии *ex vivo* в отличие от активных летних сусликов, однако у активных весенних сусликов апоптотический индекс в гепатоцитах выше [28].

torpidity (hypothermia) and arousals, the alternation and duration of which depend on animal species and environmental conditions. Under hibernation the metabolism, BT, heart and respiratory rhythms, as well as other indices of vital activity, are reduced down to the level, usually being lethal for homeotherms, since in this case, the vital functions are irreversibly suppressed by a deep hypothermia. During arousal period the body functions are quite quickly restored, and the mechanisms involved in it may affect the cell and systemic regulatory pathways, being characteristic for the organisms incapable of hibernation as well [5, 19]. In particular, T. Oda *et al.* [22] established the changes in proteome (the entire set of expressed proteins) in liver of anaesthetised rats under deep hypothermia to be similar to those in different cells of hibernating mammals, excepting endoplasmic reticulum chaperones.

The state of organs, directly involved into maintaining the body's homeostasis, including a temperature one, is essential for hypothermia. The liver is one of these organs. Under hibernation both liver and gastrointestinal tract of an animal do not participate in digestion. Under these conditions the liver is mainly a depositing and heat-producing organ with a high energy potential. This is morphologically manifested in blood filled vessels and adjacent sinusoids, increased glycogen and lipid stocks; hereat the liver parenchyma is in a hypobiotic state [7, 12, 13]. Moreover, an electron microscopy allowed to reveal the activation of mitochondrial and lysosomal apparatus of hepatocytes in ground squirrels (*Citellus undulatus*) during hibernation, and this was considered as the most important element in cold adaptation [7].

J.L. Frehn and J.A. Thomas [6] showed that physiological and morphological changes in hibernating hamsters (*Mesocricetus auratus*) differed from those in the hamsters experienced a cold exposure, but not entered the hibernation. In particular, a mitochondrial activity in the liver of hibernating hamsters reduced, while after a cold exposure it increased.

The liver of hibernating ground squirrels (*Ictidomys tridecemlineatus*) is resistant to ischemia and reperfusion *ex vivo* in contrast to the active summer ground squirrels, however in the active spring animals a hepatic apoptotic index is higher [23]. There were revealed the liver-specific temperature-dependent molecular processes, resulting in a decreased mitochondrial respiration during the daily torpor in Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*) [14]. A decreased metabolism in mammalian organism during torpor is also accompanied by a reversible suppression of mitochondrial respiration rate. For example, in ground squirrels (*Ictidomys tridecemlineatus*) liver it makes 70% [3]. The strongly pronounced seasonal changes in the lipid/



Выявлены специфические для печени температурозависимые молекулярные процессы, приводящие к снижению митохондриального дыхания во время ежедневного торпора у джунгарских хомяков (*Phodopus sungorus*) [22]. Снижение метаболизма в организме млекопитающих в течение торпора сопровождается также обратимым подавлением уровня дыхания митохондрий. Так, у сусликов (*Ictidomys tridecemlineatus*) в печени он составляет 70% [16]. Резко выраженные сезонные изменения соотношения липид/протеин в микросомальной фракции печени свидетельствуют об участии липидов этой фракции печени в адаптации суслика (*Spermophilus undulatus*) к гибернации [12].

В работах А. Jani и соавт., S.L. Lindell и соавт. [20, 23] отмечено, что гибернация представляет собой уникальную естественную модель длительного хранения органов и трансплантации органов, когда торпор (состояние оцепенения и гипотермии) можно рассматривать как естественный эквивалент хранения почки донора при 4°C, а пробуждение от спячки – как естественный эквивалент «тепловой» реперфузии, проявляющейся при трансплантации органа реципиенту. Кроме того известно, что печень способна активно регенерировать.

Приведенные выше факты свидетельствуют о том, что в цикле гибернации, сопровождающемся, в частности, гипотермией организма, печень претерпевает значительные изменения, которые могут отражаться на ее структуре, поскольку сохранность структуры является необходимым условием для нормального функционирования органа.

Цель работы – сравнительное изучение морфологических изменений в ткани печени крыс (при искусственном гипометаболизме) и хомяков (при искусственном и естественном (гибернация) гипометаболизме), а также на этапах восстановления после пробуждения (через 2 и 24 ч после выхода из гипометаболизма).

Материалы и методы

Эксперименты проводили в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными VI Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2016) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986), а также с требованиями комитета по биоэтике (ИПККиК НАН Украины, Харьков). Работу выполняли в осенне-зимний период на самцах золотистых хомяков (*Mesocricetus auratus*) (масса 85–95 г; $n = 30$) и самцах беспородных белых крыс (*Rattus norvegicus*) (масса 180–220 г; $n = 20$). До начала эксперимента животных содержали в условиях вивария при естест-

protein ratio in microsomal fraction of liver evidence involvement of lipids of this liver fraction in ground squirrel (*Spermophilus undulatus*) during adaptation to hibernation [24].

In the papers of A. Jani *et al.*, S.L. Lindell *et al.* [8, 15] the hibernation was reported to be the unique natural model for a long-term organ storage and transplantation, when the torpor (state of stupor and hypothermia) might be considered as a natural equivalent of donor's kidney storage at 4°C and arousal from hibernation as a natural equivalent to warm reperfusion, occurring during organ transplantation to a recipient. In addition, the liver is known to be capable of active regeneration.

The mentioned above testifies to the fact, that during hibernation, accompanied, in particular, by a body's hypothermia, the liver undergoes significant changes, likely affecting its structure, since integrity of the latter is a necessary condition for normal functioning of the organ.

This research aim was a comparative study of morphological changes in liver tissue of rats (at artificial hypometabolism) and hamsters (at artificial and natural (hibernation) hypometabolism), as well as at the recovery stages after arousal (2 and 24 hrs later arousal from hypometabolism).

Materials and methods

The experiments were carried out according to the General Principles of Experiments in Animals approved by the 6th National Congress in Bioethics (Kyiv, 2016) and agreed to the statements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986), as well as with the requirements of the Committee in Bioethics (Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Kharkiv). This research was performed during the autumn-winter period in male golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) (weight 85–95 g; $n = 30$) and outbred white male rats (*Rattus norvegicus*) (weight 180–220 g; $n = 20$). The animals before the experiment were housed at the animal facility with natural light/dark cycle and a standard diet *ad libitum* enriched with wheat and sunflower seeds.

Before entering the NHM state hamsters were placed into individual cages, their diet was deprived of juicy food, the animals were provided with nesting material (sawdust and hay), and then transferred into a dark room with air temperature of $(5 \pm 2)^\circ\text{C}$ (industrial cooling chamber of 20 m³ volume with automatic temperature control). Hamsters entered hibernation after 10–14 days. An average bout duration was (3 ± 0.5) days.

The state of artificial hypometabolism (AHM) was simulated using the 'closed vessel' method [18]. Animals in a sealed vessel (3 and 2 dm³ volume for rats



венном световом режиме на стандартном рационе *ad libitum* с добавлением зерен пшеницы и семян подсолнечника.

Хомяков перед погружением в состояние ЕГМ рассаживали в индивидуальные клетки, из рациона исключали сочную пищу, снабжали гнездовым материалом (древесные опилки и сено) и переносили в темное помещение с температурой воздуха (5 ± 2)°C (промышленная холодильная камера объемом 20 м³ с автоматической регулировкой температуры). Хомяки погружались в спячку через 10–14 суток. Средняя длительность баута составляла ($3 \pm 0,5$) суток.

