

УДК 591.128:591.461.2:591.133.2

В.В. Ломако<sup>1\*</sup>, И.И. Кондаков<sup>2</sup>

## Структурные изменения в почках гомойо- и гетеротермных животных при искусственном и естественном гипометаболизме

UDC 591.128:591.461.2:591.133.2

V.V. Lomako<sup>1\*</sup>, I.I. Kondakov<sup>2</sup>

## Structural Changes in Kidneys of Homeo- and Heterothermal Animals Undergoing Artificial and Natural Hypometabolism

**Ключевые слова:** гибернация, искусственный гипометаболизм, почки, крысы, хомяки.

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

**Key words:** hibernation, artificial hypometabolism, kidneys, rats, hamsters.

Сохранность структуры почек является необходимым условием для их нормального функционирования и имеет решающее значение в ряде клинических случаев, связанных с почечной ишемией, а также при хранении органов для трансплантации. Известно, что при гибернации животные способны понизить температуру тела (ТТ) практически до 0°C, а функции организма – до минимума. Почки при этом находятся в условиях гипотермии, когда ренальный кровоток и продукция мочи сильно редуцированы. Периоды пробуждения от спячки сопровождаются повышением ТТ, увеличением почечного кровотока и восстановлением нормальной выработки мочи. Уменьшение притока крови к почке и нормализация почечного кровотока (реперфузия) являются двумя ключевыми факторами, влияющими на целостность структуры почек в этих условиях [8, 11]. Функции почек при гибернации претерпевают глубокие сезонные изменения, поэтому почки гибернирующих животных могут быть естественной моделью для исследования, поскольку способны функционировать в условиях гипотермии, ишемии и реперфузии.

Цель работы – изучение структурных изменений в почках крыс при гипометаболизме (искусственном) и хомяков (искусственном и естественном (гибернация)) и на этапах восстановления (через 2 и 24 ч).

The integrity of renal structure and its preservation are essential for proper functioning of kidney, as well as they are crucial in some clinical cases associated with renal ischemia, and also during storage of organs for following transplantation. During hibernation the animals are known as capable to lower body's temperature (BT) virtually down to 0°C and diminish extremely the body's functions. Kidneys underwent hypothermia hereat, when the renal blood flow and urine production are greatly reduced. The periods of arousal from dormancy are accompanied with increasing BT, augmenting renal blood flow and recovering normal urine production. A decreased blood flow to the kidney and normalization of renal blood flow (reperfusion) are the two key factors affecting the renal structure integrity under these conditions [3, 11]. The renal functions during hibernation undergo profound season changes, therefore the kidneys of hibernating animals may be natural model for such a study, since they are able to function under hypothermia, ischemia and reperfusion.

This research aim was to study structural changes in kidneys of rats undergoing hypometabolism (artificial) and hamsters (artificial and natural (hibernation)) and at recovery stages (2 and 24 hrs later).

Experiments were carried out according to the General Principles of Experiments in Animals approved by the 6<sup>th</sup> National Congress in Bioethics (Kyiv, 2016) and agreed to the statements of European Convention

<sup>1</sup>Отдел криофизиологии, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

<sup>2</sup>Отдел криоморфологии, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

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

<sup>1</sup>Department of Cryophysiology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

<sup>2</sup>Department of Cryomorphology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

\*To whom correspondence should be addressed:  
23, Pereyaslavskaya str., Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952,  
e-mail: victoria0regia@gmail.com

Поступила 22.11.2016

Принята в печать 16.01.2017

Received November, 22, 2016

Accepted January, 16, 2017

© 2017 V.V. Lomako et al., Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

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

Эксперименты проводили в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными VI Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2016) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986). Работу выполняли в осенне-зимний период на самцах золотистых хомяков (масса 85–95 г;  $n = 30$ ) и самцах беспородных белых крыс (масса 180–220 г;  $n = 20$ ). До начала эксперимента животных содержали в условиях вивария при естественном световом режиме на стандартном рационе *ad libitum* с добавлением зерен пшеницы и семян подсолнечника.

