

УДК 581.17

З.М. Шихамірова\*, А.М. Джафарова, Н.К. Клічханов

## Гематологічні характеристики та показники еритрокінетики у малих ховрахів у динаміці пробудження від зимової сплячки

UDC 581.17

Z.M. Shihamirova\*, A.M. Dzhafarova, N.K. Klichkhanov

### Hematological Characteristics and Erythrokinetic Indices in Little Ground Squirrels During Arousal from Hibernation

**Реферат:** У період зимової сплячки дрібні ссавці багаторазово проходять через холодову (торпор) і теплову (розігрівання) фази, і для адекватного постачання тканин киснем необхідні адаптивні зміни еритроцитів. У роботі вивчено структурні та функціональні показники еритроцитів малих ховрахів у динаміці пробудження від зимової сплячки. Встановлено, що у торпідному стані кількість еритроцитів, рівень гемоглобіну і МСН у крові істотно не змінюються, але МСВ і НСТ зменшуються, а МСНС і RDW збільшуються порівняно з контролем. У гібернуючих тварин кількість ретикулоцитів у крові зменшується і скорочується період виведення еритроцитів із кровообігу, але здатність до продукування еритроцитів зберігається на рівні контролю. Під час пробудження температура тіла 25–30°C є критичною для перебудови структурних і функціональних показників еритроцитів. Про це свідчать зростання RDW і тенденція до підвищення НСТ, МСВ; підвищення рівня ретикулоцитів у крові та подовження часу їх дозрівання; збільшення періоду напівжиття еритроцитів. Після повного зігрівання ховрахів продукція еритроцитів значно збільшується за рахунок скорочення часу дозрівання ретикулоцитів.

**Ключові слова:** гематологічні параметри, еритроцитарні індекси, еритрокінетика, зимова сплячка, пробудження від зимової сплячки, ховрахи, *Spermophilus pygmaeus*.

**Abstract:** During hibernation, the small mammals pass through multiple cold (torpor) and warm (arousal) phases, as well as the adaptive changes in red blood cells are vital for an adequate oxygen supply to tissues. Here, we have analyzed the structural and functional indices of red blood cells in little ground squirrels during arousal from hibernation. The were established that in a torpid state, a count of red blood cells, HGB and MCH levels in blood did not significantly change, but MCV and HCT decreased, while MCHC and RDW increased as compared to the control. In hibernating animals, the reticulocyte count in blood decreased and the period of erythrocyte elimination from bloodstream was shortened, but the ability to produce the red blood cells remained at the control level. During arousal, the body temperature of 25–30°C was critical for rearrangement of structural and functional parameters of red blood cells. This was evidenced by RDW increase and the tendency to rise in HCT, MCV; high reticulocyte count in blood and extended time of their maturation; increased half-life of red blood cells. After complete rewarming of ground squirrels the production of red blood cells was significantly increased due to the reduced reticulocyte maturation time.

**Key words:** hematological parameters, red blood cell indices, erythrokinetics, hibernation, arousal, ground squirrel, *Spermophilus pygmaeus*.

За умов низьких температур навколишнього середовища та дефіциту харчових ресурсів деякі ссавці впадають у торпідний стан, який називають зимовою сплячкою, або гібернацією. Зимова сплячка є прикладом еволюційної адаптації ссавців до екстремальних умов існування [4]. Вона характеризується контрольованим зниженням швидкості метаболізму, температури тіла та інших фізіологічних функцій (частоти серцевих скорочень, вентиляції легень), а також периферичною вазоконстрикцією [14, 19, 22]. При цьому у гібернаторів робота органів і систем та біохімічні процеси перебудовуються так, що, навіть при дуже низькій температурі тіла, в організмі підтримується певний гомеостаз [14, 36].

Under low ambient temperatures and shortages of food resources, some mammals enter a torpid state, which is called hibernation. Hibernation is an example of evolutionary adaptation of mammals to extreme living conditions [17]. It is characterized by a controlled decrease in metabolic rate, body temperature and other physiological functions (heart rate, lung ventilation), as well as peripheral vasoconstriction [6, 11, 16]. Herewith, in hibernators, the function of organs and systems and biochemical processes are rearranged so that, even at a very low temperature of a body, it maintains a certain homeostasis [6, 36].

An important aspect of hibernation in small mammals is its discontinuity, *i. e.* the hibernation consists of the periods of deep torpor, the so-called

Дагестанський державний університет, м. Махачкала, Росія

Dagestan State University, Makhachkala, Russia

\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Гаджиева, 43-а, м. Махачкала, Росія 367000;  
тел.: 8 (8722) 68-23-26  
електронна пошта: klich-khan@mail.ru

\*To whom correspondence should be addressed:

43-a, Hadzhyieva str., Makhachkala, Russia 367000;  
tel.: 8 8722 68 2326  
e-mail: klich-khan@mail.ru

Надійшла 10.06.2019

Прийнята до друку 23.04.2020

Received June, 10, 2019

Accepted April, 23, 2020

© 2020 Z.M. Shihamirova, *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.

Важливим аспектом гібернації у дрібних ссавців є її уривчастість: сплячка складається з періодів глибокого торпора, так званих баутів, які чергуються міжбаутними пробудженнями. Під час міжбаутних пробуджень тварини розігріваються протягом 1,5–2,5 годин до нормотермії, при цьому біохімічні та фізіологічні параметри організму за короткий термін повертаються до еутермного рівня [14, 25]. Швидке посилення перфузії кров'ю тканин зимосплячих тварин під час періодичних пробуджень може збільшити ризик пошкоджень внаслідок ішемії-реперфузії в тих ділянках, де температура тканини вже підвищилася, а швидкість кровотока в повному обсязі ще не відновилася. Незважаючи на те, що зміни в споживанні кисню тканинами йдуть паралельно зі змінами в серцевому викиді, легеневій вентиляції, об'ємі крові на периферії, у зимосплячих ссавців при вході та виході з торпідного стану виникає потенційний ризик невідповідності між постачанням і споживанням кисню [14], що у незимосплячих тварин може призвести до розвитку ішемічних і реперфузійних пошкоджень [24].

Еритроцити відіграють ключову роль у транспорті та забезпеченні тканин киснем. Відомо, що в еритроцитах існують метаболічні сигнальні каскади, які сприяють віддачі кисню і оксигенації тканин у результаті системної гіпоксемії. Значний внесок у запобігання окисному стресу у період сплячки може давати регулювання афінності гемоглобіну до кисню. Показано, що у гібернуючих ссавців афінність гемоглобіну до кисню підвищується, що зменшує його вивільнення в тканини відповідно до їх низької метаболічної активності [32]. Слід зазначити, що вміст кисню в тканинах буде визначатися не тільки афінністю гемоглобіну до нього, а й вмістом гемоглобіну в еритроцитах, а також і розмірами останніх, реологічними властивостями крові тощо.

Результати досліджень основних гематологічних показників крові різних тварин у період зимової сплячки неоднозначні. Так, вивчення сезонних змін рівня еритроцитів у крові малого ховраха (*Spermophilus pygmaeus*) показало його підвищення в зимові місяці, коли тварини знаходяться в торпідному стані [8]. У лісовій мишівки (*Sicista betulina*) в період зимової сплячки було встановлено збільшення кількості еритроцитів, гемоглобіну і гематокриту [41]. У їжаків (*Erinaceus europaeus*) у початкові місяці сплячки [37] та у гібернуючих тринадцятисмугих ховрахів (*Spermophilus tridecemlineatus*) [35] гематологічні показники були знижені порівняно з

bouts, which alternate with interbout arousals. During them the animals are rewarmed within 1.5–2.5 hrs to normothermy, and the biochemical and physiological body parameters return to the euthermic level in a short time [6, 22]. A rapid increase in blood perfusion of tissues in hibernating animals during periodic arousals may enhance the risk of injury due to the ischemia-reperfusion in those areas, where the tissue temperature has already risen, while the blood flow velocity has not fully recovered yet. Although the changes in oxygen consumption by tissues proceed together with those in cardiac output, pulmonary ventilation, peripheral blood volume, the hibernating mammals during entry into and exit from a torpid state may be a potential risk of mismatch between oxygen supply and consumption [6], that in non-hibernating animals can lead to the ischemic and reperfusion injury development [20].

The red blood cells (RBCs) play a key role in oxygen transport and supply to tissues. The RBCs are known to have the metabolic signaling cascades, promoting the oxygen delivery and tissue oxygenation as a result of systemic hypoxemia. The regulation of hemoglobin affinity for oxygen can make an essential contribution into preventing oxidative stress during hibernation. The hemoglobin affinity for oxygen in hibernating mammals was shown to increase, that reduced its release into tissues in accordance with their low metabolic activity [32]. It should be noted that the oxygen content in tissues will be determined not only by hemoglobin affinity for it, but its content in RBCs as well, and the size of the latter, rheological properties of blood, and *etc.*

The findings on the main hematological variables of different animals during hibernation are controversial. For example, the study of seasonal changes in RBC count in blood of little ground squirrel (*Spermophilus pygmaeus*) showed its increase in winter months, when the animals were in a torpid state [28]. An increased counts of RBCs, hemoglobin and hematocrit were found out in the northern birch mouse (*Sicista betulina*) during hibernation [41]. In the hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) within the initial months of hibernation [37] and in hibernating thirteen-lined ground squirrels (*Spermophilus tridecemlineatus*) [35] the hematological variables were reduced as compared with the summer control. At the same time S.T. Cooper *et al.* [8] have revealed no significant changes in RBC count, hemoglobin and hematocrit levels in *S. tridecemlineatus* in a torpid state and after interbout arousal as compared with the summer control.



літнім контролем. У той самий час S.T. Cooper та співавт. [16] у *S. tridecemlineatus* у торпідному стані та після міжбаутного пробудження не виявили істотних змін кількості еритроцитів, рівня гемоглобіну і гематокриту порівняно з літнім контролем.