Состояние искусственного гипометаболизма (ИГМ) моделировали с помощью метода «закрытого сосуда», подробно описанного нами ранее [10]. Животных в герметически закрытом сосуде (объемом 3 дм³ – для крыс и 2 дм³ – для хомяков) помещали в темную холодильную камеру (2–5°C). Находясь в условиях пониженной температуры и нарастающей гипоксии-гиперкапнии, животные постепенно (в течение 2,5–3 ч) погружались в состояние, сходное по физиологическим параметрам с естественной гибернацией.

Животных ($n = 5$ в каждой экспериментальной группе) выводили из эксперимента путем декапитации, материал забирали у интактных животных (контрольная группа), при достижении гипометаболических состояний (ИГМ и ЕГМ), а также на этапах восстановления (через 2 и 24 ч после выхода из гипометаболизма). Для морфологического исследования забирали стандартизированный участок левой доли печени животного.

Гистологическое исследование проводили по стандартной методике [2]: ткань фиксировали в 10%-м растворе нейтрального формалина в течение 24 ч. После отмывания фиксированный материал обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали парафином. Полученные срезы толщиной 6–8 мкм окрашивали гематоксилином и эозином.

Препараты изучали и фотографировали с помощью микроскопа «Axio Observer Z1» («Carl Zeiss», Германия) с программным обеспечением для анализа изображений «AxioVision Rel. 4.8» («Carl Zeiss»). При морфологическом исследовании визуально оценивали состояние гистологических образцов печени (кровенаполнение сосудов, состояние структурных компонентов, периваскулярных и интерстициальных пространств, гепатоцитов и их ядер, наличие дегенеративно-дистрофических изменений и др.). Содержание общего протеина в 10%-х гомогенатах ткани печени определяли методом Бредфорда [15]. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили методом Манна-Уитни.

and hamsters, respectively) were placed into a dark cooling chamber (2...5°C). Being under reduced temperature and increasing hypoxia-hypercapnia, the animals gradually (within 2.5–3 hrs) entered the state, similar by physiological parameters to natural hibernation.

The animals ($n = 5$ in each experimental group) were decapitated, the material was procured from the intact animals (the control group), from the animals achieved the hypometabolic state (AHM and NHM), as well as those at the recovery stages (in 2 and 24 hrs after arousal from hypometabolism). The same site of left hepatic lobe was taken for morphological examination in all the animals.

Histological examination was performed according to the standard technique [29]: the tissue was fixed in 10% neutral formalin solution within 24 hrs. After washing the fixed material was dehydrated in alcohols of increasing concentration and embedded into paraffin. The obtained sections of 6–8 μm thickness were stained with hematoxylin and eosin.

The preparations were studied and photographed with the microscope Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Germany) equipped with the image analysis software AxioVision Rel. 4.8 (Carl Zeiss). The state of liver histological samples (blood filling of vessels, state of structural components, perivascular and interstitial spaces, hepatocytes and their nuclei, the presence of degenerative and dystrophic changes *etc.*) was visually assessed during morphological examination. The total protein content in 10% homogenates of liver tissues was determined by the Bradford assay [2]. For statistical data processing we used the Mann-Whitney test.

Results and discussion

The analysis of liver histological preparations showed no changes revealed in rats under AHM as compared to the control, except the presence of binuclear hepatocytes (Fig. 1A), whereas in hamsters under AHM we observed the thrombi in vessels, rare foci of protein dystrophy, increased interstitial spaces, groups of cells with small round nuclei (possibly, leukocyte infiltration) (Fig. 1B, in the center). Multiple foci of protein dystrophy, a large number of hepatocytes with nuclei at different stages of necrobiosis (karyopyknosis, karyorrhesis and karyolysis) were found in liver tissue of rats (Fig. 2A) and hamsters (Fig. 2B) 2 hrs later arousal from AHM. In hamsters we also observed a venous hyperemia and thrombi in some vessels (Fig. 2B), resulting from a decelerated blood circulation and disordered blood outflow. In rat and hamster liver tissue (Fig. 3, respectively) 24 hrs later arousal from AHP the degenerative and dystrophic changes were enhanced. For example, the signs of all kinds of protein dystrophies such as granular, hyaline-droplet and hydropic (cytoplasm ‘vacuolisation’) ones were observed in hepa-



Результаты и обсуждение

Анализ гистологических препаратов печени показал, что у крыс при ИГМ изменений по сравнению с контролем выявлено не было, кроме наличия двуядерных гепатоцитов (рис. 1, А), тогда как у хомяков при ИГМ наблюдались тромбы в сосудах, незначительные очаги белковой дистрофии, увеличение интерстициальных пространств, скопление клеток с мелкими круглыми ядрами (возможно, инфильтрация лейкоцитов) (рис. 1, В (в центре)). В ткани печени крыс (рис. 2, А) и хомяков (рис. 2, В) через 2 ч после выхода из ИГМ определялись множественные очаги белковой дистрофии, большое количество гепатоцитов с ядрами на разных стадиях некробиоза (кариопикноз, кариорексис и кариолизис). У хомяков также наблюдали венозную гиперемия и тромбы в части сосудов (рис. 2, В), что является следствием замедления кровообращения и нарушения оттока крови. В ткани печени крыс (рис. 3, А) и хомяков (рис. 3, В) через 24 ч после выхода из ИГМ дегенеративно-дистрофические изменения усиливались. Так, в гепатоцитах наблюдались признаки всех видов белковых дистрофий – зернистая, гиалиново-капельная и гидропическая («вакуолизация» цитоплазмы). Изменения были более выражены на периферии (вблизи сосудов они отсутствовали или менее заметны); сохранялись гиперемия сосудов и тромбы в них, большое количество гепатоцитов с ядрами на всех стадиях некробиотического процесса. Признаки и причины возникновения дистрофий, а также процессы тромбообразования подробно описаны нами ранее [10]. Кроме того, в ткани печени крыс наблюдали большое количество двуядерных гепатоцитов, что свидетельствует об усилении активности белок-синтезирующего аппарата клетки.

При ЕГМ (гибернация) у хомяков (рис. 4, А) также наблюдали дистрофические изменения в гепатоцитах (в основном признаки гидропической белковой дистрофии), которые ближе к сосудам отсутствовали. Ядра некоторых гепатоцитов были на стадиях кариопикноза и кариорексиса. Также отмечали большое количество двуядерных гепатоцитов, что наряду с активацией синтеза белка характеризуется как одно из проявлений компенсаторно-приспособительных реакций. Кроме того, в поле зрения обнаружены скопления круглоядерных клеток (возможно, лейкоцитов). Через 24 ч после выхода из гибернации в ткани печени хомяков (рис. 4, В) наблюдались двуядерные клетки и незначительные локальные дистрофические изменения на периферии, возле сосудов сохранялась инфильтрация круглоядерных клеток.