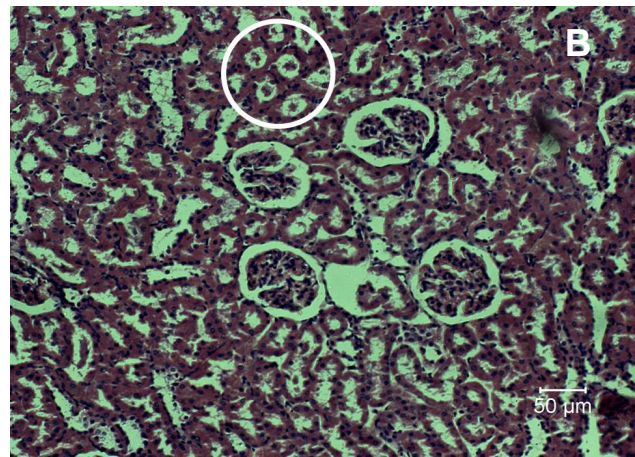
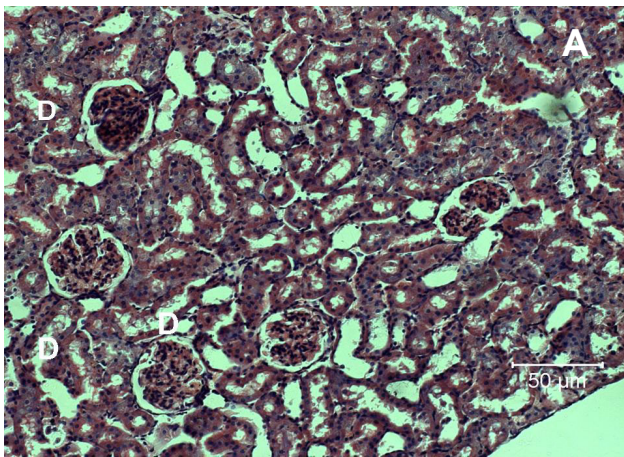
Хомяков перед погружением в состояние естественного гипометаболизма (ЕГМ) рассаживали в индивидуальные клетки, из рациона исключали сочную пищу, снабжали гнездовым материалом (древесные опилки и сено) и переносили в темное помещение с температурой воздуха ( $5 \pm 2$ )°C (промышленная холодильная камера объемом 20 м<sup>3</sup> с автоматической регулировкой температуры). Хомяки погружались в спячку через 10–14 суток. Средняя длительность баута составляла ( $3 \pm 0,5$ ) суток. Состояние искусственного гипометаболизма (ИГМ) моделировали с помощью метода «закрытого сосуда» [4]. Животных в герметически закрытом сосуде (объемом 3 дм<sup>3</sup> для крыс и 2 дм<sup>3</sup> для хомяков) помещали в темную холодильную камеру (2...5°C). Находясь в условиях пониженной температуры и нарастающей гипоксии-гиперкапнии, животные постепенно (в течение 2,5–3 ч) погружались в состояние, сходное по физиологическим параметрам с естественной гибернацией. Животных выводили из эксперимента путем декапитации, материал забирали при достижении ИГМ и ЕГМ, а также на этапах восстановления (через 2 и 24 ч после выхода из гипометаболических состояний) ( $n = 5$  в каждой экспериментальной группе). Для морфологического исследования забирали левую почку животного. Гистологическое исследование проводили по стандартной методике [2]. Полученные срезы ткани почек толщиной 6–8 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Препараты изучали и фотографировали с помощью микроскопа «Axio Observer Z1» («Carl Zeiss», Германия) с программным обеспечением для анализа изображений «AxioVision Rel. 4.8» («Carl Zeiss»). При морфологическом исследовании визуально оценивали состояние гистологических образцов ткани почек (кровенаполнение сосудов, состояние структурных компонентов почки, периваскулярных и интерстициальных пространств, эндотелиальных клеток, наличие дегенеративно-дистрофических

for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasburg, 1986). The research was carried out within the autumn-winter period in male golden hamsters (weighting 85–95 g;  $n = 30$ ) and male bredless albino rats (180–220 g;  $n = 20$ ). Before the experiment the animals were housed in the animal facility with natural light/dark cycle and a standard diet *ad libitum* enriched with wheat and sunflower seeds.