Відомо, що в стані гібернації поділ клітин у кровотвірній тканині є значно зниженим [12], а тривалість життя циркулюючих еритроцитів – істотно збільшеною [13]. Також встановлено, що в торпідному стані середній об'єм еритроцитів у *S. tridecemlineatus* зменшується, а в період міжбаутного неспання збільшується [16]. З огляду на той факт, що у процесі циркуляції в кровотоці розмір еритроцитів зазвичай зменшується через втрату частини мембрани, тому збільшення розмірів еритроцитів у період міжбаутного неспання автори пов'язують із активацією еритропоезу і надходженням у кров ретикулоцитів, розмір яких більше, ніж у циркулюючих еритроцитів. Однак результати прямого визначення кількості ретикулоцитів у крові довгохвостих ховрахів (*Spermophilus undulatus*) у торпідному стані показали значне зменшення їх кількості порівняно з літнім контролем, а після стимульованого пробудження цей показник не збільшувався порівняно з торпідним станом тварин [2].

Отже, зміна гематологічних параметрів і фізіологічних характеристик еритроцитів наразі досліджена у тварин в торпідному стані у період міжбаутного неспання, але особливості таких змін під час їх пробудження залишаються невивченими.

Мета роботи – дослідження гематологічних параметрів крові, еритроцитарних індексів і показників еритрокінетики ховрахів під час зимової сплячки і в динаміці індукованого пробудження.

### Матеріали і методи

Дослідження проводили на малих ховрахах (*S. pygmaeus* Pall.) із масою тіла 250–300 г. Тварини були виловлені у Буйнакському районі Республіки Дагестан (42° 55'S, 47° 20'W; 320 м над рівнем моря). Роботу виконували з дотриманням усіх норм і вимог, затверджених Директивою 2010/63/EU Ради Європейського співтовариства щодо захисту тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях.

Для моделювання гібернації та пробудження тварин випадковим чином розподілили на 7 груп ( $n = 6$  у кожній): контроль у літній період; стан глибокої гібернації; різні етапи індукованого пробудження (тварини з температурою тіла 10,

It is known that during hibernation, the cell division in hematopoietic tissue is significantly reduced [4], and the lifespan of circulating RBCs is greatly increased [5]. Also, it has been found that in a torpid state, the average RBC volume in *S. tridecemlineatus* decreases, but in the period of interbout arousal it increases [8]. Due to the fact that during circulation in bloodstream the RBC size usually diminishes because of a loss of membrane part, so an increase in RBC size during interbout arousal is associated with the erythropoiesis activation and the entry in blood of larger reticulocytes than those in circulating RBCs. However, the results of a direct determination of reticulocyte count in blood of long-tailed ground squirrels (*Spermophilus undulatus*) in a torpid state showed a significant decrease in their number as compared with summer control, and after stimulated arousal this index did not increase as compared with a torpid state of animals [13].

Thus, to date, a change in hematological parameters and physiological characteristics of erythrocytes has been investigated in animals in a torpid state and during interbout awakening, but the features of such changes during their arousal have remained unstudied.

The research aim was to investigate the hematological variables, RBC and erythrokinetic indices in ground squirrels during hibernation and within the induced arousal.

### Materials and methods

The research was carried-out in little ground squirrels (*S. pygmaeus* Pall.), weighting 250–300g. The animals were caught in Buynaksk district of the Republic of Dagestan (42° 55'S, 47° 20'W; 320 m above sea level). The experiments were implemented in compliance with all the standards and requirements approved by the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council 'On the Protection of Animals Used for Scientific Purposes'.

To simulate hibernation and arousal, the animals were randomly divided into 7 groups ( $n = 6$  in each): the control in summer period; state of deep hibernation; different stages of induced arousal (animals with body temperature of 10, 20, 25, 30 and 37°C). In summer, the animals were housed in the animal facility in individual cages with *ad libitum* access to water and food on a standard pellet diet for rats, mice and hamsters (Laboratory, Russia), supplemented with raw seeds, fresh cabbage, carrots and greens. At the end of October, to initiate hibernation, the ground squirrels were placed into individual cages in a dark room with



20, 25, 30 і 37°C). У літній період тварин утримували в індивідуальних клітках в умовах віварію з вільним доступом до води та їжі на стандартній дієті у вигляді гранульованого комбікорму для щурів, мишей і хом'яків («Лабора́торкорм», Росія) та додатковим включенням до раціону неочищеного насіння, свіжої капусти, моркви і зелені. Наприкінці жовтня для ініціювання зимової сплячки ховрахів поміщали в індивідуальні клітки в темне приміщення з температурою 2–5°C. Через декілька днів тварини впадали в сплячку з пониженням температури тіла (Тт) до  $(3,8 \pm 0,4)^\circ\text{C}$ . Після двох місяців гібернації середня тривалість баута становила  $(14 \pm 0,5)$  діб. Для експериментів тварин відбирали в торпідному стані посередині баута (7 діб від початку повторного впадання в сплячку). З метою ініціації пробудження ховрахів перенесли в приміщення з температурою 20°C. Повне пробудження тварин і підйом Тт до 37°C відбувалися приблизно за  $(2,4 \pm 0,2)$  години. Після досягнення Тт 10, 20, 25, 30 і 37°C тварин використовували в експерименті. Температуру тіла вимірювали цифровим термометром MS 6501 («Mastech», Гонконг), датчик якого вводили в пряму кишку на глибину 3–4 см.

*Дослідження гематологічних параметрів крові.* Зразки крові у ховрахів під час пробудження після підйому Тт до 20°C і вище, а також у ховрахів контрольної групи брали після декапітації анестезованих тварин. Анастезію проводили внутрішньочеревним введенням пентабарбіталу натрію (85 мг/кг маси тіла). У ховрахів, які знаходилися у торпідному стані, та тих, у яких Тт після початку пробудження становила 10°C, кров брали без анестезії. Зразки крові забирали в спеціальні вакутейнери з антикоагулянтом К2-ЕДТА («Guangzhou Improve Medical Instruments», КНР). Кількість еритроцитів (RBC), концентрацію гемоглобіну (HGB), гематокрит (HCT), а також еритроцитарні індекси – середній об'єм еритроцита (MCV), середній вміст гемоглобіну в еритроциті (MCH), середня концентрація гемоглобіну в еритроциті (MCHC), гетерогенність еритроцитів за об'ємом (RDW) встановлювали на гематологічному аналізаторі «Sysmex KX-21» («Sysmex Corporation», Японія).

*Визначення цитокінетичних показників еритроцитарного балансу крові.* Для забарвлення ретикулоцитів 0,3 мл крові змішували з 0,1 мл 1%-го розчину брильянтового крезилового синього, приготованого на 0,9%-му розчині NaCl («Арбис<sup>+</sup>», Росія) і витримували 40 хв при кім-

а temperature of 2–5°C. After a few days, the animals went into hibernation with a decrease in temperature of body (Tb) down to  $(3.8 \pm 0.4)^\circ\text{C}$ . After two months of hibernation, the average duration of bout was  $(14 \pm 0.5)$  days. For experiments, the animals were selected in a torpid state in the middle of the bout (7 days from the beginning of re-hibernation). To initiate the arousal, the ground squirrels were moved to a room with a temperature of 20°C. A complete arousal of animals and Tb rise up to 37°C occurred within  $(2.4 \pm 0.2)$  hrs approximately. After reaching Tb of 10, 20, 25, 30 and 37°C, the animals were used in the experiment. Body temperature was measured with a digital thermometer MS 6501 (Mastech, Hong Kong), the sensor was inserted into the rectum to a 3–4 cm depth.

*Study of hematological variables.* Blood samples were collected from ground squirrels during arousal after Tb rising up to 20°C and higher, as well as from the control group animals after decapitation of anesthetized animals by intraperitoneal administration of sodium pentobarbital (85 mg / kg body weight). In the ground squirrels in a torpid state, and those with 10°C Tb after arousal onset, blood was sampled without anesthesia. Blood samples were collected into special vacutainer blood collection tubes with anticoagulant K2-EDTA (Guangzhou Improve Medical Instruments, China). The count of red blood cells (RBCs), hemoglobin concentration (HGB), hematocrit (HCT), as well as the RBC indices such as: mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), red cell distribution width (RDW) were measured with hematology analyzer Sysmex KX-21 (Sysmex Corporation, Japan).

*Determination of cytokinetic indices of RBC balance of blood.* To stain reticulocytes, 0.3 ml of blood was mixed with 0.1 ml of 1% diamond cresil blue prepared with 0.9% NaCl solution (Arbis<sup>+</sup>, Russia) and kept for 40 min at room temperature. A part of blood with anticoagulant was kept for 4 hrs in a thermostat at 37°C, then the samples were stained as described above. The smears were prepared from all the samples and then fixed in methanol. They were air-dried and examined with immersion microscope Micromed-5 ( $\times 100$  objective lens,  $\times 10$  ocular lens) (LOMO, Russia). Reticulocytes were counted per 1,000 red blood cells.

The RBC lifespan was assessed by the method based on determining the rate of *in vitro* reticulocyte maturation. This method assumes the presence of equilibrated RBC balance, ensured by inflow



натній температурі. Частину крові з антикоагулянтном витримували 4 години в термостаті при 37°C, далі проби забарвлювали, як описано вище. З усіх проб готували мазки, а потім фіксували в метанолі. Мазки висушували на повітрі та переглядали на імерсійному мікроскопі «Мікромед-5» (об'єктив  $\times 100$ , окуляр  $\times 10$ ) («ЛОМО», Росія). Підрахунок ретикулоцитів виконували на 1000 еритроцитів.

Тривалість життя еритроцитів оцінювали за методом, заснованим на визначенні швидкості дозрівання ретикулоцитів *in vitro*. Даний метод передбачає наявність рівноважного еритроцитарного балансу, який забезпечується надходженням і виведенням із крові однакової кількості еритроцитів за одиницю часу. Ми припустили, що рівноважний баланс еритроцитів у крові тварин підтримується як у торпідному стані, так і під час виходу зі сплячки. Цитокінетичні показники еритроцитарного балансу крові розраховували за формулами, запропонованими А. В. Ілюхіним і співавт. [3, 6]. За кількістю еритроцитів і ретикулоцитів до та після 4 годин інкубації розраховували період напіввиведення ретикулоцитів із проби ( $T_{1/2p}$ ), величину добової продукції еритроцитів ( $P_{ep/\text{доб}}$ ) та період напіввиведення еритроцитів із кровообігу ( $T_{1/2ep}$ ).