Выявленные нами дегенеративно-дистрофические изменения в печени при гипометаболи-

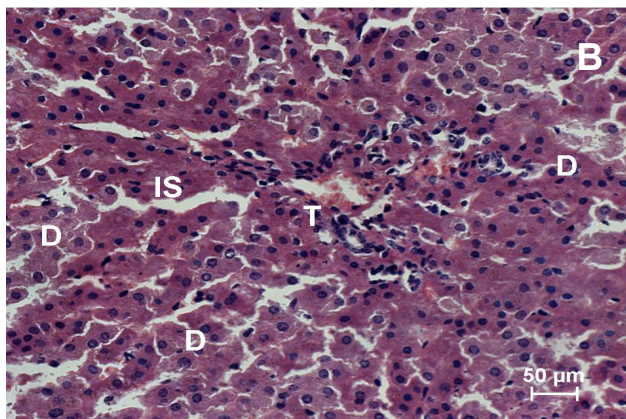
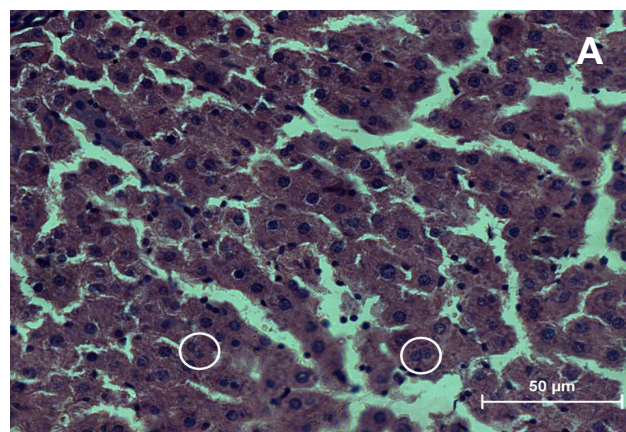


Рис. 1. Ткань печени крысы (А) и хомяка (В) при ИГМ: D – признаки белковой дистрофии; Т – тромб; IS – интерстициальное пространство; белым контуром показаны двуядерные гепатоциты. Окраска гематоксилином и эозином.

Fig. 1. Liver tissue of rat (A) and hamster (B) under AHM: D points to protein dystrophy signs; T is thrombus; IS is interstitial space; white contour shows binuclear hepatocytes. H&E stain.

toocytes. The changes were more pronounced at the periphery (they were either absent or less visible near the vessels); the hyperemia and thrombosis of blood vessels, a large number of hepatocytes with nuclei at all the stages of necrobiotic process were also present. The signs and causes of dystrophy occurrence, as well as the thrombolization were described in details previously [18]. In addition, we observed a large number of binuclear hepatocytes in rat liver tissue, which testified to an enhanced activity of protein-synthesising apparatus of cell.

Under NHM (hibernation) in hamsters (Fig. 4A) we also noted dystrophic changes in hepatocytes (mainly signs of hydropic protein dystrophy), being absent near the vessels. The nuclei of some hepatocytes were karyopyknotic and karyorrhectic. There was also observed a large number of binuclear hepatocytes, being one of the manifestations of compensatory and adaptive responses along with the protein synthesis activation. In addition, the clusters of round-nuclei cells (possibly,

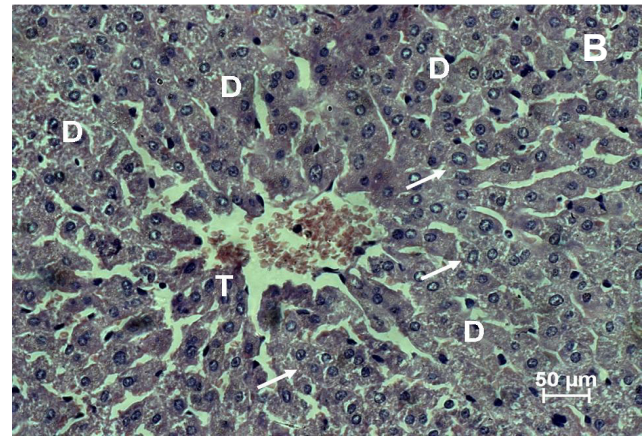
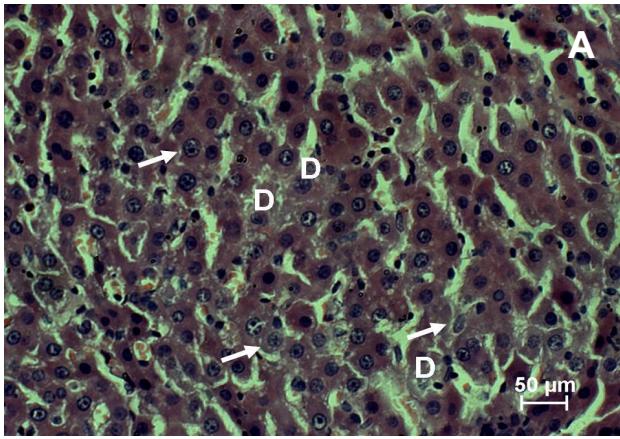


Рис. 2. Ткань печени крысы (А) и хомяка (В) через 2 ч после ИГМ: D – признаки белковой дистрофии; Т – тромб; стрелками указаны ядра гепатоцитов на разных стадиях некробиоза (кариопикноз, кариорексис, кариолизис). Окраска гематоксилином и эозином.

Fig. 2. Liver tissue of rat (A) and hamster (B) 2 hrs after AHM: D points to protein dystrophy signs; T is thrombus; arrows indicate hepatocyte nuclei at different necrobiotic stages (karyopyknosis, karyorrhesis, karyolysis). H&E stain.

ческих состояниях (см. рис. 1; 4, А) скорее всего связаны с нарушением кровотока, имеют компенсаторно-приспособительный характер и обратимы у гетеротермных хомяков после восстановления температуры тела и кровообращения (рис. 4, В). Регенераторные реакции гепатоцитов проявлялись в усилении их митотической активности, особенно в периполярной зоне. Здесь же увеличивалось количество двуядерных гепатоцитов. У всех животных отмечалось нарушение гемодинамики – неравномерное полнокровие синусоидов, центральных и портальных вен.

Полученные нами данные согласуются с результатами исследований, проведенных на гибернарующих длиннохвостых сусликах (*Citellus undulatus*) [3, 6, 7], в ткани печени которых были отмечены признаки редукции кровотока и застойные явления в сосудистой системе. Отмечалась дегидратация печени, гепатоциты характеризовались полиморфизмом: наблюдали гипертрофированные, дистрофически и апоптотически измененные, двуядерные, полиплоидные клетки, а также гепатоциты на разных стадиях митоза. Кроме того, в паренхиме (преимущественно в зонах триад) также отмечены диффузно расположенные гепатоциты на разных стадиях жировой и гидропической дистрофий. Степень выраженности дистрофических изменений гепатоцитов коррелировала с потерей ими гликогена [7]. Следует отметить, что обезвреживающее действие печени зависит от уровня гликогена: при его падении снижаются и защитные функции печени.