Before entering the natural hypometabolism (NHM) state the hamsters were placed into individual cages, the diet was deprived of juicy food. They were provided with nesting material (sawdust and hay), and then transferred into a dark room with air temperature ( $5 \pm 2$ )°C (industrial cooling chamber of 20 m<sup>3</sup> volume with automatically controlled temperature). Hamsters entered hibernation after 10–14 days. An average bout duration was ( $3 \pm 0.5$ ) days. The state of artificial hypometabolism (AHM) was simulated using the ‘closed vessel’ method [6]. Animals in a sealed vessel (3 and 2 dm<sup>3</sup> volume for rats and hamsters, respectively) were placed into a dark cooling chamber (2...5°C). Being under reduced temperature and increasing hypoxia-hypercapnia, the animals gradually (within 2.5–3 hrs) entered the state, similar by physiological parameters to natural hibernation. The animals were decapitated, the sampling was performed when the AHM and NHM were achieved, as well as at the recovery stages (2 and 24 hrs after arousal from hypometabolic states) ( $n = 5$  in each experimental group). The left kidney of animal was taken for morphological examination. Histological examination was performed according to the standard technique [8]. The obtained 6–8 μm thick sections of kidney tissues were stained with hematoxylin and eosin. The preparations were studied and photographed with the microscope Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Germany) with the image analysis software AxioVision Rel. 4.8 (Carl Zeiss). The state of renal tissues (blood filling, state of structural components of kidney, perivascular and interstitial spaces, endothelial cells, presence of degenerative-dystrophic changes, etc.) was visually assessed in histological sections during morphological examination. The total protein content in tissues was determined by the Bradford protein assay [2]. For statistical data processing we used the Mann-Whitney test.

In renal tissue of AHM rats we revealed the slight signs of protein dystrophy, thereat the epithelium was preserved, nephrons were large, no blood flow reduction was observed (Fig. 1A). In hamsters undergoing AHM we have noted the increased interstitial spaces (signs of edema) and vascular congestion, which might indicate a slowing down of blood circulation and blood outflow disorder; in epithelial cells of distal tubules the signs of granular, moderate hydropic and hyaline-





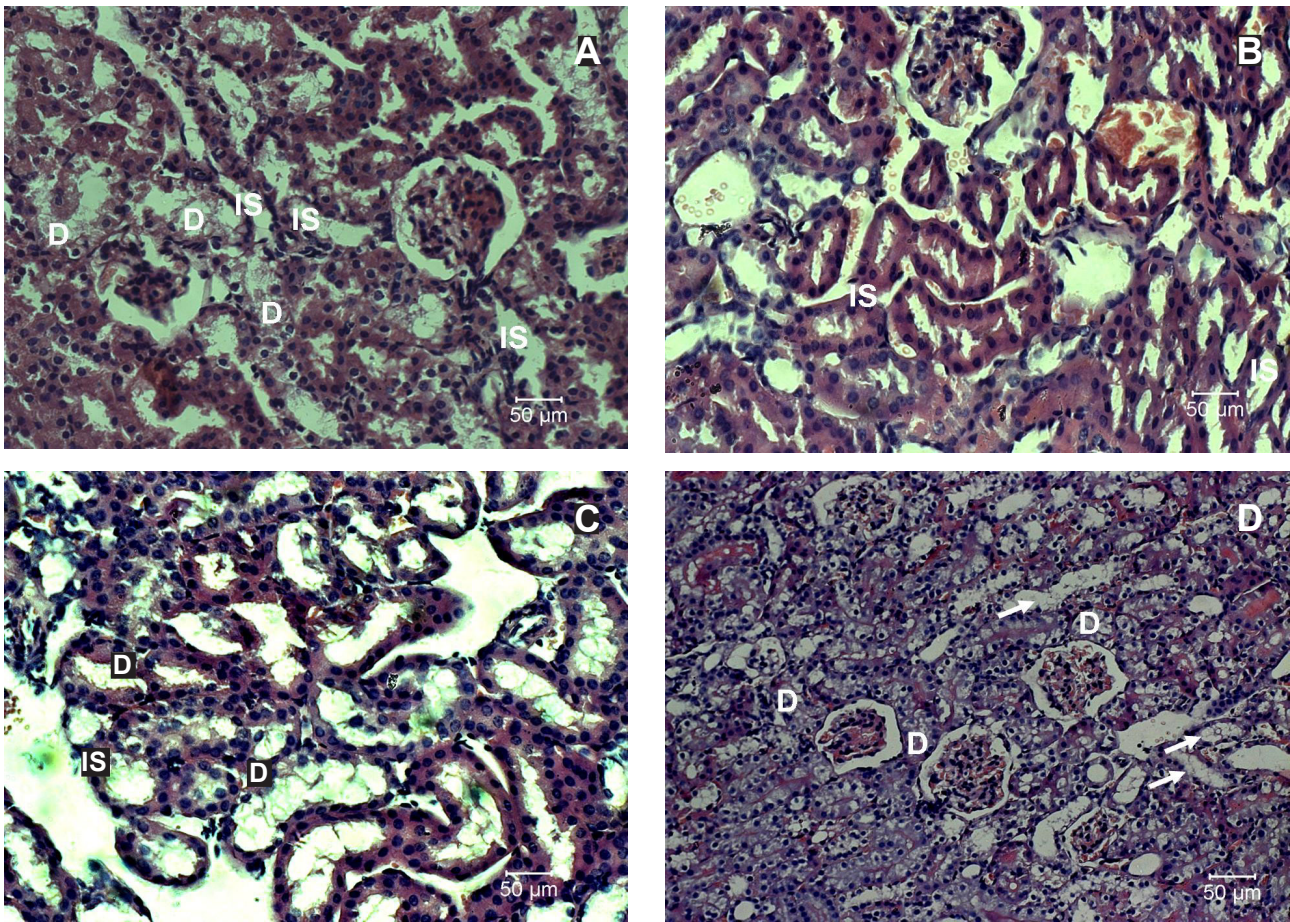
**Рис. 1.** Ткань почки крысы при искусственном гипометаболическом состоянии: **А** – гипометаболическое состояние; **В** – через 24 ч после выхода из гипометаболического состояния; Белым контуром отмечены просветы проксимальных канальцев нефрона, заполненные слущенным эпителием, **Д** – признаки белковой дистрофии. Окраска гематоксилином и эозином.