Період напіввиведення ретикулоцитів із проби, обумовлений їх дозріванням, розраховували за формулою:

$$T_{1/2p} = \frac{0,301 \times t}{-\lg \frac{N_{pt}}{N_{p0}}} = \frac{1,204}{-\lg \frac{N_{pt}}{N_{p0}}},$$

де  $t$  – час інкубації;  $N_{p0}$  – кількість ретикулоцитів в пробі до інкубації, %;  $N_{pt}$  – кількість ретикулоцитів у пробі після інкубації, %.

Величину добової продукції еритроцитів на 1 мкл крові визначали за рівнянням:

$$P_{ep/\text{доб}} = \frac{0,693}{T_{1/2ep}} \times N_{ep},$$

де  $T_{1/2ep}$  – період напіввиведення еритроцитів із кровообігу (діб).

Період напіввиведення еритроцитів оцінювали за формулою:

$$T_{1/2ep} = \frac{T_{1/2p} \times 1000}{N_{p0} \times 24},$$

and outflow of the same number of RBCs per time unit. We have assumed that an equilibrated balance of RBCs in blood of animals is maintained both in a torpid state and during arousal from hibernation as well. Cytokinetic indices of RBC balance of blood were counted by the formulas proposed by A.V. Ilyukhin *et al.* [15, 21]. The half-life of reticulocytes ( $T_{1/2r}$ ) in a sample, the value of red blood cell production per day ( $P_{RBC/\text{day}}$ ) and the half-life of red blood cells in blood circulation ( $T_{1/2RBC}$ ) were calculated by RBC and reticulocyte counts prior to and after 4 hrs of incubation.

The reticulocytes' half-life, stipulated by their maturation was calculated by the formula:

$$T_{1/2r} = \frac{0.301 \times t}{-\lg \frac{N_{rt}}{N_{r0}}} = \frac{1.204}{-\lg \frac{N_{rt}}{N_{r0}}},$$

where  $t$  is incubation time;  $N_{r0}$  is reticulocyte number in the sample prior to incubation, %;  $N_{rt}$  is reticulocyte number in the sample after incubation, %.

The value of daily RBC production per 1  $\mu\text{l}$  of blood ( $P_{RBC/\text{day}}$ ) was found with the equation:

$$P_{RBC/\text{day}} = \frac{0.693}{T_{1/2RBC}} \times N_{RBC},$$

where  $T_{1/2RBC}$  is bloodstream RBC half-life (days).

The RBC half-life was estimated by the formula:

$$T_{1/2RBC} = \frac{T_{1/2r} \times 1000}{N_{r0} \times 24},$$

Our findings were statistically processed using one-way analysis of variance (ANOVA) and Pearson's correlation coefficient using Statistica 8.0. software (StatSoft, USA). Significance of differences was determined by Fisher's test at the level of  $p \leq 0.05$ . The data in the Table and diagrams are given as the mean  $\pm$  mean error.

## Results and discussion

The analysis of RBC count in *S. pygmaeus* blood under deep hibernation revealed no significant differences as compared with the control (Fig. 1A). It is known that in deep hibernation the yellow (*Spermophilus fulvus*), relict (*Spermophilus relictus*) [29] and thirteen-lined ground squirrels (*S. tridecemlineatus*) [8] demonstrated no changes in RBC count as compared with summer animals. Du-



Статистичну обробку результатів проводили за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) та кореляційного аналізу за методом Пірсона з використанням пакета «Statistica 8.0.» («StatSoft», США). Значущість відмінностей визначали за критерієм Фішера на рівні  $p \leq 0,05$ . Дані в таблиці та діаграмах наведено як середнє  $\pm$  похибка середнього.

### Результати та обговорення

Аналіз кількості еритроцитів у крові *S. pygmaeus* у стані глибокої гібернації не виявив значущих відмінностей порівняно з контролем (рис. 1, А). Відомо, що у стані глибокої гібер-

ring arousal, the RBC count in *S. pygmaeus* blood did not significantly change as well.

It should be noted that the hemoglobin level in *S. pygmaeus* blood both in a torpid state and during warming, did not considerably change with respect to the control (Fig. 1B). After 2 months of hibernation in Daurian ground squirrels (*Spermophilus dauricus*), the hemoglobin level in blood remained unchanged as well [14]. At the same time, the hematocrit in *S. pygmaeus* significantly decreased in a torpid state (Fig. 1C). A similar phenomenon was also found in bats and small marsupials [10]. Of interest is to note that in large hibernating mammals, the brown bear (*Ursus*

Цитокінетичні показники еритроцитарного балансу крові ховрахів в умовах зимової сплячки і динаміці ініційованого зігрівання ( $n = 6$  для кожного стану)

Cytokinetic indices of RBC blood balance in ground squirrels under winter hibernation and during initiated rewarming ( $n = 6$  for each state)

Стан тварини Animal state	$N_{r0}$ $N_{r0}$	$N_r$ через 4 год $N_r$ in 4 hrs	$T_{1/2p}$ $T_{1/2r}$	$T_{1/2ep}$ $T_{1/2RBC}$	$P_{ep/roba}$ $P_{RBC/day}$
Контроль Control	2,26 $\pm$ 0,06	1,99 $\pm$ 0,06	19,07 $\pm$ 0,44	358,45 $\pm$ 0,63	27199 $\pm$ 1808
Сплячка, $T_t$ 4°C Hibernation, 4°C Tb	1,50 $\pm$ 0,24*	1,37 $\pm$ 0,26*	13,28 $\pm$ 1,01*	280,68 $\pm$ 36,97*	27811 $\pm$ 2116
Зігрівання, $T_t$ 10°C Rewarming, 10°C Tb	1,78 $\pm$ 0,05*	1,18 $\pm$ 0,13*	10,56 $\pm$ 2,09**	253,98 $\pm$ 55,34	46899 $\pm$ 9701*
Зігрівання, $T_t$ 20°C Rewarming, 20°C Tb	1,93 $\pm$ 0,09*	1 $\pm$ 0,17	6,99 $\pm$ 0,15 <sup>#</sup>	208,74 $\pm$ 49,82*	55210 $\pm$ 11061*
Зігрівання, $T_t$ 25°C Rewarming, 25°C Tb	2,07 $\pm$ 0,18	1,63 $\pm$ 0,22	14,48 $\pm$ 1,75*	244,19 $\pm$ 43,23*	46285 $\pm$ 13414,8
Зігрівання, $T_t$ 30°C Rewarming, 30°C Tb	3,05 $\pm$ 0,43**	2,27 $\pm$ 0,12 <sup>#</sup>	18,67 $\pm$ 1,21 <sup>#</sup>	316,55 $\pm$ 28,79 <sup>#</sup>	32507 $\pm$ 3008
Зігрівання, $T_t$ 37°C Rewarming, 37°C Tb	1,78 $\pm$ 0,06*	1,25 $\pm$ 0,08*	7,47 $\pm$ 0,81**	193,74 $\pm$ 22,82*	63257 $\pm$ 5229**

**Примітки:** відмінності значущі порівняно з контролем (\*) та сплячкою (#),  $p \leq 0,05$ .

**Notes:** differences are significant if compared with the control (\*) and hibernation (#),  $p \leq 0.05$ .

нації у жовтого (*Spermophilus fulvus*), реліктового (*Spermophilus relictus*) [9] і тринадцятилиного ховрахів (*S. tridecemlineatus*) [16] також не було виявлено змін у кількості еритроцитів порівняно з літнім контролем. Під час пробудження кількість еритроцитів у крові *S. pygmaeus* також значуще не змінювалася.

Варто відзначити, що рівень гемоглобіну в крові *S. pygmaeus* як у торпідному стані, так і під час зігрівання значуще не змінювався по відношенню до контролю (рис. 1, В). Після 2 місяців сплячки у даурських ховрахів (*Spermophilus dauricus*) рівень гемоглобіну в крові також не змінювався [21]. У той час гематокрит у *S. pygmaeus* значуще знижувався у торпідному стані (рис. 1, С). Подібне явище було виявлено

*arctos*) for example, the hematocrit was conversely increased during deep hibernation [32]. Such differences in hematocrit under hypobiosis were probably stipulated by animal species, its body temperature during hibernation and its duration.

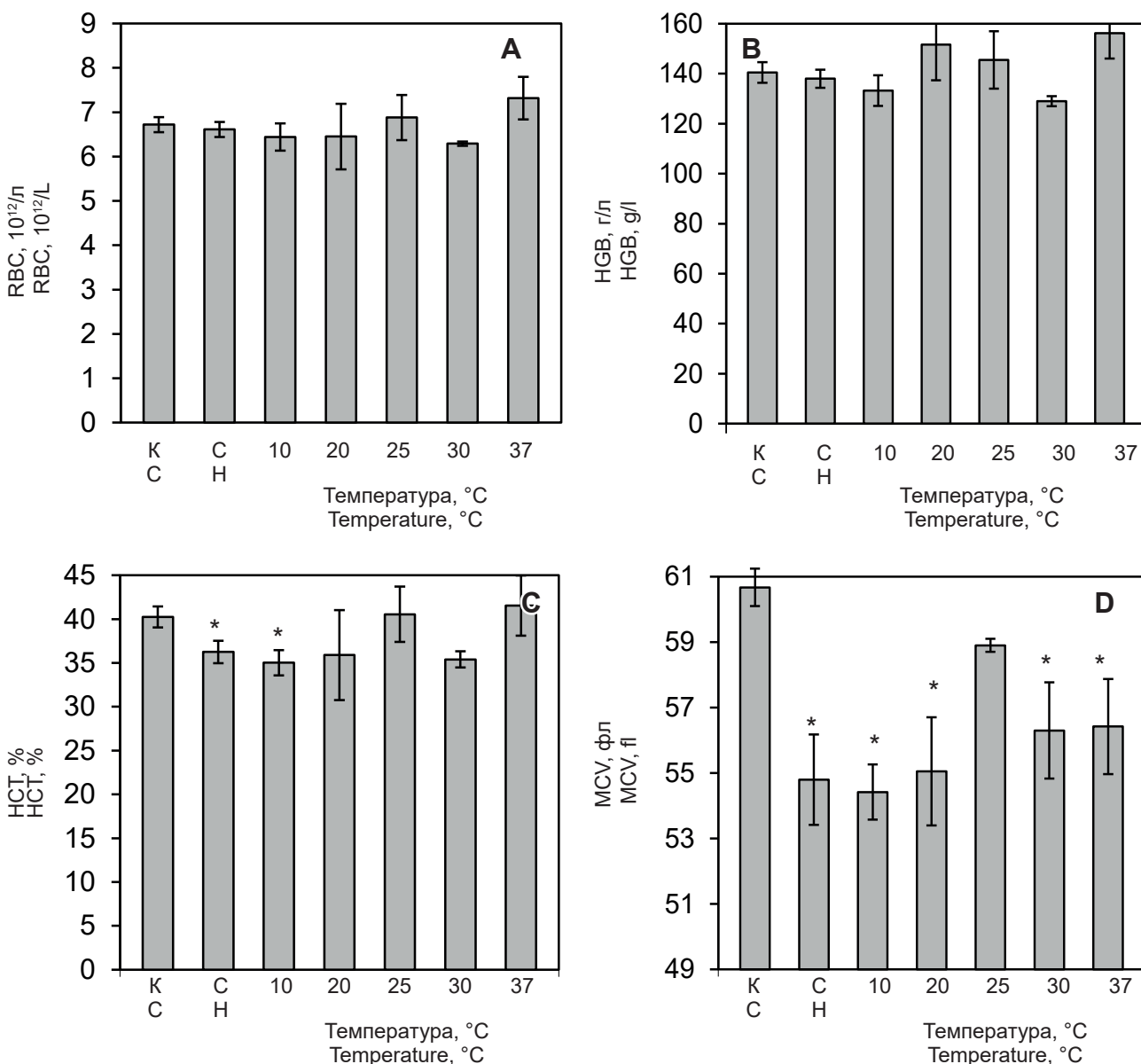
It should be noted that during ground squirrel rewarming at Tb of 25°C, the hematocrit increased up to the control level, and then decreased again and normalized only after complete rewarming of animal (Fig. 1C). Hematocrit is one of the main rheological factors, on which the fluidity and hemodynamics of whole blood and, consequently, tissue perfusion are dependent [7]. In this view, the hematocrit decrease in ground squirrels, being in a torpid state may contribute to an increase in blood fluidity, thereby improving a local perfu-