В работе В.Ф. Козловой и Т.Н. Юрченко [6] показано, что в ткани печени гибернарующих длиннохвостых сусликов (*Citellus undulatus*) периваскулярно наблюдается мелкоочажковая инфильтрация

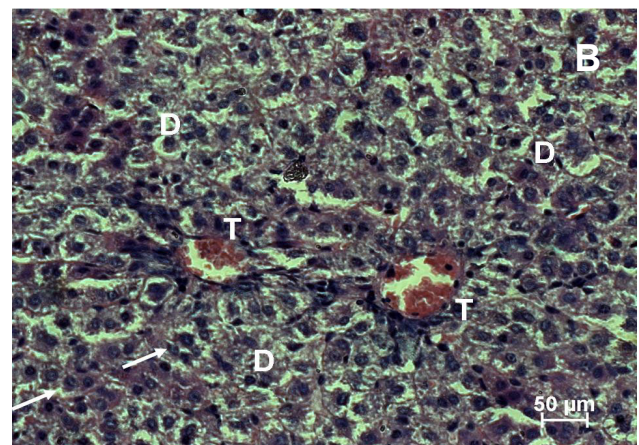
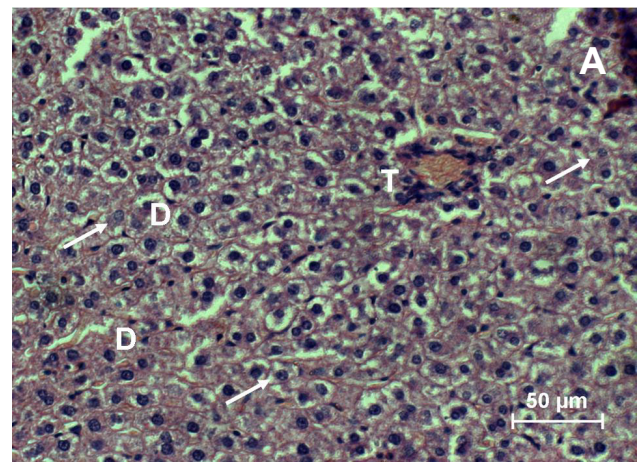


Рис. 3. Ткань печени крысы (А) и хомяка (В) через 24 ч после ИГМ: D – признаки белковой дистрофии; Т – тромб; стрелками указаны ядра гепатоцитов на различных стадиях некробиоза (кариопикноз, кариорексис, кариолизис).

Fig. 3. Liver tissue of rat (A) and hamster (B) 24 hrs later AHM: D shows protein dystrophy signs; T is thrombus; arrows indicate hepatocyte nuclei at different necrobiotic stages (karyopyknosis, karyorrhesis, karyolysis).



Уровень общего протеина (мкг/мл)
в ткани печени при естественном и искусственном
гипометаболизме ($M \pm m$)
Content of total protein ($\mu\text{g/ml}$) in liver tissue under natural
and artificial hypometabolism ($M \pm m$)

Условия эксперимента Experiment conditions	Вид животного Animal species	
	Крыса Rat	Хомяк Hamster
Контроль Control	3,332 \pm 0,366	4,708 \pm 0,701
ИГМ АНМ	5,628 \pm 0,54*	6,566 \pm 0,953*
ИГМ 2 ч АНМ 2 hrs	4,79 \pm 1,502	276 \pm 0,89
ИГМ 24 ч АНМ 24 hrs	8,507 \pm 2,295*	8,542 \pm 0,985*
ЕГМ ННМ	7,07 \pm 0,85*	7,07 \pm 0,85*

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

Note: * – differences are statistically significant versus the control, $p < 0.05$.

лейкоцитами. По мнению авторов, скопление лейкоцитов в тканях внутренних органов может быть связано с выполнением ими не только защитной, но и трофической функции по депонированию и вовлечению в метаболизм нуклеиновых кислот и протеинов. В нашем исследовании также отмечена инфильтрация лейкоцитами ткани печени у хомячков как при ИГМ, так и ЕГМ (см. рис. 1, В и 4, А).

Известно, что печень активно участвует в обмене протеинов и запасает их на 30–60% больше, чем

leukocytes) were revealed. The binuclear cells and slight local dystrophic changes at the periphery were observed 24 hrs later an arousal from hibernation in liver tissue of hamsters (Fig. 4B), the infiltration of round cells was kept near the vessels.

The degenerative and dystrophic changes revealed in liver under hypometabolic states (see Fig. 1, 4A) were most likely associated with blood flow disorder. They were of compensatory and adaptive character, being reversible in heterothermic hamsters after body temperature and blood circulation recovery (Fig. 4B). Regenerative reactions of hepatocytes were manifested in terms of their mitotic activity enhancement, especially in peripolar zone, wherein an increased number of binuclear hepatocytes was observed too. All the animals showed a disorder of hemodynamics: uneven congestion of sinusoids, central and portal veins.

Our findings were with those, obtained in hibernating long-tailed ground squirrels (*Citellus undulatus*) [7, 12, 13], in the liver tissue of those the signs of blood flow reduction and vascular congestion were seen. There was noted the liver dehydration, the hepatocytes were characterised by polymorphism: the hypertrophied, dystrophically changed, apoptotic, binuclear, polyploid cells, as well as the hepatocytes at different mitotic stages were observed. In addition, the parenchyma (mainly in the triad zones) contained diffusely located hepatocytes at different stages of fat and hydropic dystrophies. The manifestation of dystrophic changes in hepatocytes correlated with their loss of glycogen [13]. It should be noted that a detoxifying effect of liver depends on glycogen level: when it falls, the protective functions of liver decrease.

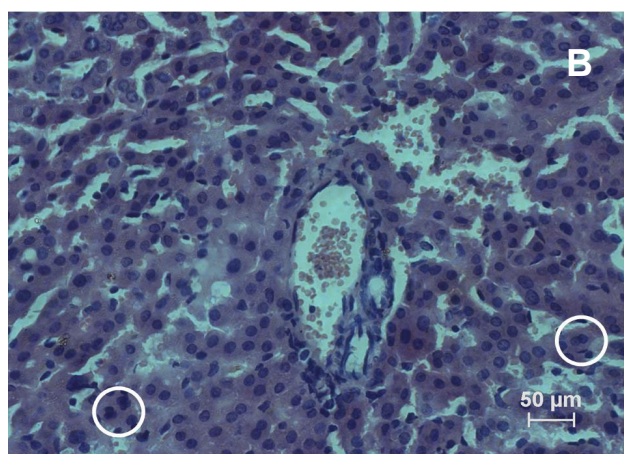
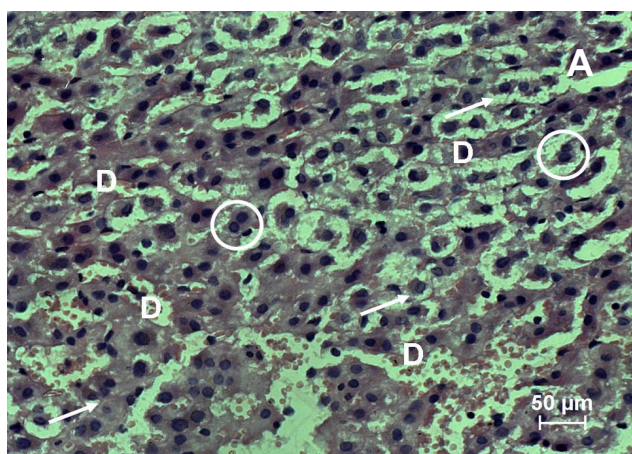


Рис. 4. Ткань печени хомяка при ЕГМ (А) и через 24 ч после ЕГМ (В): D – признаки белковой дистрофии; стрелками указаны ядра гепатоцитов на стадиях некробиоза (кариопикноз, кариорексис); двуядерные гепатоциты (белый контур). Окраска гематоксилином и эозином.