**Fig. 1.** Kidney tissue of rat in artificial hypometabolic state: **A** – hypometabolic state; **B** – 24 hrs later artificial hypometabolic state; white color circled – lumens of proximal tubules of nephron, filled with exfoliated epithelium, **D** – signs of protein dystrophy. H&E staining.

изменений и др.). Содержание общего протеина в тканях определяли методом Бредфорда [7]. Для статистической обработки данных использовали непараметрический критерий Манна-Уитни.

В ткани почек крыс при ИГМ выявлены незначительные признаки белковой дистрофии, при этом эпителий сохранен, нефроны большие, редукция кровотока не наблюдалась (рис. 1, А). У хомяков при ИГМ были отмечены увеличение интерстициальных пространств (признаки отека) и гиперемия сосудов, что может указывать на замедление кровообращения и нарушение оттока крови; в клетках эпителия дистальных канальцев обнаружены признаки зернистой, умеренной гидропической и гиалиново-капельной дистрофий (рис. 2, А). Признаки и причины дистрофий подробно описаны нами ранее [4]. У крыс через 2 ч после выхода из ИГМ в ткани почек каких-либо изменений не выявлено. Однако через 24 ч просвет проксимальных канальцев нефрона был заполнен слущенным эпителием, что является следствием нарушения кровообращения и гибели эпителиоцитов (рис. 1, В, обведено белым контуром). У хомяков через 2 ч после выхода из ИГМ сохранялись нарушение кровообращения и расширение интерстициальных пространств, наблюдались дистрофические изменения эпителия дистальных канальцев (рис. 2, В), а через 24 ч – нарушения были уже менее выражены, но сохранялись гиперемия сосудов и признаки гиалиново-капельной дистрофии (рис. 2, С). При ЕГМ у хомяков в ткани почек наблюдали венозную гиперемию, дистрофические изменения эпителия проксимальных канальцев (гидропическая дистрофия); просвет собирательных трубочек и дистальных

drop dystrophies (Fig. 2A) were found. The features and causes of the dystrophies we described in details previously [6]. In rats, 2 hrs later arousal from AHM no changes in renal tissue were revealed. Nevertheless, 24 hrs later the lumen of proximal nephrons was filled with exfoliated epithelium, that we associated with circulatory failure and epithelial cell death (Fig. 1B, white oval). In hamsters, 2 hrs later arousal from AHM the circulatory failure and expansion of interstitial spaces were kept, the degenerative changes in epithelium of distal tubules were observed (Fig. 2B), and 24 hrs later these disorders were less pronounced, but a vascular congestion of vessels and signs of hyaline-drop dystrophy were still observed (Fig. 2C). Renal tissue in hamsters undergoing NHM had a venous congestion, degenerative changes in epithelium of proximal tubules (hydropic dystrophy); a lumen of collector tubules and distal nephrons was filled with exfoliated epithelium (Fig. 2D, white arrows). After 24 hrs no changes in kidney tissue of hamsters were found, its structure was the same as in the normal kidney. V.F. Kozlova and T.N. Yurchenko [5] studied renal tissue of ground squirrel under hibernation and demonstrated reduced blood flow and congestive phenomena in vascular system as well, moreover they reported the hypertrophy and hyperplasia of smooth muscle cells, flattening and dehydration of epithelium of proximal and distal tubules. The noted by us features in renal tissue state were to some extent reflected in a changed total protein level (Table), which decreased only during hibernation (almost thrice). This fact may be due to a more significant deceleration of blood flow and BT decrease ( $(8 \pm 1)^\circ\text{C}$ ) during hibernation as compared to AHM ( $(16 \pm 1)^\circ\text{C}$ ) [6]. In addition,