також у кажанів і дрібних сумчастих [18]. Цікаво відзначити, що у великих зимосплячих ссавців, таких як бурий ведмідь (*Ursus arctos*), гематокрит у стані глибокої зимової сплячки, навпаки, зростає [32]. Такі відмінності гематокриту в стані гіпобіозу, ймовірно, обумовлені видом тварини, температурою її тіла під час сплячки і тривалістю сплячки.

Слід зазначити, що під час зігрівання ховрахів при  $T_t$  25°C гематокрит зростає до контрольного рівня, а потім знову знижується і нормалізується лише після їх повного зігрівання (рис. 1, С). Гематокрит є одним із основ-

них показників крові ховрахів в умовах зимової сплячки і в динаміці ініційованого зігрівання: (А – RBC, В – HGB, С – HTC, D – MCV), К – контроль, С – сплячка. \* – різниця значуща по відношенню до контролю,  $p \leq 0,05$ .



**Рис. 1.** Гематологічні показники крові ховрахів в умовах зимової сплячки і в динаміці ініційованого зігрівання: А – RBC, В – HGB, С – HTC, D – MCV), К – контроль, С – сплячка. \* – різниця значуща по відношенню до контролю,  $p \leq 0,05$ .

**Fig. 1.** Hematological variables of ground squirrel blood during winter hibernation and initiated rewarming: (A – RBC, B – HGB, C – HTC, D – MCV), C – control, H – hibernation. \* – differences are significant if compared with the control,  $p \leq 0.05$ .



них реологічних факторів, від якого залежить текучість та гемодинаміка цільної крові і, отже, перфузія тканин [15]. З цієї позиції зниження гематокриту у ховрахів, які перебувають у торпідному стані, можливо, сприяє підвищенню текучості крові і тим самим покращує локальну перфузію тканин. Це особливо важливо, оскільки в період сплячки об'єм плазми і циркулюючої крові у гібернантів зменшується [17, 20, 23]. Гематокрит безпосередньо пов'язаний з основними характеристиками еритроцитів: кількістю, розміром, формою та здатністю до деформації [7]. Оскільки згідно з нашими даними кількість еритроцитів у крові ховрахів у торпідному стані істотно не змінюється, тому можна вважати, що основний внесок в зниження гематокриту вносять їх власні мікрореологічні властивості (розмір, форма тощо). Із рис. 1, D видно, що у гібернуючих ховрахів MCV зменшується на 9,8% ( $p < 0,05$ ), а під час зігрівання спостерігається тенденція до його збільшення. Кореляційний аналіз показав, що зміни гематокриту в циклі сплячка-зігрівання позитивно корелюють ( $r = 0,72$ ) зі змінами MCV, що вказує на їх тісний взаємозв'язок.

Варто зазначити, що збільшення MCV і НСТ, яке виявлене після досягнення  $T_t$  25°C (рис. 1, C і D), може мати біологічний сенс. Встановлено, що помірне підвищення в'язкості крові сприяє перфузії тканин, збільшенню щільності функціонуючих капілярів у них і зменшенню периферичного судинного опору [34], що, в свою чергу, призводить до підвищення напруги зсуву на стінці судини, активації ендотелію з подальшим виділенням вазодилататорної молекули – оксиду азоту (NO) [26]. Показано, що в тканині печінки, легенях і серці малоазійських ховрахів (*Spermophilus xanthoprimum*) після пробудження рівень стабільних метаболітів NO був вище, ніж у тих тварин, які знаходилися у стані сплячки [11]. Електронно-імуноцитохімічним методом показано, що в ендотеліальних клітинах ниркової та брижової артерій золотистих хом'яків (*Mesocricetus auratus*) у торпідному стані кількість клітин, які містять синтазу оксиду азоту (NO-синтаза), значно менша порівняно з контролем, а на пізній стадії пробудження тварин, коли  $T_t$  протягом 2 годин підвищилася з 9 до 32°C, кількість таких клітин практично не відрізнялася від контролю [33]. Експресію NO-синтази в ендотеліальних клітинах під час пробудження тварин автори також пов'язують із підвищенням напруги зсуву на стінці судини.

Які ж причини зменшення об'єму еритроцитів під час гібернації? S.T. Cooper та співавт.

to its increase during rewarming. The correlation analysis showed the hematocrit changes in hibernation-rewarming cycle to positively correlate ( $r = 0.72$ ) with those in MCV, indicating thereby a close relationship between them.

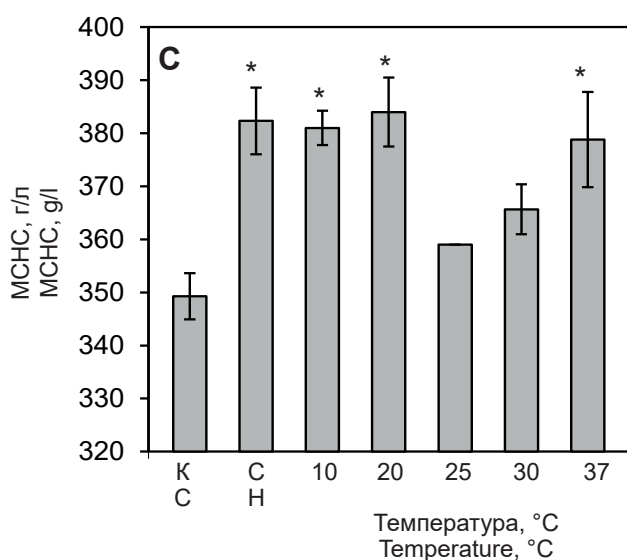
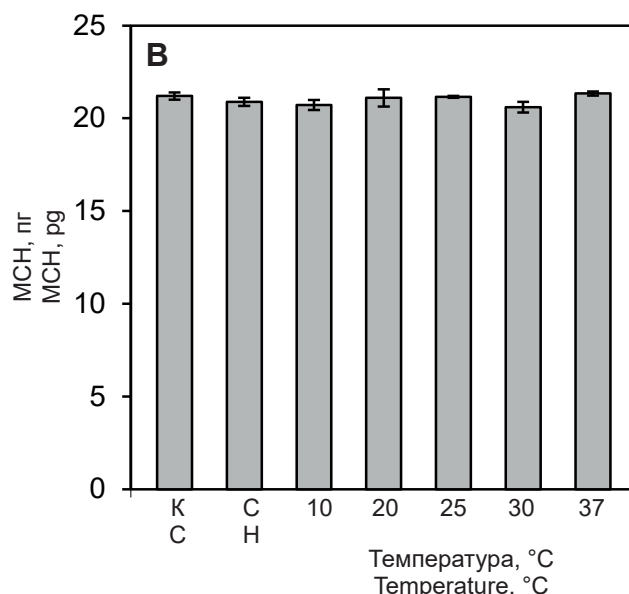
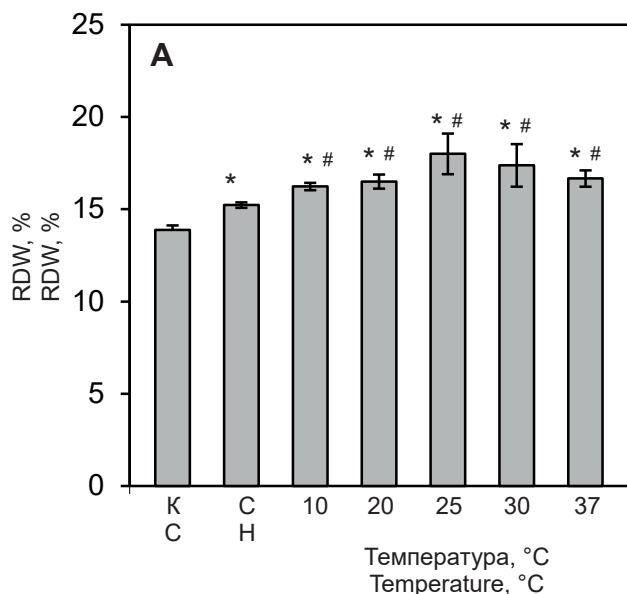
It should be noted that an increase in MCV and HCT, revealed after reaching  $T_b$  of 25°C (Fig. 1C and D), may have a biological meaning. It was found out that a moderate rise in blood viscosity promoted the tissue perfusion, the augmented functional capillary density in them and reduced peripheral vascular resistance [34], which in turn entailed an increased shear stress on vessel wall, endothelial activation with subsequent release of vasodilator molecules: nitric oxide (NO) [23]. In tissues of liver, lungs and heart of Asia Minor ground squirrels (*Spermophilus xanthoprimum*) the level of NO stable metabolites after arousal was shown to be higher than in the animals during hibernation [3]. Electronimmunocytochemistry demonstrated that in endothelial cells of renal and mesenteric arteries of golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) in a torpid state, the number of cells containing nitric oxide synthase (NO-synthase) was much lower than in the control, and at a late stage of animal arousal, when  $T_b$  increased from 9 up to 32°C within 2 hrs, the number of these cells did not virtually differ from the control [33]. The expression of NO-synthase in endothelial cells during animal arousal, the authors also associated with an increased shear stress on the vessel wall.