Fig. 4. Hamster liver tissue under NHM (A) and in 24 hrs after it (B): D is protein dystrophy signs; arrows indicate hepatocyte nuclei at different necrobiotic stages (karyopyknosis, karyorrhesis); binuclear hepatocytes (white contour). H&E stain.

другие органы. При изучении уровня общего протеина в ткани печени крыс и хомяков было отмечено его увеличение при достижении ИГМ и через 24 ч после выхода из него, а также при гибернации (таблица). Именно на этих этапах наблюдения в ткани печени (см. рис. 1; 3; 4, А) отмечали увеличение количества двуядерных гепатоцитов (указывает на усиление синтетической активности клетки) либо происходила декомпозиция (фанероз) клеточных ультраструктур, что способствует накоплению в клетке избыточного количества протеинов вследствие активации дегенеративно-дистрофических процессов.

Выявленное нами повышение общего протеина в печени крыс и хомяков может быть обусловлено сохранением определенного уровня экспрессии генов и активности специфических протеинов для поддержания разных стадий гипометаболизма. Показано, что при гибернации у млекопитающих глубокое подавление скорости обмена веществ сочетается с селективным увеличением экспрессии ключевых генов и синтеза специфических белков для обеспечения необходимых уровней метаболических процессов [17, 18]. Кроме того, в сердце и печени гетеротермных животных на различных этапах гибернации синтезируется не только разное количество протеинов, но и спектр их существенно изменен. Такие изменения видоспецифичны и характерны только для определенного этапа гибернации [4]: например, в автографах митохондрий печени активных длиннохвостых сусликов (*Citellus undulatus*) обнаруживается 16 полос протеинов, синтезируемых *de novo*, а у гибернирующих – только 5 и со значительно меньшей интенсивностью.

Погружение в гипометаболическое состояние достигается в результате скоординированного снижения энергетических затрат, в частности АТФ-зависимых процессов – транскрипции и трансляции. В частности, установлено, что во время длительной гибернации в печени тринадцатиполосных сусликов (*Ictidomys tridecemlineatus*) уровень экспрессии циклинов А и В снижается, а при пробуждении повышается, что предполагает прогрессию клеточного цикла, который обратимо приостанавливается при торпоре и возобновляется при достижении эутермии [31]. N. Kondo и соавт. [21] в крови бурундуков (*Tamias sibiricus*) обнаружили специфический комплекс протеинов – HP20, который, по их мнению, является ключевым фактором, подготавливающим организм к наступлению гибернации. Комплекс HP20 синтезируется в клетках печени, секретируется в кровь и далее поступает в ЦНС. Кроме того, для зимоспящих млекопитающих выявлена посттрансляционная модификация протеинов путем SUMO-лирования (*Small Ubiquitin-like*

V.F. Kozlova and T.N. Yurchenko [12] reported, that in the liver tissue of hibernating long-tailed ground squirrels (*Citellus undulatus*), a small-focal leukocyte infiltration was perivascularly observed. The authors believed the accumulation of leukocytes in tissues of internal organs as possibly associated with implementing not only protective, but trophic function on depositing and involving in metabolism of nucleic acids and proteins as well. Here we also observed the leukocyte infiltration of liver tissue in hamsters both under AHM and NHM (see Fig. 1B and 4A).

The liver is known as an active participant of protein metabolism and accumulates 30–60% more than other organs. Analysis of the total protein content in rat and hamster liver tissue revealed its increase when reaching AHM and 24 hrs after arousal, as well as in hibernation (Table). Right at these stages of observation in the liver tissue (see Fig. 1, 3, 4A) we noted an increased content of binuclear hepatocytes (indicating an enhanced synthetic activity of cell) or the decomposition (phanerosis) of cell ultrastructures occurred, thereby promoting the accumulation of excess protein number in cell due to activation of degenerative and dystrophic processes.

An increased total protein we revealed in rat and hamster liver might be stipulated by the keeping of a certain level of gene expression and the activity of specific proteins to maintain different hypometabolic stages. A deep suppression of metabolic rate in mammals during hibernation was combined with a selective increase in the expression of key genes and synthesis of specific proteins to provide the necessary levels of metabolic processes [4, 5]. In addition, not only different amount of proteins is synthesised in heart and liver of heterotherms at different stages of hibernation, but their spectrum is significantly changed. These changes are species-specific and characteristic only for a certain stage of hibernation [31]: for example, in mitochondrial hepatic autographs of active long-tailed ground squirrels (*Citellus undulatus*) there were found 16 bands of proteins, synthesised *de novo*, but in hibernating ones there were only 5 and with much lower intensity.

Entering the hypometabolic state is achieved due to a coordinated reduction in energy consumption, in particular ATP-dependent processes: transcription and translation. In particular, during prolonged hibernation in liver of thirteen-band ground squirrels (*Ictidomys tridecemlineatus*), the expression level of cyclins A and B was established to decrease, and during arousal it was increased, thereby suggesting the cell cycle progression, which was reversibly suspended at torpor and recovered upon achieving the euthermy [30]. N. Kondo *et al.* [11] have found in blood of chipmunks (*Tamias sibiricus*) a specific complex of proteins: HP20, which, in their view, was the key factor in preparing the body



Modifier). Данное семейство протеинов с помощью ковалентной связи обратимо присоединяется к внутриклеточным протеинам и изменяет их свойства. Модификация путем SUMO-лирования вовлекается во многие клеточные процессы: ядерно-цитозольный транспорт, регуляция транскрипции, апоптоз, стабилизация белков, клеточный цикл, стрессовые реакции. У сусликов, находящихся в состоянии гибернации, увеличивается уровень SUMO-связанных протеинов в мозге, печени и почках; при пробуждении количество таких конъюгатов уменьшается [30]. Биологический смысл SUMO-лирования, вероятно, заключается в стабилизации протеиновых молекул и предотвращении их деградации при гибернации [26]. В печени якутского суслика (*Spermophilus undulatus*) при гибернации увеличивается количество ацетил-связывающих протеинов, транспортеров жирных кислот и ферментов синтеза кетонных тел [8].

При естественной гибернации большое количество крови депонируется в селезенке [5], отмечаются изменения физико-химических свойств крови и состояния эритроцитов [11]. Погружение в гипометаболическое состояние сопровождается существенным снижением артериального давления (с 70–72 до 16 мм р. ст.) [5, 25], поэтому отмеченные нами дегенеративно-дистрофические изменения в ткани печени могут быть обусловлены резким замедлением кровообращения.

Ранее нами были выявлены особенности динамики активности химазы и тонина – энзимов, участвующих в образовании вазоконстрикторного пептида ангиотензина (А) II из AI в печени крыс и хомяков при гипометаболических состояниях [1, 13, 14]. Химаза – видоспецифичный энзим. У крыс и мышей (в отличие от человека, приматов, собак и хомяков) она является ангиотенгиназой: быстро гидролизует связь Tyr4-Ile5 в AI и образует AII при высоких концентрациях AI. У хомяков при ЕГМ активность химазы и тонина не изменяется [14]. У крыс при ИГМ активность химазы и тонина снижается [1], у хомяков при ИГМ активность химазы повышается (почти в три раза), а тонина снижается (более чем в два раза). Такая динамика активности химазы и тонина может служить объяснением некоторых выявленных нами изменений в структуре и гемодинамике печени при гипометаболических состояниях (гиперемия сосудов, дегенеративно-дистрофические изменения, тромбобразование и др.), обусловленных резкой редукцией кровообращения.