**Рис. 2.** Ткань почки хомяка: **A** – искусственное гипометаболическое состояние; **B** – через 2 ч после выхода из искусственного гипометаболического состояния; **C** – через 24 ч после выхода из искусственного гипометаболического состояния; **D** – состояние гибернации; IS – интерстициальные пространства; D – признаки белковой дистрофии. Стрелками показаны просветы собирательных трубочек и дистальных канальцев нефрона, заполненные слущенным эпителием. Окраска гематоксилином и эозином.

**Fig. 2.** Hamster kidney tissue in: **A** – artificial hypometabolic state; **B** – 2 hrs later artificial hypometabolic state; **C** – 24 hrs later artificial hypometabolic state; **D** – hibernation state; IS – interstitial space; D – signs of protein dystrophy. The arrows indicate the lumens of collecting tubules and distal tubules of nephron, filled with exfoliated epithelium. H&E staining.

канальцев нефрона был заполнен слущенным эпителием (рис. 2, D, белые стрелки). Через 24 ч в ткани почки хомяков каких-либо изменений выявлено не было, структура ее соответствовала нормальной почке. В.Ф. Козловой и Т.Н. Юрченко [3] при исследовании ткани почек сусликов, находящихся в гибернации, показано, что ее состояние и структура также характеризуются признаками редукции кровотока и застойными явлениями в сосудистой системе, наблюдаются гипертрофия и гиперплазия гладко-мышечных клеток, уплощение и дегидратация эпителия проксимальных и дистальных канальцев. Отмеченные нами особенности в состоянии ткани почек в определенной степени находят отражение в изменении уровня общего протеина (таблица), который снижался только при гибернации (почти в три раза). Это может быть связано с более значительным замедлением кровотока и падением ТТ

the hibernation development is known as being accompanied with a significant reduction of blood pressure [7]. Of note is also the fact that the featured changes in chymase and tonin enzyme activity, which participate in the formation of vasoconstrictor peptide angiotensin (A) II from AI in kidney, being observed in rats and hamsters undergoing HM [1, 9] may explain some deformations revealed by us in renal structure and hemodynamics (Figs. 1 and 2). Chymase in rats and mice, unlike that in humans, primates, dogs, and hamsters, is one of the angiotensinases, because it rapidly hydrolyzes the linkage of Tyr4-Ile5 in AII, and forms AII only at high concentrations of AI. In hamsters undergoing NHM the chymase activity in kidneys increases multifold, and of tonin is multifold reduced [10], the activation of renal renin-angiotensin system is an important part in hypertension pathogenesis and renal damage [4]. No chan-



((8 ± 1)°C) при гибернации по сравнению с ИГМ ((16 ± 1)°C) [4]. Кроме того известно, что развитие гибернации сопровождается существенным снижением кровяного давления [10]. Следует также отметить, что особенности изменения активности энзимов химазы и тонина, участвующих в образовании вазоконстрикторного пептида ангиотензина (А) II из АI в почках, при ИГМ у крыс и хомяков [1, 5] могут служить объяснением некоторых выявленных нами изменений в структуре и гемодинамике почек (рис. 1 и 2). Химаза у крыс и мышей, в отличие от таковой у человека, приматов, собак и хомяков, является ангиотенгиназой, поскольку быстро гидролизует связь Туг4-Пе5 в АII, образует АII только при высоких концентрациях АI. У хомяков при ИГМ активность химазы в почках возрастает в разы, а тонина – в разы снижается [6], активация же почечной ренин-ангиотензиновой системы является важным звеном в патогенезе гипертензии и повреждении почек [9]. При ИГМ у крыс активность тонина и химазы не изменяется [1].