What are the reasons for decrease in RBC volume during hibernation? S.T. Cooper *et al.* [8] showed a MCV decrease of in hibernators at a torpid state and suggested it to be associated with the RBC loss of a part of damaged membrane due to a prolonged circulation in bloodstream. It is possible that during circulation in the hypobiosis-arousal cycle a part of RBC membrane undergoes changes due to oxidative modification of lipids and proteins, band 3 protein clustering, externalization of phosphatidylserine to outer monolayer, binding to autologous antibodies because of aging or erythroptosis [30], with subsequent RBC elimination by cells of reticuloendothelial system. The removal of a membrane part by vesiculation allows preserving more than 80% of RBC membrane, preventing thereby their pre-mature elimination from bloodstream [40].

The *S. pygmaeus* in a torpid state showed the RDW increase by 9.7% ( $p < 0.001$ ) relative to the control (Fig. 2A). This testifies to the RBC presence in their blood, which differ significantly







**Рис. 2.** Гематологічні показники крові ховрахів в умовах зимової сплячки і динаміці ініційованого зігрівання: **A** – RDW, **B** – MCH, **C** – MCHC, К – контроль, С – сплячка. Різниця значуща по відношенню до контролю (\*) та сплячки (#),  $p \leq 0,05$ .

**Fig. 2.** Hematological variables of ground squirrel blood under hibernation and during initiated rewarming: (**A** – RDW, **B** – MCH, **C** – MCHC), C – control, H – hibernation. Differences are significant if compared with the control (\*) and hibernation (#),  $p \leq 0.05$ .

[16] показали зменшення MCV у гібернантів у торпідному стані та припустили, що воно пов'язане з втратою еритроцитами частини пошкодженої мембрани внаслідок тривалої циркуляції в кров'яному руслі. Можливо, що в процесі циркуляції в циклі гіпобіоз-пробудження частина мембрани еритроцитів змінюється внаслідок окисної модифікації ліпідів і білків, кластеризації білка смуги 3, екстерналізації фосфотиділсерину на зовнішній моношар, зв'язування з аутологічними антитілами через старіння або еритроптоза [30], з подальшою елімінацією еритроцитів клітинами ретикуло-ендотеліальної системи. Видалення ж частини мембрани шляхом везикулізації дозволяє зберегти понад 80 % мембрани еритроцитів, що запобігає передчасній їх елімінації з кровотоку [40].

Показано, що у *S. pygmaeus* у торпідному стані RDW збільшується на 9,7% ( $p < 0,001$ ) по

in size. The initial stages of animal rewarming contribute to further RDW increase, *i. e.* at Tb of 25°C it reaches the maximum values ( $18.01 \pm 1.10\%$ ), that is 29.8% higher than in animals of the control group ( $p < 0.001$ ), and by 18.3% higher than in those in a torpid state ( $p < 0.001$ ). Of note is the fact, that after complete animal rewarming, this index is not normalized.

Hibernation and rewarming do not affect the MCH (Fig. 2B), that is consistent with the changes in hemoglobin content and RBC count. Herewith, MCHC in dormant ground squirrels augments by 9.5% ( $p < 0.001$ ) and remains increased at the initial stages of animal rewarming (Tb of 10–20°C) (Fig. 2C). Further animal rewarming up to Tb of 25–30°C promotes reducing MCHC down to the level of control, however at Tb of 37°C this parameter value is restored up to the level of dormant animals. Correlation analysis showed the MCHC in the hibernation-rewarming cycle to negatively correlate ( $r = -0.5$ ) with MCV. An increased MCHC during hibernation likely enables enhancing the oxygen capacity of individual RBCs. It is known that in a torpid state at low body temperature, the affinity of hemoglobin for oxygen increases [31]. At the same time, the concentration of 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG)



відношенню до контролю (рис. 2, А). Це свідчить про наявність у їх крові еритроцитів, які істотно відрізняються за розмірами. Початкові етапи зігрівання тварини сприяють подальшому підвищенню RDW: при  $T_t$  25°C він сягає максимальних значень ( $18,01 \pm 1,10$ )%, що на 29,8% більше, ніж у тварин контрольної групи ( $p < 0,001$ ), і на 18,3% – ніж у тварин у торпідному стані ( $p < 0,001$ ). Варто зазначити, що після повного зігрівання тварин даний показник не нормалізувався.

Сплячка і зігрівання не впливають на MCH (рис. 2, В), що узгоджується зі змінами вмісту гемоглобіну та кількості еритроцитів. При цьому MCHC у сплячих ховрахів зростала на 9,5% ( $p < 0,001$ ) і залишалася підвищеною на початкових етапах зігрівання тварин ( $T_t$  10–20°C) (рис. 2, С). Подальше зігрівання тварин до  $T_t$  25–30°C сприяє зниженню MCHC до рівня контролю, однак при  $T_t$  37°C значення цього параметра відновлюється до рівня сплячих тварин. Кореляційний аналіз показав, що показник MCHC у циклі сплячка-зігрівання негативно корелює ( $r = -0,5$ ) з MCV. Підвищення MCHC в умовах сплячки, можливо, дозволяє збільшити кисневу ємність окремих еритроцитів. Відомо, що в торпідному стані при низькій температурі тіла підвищується афінність гемоглобіну до кисню [31]. При цьому в еритроцитах зменшується концентрація 2,3-діфосфогліцерату (2,3-ДФГ), що знижує віддачу кисню тканинам. Під час пробудження хом'яків виявлено підвищення рівня 2,3-ДФГ у еритроцитах порівняно з торпідним станом [38]. Отже, під час виходу зі сплячки підвищення  $T_t$  і концентрації 2,3-ДФГ може знизити спорідненість гемоглобіну до кисню і сприяти швидкій оксигенації тканин.

Таким чином, протягом циклу сплячка-зігрівання в крові ховрахів значуще змінюються об'єм, насиченість гемоглобіном і гетерогенність популяції еритроцитів, при цьому їх кількість істотно не змінюється. У сукупності це вказує на зміни в системі еритрона ховрахів, які перебувають у торпідному стані та на різних етапах виходу зі сплячки.

Рівновага в системі еритрона обумовлена двома факторами: природною смертю еритроцитів та їх кістково мозковою продукцією. Запропонована А.В. Ілюхіним та співавт. [3] методика підрахунку кістково мозкової продукції еритроцитів, яка полягає у визначенні вмісту ретикулоцитів до та після інкубації проби крові за певний проміжок часу, дозволяє отримати ряд цитокінетичних характеристик.

in RBCs decreases, reducing thereby the oxygen delivery to tissues. During arousal of hamsters, there was noted an increase in 2,3-DPG level in RBCs as compared with a torpid state [38]. So, during arousal from hibernation, an increase in  $T_b$  and 2,3-DPG concentration can reduce the hemoglobin affinity for oxygen and promote rapid tissue oxygenation.

Thus, during the hibernation-rewarming cycle in blood of ground squirrels there is a significant variation in the volume, hemoglobin saturation and heterogeneity of RBC population, while there is no strong alteration in their number. Altogether, this testifies to the changes in erythron system of ground squirrels, being in a torpid state and at different stages of arousal.

The equilibrium in the erythron system is stipulated by two factors, *i. e.* natural death of RBCs and their production by bone marrow. The technique of counting the bone marrow production of RBCs proposed by A.V. Ilyukhin *et al.* [15], consisting in examining the reticulocyte count prior to and after incubation of blood sample for a certain time period, allows to obtain some cytokinetic characteristics.

The RBC cytokinetic indices, presented in the Table demonstrate a decrease in an initial number of reticulocytes ( $N_{r0}$ ) in blood of ground squirrels in a torpid state by 33.6% ( $p < 0.05$ ) versus the control. The rewarming contributed to an increase in reticulocyte count, which reached the maximum at  $T_b$  of 30°C, *i. e.* an increment was 34.9 and 103.3% versus the control and torpid state, respectively. After complete recovery of  $T_b$  of animals up to 37°C the reticulocyte count decreased and corresponded to that at the initial stages of arousal. A low reticulocyte count was also found in blood of dormant and artificially aroused *S. undulatus* [13]. Thus, the animal rewarming induces the reticulocyte release from bone marrow into the blood.

The calculation of reticulocyte half-life ( $T_{1/2r}$ ), determined by the time of their maturation, showed its reduction under torpid states by 30.4% as compared with the control. This may be due to a higher potential for rapid maturation in reticulocytes of hibernating animals than the control ones. This property is most likely associated to a change in gene expression level, responsible for this process. S.T. Cooper *et al.* showed [8] that during hibernation in heterotherms, the expression of most genes, associated with erythropoiesis was not significantly changed. The exception was a three-fold increase in SF3B1 gene expression. A high level of SF3B1 gene expression is suggested as



З представлених у таблиці цитокінетичних показників еритроцитів видно, що в крові ховрахів, які перебувають в торпідному стані, вихідна кількість ретикулоцитів ( $N_{p0}$ ) знижувалася на 33,6% ( $p < 0,05$ ) відносно контролю. Зігрівання сприяло збільшенню кількості ретикулоцитів, яка досягала максимуму при  $T_t$  30°C, – приріст становив 34,9% відносно контролю і 103,3% відносно торпідного стану. Після повного відновлення  $T_t$  тварин до 37°C кількість ретикулоцитів знижувалася і відповідала такій на початкових етапах пробудження. У крові сплячих і штучно пробуджених *S. undulatus* також було виявлено низький рівень ретикулоцитів [2]. Таким чином, розігрівання тварини індукує вихід ретикулоцитів із кісткового мозку в кров.