В цикле гибернации организм млекопитающих защищен от повреждающего действия гипоперфузии и реперфузии, происходящих при охлаждении/согревании. В то же время у гибернирующих

for hibernation. The HP20 complex is synthesised in liver cells, secreted into blood and then entered the CNS. In addition, a post-translational modification of proteins via SUMOlation (Small Ubiquitin-like Modifier) was revealed for hibernating mammals. This protein family reversibly binds the intracellular proteins by means of covalent bond and changes their properties. The modification by SUMOlation is involved in many cellular processes: nuclear-cytosolic transport, transcription regulation, apoptosis, protein stabilization, cell cycle, stress reactions. In hibernating ground squirrels the level of SUMO-associated proteins in brain, liver and kidneys is increased; during arousal the amount of these conjugates reduces [28]. A biological importance of SUMOlation is probably in stabilising protein molecules and preventing their degradation during hibernation [21]. In the liver of Yakutian ground squirrel (*Spermophilus undulatus*) a number of acetyl-binding proteins, carriers of fatty acids and enzymes of ketone body synthesis increases in hibernation [10].

Under natural hibernation, a large amount of blood is deposited in spleen [9], the changes in physical and chemical blood properties and erythrocyte state are noted [17]. Entering the hypometabolic state is accompanied by a significant decrease in blood pressure (from 70–72 down to 16 mm mercury) [9, 20], therefore the degenerative and dystrophic changes we observed in liver tissue might result from a sharp deceleration of blood circulation.

Previously we revealed the features in dynamics of enzyme activity, involved in vasoconstrictor peptide formation of angiotensin (A) II from AI, chymase and tonin, in rat and hamster liver under hypometabolic states [1, 25, 26]. Chymase is a species-specific enzyme. In rats and mice (unlike humans, primates, dogs and hamsters), it is the angiotensinase: it rapidly hydrolyses the Tyr4-Ile5 bond to AI and forms AII at high concentrations of AI. In hamsters under NHM the activity of chymase and tonin remains unchanged [26]. In rats under AHM the activity of chymase and tonin decreases [1], in hamsters under AHM the chymase activity augments (almost threefold), and that of tonin decreases (more than twice). This dynamics of chymase and tonin activity may explain some changes we revealed in the structure and hemodynamics of liver under hypometabolic states (vascular hyperemia, degenerative and dystrophic changes, thrombus formation *etc.*), caused by a sharp reduction in blood circulation.

During hibernation cycle the mammalian organism is protected against a damaging effect of hypoperfusion and reperfusion, occurring during cooling/warming. At the same time, the hibernators experiencing low blood flow, hypotension and increased blood viscosity (due to low body temperature) have elevated risk of thrombolization. However, an increased expression of $\alpha 2$ -mac



животных в условиях низкого кровотока, пониженного давления и повышенной вязкости крови (вследствие низкой температуры тела) возникает риск тромбоза. Однако увеличение экспрессии $\alpha 2$ -макроглобулина (синтезируется в печени) [29], а также некоторых протеинов семейства серпинов снижает риск тромбообразования путем ингибирования факторов свёртывания крови, тромбина и фибрина (синтезируются в печени) [30].

Минимизация физиологических функций не приводит к необратимым изменениям у гетеротермных млекопитающих, поскольку их организм обладает регуляторной системой, обеспечивающей гомеостаз при минимальном, но стабильном уровне обмена веществ. Так, дегенеративно-дистрофические изменения в ткани печени, выявленные нами на этапах гипометаболизма и выходе из него, также, как и наблюдаемые нами ранее в тканях сердца [10] и почек [9], обратимы после восстановления ТТ и нормального кровообращения. Кроме того, при естественном и искусственном гипометаболизме (у хомяков), а также на этапах восстановления (у крыс и хомяков), наблюдалась активация некробиотических процессов, что, как известно, способствует стимуляции дальнейшей физиологической регенерации в организме.

Выводы

1. При ИГМ в ткани печени крыс отмечались двоядерные гепатоциты, тромбы в сосудах, незначительные очаги белковой дистрофии, увеличение интерстициальных пространств, очаги инфильтрации ткани лейкоцитами.

2. В ткани печени крыс и хомяков через 2 ч после выхода из ИГМ наблюдались множественные очаги белковой дистрофии, большое количество гепатоцитов с ядрами на разных стадиях некробиоза (кариопикноз, кариорексис и кариолизис). У хомяков также отмечались венозная гиперемия и тромбы в сосудах.

3. У обоих видов животных через 24 ч после выхода из ИГМ дегенеративно-дистрофические изменения в гепатоцитах усиливались: обнаруживались все типы белковых дистрофий (зернистая, гиалиново-капельная и гидропическая), вблизи сосудов они отсутствовали или были менее выражены; сохранялись гиперемия сосудов и тромбы в них, а также большое количество гепатоцитов с ядрами на всех стадиях некробиоза. Кроме того, в ткани печени крыс отмечалось большое количество двоядерных гепатоцитов.

4. При естественной гибернации в ткани печени хомяков также наблюдались клетки с ядрами на стадиях кариопикноза и кариорексиса, двоядерные гепатоциты, очаги инфильтрации ткани печени лей-

роглобулин (синтезисирован в печени) [27], а также некоторые белки семейства серпинов снижают риск тромбоза путем ингибирования факторов свёртывания крови, тромбина и фибрина (синтезисирован в печени) [28].

Минимизация физиологических функций не приводит к необратимым изменениям у гетеротермных млекопитающих, поскольку их организм обладает регуляторной системой, обеспечивающей гомеостаз при минимальном, но стабильном уровне обмена веществ. Так, дегенеративно-дистрофические изменения в ткани печени, выявленные нами на этапах гипометаболизма и выходе из него, также, как и наблюдаемые нами ранее в тканях сердца [10] и почек [9], обратимы после восстановления ТТ и нормального кровообращения. Кроме того, при естественном и искусственном гипометаболизме (у хомяков), а также на этапах восстановления (у крыс и хомяков), наблюдалась активация некробиотических процессов, что, как известно, способствует стимуляции дальнейшей физиологической регенерации в организме.

Conclusions

1. Under AHM in rat liver tissue we observed the binuclear hepatocytes, blood thrombi in vessels, rare foci of protein dystrophy, increased interstitial spaces, and foci of tissue leukocyte infiltration.

2. Multiple foci of protein dystrophy, a large number of hepatocytes with nuclei at different necrobiotic stages (karyopyknosis, karyorrhexis and karyolysis) were observed in liver tissue of rats and hamsters 2 hrs after arousal from AHM. A venous hyperemia and blood thrombi were also noted in the vessels.

3. In both animal species, 24 hrs after arousal from AHM the degenerative and dystrophic changes in hepatocytes were enhanced: there were found all the types of protein dystrophies (granular, hyaline-droplet and hydropic ones), they were absent or less pronounced near the vessels; the vascular hyperemia and blood thrombi in vessels, as well as a large number of hepatocytes with nuclei at all the stages of necrobiosis were kept. In addition, a large number of binuclear hepatocytes was observed in rat liver tissue.

