

УДК 591.128.2.085.1:591.543.42:615.832.9

В.В. Ломако*, А.В. Шило

Гистологическая картина в неокортексе и гипоталамусе гомойо- и гетеротермных животных при искусственном и естественном гипометаболизме

UDC 591.128.2.085.1:591.543.42:615.832.9

V.V. Lomako*, A.V. Shylo

Histological Picture in Neocortex and Hypothalamus of Homoio- and Heterothermal Animals Under Artificial and Natural Hypometabolism

Реферат: Изучали структурные изменения в тканях неокортекса и гипоталамуса у гетеротермных хомяков при естественном и искусственном гипометаболизме и гомойотермных крыс при искусственном гипометаболизме, а также на этапах восстановления (через 2 и 24 ч после выхода из гипометаболических состояний). Наблюдали следующие изменения в изученных тканях мозга: расширение/сужение периваскулярных пространств и появление темных нейронов; появление нейронов с ядрышками в ядре, указывающее на усиление синтеза белка в ответ на гипоксию, что подтверждено соответствующими колебаниями уровня общего белка в этих тканях. Выявленные изменения не являются следствием токсического воздействия или патологических проявлений, а, вероятно, отражают различные фазы нормальных метаболических процессов при гипометаболизме. Изменения имеют видоспецифический характер, качественно и количественно по-разному проявляются на определенных этапах входа и выхода из гипометаболических состояний.

Ключевые слова: неокортекс, гипоталамус, темные нейроны, гибернация, искусственное гипометаболическое состояние, гомойотермия, гетеротермия.

Реферат: Вивчали структурні зміни в тканинах неокортексу та гіпоталамуса гетеротермних хом'яків при природному і штучному гіпометаболізмі та гомойотермних щурів при штучному гіпометаболізмі, а також на етапах відновлення (через 2 і 24 години після виходу із гіпометаболічних станів). Спостерігали такі зміни у вивчених тканинах мозку: розширення/звуження периваскулярних просторів і поява темних нейронів; поява нейронів із ядрцями в ядрі, що вказує на посилення синтезу білка у відповідь на гіпоксію і підтверджено відповідними коливаннями рівня загального білка в цих тканинах. Виявлені зміни не є наслідком токсичного впливу або патологічних проявів, а, ймовірно, відображають різні фази нормальних метаболічних процесів при гіпометаболізмі. Зміни мають видоспецифічний характер, якісно та кількісно по-різному проявляються на певних етапах входу і виходу з гіпометаболічних станів.

Ключові слова: неокортекс, гіпоталамус, темні нейрони, гібернація, штучний гіпометаболічний стан, гомойотермія, гетеротермія.

Abstract: Structural changes in the brain neocortex and hypothalamus in heterothermal hamsters under natural and artificial hypometabolism, and in homoiothermal rats under artificial hypometabolism as well as 2 and 24 hrs later awakening from hypometabolic states were studied. The following changes in the studied brain tissues were observed: a dilation/constriction of perivascular spaces and dark neurons appearance; the emergence of neurons with nucleoli in their nucleus, likely indicating an increased protein synthesis in response to hypoxia. The latter was confirmed by the revealed corresponding fluctuations in the total protein levels in the tissues. The identified changes probably reflect different phases of normal metabolic processes under hypometabolism and are not resulted from either toxic effect or pathological manifestations. The changes were species-specific and manifested differently, both qualitatively and quantitatively, at certain stages of entering and awakening from hypometabolic states.

Key words: neocortex, hypothalamus, dark neurons, hibernation, artificial hypometabolic state, homoiothermia, heterothermia.

Гибернация млекопитающих – пример естественной видовой адаптации, позволяющей животным выживать в экстремальных условиях; представляет собой уникальную модель для изучения механизмов устойчивости организма к действию экстремальных факторов (низкая температура, гипоксия, оксидативный стресс и др.).

Mammalian hibernation is an example of natural species adaptation allowing the animals to survive extreme conditions, and in addition it could serve as a unique model for studying the mechanisms underlying the resistance of an organism to the effect of extreme factors (low temperatures, hypoxia, oxidative stress etc.).

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

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-30-84,
электронная почта: victorial2003@list.ru

Поступила 09.12.2014
Принята в печать 12.01.2015

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2015. – Т. 25, №2. – С. 93–103.
© 2015 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

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

*To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;
tel.: +380 57 3737435, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: victorial2003@list.ru

Received December, 09, 2014
Accepted January, 12, 2015

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2015. 25(2): 93–103.
© 2015 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

Процессы погружения и выхода из гибернации, длительность ее баутов контролируются центральной нервной системой (ЦНС) [10, 18]. Однако структуры мозга при гибернации находятся на разном уровне функциональной активности. Их активность снижается по нисходящей: с эволюционно более молодых структур ЦНС (неокортексе) к эволюционно более «древним» подкорковым структурам (гипоталамус, гиппокамп и др.). При этом биоэлектрическая активность (БЭА) в неокортексе полностью подавлена, а в гипоталамусе и гиппокампе она регистрируется даже в состоянии глубокой гибернации [9, 29].

У животных, способных погружаться в гибернацию, клетки и системы устойчивы к различным повреждениям [13], поэтому для экспериментальной биологии и прикладной медицины методы искусственного снижения метаболизма гомойотермного организма представляют большой интерес. При искусственном гипометаболизме (ИГМ), в отличие от равной по глубине любой разновидности гипотермии, потребление кислорода в два раза ниже. Погружение в ИГМ, когда снижение температуры тела до 20...15°C происходит на фоне нарастающей гипоксии-гиперкапнии, вызывает обездвиженность, угнетение тактильной и болевой чувствительности, метаболизма, ритма сердца и БЭА головного мозга [4]; отмечается снижение амплитуды БЭА неокортекса, депрессия всех частотных составляющих электроэнцефалограммы (ЭЭГ) на фоне доминирования мощности в δ -диапазоне [7, 8]. Из этого состояния животное способно возвращаться к нормотермии, как и при естественном гипометаболизме [4], причем активность мозга достигает нормального функционального уровня в два раза быстрее у гетеротермных, чем у гомойотермных животных [8].

Гипоталамо-гипофизарная система является нейроэффектором звеном ЦНС, она активно участвует в реализации гибернации, и по картине ее морфофункционального состояния можно судить об изменениях, происходящих при гибернации животного [6]. Гистологическая картина неокортекса и гипоталамуса – структур ЦНС, вовлеченных в реализацию и контроль процессов терморегуляции [30] и гибернации [10, 18], даст возможность выявить характерные структурно-функциональные изменения при погружении в гипометаболические состояния (ГМС) и выходе из них.

Цель работы – изучить структурные изменения в тканях неокортекса и гипоталамуса гетеро(хомяки) и гомойотермных (крысы) животных при искусственном и естественном гипометаболизме на этапах восстановления (через 2 и 24 ч после выхода из гипометаболического состояния).

The processes of the hibernation entering and awakening, the duration of its bouts are controlled by central nervous system (CNS) [1, 8]. However, the brain structures during hibernation are at different levels of functional activity. Their activity decreases downward, starting from evolutionarily younger CNS structures (neocortex) to the evolutionarily more ‘ancient’ subcortical structures (hypothalamus, hippocampus *etc.*): while a bioelectrical activity (BEA) in the neocortex is completely suppressed, in the hypothalamus and hippocampus it is strongly modified but preserved in deep hibernation [22, 32].