Розрахунок періоду напіввиведення ретикулоцитів ( $T_{1/2p}$ ), який визначається часом їх дозрівання, показав, що в стані гіпобіозу він зменшується на 30,4 % порівняно з контролем. Це може бути обумовлено тим, що ретикулоцити у гібернаючих тварин мають більш високий потенціал до швидкого дозрівання, ніж у тварин контрольної групи. Така властивість, швидше за все, пов'язана зі зміною рівня експресії генів, відповідальних за цей процес. Дослідження S.T. Cooper та співавторів показали [16], що протягом зимової сплячки у гетеротермів експресія більшості генів, пов'язаних із еритропоезом, не зазнавала суттєвих змін. Виняток становить триразове збільшення експресії гена SF3B1. Припускається, що високий рівень експресії цього гена може сприяти ефективному еритрогенезу під час коротких періодів пробудження тварин [16]. Це узгоджується з нашими даними, які демонструють збільшення кількості ретикулоцитів під час зігрівання. Виявилось, що на початкових етапах зігрівання тварин ( $T_t$  10 і 20°C) істотно скорочувався період напіввиведення ретикулоцитів (на 44,63 і 63,3% відповідно) відносно контрольних значень. Зігрівання ховрахів ( $T_t$  30°C) призводило до збільшення часу дозрівання ретикулоцитів до показників контрольних тварин. А після остаточного зігрівання ( $T_t$  37°C) величина  $T_{1/2p}$  знову значно знижувалася (на 56,2%) відносно контролю.

Під час глибокої сплячки період напіввиведення еритроцитів із кровообігу ( $T_{1/2ep}$ ) скорочувався на 21,7% відносно контролю. Слід зазначити, що отримані нами результати не узгоджуються з даними М. А. Brock [13], яка, використовуючи радіоактивний хром ( $^{51}\text{Cr}$ ), виявила суттєве подовження тривалості життя еритроцитів у *M. auratus*, які перебували у торпідному стані. Така невідповідність, ймовірно, пояснюється

likely promoting an efficient erythropoiesis during short periods of animal arousal [8]. This is consistent with our findings, demonstrating an increase in reticulocyte count during rewarming. At that at the initial stages of animal rewarming ( $T_b$  of 10 and 20°C) the reticulocyte half-life was found to be significantly reduced (by 44.63 and 63.3%, respectively) versus the control values. The rewarming of ground squirrels up to  $T_b$  of 30°C led to an increase in maturation time of reticulocytes up to the indices of control animals. And after the final rewarming ( $T_b$  of 37°C) the  $T_{1/2r}$  value significantly decreased again (by 56.2%) versus the control.

During deep hibernation, the RBC half-life ( $T_{1/2RBC}$ ) decreased by 21.7% relative to the control. It should be noted that our findings do not agree with the data reported by M.A. Brock [5], who, using radioactive chromium ( $^{51}\text{Cr}$ ), has revealed a significant extension of RBC lifespan in *M. auratus*, which were in a torpid state. This discrepancy may result from differences in research techniques, animal species and hibernation duration.

At the initial stages of animal rewarming the  $T_{1/2RBC}$  was further decreased, and at  $T_b$  of 20°C it made already 55.9% versus the control. At  $T_b$  of 25–30°C, the RBC half-life augmented up to the level of animals in a torpid state. However, after complete animal rewarming,  $T_{1/2RBC}$  was again by 43.7% lower than in the animals in a torpid state and by 56.24% lower than the control group.

Reduced lifespan of RBCs during animal arousal from hibernation may be associated with oxidative membrane damage. There are no direct data on changes in the level of reactive oxygen species (ROS) in blood plasma and RBCs during animal arousal from hibernation, but indirect data indicate the intensification of ROS formation in tissues at certain stages of arousal. O. Toien *et al.* [39] during initiated arousal from hibernation of Arctic ground squirrels (*Spermophilus parryi*) (21°C ambient temperature) after reaching 23°C in mouth (rectal temperature was ~10°C) revealed a peak of oxygen consumption that coincided with the maximum rate of fall of ascorbic acid level in blood plasma and accumulation of uric acid: an index of ROS formation. In blood of *M. auratus* the peaks of oxygen consumption and uric acid accumulation in blood plasma were observed at  $T_b$  of 32°C [26, 27]. Namely at this body temperature the highest increase in the activity of antioxidant enzymes such as: extracellular superoxide dismutase (SOD) and catalase was found in blood



різними методами дослідження, видом тварин і тривалістю сплячки.

На початкових етапах зігрівання тварин відбувається подальше зниження  $T_{1/2ep}$ , і при  $T_t$  20°C він вже становить 55,9% відносно контролю. При  $T_t$  25–30°C період напіввиведення еритроцитів збільшується до рівня тих, що знаходяться у торпідному стані. Однак після повного відігрівання тварин  $T_{1/2ep}$  знову стає на 43,7% менше, ніж у тварин, які перебувають у торпідному стані та на 56,24% менше порівняно контрольної групи.

Скорочення тривалості життя еритроцитів під час пробудження тварин від зимової сплячки може бути пов'язане з окисними пошкодженнями мембрани. Прямі дані щодо зміни рівня активних форм кисню (АФК) у плазмі крові та еритроцитах під час пробудження тварин від зимової сплячки відсутні, однак непрямі дані вказують на інтенсифікацію утворення АФК у тканинах на певних етапах пробудження. О. Тоїєн та співавт. [39] під час ініційованого пробудження від сплячки арктичних ховрахів (*Spermophilus parryi*) (температура навколишнього середовища 21°C) після досягнення температури в ротовій порожнині 23°C (ректальна температура ~ 10°C) виявили пік споживання кисню, який збігався з максимальною швидкістю падіння рівня аскорбінової кислоти в плазмі крові та накопичення сечової кислоти – індикатору утворення АФК. У крові *M. auratus* піки споживання кисню і накопичення сечової кислоти в плазмі крові спостерігалися при  $T_t$  32°C [28, 29]. Саме при цій температурі тіла в плазмі крові було виявлено найбільше підвищення активності таких антиоксидантних ферментів, як екстрацелюлярна супероксиддисмутаза (СОД) і каталаза [10, 28, 29]. Дослідження інтенсивності вільнорадикальних процесів у крові *S. pygmaeus* у динаміці пробудження показало значне підвищення окислювальної модифікації білків плазми (за карбонільними групами) після підйому  $T_t$  до 25°C [1]. При цьому в плазмі крові підвищувалася загальна антиокисна активність, а в еритроцитах – активність СОД. Ці дані вказують на те, що у різних тварин на певній стадії пробудження від сплячки через значне прискорення метаболізму і реперфузії «бездіяльних» тканин відбувається інтенсифікація процесів утворення АФК у крові, які до включення антиоксидантного захисту на повну потужність можуть сприяти окислювальним пошкодженням білків, ліпідів плазми та мембран формених елементів крові. Слід зазначити, що окисні пошкодження мембрани призводять до швидкого ста-

plasma [1, 26, 27]. The study of the intensity of free radical processes in blood of *S. pygmaeus* during arousal showed a significant increase in oxidative modification of plasma proteins (by carbonyl groups) after  $T_b$  increase up to 25°C [2]. Herewith, the general antioxidant activity increased in blood plasma, and SOD activity did in RBCs. These data indicate that in different animals at a certain stage of arousal from hibernation resulted from a significant acceleration of metabolism and reperfusion of 'inactive' tissues, the ROS formation in blood is intensified, which before triggering an antioxidant protection at full power can contribute to oxidative damages of proteins and plasma lipids and membranes of blood cells. It should be noted that oxidative damages to membrane lead to rapid aging of RBCs, resulted in accelerated excretion of these cells from bloodstream [24].

Based on our findings, we may suggest the reticulocytes of torpid animals to have a higher potential for rapid maturation, and RBCs are characterized with a faster elimination from bloodstream as compared with the control group of animals. This potential can not be realized at low  $T_b$  during hibernation, but at the stages of animal rewarming it may have biological meaning. Probably, the revealed changes have the character of 'offensive', resistant form of adaptation, occurring during animal arousal, *i. e.* the young reticulocytes are able to mature more rapidly into RBCs, and the ones, which may be exposed to destructive processes during hibernation, may be faster eliminated from bloodstream. Of interest is the fact, that between the period of reticulocyte maturation and that of RBC elimination from blood there is a positive correlation ( $r = 0.93$ ;  $p < 0.05$ ), *i. e.* the higher is the reticulocytes ability to mature, the shorter is the RBC bloodstream half-life.

The calculation of RBC production per day ( $P_{RBC/day}$ ) showed this index as remained virtually unchanged during hibernation relative to the control. Animal warming up to  $T_b$  of 25°C was accompanied by a significant increase in RBC production per day, but at  $T_b$  of 30°C it significantly decreased (by 30.7%) relative to the initial stage of rewarming ( $T_b$  of 10°C). However, after  $T_b$  normalization, a pronounced manifestation of RBC production per day was observed, and its level was herewith 2.3 times higher than the control values.

Many hematological characteristics and erythrokinetic indices should be noted to be significantly changed within the  $T_b$  range of 25–30°C.



ріння еритроцитів, внаслідок чого такі клітини прискорено виводяться з кровообігу [27].

На підставі отриманих даних можна зробити висновок, що ретикулоцити тварин, які перебувають у торпідному стані, мають більш високий потенціал до швидкого дозрівання, а еритроцити – до швидшого виведення з кровообігу порівняно з тваринами контрольної групи. Цей потенціал не може реалізовуватися при низьких  $T_t$  у період сплячки, але на етапах розігрівання тварин може мати біологічний сенс. Ймовірно, виявлені зміни мають характер «наступальної», резистентної форми адаптації, яка виникає під час пробудження тварин, тобто юні ретикулоцити здатні швидше дозрівати в еритроцити, а еритроцити, які можуть бути схильні до деструктивних процесів у період сплячки швидше виводитися з кровообігу. Цікаво, що між періодом дозрівання ретикулоцитів і періодом виведення еритроцитів з кровообігу спостерігається позитивна кореляція ( $r = 0,93$ ;  $p < 0,05$ ), тобто чим вище здатність ретикулоцитів до дозрівання, тим коротший період напіввиведення еритроцитів із кровообігу.