4. Under natural hibernation in hamster liver tissue we also observed the cells with nuclei being karyopyknotic and karyorrhectic, binuclear hepatocytes, foci of leukocyte infiltration of liver tissue, as well as the signs of hydropic dystrophy at the periphery (they were absent near the vessels). In 24 hrs after the animal arousal from hibernation, the binuclear hepatocytes were noted in liver tissue, the slight dystrophic changes, as well as the foci of leukocyte infiltration were kept locally at the periphery.

5. Under hibernation, as well as when achieving AHM in rats and hamsters, and 24 hrs later arousal from it the level of total protein in liver tissue augmented.



коцитами, а также признаки гидропической дистрофии на периферии (вблизи сосудов они отсутствовали). Через 24 ч после выхода животных из гибернации в ткани печени отмечались двоядерные гепатоциты, локально на периферии сохранялись незначительные дистрофические изменения, а также очаги инфильтрации лейкоцитами.

5. При гибернации, а также при достижении ИГМ у крыс и хомяков и через 24 ч после выхода из него в ткани печени уровень общего протеина повышался.

Авторы выражают благодарность ст. н. с., к. б. н. И.Ф. Коваленко, ст. н. с., к. б. н. Л.Н. Марченко и ст. н. с., к. м. н. И.И. Кондакову за методическую и консультативную помощь.

Литература

1. Бабийчук Г.О., Самохина Л.М., Шило О.В. та ін. Хімаза, тонін та кальпаїні за умов гіпометаболічного стану у щурів // Проблеми криобіології. – 2005. – Т. 15, №3. – С. 465–466.
2. Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии и гистологической техники. – М.: Медицина, 1982. – 304 с.
3. Говоруха Т.П., Козлова В.Ф., Репин Н.В. Морфологические изменения в печени сусликов при естественном гипобиозе // Проблеми криобіології. – 1994. – №4. – С. 27–31.
4. Жегунов Г.Ф., Карманова И.Г. Эволюционно-генетические аспекты изучения гипобиоза и зимней спячки // Проблеми криобіології. – 1995. – №2. – С. 14–19.
5. Калабухов Н.И. Спячка млекопитающих. – М.: Наука, 1985. – 269 с.
6. Козлова В.Ф., Юрченко Т.Н. Структурные аспекты адаптации зимнеящих животных // Проблеми криобіології. – 1996. – №3. – С. 44–51.
7. Козлова В.Ф., Юрченко Т.Н., Щетинский М.И., Репин Н.В. Особенности морфофункционального состояния организма гетеротермных животных в цикле гибернация-пробуждение // Проблеми криобіології. – 1998. – №2. – С. 32–38.
8. Коломийцева И.К., Перепелкина Н.И., Фесенко Е.Е. Липиды мембранных структур печени при гибернации якутского суслика *Spermophilus undulatus* // Доклады Академии наук. – 2013. – Т. 448, №3. – С. 351–354.
9. Ломако В.В., Кондаков И.И. Структурные изменения в печени гетеро- и гомойотермных животных при искусственном и естественном гипометаболизме // Проблеми криобіології и криомедицины. – 2017. – Т. 27, №1. – С. 81–86.
10. Ломако В.В., Шило А.В., Коваленко И.Ф. Структурно-функциональные изменения в сердце гетеро- и гомойотермных животных при искусственном и естественном гипометаболизме // Проблеми криобіології и криомедицины. – 2016. – Т. 26, №4. – С. 308–321.
11. Ломако В.В., Шило А.В., Коваленко И.Ф., Бабийчук Г.А. Эритроциты гетеро- и гомойотермных животных при естественной и искусственной гипотермии // Журнал эволюционной биохимии и физиологии им. И.М. Сеченова. – 2015. – Т. 51, №1. – С. 52–59.
12. Перепелкина Н.И., Коломийцева И.К. Липиды микросомальной фракции печени при гибернации суслика *Spermophilus undulatus* // Биофизика. – 2016. – Т. 61, №4. – С. 766–770.
13. Самохина Л.М., Ломако В.В., Шило О.В. Хімаза, тонін та кальпаїні за умов штучного гіпометаболічного стану у хо-

The authors acknowledge I.F. Kovalenko, senior research fellow, PhD, L.N. Marchenko, senior research fellow, PhD and I.I. Kondakov, senior research fellow, PhD for methodological and consulting assistance.

References

1. Babijchuk G.O., Samokhina L.M., Shylo O.V. et al. Chymase, tonin and calpains under hypometabolic state in rats. *Probl Cryobiol* 2005; 15(3): 465–466.
2. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72 (7): 248–254.
3. Brown J.C.L., Chung D.J., Belgrave K.R., Staples J.F. Mitochondrial metabolic suppression and reactive oxygen species production in liver and skeletal muscle of hibernating thirteen-lined ground squirrels. *Am J Physiol* 2012; 302(1): R15–R28.
4. Eddy S.F., Storey K.B. p38 MAPK regulation of transcription factor targets in muscle and heart of the hibernating bat, *Myotis lucifugus*. *Cell Biochem Funct* 2007; 25(6): 759–765.
5. Fahlman A., Storey J.M., Storey K.B. Gene up-regulation in heart during mammalian hibernation. *Cryobiology* 2000; 40(4): 332–342.
6. Frehn J.L., Thomas J.A. Effects of cold exposure and hibernation on the liver, brown fat, and testes from golden hamsters. *J Exp Zool* 1969; 170 (1): 107–116.
7. Govorukha T.P., Kozlova V.F., Repin N.V. Morphological alteration in the liver during natural hypobiosis. *Probl Cryobiol* 1994; (4): 27–31.
8. Jani A., Martin S.L., Jain S. et al. Renal adaptation during hibernation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013; 305 (11): F1521–F1532.
9. Kalabukhov N.I. Mammalian hibernation. Moscow: Nauka; 1985.
10. Kolomiitseva I.K., Perepelkina N.I., Fesenko E.E. Lipids of liver membrane structures in Yakutian ground squirrels (*Spermophilus undulatus*) under hibernation. *Doklady Akademii Nauk* 2013; 448(3): 351–354.
11. Kondo N., Sekijima T., Kondo J. et al. Circannual control of hibernation by HP complex in the brain. *Cell* 2006; 125(1): 161–172.
12. Kozlova V.F., Yurchenko T.N. Structural aspects of adaptation of the hibernating animals. *Probl Cryobiol* 1996; (3): 44–51.
13. Kozlova V.F., Yurchenko T.N., Schetinsky M.I., Repin N.V. Peculiar features of the morphofunctional state of a heterothermic organism in a hibernation-arousal bout. *Probl Cryobiol* 1998; (2): 32–38.
14. Kutschke M., Grimpo K., Kastl A. et al. Depression of mitochondrial respiration during daily torpor of the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*, is specific for liver and correlates with body temperature. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2013; 164(4): 584–589.
15. Lindell S.L., Klahn S.L., Piazza T.M. et al. Natural resistance to liver cold ischemia-reperfusion injury associated with the hibernation phenotype. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288(3): G473–G480.
16. Lomako V.V., Kondakov I.I. Structural changes in kidneys of homeo- and heterothermic animals undergoing artificial and natural hypometabolism. *Probl Cryobiol Cryomed* 2017; 27(1): 81–86.
17. Lomako V.V., Shilo A.V., Kovalenko I.F., Babiichuk G.A. Erythrocytes of hetero- and homiothermic animals under natural and artificial hypothermia. *J Evol Biochem Physiol* 2015; 51(1): 58–66.
18. Lomako V.V., Shilo O.V., Kovalenko I.F. Structural and functional changes in heart tissue of hetero- and homiothermic animals under artificial and natural hypometabolism. *Probl Cryobiol Cryomed* 2016; 26(4): 308–321.