The animals being able of entering hibernation have the cells and systems resistant to a variety of injuries [4], so the methods of artificial inhibition of the metabolism of homoiothermal organism are of great interest for experimental biology and applied medicine. Artificial hypometabolism (AHM), unlike any of equal depth hypothermia variations, is accompanied by twice lower oxygen consumption. Entering the AHM when the decrease in body temperature down to 20...15°C takes place on the background of increasing hypoxia-hypercapnia, causes immobility, suppression of tactile and pain sensitivities, decrease in metabolism, heart and respiratory rhythm and brain BEA [23]; a decline of BEA amplitude of the neocortex is observed, as well as a depression of all the frequency components of the electroencephalogram (EEG) but with relative predominance of δ -oscillations [31, 33]. An animal is able of rewarming from this state to normothermia, as in the case of natural hypometabolism (NHM) [23], moreover the activity of the brain reaches a normal functional level twice faster in heterothermal than homoiothermal animals [31].

Hypothalamic-pituitary system is a neuroeffector link of the CNS, actively involved into the implementation of hibernation and the appearance of its morpho-functional state could indicate the changes occurring during an animal hibernation [30]. Histological analysis of neocortex and hypothalamus, *i.e.* the CNS structures involved into the implementation and control of thermoregulation [24] and hibernation [1, 8], would provide an opportunity to identify specific structural and functional changes when entering and rewarming from a hypometabolic state (HMS) [30].

The research aim was to study structural changes in the neocortex and hypothalamus tissues of hetero(hamsters) and homoiothermal (rats) animals under artificial and natural hypometabolism and at recovery stages (2 hrs and 24 hrs after rewarming from the hypometabolic state).

Materials and methods

The experiments were carried out in accordance with the General Principles of Experiments in Animals



Материалы и методы

Эксперименты проведены в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными V Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2013) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986). Работа выполнена в осенне-зимний период на самцах золотистых хомяков (массой 85–95 г) и самцах беспородных белых крыс (массой 180–220 г). До начала эксперимента животных содержали в условиях вивария при естественном световом режиме на стандартном рационе *ad libitum* с добавлением зерен пшеницы и семян подсолнечника.

Перед погружением в естественный гипометаболизм (ЕГМ) хомяков рассаживали в индивидуальные клетки, из рациона исключали сочную пищу, снабжали гнездовым материалом (древесные опилки и сено) и переносили в темное помещение с температурой воздуха около $(3 \pm 1)^\circ\text{C}$ (промышленная холодильная камера объемом 20 м^3 с автоматической регулировкой температуры). Хомяки погружались в спячку через 10–14 дней. Средняя длительность баута составила $(3 \pm 0,5)$ суток.

Состояние ИГМ моделировали с помощью метода «закрытого сосуда» [4, 7]. Животных в герметически закрытом сосуде (объемом 3 дм^3 для крыс и 2 дм^3 для хомяков) помещали в темную холодовую камеру ($2...5^\circ\text{C}$). Находясь в условиях пониженной температуры и нарастающей гипоксии-гиперкапнии, животные постепенно (в течение 2,5–3 ч) погружались в состояние, по физиологическим параметрам сходное с естественной гибернацией [4, 7]. Животных ($n = 5$) выводили из эксперимента путем декапитации, забор материала проводили при достижении ГМС и на этапах восстановления (через 2 и 24 ч).

Гистологическое исследование выполняли по стандартной методике [1]: ткани фиксировали в 10%-м растворе нейтрального формалина в течение 24 ч. После отмывания фиксированный материал обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в парафин. 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». При морфологическом исследовании визуально оценивали состояние гистологических образцов тканей неокортекса и гипоталамуса (диаметр просвета сосудов, их кровенаполнение, состояние периваскулярных пространств, нейронов и их ядер). Уровень общего белка в тканях определяли методом Бред-

approved by the 5th National Congress in Bioethics (Kiev, 2013) and consistent with the statements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986). The work was performed in autumn-winter period in male golden hamsters (85–95 g weight) and male outbred albino rats (180–220 g). Before the experiment start the animals were kept under animal house conditions with natural light conditions on the standard diet *ad libitum* with wheat grains and sunflower seeds.

Before entering the natural hypometabolism (NHM) the hamsters were placed into individual cages, the diet was deprived of juicy food, the animals were supplied with nesting material (sawdust and hay) and transferred into a dark room with an air temperature of about $(3 \pm 1)^\circ\text{C}$ (large scale freezer of 20 м^3 with automated temperature control). The hamsters entered hibernation after 10–14 days. The average bout duration was (3 ± 0.5) days.

AHM state was achieved using the method of the ‘closed vessel’ [23, 33]. The animals in the sealed vessel (for rats it was of 3 дм^3 volume and 2 дм^3 for hamsters) were placed into a dark cold chamber ($2...5^\circ\text{C}$). Being at lowered temperatures and increasing hypoxia-hypercapnia, the animals gradually (within 2.5–3 hrs) entered the state similar by some physiological parameters to natural hibernation [23, 33]. The animals ($n = 5$) were sacrificed by decapitation, the samples were collected when achieving the HMS and at the recovery stages (2 and 24 hrs). Histological examination was performed according to standard procedures [34]: the tissues were fixed in 10% neutral formalin solution for 24 hrs. After washing the fixed material was dehydrated in alcohols of an increasing concentration and paraffin embedded. The obtained 6–8 mm slices were stained by hematoxylin and eosin. The samples were examined and the photos were made with Axio Observer Z1 microscope (Carl Zeiss, Germany); image analysis was done using the AxioVision Rel. 4.8 software. Morphological study involved visual assessment of the state of histological samples of neocortex and hypothalamus tissues (diameter of the lumen of blood vessels, their blood supply, condition of perivascular spaces of neurons and their nuclei). The content of total protein in tissues was determined according Bradford [2]. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test.

Results and discussion

Artificial and natural HMSs in the tissue samples of neocortex were accompanied by an increased volume in perivascular spaces, observed especially in heterothermal hamsters (Fig. 1, A). The vision fields in neocortical tissues of homoiothermal rats contained significant amount of neurons, in which the nuclei with nucleoli



форда [11]. Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

При искусственном и естественном ГМС в образцах ткани неокортекса наблюдали увеличение объема периваскулярных пространств, особенно у гетеротермных хомяков (рис. 1, А). В поле зрения в ткани неокортекса у гомойотермных крыс отмечали значительное количество нейронов, в которых видны ядра с ядрышками (рис. 1, А1), что указывает на активацию процессов синтеза белка и является ответной реакцией на действие гипоксии. Подтверждением этому служат наши данные о повышении уровня общего белка в ткани неокортекса крыс с $(1,49 \pm 0,2)$ мкг/мл в контроле до $(3,02 \pm 1,41)$ мкг/мл при достижении ИГМ. У хомяков, мозг которых, как и у всех гибернарующих млекопитающих [1, 26], менее чувствителен к гипоксии, в ткани неокортекса, напротив, наблюдали тенденцию к снижению уровня общего белка как при искусственном $(1,22 \pm 0,15)$ мкг/мл, так и естественном ГМС $(1,16 \pm 0,21)$ мкг/мл (контроль $(1,44 \pm 0,29)$ мкг/мл). Кроме того, у хомяков при ГМС в неокортексе обнаружены темные нейроны [22, 25] (рис. 1, А2 и А3).

В ткани гипоталамуса (рис. 1, В), как и в неокортексе, при ИГМ и ЕГМ также наблюдали разную степень расширения периваскулярных пространств (более заметно у хомяков) (рис. 1, В2 и В3). Отмечали множество функционально активных, наполненных кровью сосудов разного диаметра (капилляры, артерии, артериолы) (рис. 1, В), особенно у хомяков при ЕГМ (рис. 1, В3). Кроме того, было обнаружено снижение уровня общего белка в ткани гипоталамуса: при ИГМ – как у крыс с $(1,21 \pm 0,38)$ мкг/мл в контроле до $(1,15 \pm 0,01)$ мкг/мл, так и у хомяков с $(1,34 \pm 0,2)$ мкг/мл в контроле до $(1,09 \pm 0,09)$ мкг/мл, а при ЕГМ у хомяков до $(0,5 \pm 0,14)$ мкг/мл ($p < 0,05$).