Розрахунок продукції еритроцитів у добу ( $P_{ep/доба}$ ) показав, що протягом зимової сплячки цей показник практично не змінюється відносно контролю. Зігрівання тварин до  $T_t 25^\circ\text{C}$  супроводжується значним збільшенням добової продукції еритроцитів, але при  $T_t 30^\circ\text{C}$  вона значно зменшується (на 30,7%) відносно початкового етапу зігрівання ( $T_t 10^\circ\text{C}$ ). Однак після нормалізації  $T_t$  спостерігається виражена маніфестація добової продукції еритроцитів, при цьому її рівень перевищує контрольні значення в 2,3 рази.

Слід зазначити, що багато гематологічних характеристик і показників еритрокінетики істотно змінюються в діапазоні  $T_t 25\text{--}30^\circ\text{C}$ . На наш погляд ці зміни можна пояснити тим, що приблизно в цьому діапазоні  $T_t$  значно підвищується споживання кисню [29] і активуються вільнорадикальні процеси у тканинах [1, 5], що забезпечує адекватну реакцію системи еритрона в цей період.

### Висновки

1. У стані гіпобіозу кількість еритроцитів, гемоглобіну і MCH істотно не змінюються, але MCV і HCT значуще зменшуються, а MCHC і RDW значуще збільшуються порівняно з контролем. Еритрокінетичні показники свідчать про те, що у тварин, які перебувають у торпідному стані, незважаючи на зменшення кількості ретикулоцитів у крові та скорочення періоду напіввиведен-

We believe that these changes may be explained by the fact that nearly within this  $T_b$  range the oxygen consumption is significantly increased [27] and free radical processes in tissues are activated [2, 19], promoting thereby an adequate response of erythron system during this period.

### Conclusions

1. Under torpid states, a count of RBCs, hemoglobin and MCH were not considerably changed, but MCV and HCT were significantly reduced, and MCHC and RDW were significantly increased as compared with the control. Erythrokinetic parameters testified to the fact, that in animals in a torpid state, despite a decreased count of reticulocytes in blood and the reduced RBC bloodstream half-life, the ability to produce RBCs remained at the control level.

2. During arousal, a rise in body temperature up to  $25^\circ\text{C}$  entailed an increase in RDW relative to the torpid animals. Herewith, the tendency to MCV and HCT increase was revealed. With a rise in the body temperature, the reticulocyte count in blood and their maturation time augmented with the maximum at  $T_b$  of  $30^\circ\text{C}$ . At this body temperature, the RBC half-life in bloodstream was prolonged as well.

3. In blood of ground squirrels, after complete rewarming, the reticulocyte count reduced relative to both control and  $T_b$  of  $25\text{--}30^\circ\text{C}$ , but their maturation time was significantly decreased, resulting in a strong increase in RBC production. Herewith, the RBC half-life reduced relative to the control and previous stage of rewarming.

### References

1. Akita K, Hanaya T, Arai S, et al. Purification, identification, characterization, and cDNA cloning of a high molecular weight extracellular superoxide dismutase of hamster that transiently increases in plasma during arousal from hibernation. *Comp Biochem Physiol A*. 2007; 146: 223–32.
2. Astayeva MD, Klichkhanov NK. [Oxidative modification of proteins and antioxidative blood activity of ground squirrels during induced awakening from winter sleep]. *Izv Akad Nauk Ser Biol*. 2009; (6): 662–8. Russian.
3. Avci E, Bulut S, Bircan FS, Ozluk A, Cevher SC. Effect of hibernation on oxidative and antioxidant events under laboratory conditions in anatolian ground squirrel *Spermophilus xanthopyrmnus* (Bennett, 1835) (Mammalia: Sciuridae) from Central Anatolia. *Pakistan J Zool*. 2014; 46(1): 177–83.



ня еритроцитів із кровообігу, здатність до продукції еритроцитів зберігається на рівні контролю.

2. Під час пробудження підйом температури тіла до 25°C призводить до підвищення RDW відносно показника тварин, які знаходяться у торпідному стані. При цьому виявлена тенденція до збільшення MCV і НСТ. З підвищенням температури тіла кількість ретикулоцитів у крові та час їх дозрівання збільшуються з максимумом при Tt 30°C. За такої температури тіла подовжується також і період напіввиведення еритроцитів з кровообігу.

3. У крові ховрахів після повного зігрівання зменшується кількість ретикулоцитів відносно як контролю, так і Tt 25–30°C, але істотно скорочується час їх дозрівання, внаслідок чого продукція еритроцитів значно збільшується. При цьому скорочується період напіввиведення еритроцитів відносно контролю і попереднього етапу зігрівання.

## Література

1. Астаева МД, Кличханов НК. Окислительная модификация белков и антиокислительная активность крови сусликов в ходе индуцированного пробуждения от зимней спячки. Известия РАН. Серия биологическая. 2009; (6): 662–8.
2. Гулевский АК, Щенявский ИИ. Сезонные изменения механической резистентности эритроцитов длиннохвостых сусликов (*Citellus undulatus*). Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2014; 50(5): 364–8.
3. Илюхин АВ, Бурковская ТЕ, Шафиркин АВ, и др. Некоторые методические вопросы исследования эритроцитарного баланса по данным подсчета инкубированных ретикулоцитов. Космическая биология и авиакосмическая медицина. 1982; 16(3): 86–8.
4. Калабухов НИ. Зимняя спячка млекопитающих. Москва: Наука; 1985. 260 с.
5. Кличханов НК, Исмаилова ЖГ, Астаева МД, и др. Свободнорадикальные процессы в мозге сусликов в динамике пробуждения от зимней спячки. Проблемы криобиологии. 2012; 22(3): 299.
6. Липунова ЕА, Скоркина МЮ. Система красной крови: Сравнительная физиология. Белгород: БелГУ; 2004. 216 с.
7. Муравьев АВ, Чепоров СВ. Гемореология (экспериментальные и клинические аспекты реологии крови). Ярославль: ЯГПУ; 2009. 178 с.
8. Передрий НС. Сезонные изменения гематологических показателей у сусликов популяции юга Украины. Вестник зоологии. 1973; (2): 21–5.
9. Пономарева ТА, Гейн АК, Тюрина ВВ. Функции гемостаза у зимоспящих млекопитающих при гипотермии и гибернации. В: Колаева СГ, редактор. Эколого-физиологические характеристики природных гипометаболических состояний. Пущино; 1992. с. 16–25.
10. Akita K, Hanaya T, Arai S, et al. Purification, identification, characterization, and cDNA cloning of a high molecular weight extracellular superoxide dismutase of hamster that transiently increases in plasma during arousal from hibernation. Comp Biochem Physiol A. 2007; 146: 223–32.
4. Brock MA. Hibernation and temperature effects on the ageing of red blood cells. Ann Acad Sci Fenn Ser A4. 1964; 71: 51–6.
5. Brock MA. Production and life span of erythrocytes during hibernation in the golden hamster. Am J Physiol. 1960; 198: 1181–6.
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. Cho Y-I, Cho DJ. Hemorheology and microvascular. Korean Circ J. 2011; 41(6): 287–95.
8. Cooper ST, Sell SS, Fahrenkrog M, et al. Effects of hibernation on bone marrow transcriptome in thirteen-lined ground squirrels. Physiol Genomics. 2016; 48: 513–25.
9. Eliassen E. Changes of blood volume in the prehibernating and deep-hibernating hedgehog. Nature. 1961; 192:1047–9.
10. Franco M, Contreras C, Nespolo RF. Profound changes in blood parameters during torpor in a South American marsupial. Comp Biochem Physiol A. 2013; 166(2): 338–42.
11. Geiser F. Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor. Annu Rev Physiol. 2004; 66: 239–74.
12. Græsli AR, Evans AL, Fahlman A, et al. Seasonal variation in haematological and biochemical variables in free-ranging subadult brown bears (*Ursus arctos*) in Sweden. BMC Vet Res [Internet]. 2015 Dec 08 [Cited 28.05.2019]; 11: 301. Available from: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-015-0615-2>
13. Gulevskii AK, Shchenyavskii II. Seasonal changes in mechanical resistance of erythrocytes of the long-tailed ground squirrel (*Citellus undulatus*). J Evol Biochem Phys. 2014; 50(5): 416–20.
14. Hu HX, Du FY, Fu W-W, et al. A dramatic blood plasticity in hibernating and 14-day hindlimb unloading Daurian ground squirrels (*Spermophilus dauricus*). J Comp Physiol B. 2017; 187 (5–6): 869–79.
15. Ilyukhin AV, Burkovskaya TE, Shafirkin AV, et al. [Some methodological issues of the study of erythrocyte balance according to the calculation of incubated reticulocytes]. Kosmicheskaya Biologiya i Aviakosmicheskaya Meditsina. 1982; 16(3): 86–8. Russian.
16. Jørgensen PG, Arnemo J, Swenson JE, et al. Low cardiac output as physiological phenomenon in hibernating, free-ranging Scandinavian brown bears (*Ursus arctos*) – an observational study. Cardiovasc Ultrasound [Internet]. 2014 Sep 16 [Cited 28.05.2019]; 12: 36. Available from: <https://cardiovascularultrasound.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-7120-12-36>
17. Kalabukhov NI. [Mammal hibernation]. Moscow: Nauka, 1985. 260 p. Russian.
18. Kallen FC. Vascular changes related to hibernation in the vesperilionid bat, *Myotis lucifugus*. Bull Museum Comp Zool. 1960; 124: 373–86.
19. Klichkhanov NK, Ismailova ZhG, Astaeva MD, Shikhamirova ZM. Free radical processes in brain of ground squirrels in dynamics of arousal from winter hibernation. Problems of Cryobiology. 2012; 22(3): 299.
20. Lin L, Wang X, Yu Z. Ischemia-reperfusion injury in the brain: mechanisms and potential therapeutic strategies. Biochem Pharmacol (Los Angel) [Internet]. 2016 [Cited 20.09.2019]; 5 (4): 213. Available from: <https://www.longdom.org/abstract/ischemiareperfusion-injury-in-the-brain-mechanisms-and-potential-therapeutic-strategies-14350.html>
21. Lipunova EA, Skorkina MYu. [Red blood system: Comparative physiology]. Belgorod: BelGU. 2004. 216 p. Russian.
22. Ma YL, Zhu X, Rivera PM, et al. Absence of cellular stress in brain after hypoxia induced by arousal from hibernation in