- м'яків // Проблемы криобиологии. – 2007. – Т. 17, №4. – С. 347–355.
14. Самохіна Л.М., Ломачко В.В., Шило О.В. Хімаза, тонін та кальпаїни за умов природної гібернації у хом'яків // Досягнення біології та медицини. – 2010. – №2. – С. 29–32.
 15. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72, №7. – P. 248–254.
 16. Brown J.C.L., Chung D.J., Belgrave K.R., Staples J.F. Mitochondrial metabolic suppression and reactive oxygen species production in liver and skeletal muscle of hibernating thirteen-lined ground squirrels // *Am. J. Physiol.* – 2012. – Vol. 302, №1. – P. R15–R28.
 17. Eddy S.F., Storey K.B. p38 MAPK regulation of transcription factor targets in muscle and heart of the hibernating bat, *Myotis lucifugus* // *Cell Biochem. Funct.* – 2007. – Vol. 25, №6. – P. 759–765.
 18. Fahlman A., Storey J.M., Storey K.B. Gene up-regulation in heart during mammalian hibernation // *Cryobiology.* – 2000. – Vol. 40, №4. – P. 332–342.
 19. Frehn J.L., Thomas J.A. Effects of cold exposure and hibernation on the liver, brown fat, and testes from golden hamsters // *J. Exp. Zool.* – 1969. – Vol. 170, №1. – P. 107–116.
 20. Jani A., Martin S.L., Jain S. et al. Renal adaptation during hibernation // *Am J Physiol. Renal. Physiol.* – 2013. – Vol. 305, №11. – P. F1521–F1532.
 21. Kondo N., Sekijima T., Kondo J. et al. Circannual control of hibernation by HP complex in the brain // *Cell.* – 2006. – Vol. 125, №1. – P. 161–172.
 22. Kutschke M., Grimpo K., Kastl A. et al. Depression of mitochondrial respiration during daily torpor of the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*, is specific for liver and correlates with body temperature // *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* – 2013. – Vol. 164, №4. – P. 584–589.
 23. Lindell S.L., Klahn S.L., Piazza T.M. et al. Natural resistance to liver cold ischemia-reperfusion injury associated with the hibernation phenotype // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2005. – Vol. 288, №3. – P. G473–G480.
 24. Luu B.E., Biggar K.K., Wu C.W., Storey K.B. Torpor-responsive expression of novel microRNA regulating metabolism and other cellular pathways in the thirteen-lined ground squirrel, *Ictidomys tridecemlineatus* // *FEBS Lett.* – 2016. – Vol. 590, №20. – P. 3574–3582.
 25. Lyman C.P. Hibernation in Mammals // *Circulation.* – 1961. – Vol. 24, №8. – P. 434–445.
 26. Morin P.Jr., Storey K.B. Mammalian hibernation: differential gene expression and novel application of epigenetic controls // *Int. J. Dev. Biol.* – 2009. – Vol. 53, №2–3. – P. 433–442.
 27. Oda T., Shimizu K., Yamaguchi A. et al. Hypothermia produces rat liver proteomic changes as in hibernating mammals but decreases endoplasmic reticulum chaperones // *Cryobiology.* – 2012. – Vol. 65, №2. – P. 104–112.
 28. Otis J.P., Pike A.C., Torrealba J.R., Carey H.V. Hibernation reduces cellular damage caused by warm hepatic ischemia-reperfusion in ground squirrels // *J. Comp. Physiol. B.* – 2017. – Vol. 187, №4. – P. 639–648.
 29. Srere H.K., Belke D., Wang L.C., Martin S.L. Alpha-2-Macroglobulin gene expression during hibernation in ground squirrels is independent of acute phase response // *Am. J. Physiol.* – 1995. – Vol. 268, №6. – P. R1507–R1512.
 30. Storey K.B. Out cold: biochemical regulation of mammalian hibernation – a mini-review // *Gerontology.* – 2010. – Vol. 56, №2. – P. 220–230.
 31. Wu C.W., Storey K.B. Pattern of cellular quiescence over the hibernation cycle in liver of thirteen-lined ground squirrels // *Cell Cycle.* – 2012. – Vol. 11, №9. – P. 1714–1726.
 19. Luu B.E., Biggar K.K., Wu C.W., Storey K.B. Torpor-responsive expression of novel microRNA regulating metabolism and other cellular pathways in the thirteen-lined ground squirrel, *Ictidomys tridecemlineatus*. *FEBS Lett* 2016; 590(20): 3574–3582.
 20. Lyman C.P. Hibernation in Mammals. *Circulation* 1961; 24 (8): 434–445.
 21. Morin P.Jr., Storey K.B. Mammalian hibernation: differential gene expression and novel application of epigenetic controls. *Int J Dev Biol* 2009; 53(2–3): 433–442.
 22. Oda T., Shimizu K., Yamaguchi A. et al. Hypothermia produces rat liver proteomic changes as in hibernating mammals but decreases endoplasmic reticulum chaperones. *Cryobiology* 2012; 65(2): 104–112.
 23. Otis J.P., Pike A.C., Torrealba J.R., Carey H.V. Hibernation reduces cellular damage caused by warm hepatic ischemia-reperfusion in ground squirrels. *J Comp Physiol B.* 2017; 87(4): 639–648.
 24. Perepelkina N.I., Kolomytseva I.K. Lipids of liver microsomal fraction in ground squirrel *Spermophilus undulatus* under hibernation. *Biophysics* 2016; 61(4):766–770.
 25. Samokhina L.M., Lomako V.V., Shylo O.V. Chymase, tonin and calpains under artificial hypometabolic state in hamsters. *Probl Cryobiol* 2007; 17(4): 347–355.
 26. Samokhina L.M., Lomako V.V., Shylo O.V. Chymase, tonin and calpains under conditions of natural hibernation in hamster. *Achievement Biology and Medicine* 2010; (2): 29–32.
 27. Srere H.K., Belke D., Wang L.C., Martin S.L. Alpha-2-Macroglobulin gene expression during hibernation in ground squirrels is independent of acute phase response. *Am J Physiol* 1995; 268 (6): R1507–R1512.
 28. Storey K.B. Out cold: biochemical regulation of mammalian hibernation – a mini-review. *Gerontology* 2010; 56(2): 220–230.
 29. Volkova O.V., Eletskiy Yu.K. Fundamentals of histology and histological techniques. Moscow: Meditsina; 1982.
 30. Wu C.W., Storey K.B. Pattern of cellular quiescence over the hibernation cycle in liver of thirteen-lined ground squirrels. *Cell Cycle* 2012; 11(9): 1714–1726.
 31. Zhegunov G.F., Karmanova I.G. Evolutionary-genetic aspects of studying hipobiosis and hibernation. *Probl Cryobiol* 1995; (2): 14–19.