Через 2 ч после выхода из ИГМ в ткани неокортекса как у крыс (рис. 2, А1), так и у хомяков

were seen (Fig. 1, А1), that indicated the activation of protein synthesis and was a response to hypoxia. This was confirmed by our findings about an increased level of total protein in rat neocortical tissue from (1.49 ± 0.2) $\mu\text{g/ml}$ in the control to (3.02 ± 1.41) $\mu\text{g/ml}$ when reaching the AHM. And *vice versa*, there was a tendency to a decreased level of total protein both at artificial (1.22 ± 0.15) $\mu\text{g/ml}$ and natural HMS (1.16 ± 0.21) $\mu\text{g/ml}$ (control (1.44 ± 0.29) $\mu\text{g/ml}$) in hamsters neocortex tissue, which brain is less sensitive to hypoxia like all hibernating mammals [19, 34]. Moreover, HMS in hamsters was accompanied with appearance of dark neurons in neocortex [13, 19] (Fig. 1, А2 and А3).

Hypothalamic tissue (Fig. 1 В), as well as the neocortex both at AHM and NHM had the dilatations of

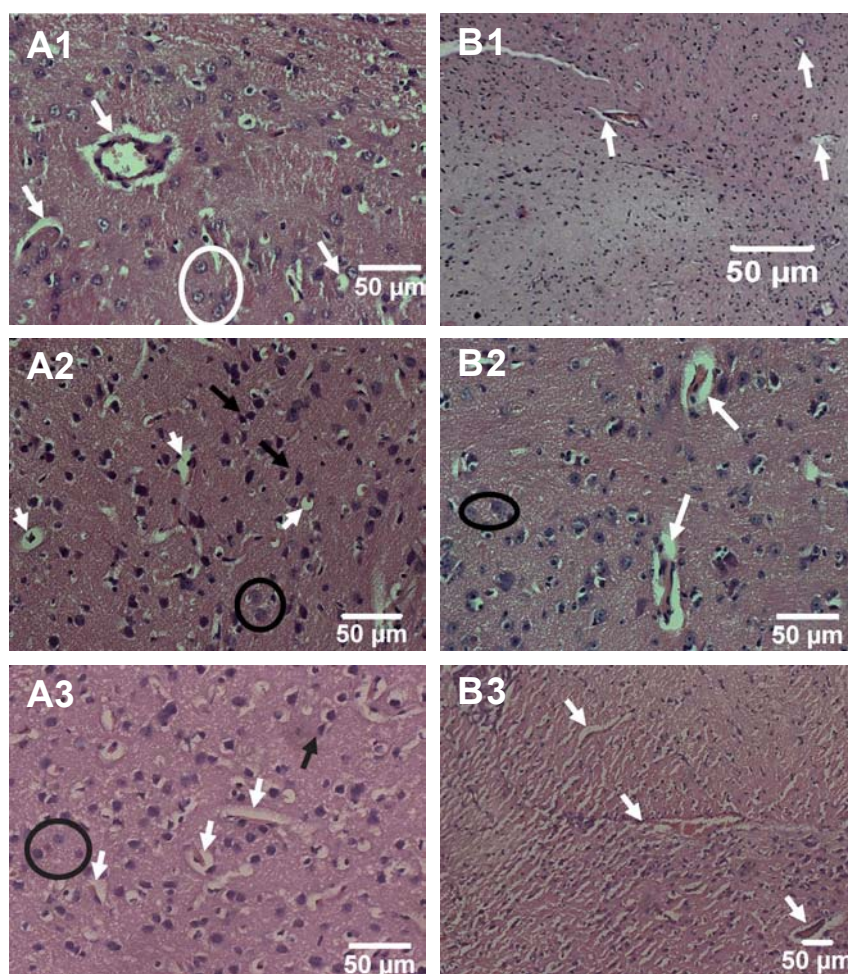


Рис. 1. Ткани головного мозга крыс и хомяков при искусственном и естественном гипометаболизме: **А** – сенсомоторная область неокортекса; **В** – гипоталамус; **1** – крысы при ИГМ; **2** – хомяки при ИГМ; **3** – хомяки при ЕГМ; периваскулярные пространства (белые стрелки); нейроны с ядрышками в ядре (обведено белым контуром); интактные (обведено черным контуром) и темные (черные стрелки) нейроны. Окраска гематоксилином и эозином.

Fig. 1. Brain tissues of rats and hamsters at artificial and natural hypometabolisms: **A** – neocortex sensorimotor area; **B** – hypothalamus; **1** – rats at AHM; **2** – hamsters at AHM; **3** – hamsters at NHM; perivascular spaces (white arrows); neurons with nucleoli in nucleus (white contour); intact (black contour) and dark (dark arrows) neurons. Hematoxylin and eosin staining.



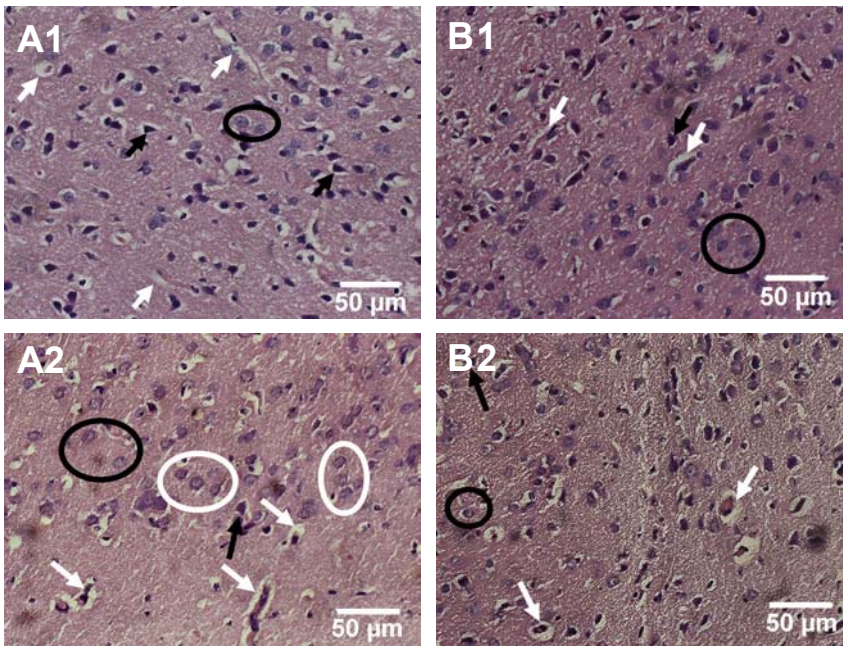


Рис. 2. Ткани головного мозга крыс и хомяков через 2 ч после выхода из искусственного гипометаболизма: **А** – сенсомоторная область неокортекса; **В** – гипоталамус; **1** – крысы при ИГМ; **2** – хомяки при ИГМ; **3** – хомяки при ЕГМ; периваскулярные пространства (белые стрелки); нейроны с ядрышками в ядре (обведено белым контуром); интактные (обведено черным контуром) и темные (черные стрелки) нейроны. Окраска гематоксилином и эозином.

Fig. 2. Brain tissues of rats and hamsters 2 hrs after artificial hypometabolism: **A** – neocortex sensorimotor area; **B** – hypothalamus; **1** – rats at AHM; **2** – hamsters at AHM; **3** – hamsters at NHM; perivascular spaces (white arrows); neurons with nucleoli in nucleus (white contour); intact (black contour) and dark (dark arrows) neurons. Hematoxylin and eosin staining.