11. Avci E, Bulut S, Bircan FS, et al. Effect of hibernation on oxidative and antioxidant events under laboratory conditions in anatolian ground squirrel *Spermophilus xanthoprimum* (Bennett, 1835) (Mammalia: Sciuridae) from Central Anatolia. *Pakistan J Zool.* 2014; 46(1): 177–83.
12. Brock MA. Hibernation and temperature effects on the ageing of red blood cells. *Ann Acad Sci Fenn Ser A4.* 1964; 71: 51–6.
13. Brock MA. Production and life span of erythrocytes during hibernation in the golden hamster. *Am J Physiol.* 1960; 198: 1181–6.
14. Carey HV, Andrews MT, Martin SL. Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. *Physiol Rev.* 2003; 83: 1153–81.
15. Cho YI, Cho DJ. Hemorheology and microvascular. *Korean Circ J.* 2011; 41(6): 287–95.
16. Cooper ST, Sell SS, Fahrenkrog M, et al. Effects of hibernation on bone marrow transcriptome in thirteen-lined ground squirrels. *Physiological Genomics.* 2016; 48: 513–25.
17. Eliassen E. Changes of blood volume in the prehibernating and deep-hibernating hedgehog. *Nature.* 1961; 192: 1047–9.
18. Franco M, Contreras C, Nespolo RF. Profound changes in blood parameters during torpor in a South American marsupial. *Comp Biochem Physiol A.* 2013; 166(2): 338–42.
19. Geiser F. Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor. *Annu Rev Physiol.* 2004; 66: 239–74.
20. Græsli AR, Evans AL, Fahlman A, et al. Seasonal variation in haematological and biochemical variables in free-ranging subadult brown bears (*Ursus arctos*) in Sweden. *BMC Vet Res [Internet].* 2015 Dec 08 [Cited 28.05.2019]; 11: 301. Available from: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-015-0615-2>
21. Hu HX, Du FY, Fu WW, et al. A dramatic blood plasticity in hibernating and 14-day hindlimb unloading Daurian ground squirrels (*Spermophilus dauricus*). *J Comp Physiol B.* 2017; 187(5–6): 869–79.
22. Jørgensen PG, Arnemo J, Swenson JE, et al. Low cardiac output as physiological phenomenon in hibernating, free-ranging Scandinavian brown bears (*Ursus arctos*) - an observational study. *Cardiovasc Ultrasound [Internet].* 2014 Sep 16 [Cited 28.05.2019]; 12: 36. Available from: <https://cardiovascularultrasound.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-7120-12-36>
23. Kallen FC. Vascular changes related to hibernation in the vespertilionid bat, *Myotis lucifugus*. *Bull Museum Comp Zool.* 1960; 124: 373–86.
24. Lin L, Wang X, Yu Z. Ischemia-reperfusion injury in the brain: mechanisms and potential therapeutic strategies. *Biochem Pharmacol (Los Angel) [Internet].* 2016 [Cited 20.09.2019]; 5(4): 213. Available from: <https://www.longdom.org/abstract/ischemiareperfusion-injury-in-the-brain-mechanisms-and-potential-therapeutic-strategies-14350.html>
25. Ma YL, Zhu X, Rivera PM, et al. Absence of cellular stress in brain after hypoxia induced by arousal from hibernation in Arctic ground squirrels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005; 289: 1297–306.
26. Martini J, Carpentier B, Chávez Negrete A, et al. Beneficial effects due to increasing blood and plasma viscosity. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2006; 35(1–2): 51–7.
27. Mohanty J, Nagababu E, Rifkind J. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Front Physiol [Internet].* 2014 Feb 28 [Cited 28.05.2019]; 5: 84. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2014.00084/full>
28. Ohta H, Okamoto I, Hanaya T, et al. Enhanced antioxidant defense due to extracellular catalase activity in Syrian hamster during arousal from hibernation. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2006; 143(4): 484–91.
29. Okamoto I, Kayano T, Hanaya T, et al. Up-regulation of an extracellular superoxide dismutase-like activity in hibernating Arctic ground squirrels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005; 289: 1297–306.
23. Martini J, Carpentier B, Chávez Negrete A, et al. Beneficial effects due to increasing blood and plasma viscosity. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2006; 35(1–2): 51–7.
24. Mohanty J, Nagababu E, Rifkind J. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Front Physiol [Internet].* 2014 Feb 28 [Cited 28.05.2019]; 5: 84. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2014.00084/full>
25. Muravyev AV, Cheporov SV. [Hemorheology (experimental and clinical aspects of blood rheology)]. Yaroslavl: YaGPU. 2009. 178 p. Russian.
26. Ohta H, Okamoto I, Hanaya T, et al. Enhanced antioxidant defense due to extracellular catalase activity in Syrian hamster during arousal from hibernation. *Comp Biochem Physiol C.* 2006; 143(4): 484–91.
27. Okamoto I, Kayano T, Hanaya T, et al. Up-regulation of an extracellular superoxide dismutase-like activity in hibernating hamsters subjected to oxidative stress in mid- to late arousal from torpor. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2006; 144(1): 47–56.
28. Peredrij NS. [Seasonal changes in hematological parameters in ground squirrels of the population of the South of Ukraine]. *Vestnik Zoologii.* 1973; (2): 21–5. Russian.
29. Ponomareva TA, Geyn AK, Tyurina VV. [Hemostatic function in hibernating mammals with hypothermia and hibernation]. In: Kolayeva SG, editor. [Ecological and physiological characteristics of the natural hypometabolic state]. Pushchino; 1992. p. 16–25. Russian.
30. Repsold L, Joubert AM. Eryptosis: an erythrocyte's suicidal type of cell death. *BioMed Research International [Internet].* 2018 Jan 03 [Cited 28.05.2019]; 2018: 9405617. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2018/9405617/>
31. Revsbech IG, Fago A. Regulation of blood oxygen transport in hibernating mammals. *J Comp Physiol B.* 2017; 187: 847–56.
32. Revsbech IG, Malte H, Frøbert O, et al. Decrease in the red cell cofactor 2,3-diphosphoglycerate increases hemoglobin oxygen affinity in the hibernating brown bear *Ursus arctos*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2013; 304: 43–9.
33. Saitongdee P, Loesch A, Knight G, et al. Ultrastructural localization of nitric oxide synthase and endothelin in the renal and mesenteric arteries of the golden hamster: differences during and after arousal from hibernation. *Endothelium.* 1999; 6(3): 197–207.
34. Salazar Vázquez BY, Martini J, Chávez Negrete A, et al. Cardiovascular benefits in moderate increases of blood and plasma viscosity surpass those associated with lowering viscosity: Experimental and clinical evidence. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2010; 44 (2): 75–85.
35. Spurrier WA, Dawe A. Several blood and circulatory changes in the hibernation of the 13-lined ground squirrel *Citellus tridecemlineatus*. *Comp Biochem Physiol.* 1973; 44(2): 267–82.
36. Storey KB, Storey JM. Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2004; 79: 207–33.
37. Suomalainen P, Rosokivi V. Studies on the physiology of the hibernating hedgehog. 17. The blood cell count of the hedgehog at different times of the year and in different phases of the hibernating cycle. *Ann Acad Sci Fenn Ser A4.* 1978; 198: 1–8.
38. Tempel GE, Musacchia XJ. Erythrocyte 2,3-diphosphoglycerate concentrations in hibernating, hypothermic, and reawakening hamsters. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1975; 148: 588–92.
39. Toien O, Drew K, Chao ML, et al. Ascorbate dynamics and oxygen consumption during arousal from hibernation in Arctic



- hamsters subjected to oxidative stress in mid- to late arousal from torpor. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2006;144(1): 47–56.
30. Repsold L, Joubert AM. Eryptosis: an erythrocyte's suicidal type of cell death. *BioMed Research International* [Internet]. 2018 Jan 03 [Cited 28.05.2019]; 2018: 9405617. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2018/9405617/>
31. Revsbech IG, Fago A. Regulation of blood oxygen transport in hibernating mammals. *J Comp Physiol B*. 2017; 187: 847–56
32. Revsbech IG, Malte H, Fröbert O, et al. Decrease in the red cell cofactor 2,3-diphosphoglycerate increases hemoglobin oxygen affinity in the hibernating brown bear *Ursus arctos*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013; 304: 43–9.
33. Saitongdee P, Loesch A, Knight G, et al. Ultrastructural localization of nitric oxide synthase and endothelin in the renal and mesenteric arteries of the golden hamster: differences during and after arousal from hibernation. *Endothelium*. 1999; 6(3):197–207.
34. Salazar Vázquez BY, Martini J, Chávez Negrete A, et al. Cardiovascular benefits in moderate increases of blood and plasma viscosity surpass those associated with lowering viscosity: Experimental and clinical evidence. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2010; 44 (2): 75–85.
35. Spurrier WA, Dawe A. Several blood and circulatory changes in the hibernation of the 13-lined ground squirrel *Citellus tridecemlineatus*. *Comp Biochem Physiol*. 1973; 44 (2): 267–82.
36. Storey KB, Storey JM. Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2004; 79: 207–33.
37. Suomalainen P, Rosokivi V. Studies on the physiology of the hibernating hedgehog. 17. The blood cell count of the hedgehog at different times of the year and in different phases of the hibernating cycle. *Ann Acad Sci Fenn Ser A4*. 1978; 198: 1–8.
38. Tempel GE, Musacchia XJ. Erythrocyte 2,3-diphosphoglycerate concentrations in hibernating, hypothermic, and rewarming hamsters. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1975; 148: 588–92.
39. Toien O, Drew K, Chao ML, et al. Ascorbate dynamics and oxygen consumption during arousal from hibernation in Arctic ground squirrels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001; 281: 572–83.
40. Willekens FLA, Werre JM, Groenen-Döpp YAM, et al. Erythrocyte vesiculation: a self-protective mechanism? *Br J Haematol*. 2008; 141: 549–56.
41. Wołk E. Hematology of a hibernating rodent – the northern birch mouse. *Acta Theriologica*. 1985; 30: 337–48.