(рис. 2, A2) периваскулярные пространства оставались расширенными, наблюдали также сосуды без периваскулярных пространств. В неокортексе крыс появилось значительное количество темных нейронов, уровень общего белка значимо не отличался от контроля – $(1,58 \pm 0,24)$ мкг/л. В ткани неокортекса хомяков через 2 ч после ИГМ наблюдали темные нейроны, в некоторых клетках также были видны ядра с ядрышками (рис. 2, A2), как и у крыс в состоянии ИГМ (рис. 1, A1). Уровень общего белка в ткани неокортекса хомяков повышался до $(1,71 \pm 0,18)$ мкг/мл (контроль $(1,44 \pm 0,29)$ мкг/мл).

В ткани гипоталамуса через 2 ч после выхода из состояния ИГМ прослеживались аналогичные с образцами неокортекса изменения (рис. 2, B1 и B2), однако расширение периваскулярных пространств было более выражено, особенно у хомяков, а темных нейронов в гипоталамусе, напротив, у крыс было больше, чем у хомяков.

Через 24 ч после выхода из ГМС как у крыс, так и хомяков в неокортексе (рис. 3) периваскулярные пространства были сужены, особенно возле крупных сосудов у хомяков (рис. 3, A2), видны

perivascular spaces of a various extent (more visible in hamsters) (Fig. 1, B2 and B3). Multiple functionally active, filled with blood vessels of different diameters (capillaries, arteries, arterioles) (Fig. 1, B) were present, especially in hamsters at NHM (Fig. 1, B3). Furthermore, there was found a decreased level of total protein in the hypothalamus tissue: at AHM – both in rats (from (1.21 ± 0.38) $\mu\text{g/ml}$ in the control down to (1.15 ± 0.01) $\mu\text{g/ml}$) and hamsters (from (1.34 ± 0.2) $\mu\text{g/ml}$ in the control down to (1.09 ± 0.09) $\mu\text{g/ml}$), and at NHM in hamsters – down to (0.5 ± 0.14) $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$).

In 2 hrs after the AHM the perivascular spaces were dilated in neocortical tissue both in rats (Fig. 2, A1) and hamsters (Fig. 2, A2), the vessels without perivascular spaces were also observed. A considerable number of dark neurons appeared in rat neocortex, the level of total protein was not significantly different from the control: (1.58 ± 0.24) $\mu\text{g/ml}$. The dark neurons were observed in

the neocortex tissue of hamsters 2 hrs after the AHM; some cells had also the nuclei with nucleoli (Fig. 2, A2), as in the rats with AHM state (Fig. 1, A1). The level of total protein in neocortex tissue of hamsters increased up to (1.71 ± 0.18) $\mu\text{g/ml}$ (control – (1.44 ± 0.29) $\mu\text{g/ml}$).

Hypothalamic tissue in 2 hrs after the AHM state had changes similar to those in the neocortex samples (Fig. 2, B1 and B2), but the dilatation of perivascular spaces was more visible, especially in hamsters, and the number of dark neurons in the hypothalamus was higher in the rats in contrast to hamsters.

In 24 hrs after the HMS the perivascular spaces were narrowed both in rat and hamster neocortex (Fig. 3), especially near the large vessels in hamsters (Fig. 3, A2), there were the vessels without perivascular spaces; the number of dark neurons was decreased; functionally active vessels of different diameters filled with blood were seen.

Rat hypothalamic tissue 24 hours after AHM (Fig. 3, B1) contained dark neurons; perivascular spaces were narrowed. In the same terms the perivascular spaces in hamster samples remained dilated, especially near the large vessels (Fig. 3, B2 and B3), the vessels of

сосуды без периваскулярных пространств; число темных нейронов уменьшалось, наблюдали наполненные кровью функционально активные сосуды различного диаметра.

В ткани гипоталамуса крыс через 24 ч после ИГМ (рис. 3, В1) были видны темные нейроны, периваскулярные пространства сужались. У хомяков в эти же сроки периваскулярные пространства оставались расширенными, особенно возле крупных сосудов (рис. 3, В2 и В3), были видны сосуды меньшего диаметра без периваскулярных пространств.

Ответ организма на охлаждение зависит от вида и возраста животного, глубины и длительности холодовой экспозиции. Данные, имеющиеся в научной литературе по этому вопросу, достаточно противоречивы.

В термонейтральной зоне (температура окружающей среды 27...29°C) у крысы и хомяка базальные метаболические показатели сходные, но в ответ на постепенное снижение температуры окружающей среды скорость метаболизма у хомяков увеличивается значительно быстрее, чем у крыс [24]. Кроме того, для гомойо- и гетеротермных животных, возможно, характерны различные соотношения типов термогенеза – сократительного и несократительного. Зависимость метаболизма от температуры в периферических тканях существенно ниже, чем в «ядре» тела, значительно снижается как при видовой, так и при индивидуальной адаптации к холоду, определяется размерами тела, экологической специализацией животных и уровнем терморегуляторного метаболизма [5]. Следовательно, гибернирующие и негибернирующие животные на холодовое воздействие будут реагировать по-разному.

Например, ранее было показано [16], что формирование ответной реакции на холодовое воздействие у крыс происходит по гипертрофическому типу, а у хомяков – по атрофическому. Для получения адекватной реакции на холодовой фактор авторы имитировали условия естественного фото-

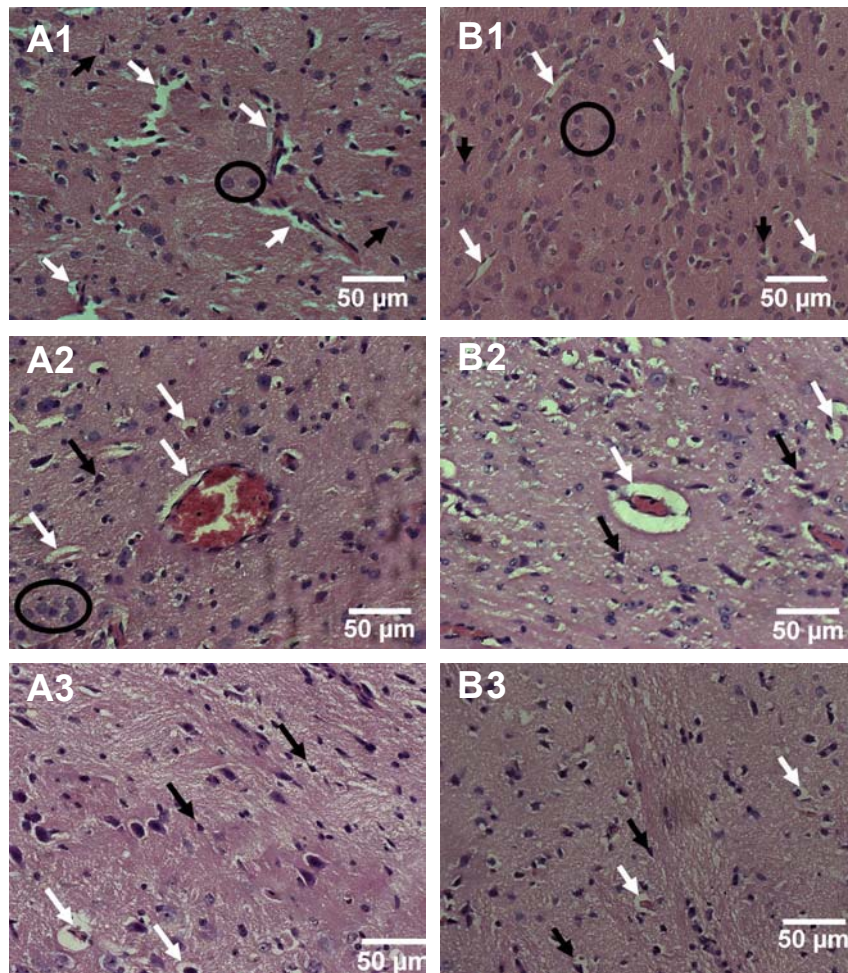


Рис. 3. Ткани головного мозга крыс и хомяков через 24 ч после выхода из искусственного и естественного гипометаболизма: **А** – сенсомоторная область неокортекса; **В** – гипоталамус; **1** – крысы при ИГМ; **2** – хомяки при ИГМ; **3** – хомяки при ЕГМ; периваскулярные пространства (белые стрелки); нейроны с ядрышками в ядре (обведено белым контуром); интактные (обведено черным контуром) и темные (черные стрелки) нейроны. Окраска гематоксилином и эозином.

Fig. 3. Brain tissues of rats and hamsters 24 hrs after artificial and natural hypometabolism: **A** – neocortex sensorimotor area; **B** – hypothalamus; **1** – rats at AHM; **2** – hamsters at AHM; **3** – hamsters at NHM; perivascular spaces (white arrows); neurons with nucleoli in nucleus (white contour); intact (black contour) and dark (dark arrows) neurons. Hematoxylin and eosin staining.

smaller diameter were observed without perivascular spaces.

The response of an organism to cooling depends on the species and age of an animal, depth and duration of cold exposure; the available published data on this topic are quite contradictory.

In thermally neutral zone (with ambient temperature of 27...29°C) rats and hamsters have similar basal metabolic parameters, but in response to gradual reduction of ambient temperature the metabolism rate in hamsters increases much faster than in rats [15]. Moreover, homoio- and heterothermal animals are likely characterized with different ratios of thermogenesis types, *i. e.* shivering and non-shivering. Metabolism dependence



периода и использовали холодное воздействие с постепенно снижающейся температурой.

Известно, что в нормальных условиях головной мозг получает 20% всего кислорода организма и особенно чувствителен к гипоксии. Подкорковые, филогенетически более «древние» структуры мозга, к которым относится и гипоталамус, имеют приоритетное снабжение кислородом и устойчивы к гипоксии, в отличие от неокортекса. Гипоталамус управляет всеми основными гомеостатическими процессами, его строение относительно одинаково у наземных млекопитающих, в отличие от организации более молодых структур – неокортекса и лимбической системы. Кроме того, в гипоталамусе сосудов на единицу площади значительно больше, чем в неокортексе. Так, у крыс при ИГМ в образцах неокортекса мы наблюдали значительное количество клеток с ядрышками в ядре, что указывает на усиление синтеза белка и является ответной реакцией на гипоксию. Это подтверждалось повышенным уровнем общего белка (на 102%) в ткани неокортекса крыс. У хомяков уровень белка как при ИГМ, так и при ЕГМ, напротив, был снижен (на 15,3 и 19,5% в ткани неокортекса; на 21,66 и 62,69% в ткани гипоталамуса соответственно). Можно предположить, что такое снижение уровня общего белка связано, в частности, с наблюдаемой при гибернации резкой редукцией его синтеза [20]. В то же время на моделях фокальной ишемии-реперфузии было показано [17], что ингибирование синтеза белка обладает нейропротекторным действием и, возможно, при естественной гибернации обеспечивает защиту нейронов от повреждения. Следует отметить, что у крыс при ИГМ в ткани гипоталамуса уровень общего белка также снижался, что, вероятно, может указывать на реализацию нейропротекторных механизмов и у гомойотермов при развитии ГМС. У гетеротермных хомяков, в отличие от гомойотермных крыс, у которых нейроны с ядрышками в ядрах наблюдали именно при ГМС, такие клетки в неокортексе появлялись только через 2 ч после выхода из ИГМ (уровень общего белка при этом повышался на 18,75% ($p < 0,05$)). Вероятно, именно на этом этапе проявляются отсроченные реакции на гипоксию, действие которой организм гетеротермного животного может испытывать в процессе выхода из гипометаболического состояния. Так, было показано [28], что организм арктического суслика подвергался эндогенной гипоксии (по уровню экспрессии HIF-1a) в процессе эутермии и в период самосогревания.

При искусственном и естественном ГМС (сочетанные эффекты гипоксии-гиперкапнии, низкой температуры окружающей среды и гипотермии организма) в тканях неокортекса и гипоталамуса у гомойо- и гетеротермных животных на структур-

on temperature in peripheral tissues is much lower than in the 'core' of the body, significantly reduces both due to species-specific and individual cold adaptations, and is determined by body size, ecological specialization of animals and the level of thermoregulatory metabolism [29]. Therefore hibernating and non-hibernating animals will respond a cold exposure in a different way.

For example, it was shown that the formation of a response to cold exposure in rats occurs by hypertrophic type, and in hamsters its corresponds to atrophic one [7]. For obtaining an adequate response to a cold factor the authors simulated the conditions of natural photoperiod and used the cold exposure with gradually reducing temperature.

It is known that under normal conditions the brain receives 20% of the body's oxygen and is particularly sensitive to hypoxia. The subcortical, phylogenetically more 'ancient' brain structures, which include hypothalamus, have a priority supply of oxygen and are hypoxia resistant, in contrast to neocortex. Hypothalamus controls all basic homeostatic processes, and its structure is relatively the same in terrestrial mammals, unlike the organization of much younger structures, *i.e.* neocortex and limbic system. Furthermore, hypothalamus has considerably higher number of vessels per a square unit than in neocortex. In particular, we observed a significant number of cells with nucleoli in nucleus in the neocortex samples in rats with AHM, indicating an increased protein synthesis and response to hypoxia. This was confirmed by an increased level of total protein (by 102%) in the tissue of rat neocortex. In hamsters, the protein level both at AHM and at NHM *vice versa* was reduced (by 15.3% and 19.5% in the tissue of neocortex; by 21.66% and 62.69% in hypothalamic tissue, respectively). It can be supposed that such a reduction in total protein level was associated in particular with the observed during hibernation sharp decrease in its synthesis [11]. At the same time, it has been shown in the models of focal ischemia-reperfusion that the inhibition of protein synthesis had a neuroprotective effects [9] and likely protected neurons from an injury during natural hibernation. It should be noted that in rats with AHM the level of total protein in hypothalamic tissue was also reduced, that probably pointed to the implementation of neuroprotective mechanisms in homoiotherms during development of HMS. Unlike homoiothermal rats in which the neurons with nucleoli in the nuclei were observed exactly at HMS, such cells in the neocortex of heterothermal hamsters appeared only 2 hrs later the AHM (level of total protein herewith increased up to 18.75%, $p < 0.05$). Probably this stage is exactly the point of delayed response to hypoxia, which action could be experienced by the heterothermal animal when rewarming from the HMS. For example, it was shown that the body of Arctic ground squirrel was exposed to



ном уровне мы наблюдали расширения периваскулярных пространств разной степени выраженности. Расширения периваскулярных пространств являются характерной и наиболее ранней гистологической картиной отека мозга и представляют в действительности отек ножек астроцитов, от степени которого может зависеть размер периваскулярного пространства. У гетеротермных хомяков расширение периваскулярных пространств было выражено сильнее. Это может, в частности, определяться значительно большими размерами ножек астроцитов у хомяков по сравнению с крысами (личное сообщение к.б.н. Л.Н. Марченко). В ткани гипоталамуса при ГМС наблюдали наполненные кровью кровеносные сосуды различного диаметра (капилляры, артерии, артериолы), что указывает на адекватное кровоснабжение и достаточный уровень его функциональной активности.

Степень расширения периваскулярных пространств в тканях мозга у гетеро- и гомойотермов при ГМС может зависеть от различной видовой чувствительности мозга этих животных к гипоксии и гипотермии, особенностей вазодинамики, локальной микроциркуляции, соотношения доли активных и неактивных капилляров в сети, увеличения или уменьшения диаметра сосудов, а также размеров ножек астроцитов. Размеры периваскулярных пространств могут определяться процессами регуляции тонуса и уровнем пульсации сосудов, разной проницаемостью гематоэнцефалического барьера (за счет изменений в межэндотелиальных структурах), а также особенностями церебральной ангиоархитектоники и кровотока, отражать различные фазы метаболических процессов и уровни функциональной активности в ЦНС.

В тканях неокортекса и гипоталамуса мы наблюдали темные нейроны (*dark neurons*), которые в большинстве источников литературы трактуются как маркер и критерий выраженности любой патологии мозга, а сам феномен связывают с отсроченной гибелью нейронов [12, 14, 25, 27, 33, 34]. Более того существует также мнение, что темные нейроны являются артефактами препарирования [23].

Группой исследователей было высказано предположение: если темный нейрон – это артефакт препарирования или неадекватной фиксации ткани, то структура синапсов светлых (интактных) и темных нейронов не должна отличаться [2]. Процесс появления новых синапсов *in vitro* реализуется за несколько десятков минут, а *in vivo* он занимает еще больше времени, тогда как химическая фиксация структуры ткани осуществляется за несколько секунд [19]. На основании различий, выявленных в структуре синапсов интактных и темных нейронов, был сделан вывод о том, что темные нейроны представляют собой особое функциональное состояние

endogenous hypoxia (on the expression rate of HIF-1 α) during euthermia and self-warming [21].

At artificial and natural HMSs (combined effects of hypoxia-hypercapnia, low ambient temperature and body hypothermia) in the neocortex and hypothalamus tissues in homoio- and heterothermal animals at the structural level, we have noted the dilatation of perivascular spaces of various severity extent. Dilated perivascular spaces are the feature and most early histological manifestation of brain edema and actually is the swelling of astrocytes' end-feet, the degree of which may depend on the size of perivascular spaces. In heterothermal hamsters the dilatation of perivascular spaces was more pronounced. It can in particular be determined by the considerably bigger sizes of the astrocytes end-feet in hamsters if compared with rats (Dr. L.N. Marchenko, personal communication). In hypothalamic tissue at HMS there observed in the blood vessels filled with blood of different diameters (capillaries, arteries, arterioles), which indicated an adequate blood supply and a sufficient level of functional activity.

The dilatation rate of perivascular spaces in the brain tissues from hetero- and homoiotherms at HMS may depend on various brain sensitivity of these animals to hypoxia and hypothermia, vasodynamics features, local microcirculation, the ratio of the share of active and inactive capillary in a network, increased or decreased diameter of the vessels, as well as the size of the astrocytes' end-feet. Dimensions of perivascular spaces can be determined by the processes regulating the tone and level of pulsation of blood vessels, by differences in blood-brain barrier permeability (due to changes in interendothelial structures), as well as by the features of cerebral architecture and blood flow, reflect different phases of metabolic processes and level of functional activity in the CNS.

In the neocortex and hypothalamus tissues we observed the dark neurons, which in most reports are considered as the marker and criterion of any of brain pathology manifestation; their appearance is associated with delayed neuronal death [3, 5, 16, 20, 27, 28]. Moreover, there is also the notion that dark neurons are the preparation artifacts [14].

A group of researchers has suggested that if the dark neuron is either an artifact of preparation or inadequate tissue fixation, then the structure of synapses of light (intact) and dark neurons should not be different [17]. The appearance of new synapses *in vitro* takes usually several dozens of minutes, *in vivo* it does much longer time, while the chemical fixation of the tissue structure lasts only a few seconds [10]. Basing of the differences identified in the synapse structure of intact and dark neurons it was concluded that the dark neurons represented a special functional state of the cell associated with the protection against nonspecific stimula-



клетки – защита от неспецифического возбуждения и эксайтотоксичности [2]. Кроме того, появление темных нейронов может быть обратимым [15, 21, 22]. В середине 90-х гг. также было показано, что в онтогенезе темные нейроны обнаруживаются, только если установлены основные нейронные связи и сформирован синаптический аппарат, а у взрослых животных изменения количества темных нейронов зависят от циркадных ритмов: утром таких нейронов мало, а поздно вечером – много [31, 32]. В мозге сусликов при гибернации также наблюдали большое количество темных нейронов, при входе в торпор таких нейронов было меньше, чем при выходе [2]. Пробуждение от спячки, как известно, сопровождается взрывной БЭА мозга, гипогликемией, оксидативным стрессом. За период гибернации суслики проходят до десятка таких циклов входа и пробуждения. Если бы все темные нейроны погибали, то гибернирующие животные не смогли бы выжить. Кроме того, общая неспецифическая активация синаптической передачи приводит к увеличению числа темных нейронов и их отсроченной гибели, и, наоборот, усиление тормозной активности или блокада возбуждающей синаптической передачи спасает нейроны от гибели. Снижение кровотока, поступления кислорода и глюкозы во время естественной гибернации, а также последующая реоксигенация при выходе из нее не приводят к повреждению и гибели клеток [18, 26].

В наших исследованиях темные нейроны были обнаружены при ГМС только у хомяков, а на этапах восстановления (через 2 и 24 ч после выхода из ГМС) и у крыс, и у хомяков.

По-видимому, выявленные нами изменения в тканях мозга (степень расширения периваскулярных пространств, появление темных нейронов, нейронов с ядрышками в ядре и колебания уровня общего белка в тканях) не являются следствием токсического воздействия или патологических изменений, а могут отражать различные фазы нормальных метаболических процессов в ЦНС при ГМС. Эти изменения носят видоспецифический характер, качественно и количественно по-разному проявляются на определенных этапах входа и выхода из естественного и искусственного ГМС.

Кроме того, существует мнение, что структурные повреждения (изменения) тканей мозга относятся к числу «эволюционно консервативных» и активируют оптимальные адаптивно-приспособительные реакции [3].

Выводы

Таким образом, при естественном и искусственном ГМС у гетеротермных хомяков и при искусственном ГМС у гомойотермных крыс наблюдаются сходные изменения: в гистологической

tion and excitotoxicity [17]. In addition, the appearance of dark neurons may be reversible [6, 12, 13]. In the mid-90s it was also shown that the dark neurons are found in ontogenesis only if the basic neural connections are established and the synaptic apparatus is formed, and in adult animals the change in the number of dark neurons depends on the circadian rhythms: in the morning the number of these neurons is small, but in late evening there are lots of them [25, 26]. The brain of ground squirrels during hibernation also contained a large amount of dark neurons, the number of such neurons was less when entering the torpor than during rewarming from the state [17]. Awakening from hibernation is known to be accompanied with the burst of brain BEA, hypoglycemia, oxidative stress. During hibernation period the ground squirrels are subjected to a dozen of such cycles of entering and awakening. If all the dark neurons would die, then hibernating animals could not survive. In addition, total non-specific activation of synaptic transmission leads to an increase in the number of dark neurons and delayed death, and *vice versa* the increasing of inhibitory activity or blocking the excitatory synaptic transmission rescues neurons from a death. The reduced blood flow, oxygen and glucose supply during natural hibernation and subsequent reoxygenation when awakening does not lead to a damage and cell death [8, 19].

In our studies dark neurons were detected during HMS only in hamsters, and at the recovery stages (2 and 24 hrs after rewarming from HMS) both in rats and hamsters.

It looks like the changes we identified in the brain tissue (the dilatation rate of perivascular spaces, the appearance of dark neurons, neurons with nucleoli in the nucleus and variations of total protein content in the tissues) are not the result of toxic effects or pathological changes, and may reflect the different phases of normal metabolic processes in CNS at HMS. These changes are species-specific, they are differently (both qualitatively and quantitatively) manifested at certain stages of entering and rewarming from the natural and artificial HMS.

In addition, the structural damages (changes) of brain tissue are believed to be among the ‘evolutionarily conservative’ phenomena and activate the optimal adaptive responses [18].

Conclusions

Thus, natural and artificial HMS in heterothermal hamsters and artificial HMS in homoiothermal rats are accompanied by similar changes: histologically, the neocortex and hypothalamus had the dilatation of perivascular spaces, the appearance of dark neurons, neurons containing the nucleus with nucleoli; and biochemically, there were changes in the level of total protein indices in these tissues.

картине неокортекса и гипоталамуса – расширение периваскулярных пространств, появление темных нейронов, нейронов с ядрышками в ядре; на биохимическом уровне – в показателях общего белка в этих тканях.

Выявленные изменения проявляются у крыс и хомяков в разной степени выраженности на входе в гипометаболические состояния и на этапах восстановления (через 2 и 24 ч).

Авторы благодарят ст.н.с., к.б.н. И.Ф. Коваленко за методическую помощь.

Литература

1. Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии и гистологической техники. – М.: Медицина, 1982. – 304 с.
2. Клименко О.А., Рогачевский В.В. Объемная ультраструктура дендритных синапсов идентифицированных темных и светлых нейронов гиппокампа крыс // XXIV Российская конф. по электронной микроскопии (РКЭМ-2012): Тезисы докладов. – Черноголовка, 2012. – С. 427–428.
3. Крыжановский Г.Н. Общая патофизиология нервной системы: Руководство. – М.: Медицина, 1997. – 351 с.
4. Мельничук С.Д., Мельничук Д.О. Гіпобіоз тварин (молекулярні механізми та практичне значення для сільськогосподарства і медицини). – К.: Видавничий центр НАУ, 2007. – 220 с.
5. Пастухов Ю.Ф., Максимов А.Л., Хаскин В.В. Адаптация к холоду и условиям Субарктики: проблемы термофизиологии. – Магадан: СВНЦ ДВО РАН, 2003. – Т. 1. – 373 с.
6. Поленов Л.А. Функциональная морфология Гомори-положительной гипоталамо-гипофизарной нейроэндокринной системы в период зимнего оцепенения у пойкилотермных и при гибернации у гомеотермных позвоночных // Криобиология и криомедицина. – 1984. – Вып. 15. – С. 44–47.
7. Тимофеев Н.Н., Прокофьева Л.П. Нейрохимия гипобиоза и пределы криорезистентности организма. – М.: Медицина, 1997. – 208 с.
8. Шило А.В. Динамика электрографических показателей у крыс и хомячков при выходе из искусственного и естественного гипометаболических состояний // Нейрофизиология. – 2015. – Т. 47, № 1. – С. 87–95.
9. Штарк М.В. Мозг зимоспящих. – Новосибирск: Наука, 1970. – 240 с.
10. Beckman A.L., Stanton T.L. Properties of the CNS during the state of hibernation // The Neural Basis of Behavior. – NY: MPTP press, 1982. – P. 19–45.
11. 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.
12. Capo I., Lalosevic D. Interpretation of dark neurons in experimental model of ischemia, neurointoxication and brain infection // Med Pregl. – 2011. – Vol. 64, № 1–2. – P. 101–106.
13. Carey H.V., Andrews M.T., Martin S.L. Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature // Physiol. Rev. – 2003. – Vol. 83. – P. 1153–1181.
14. Cortez S.C., McIntosh T.K., Noble L.J. Experimental fluid percussion brain injury: vascular disruption and neuronal and glial alterations // Brain Res. – 1989. – Vol. 482, №2. – P. 271–282.
15. Csordas A., Mazlo M., Gallyas F. Recovery versus death of "dark" (compacted) neurons in non-impaired parenchymal environment: light and electron microscopic observations // Acta Neuropathol. (Berl.). – 2003. – Vol. 106, №1. – P. 37–49.

The found changes occur in rats and hamsters in a different extent when entering and rewarming from hypometabolic states and at the recovery stages (2 and 24 hrs).

We are grateful to Senior Researcher, PhD I.F. Kovalenko for methodological assistance.

References

1. Beckman A.L., Stanton T.L. Properties of the CNS during the state of hibernation. The Neural Basis of Behavior. NY: MPTP press; 1982.
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. Capo I., Lalosevic D. Interpretation of dark neurons in experimental model of ischemia, neurointoxication and brain infection. Med Pregl 2011; 64 (1–2): 101–106.
4. Carey H.V., Andrews M.T., Martin S.L. Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. Physiol Rev 2003; 83: 1153–1181.
5. Cortez S.C., McIntosh T.K., Noble L.J. Experimental fluid percussion brain injury: vascular disruption and neuronal and glial alterations. Brain Res 1989; 482 (2): 271–282.
6. Csordas A., Mazlo M., Gallyas F. Recovery versus death of "dark" (compacted) neurons in non-impaired parenchymal environment: light and electron microscopic observations. Acta Neuropathol 2003; 106 (1): 37–49.
7. Deveci D., Egginton S. Differing mechanisms of cold-induced changes in capillary supply in m. tibialis anterior of rats and hamsters. J Experim Biology 2002; 205 (Pt. 6): 829–840.
8. Drew K.L., Buck C.L., Barnes B.M. et al. Central nervous system regulation of mammalian hibernation: implications for metabolic suppression and ischemia tolerance. J Neurochem 2007; 102 (6): 1713–1726.
9. Drew K.L., Rice M.E., Kuhn T.B., Smith M.A. Neuroprotective adaptations in hibernation: therapeutic implications for ischemia-reperfusion, traumatic brain injury and neurodegenerative diseases. Free Radic Biol Med 2001; 31 (5): 563–573.
10. Engert F., Bonhoeffer T. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. Nature 1999; 399 (6731): 66–70.
11. Frerichs K.U., Smith C.B., Brinner M. et al. Suppression of protein synthesis in brain during hibernation involves inhibition of protein initiation and elongation. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95 (11): 14511–14516.
12. Gallyas F., Zoltay G. An immediate light microscopic response of neuronal somata, dendrites and axons to noncontusing concussive head injury in the rat. Acta Neuropathol. 1992; 83 (5): 386–393.
13. Gallyas F., Zoltay G., Balas I. An immediate light microscopic response of neuronal somata, dendrites and axons to contusing concussive head injury in the rat. Acta Neuropathol 1992; 83 (5): 394–401.
14. Garman R.H. Histology of the central nervous system. Toxicol Pathol 2011; 39 (5): P. 22–35.
15. Himms-Hagen S. Brown adipose tissue and cold-acclimation. In: P. Trayhurn and D.G. Nicholls, editors. Brown Adipose Tissue. London: Edward Arnold Ltd, 1986. p. 214–267.
16. Jortner B.S. The return of the dark neuron. A histological artifact complicating contemporary neurotoxicologic evaluation. Neurotoxicology 2006; 27 (4): 628–634.
17. Klimenko O.A., Rogachevsky V.V. Volumetric ultrastructure of dendritic synapses of identified light and dark rats hippocampal neurons. Proceedings of XXIV Russian Conf. on Electron Microscopy (RKEM 2012); Chernogolovka, 2012: 427–428.



16. Deveci D., Egginton S. Differing mechanisms of cold-induced changes in capillary supply in m. tibialis anterior of rats and hamsters // *J. Experim. Biology*. – 2002. – Vol. 205, Pt. 6. – P. 829–840.
17. Drew K.L., Rice M.E., Kuhn T.B., Smith M.A. Neuroprotective adaptations in hibernation: therapeutic implications for ischemia-reperfusion, traumatic brain injury and neurodegenerative diseases // *Free Radic. Biol. Med.* – 2001. – Vol. 31, №5. – P. 563–573.
18. Drew K.L., Buck C.L., Barnes B.M. et al. Central nervous system regulation of mammalian hibernation: implications for metabolic suppression and ischemia tolerance // *J. Neurochem.* – 2007. – Vol. 102, №6. – P. 1713–1726.
19. Engert F., Bonhoeffer T. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity // *Nature*. – 1999. – Vol. 399, №6731. – P. 66–70.
20. Frerichs K.U., Smith C.B., Brinner M. et al. Suppression of protein synthesis in brain during hibernation involves inhibition of protein initiation and elongation // *Proc. Nation. Acad. Sci. USA*. – 1998. – Vol. 95, №11. – P. 14511–14516.
21. Gallyas F., Zoltay G. An immediate light microscopic response of neuronal somata, dendrites and axons to noncontusing concussive head injury in the rat // *Acta Neuropathol. (Berl.)*. – 1992. – Vol. 83, №5. – P. 386–393.
22. Gallyas F., Zoltay G., Balas I. An immediate light microscopic response of neuronal somata, dendrites and axons to contusing concussive head injury in the rat // *Acta Neuropathol. (Berl.)*. – 1992. – Vol. 83, №5. – P. 394–401.
23. Garman R.H. Histology of the central nervous system // *Toxicologic Pathology*. – 2011. – Vol. 39, №5. – P. 22–35.
24. Himms-Hagen S. Brown adipose tissue and cold-acclimation // In: *Brown Adipose Tissue* / Ed. P. Trayhurn and D.G. Nicholls. – London: Edward Arnold Ltd, 1986. – P. 214–267.
25. Jortner B.S. The return of the dark neuron. A histological artifact complicating contemporary neurotoxicologic evaluation // *Neurotoxicology*. – 2006. – Vol. 27, №4. – P. 628–634.
26. Larson J., Drew K. L., Folkow L. P. et al. No oxygen? No problem! Intrinsic brain tolerance to hypoxia in vertebrates // *J. Exp. Biol.* – 2014. – Vol. 217, Pt. 7. – P. 1024–1039.
27. Lowenstein D.H., Thomas M.J., Smith D.H., McIntosh T.K. Selective vulnerability of dentate hilar neurons following traumatic brain injury: a potential mechanistic link between head trauma and disorders of the hippocampus // *J. Neurosci.* – 1992. – Vol. 12, №12. – P. 4846–4853.
28. Ma Y. L., Zhu X., Rivera P. 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. – Vol. 289. – P. R1297–R1306.
29. Magarinos A.M., McEwen B.S., Saboureau M., Pevet P. Rapid and reversible changes in intrahippocampal connectivity during the course of hibernation in European hamsters // *PNAS*. – 2006. – Vol. 103, №49. – P. 18775–18780.
30. Morrison S.F., Nakamura K. Central neural pathways for thermoregulation // *Front Biosci.* – 2011. – Vol. 16, №1. – P. 74–104.
31. Murakami T., Ohtsuka A. Dark neurons in the mouse brain: An investigation into the possible significance of their variable appearance within a day and their relation to negatively charged cell coats // *Arch Histol. Cytol.* – 1996. – Vol. 59, № 1. – P. 79–85.
32. Murakami T., Ohtsuka A., Taguchi T., Piao D.X. Perineuronal sulfated proteoglycans and dark neurons in the brain and spinal cord: A histochemical and electron microscopic study of newborn and adult mice // *Arch Histol. Cytol.* – 1995. – Vol. 58, №5. – P. 557–565.
33. Nawashiro H., Shima K., Chigasaki H. Selective vulnerability of hippocampal CA3 neurons to hypoxia after mild concussion in the rat // *Neurol. Res.* – 1995. – Vol. 17, №6. – P. 455–460.
34. Ooigawa H., Nawashiro H., Fukui S. et al. The fate of Nissl-stained dark neurons following traumatic brain injury in rats: difference between neocortex and hippocampus regarding survival rate // *Acta Neuropathol.* – 2006. – Vol. 112, №4. – P. 471–481.
35. Kryzhanovsky G.N. General pathophysiology of nervous system: Handbook. Moscow: Medicine; 1997.
36. Larson J., Drew K.L., Folkow L.P. et al. No oxygen? No problem! Intrinsic brain tolerance to hypoxia in vertebrates. *J Exp Biol* 2014; 217 (Pt. 7): 1024–1039.
37. Lowenstein D.H., Thomas M.J., Smith D.H., McIntosh T.K. Selective vulnerability of dentate hilar neurons following traumatic brain injury: a potential mechanistic link between head trauma and disorders of the hippocampus. *J Neurosci* 1992; 12 (12): 4846–4853.
38. Ma Y.L., Zhu X., Rivera P. 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: R1297–R1306.
39. Magarinos A.M., McEwen B.S., Saboureau M., Pevet P. Rapid and reversible changes in intrahippocampal connectivity during the course of hibernation in European hamsters. *PNAS* 2006; 103 (49): 18775–18780.
40. Melnichuk C.D., Melnichuk D.O. Hypobios of animals (molecular mechanisms and practical value for agriculture and medicine). Kyiv: Vydavnytstvo NAU; 2007.
41. Morrison S.F., Nakamura K. Central neural pathways for thermoregulation. *Front Biosci* 2011; 16 (1): 74–104.
42. Murakami T., Ohtsuka A. Dark neurons in the mouse brain: An investigation into the possible significance of their variable appearance within a day and their relation to negatively charged cell coats. *Arch Histol Cytol* 1996; 59 (1): 79–85.
43. Murakami T., Ohtsuka A., Taguchi T., Piao D.X. Perineuronal sulfated proteoglycans and dark neurons in the brain and spinal cord: A histochemical and electron microscopic study of newborn and adult mice. *Arch Histol Cytol* 1995; 58 (5): 557–565.
44. Nawashiro H., Shima K., Chigasaki H. Selective vulnerability of hippocampal CA3 neurons to hypoxia after mild concussion in the rat. *Neurol Res* 1995; 17 (6): 455–460.
45. Ooigawa H., Nawashiro H., Fukui S. et al. The fate of Nissl-stained dark neurons following traumatic brain injury in rats: difference between neocortex and hippocampus regarding survival rate. *Acta Neuropathol* 2006; 112 (4): 471–481.
46. Pastukhov Yu.F., Maksimov A.L., Khaskin B.B. Adaptation to cold and subarctic conditions: Problems of thermal physiology. Magadan: NESCFEB RAS, 2003; 1.
47. Polenov L.A. Functional morphology of Gomori-positive hypothalamic-pituitary neurosecretory system during the winter torpor in poikilothermal and homoiothermal vertebrates from hibernation. *Cryobiology and Cryomedicine* 1984; (15): 44–47.
48. Shilo O.V. Dynamics of electrographic indices in rats and hamsters under artificial and natural hypometabolic states. *Neurofiziologiya* 2015; 47 (1): 87–95.
49. Shtark M.B. Brain of hibernators. Novosibirsk: Nauka; 1970.
50. Timofeev N.N., Prokofieva L.P. Neurochemistry of hypobiosis and limits of organisms cryoresistance. Moscow: Medicine; 1997.
51. Volkova O.V., Eletskiy Yu.K. Bases of histology and histological techniques. Moscow: Meditsyna; 1982.