Таким образом, структура почек у крыс при ИГМ (гипоксически-гиперкапническая модель) и через 2 ч после выхода из него не претерпевала изменений, но через 24 ч просвет части канальцев был заполнен слущенным эпителием вследствие нарушения кровотока. У хомяков в почках при ИГМ наблюдались значительные дегенеративно-дистрофические изменения, частично сохраняющиеся и через 24 ч после выхода из ИГМ. Особенности, выявленные в ткани почки при ИГМ (венозная гиперемия, дистрофические изменения эпителия проксимальных канальцев; слущенный эпителий в просвете собирательных трубочек и дистальных канальцев нефрона), очевидно, являются следствием более резкой редукции ТТ и почечного кровотока по сравнению с ИГМ. Через 24 ч после выхода из гибернации структура почки хомяков не отличалась от нормы, что указывает на активацию физиологической репарации после реперфузии.

*Авторы выражают благодарность ст.н.с., к.б.н. А.В. Шило и ст.н.с., к.б.н. И.Ф. Коваленко за методическую помощь.*

## Литература

1. Бабійчук Г.О., Самохіна Л.М., Шило О.В. та ін. Хімаза, тонін та кальпаїни за умов гіпометаболічного стану у щурів // Проблеми криобіології. – 2005. – Т. 15, №3. – С. 465–466.

Уровень общего протеина (мкг/мл) в ткани почки при естественном и искусственном гипометаболизме ( $M \pm m$ )  
Total protein level ( $\mu\text{g/ml}$ ) in kidney tissue at natural and artificial hypometabolism ( $M \pm m$ )

Условия эксперимента Experimental conditions	Вид животного Type of animal	
	Крыса Rat	Хомяк Hamster
Контроль Control	3,037 ± 0,733	3,089 ± 1,227
ИГМ AHM	3,015 ± 0,71	3,498 ± 0,774
ИГМ 2 ч AHM 2 hrs	3,769 ± 0,985	3,879 ± 0,669
ИГМ 24 ч AHM 24 hrs	3,64 ± 0,745	4,02 ± 0,394
ЕГМ NHM	-	1,11 ± 0,051*

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

**Note:** \* – differences are statistically significant if compared with the control,  $p < 0.05$ .

ges in the tonin and chymase activities were found in rats undergoing AHM [1].

Thus, the kidney structure in rats undergoing AHM (hypoxic-hypercapnic model) and 2 hrs later arousal from it remained unchanged, but 24 hrs later the lumen of some tubules was filled with exfoliated epithelium due to blood flow failure. In hamster kidneys undergoing AHN we have observed significant degenerative-dystrophic changes, some of them were observed even 24 hrs after arousal from AHM. The features, revealed in kidney tissue at NHM (venous congestion, degenerative changes in epithelium of proximal tubules, exfoliated epithelium in lumen of collector tubes and distal nephrons), were obviously resulted from a sharper decrease of BT and renal blood flow as compared with AHM. In 24 hrs after arousal from hibernation the hamster kidney structure did not differ from the norm, thereby indicating the activation of physiological reparation following reperfusion.

*The authors are thankful to Dr. A.V. Shilo, senior research fellow, PhD, and Dr. I.F. Kovalenko, senior research fellow, PhD, for methodological assistance.*

## References

1. Babijchuk G.O., Samokhina L.M., Shylo O.V. et al. Chymase, tonin and calpains under hypometabolic state in rats. Probl Cryobiol 2005; 15(3): 465–466.

2. Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии и гистологической техники. – М.: Медицина, 1982. – 304 с.
3. Козлова В.Ф., Юрченко Т.Н. Структурные аспекты адаптации зимнеявляющихся животных // Проблемы криобиологии. – 1996. – №3. – С. 44–51.
4. Ломако В.В., Шило А.В., Коваленко И.Ф. Структурно-функциональные изменения в сердце гетеро- и гомойотермных животных при искусственном и естественном гипометаболизме // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2016. – Т. 26, №4. – С. 308–321.
5. Самохіна Л.М., Ломако В.В., Шило О.В. Хімаза, тонін та кальпаїни за умов штучного гіпометаболічного стану у хом'яків // Проблемы криобиологии. – 2007. – Т. 17, №4. – С. 347–355.
6. Самохіна Л.М., Ломако В.В., Шило О.В. Хімаза, тонін та кальпаїни за умов природної гібернації у хом'яків // Досягнення біології та медицини. – 2010. – №2. – С. 29–32.
7. 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.
8. Jani A., Martin S.L., Jain S. et al. Renal adaptation during hibernation // Am. J. Physiol. Renal. Physiol. – 2013. – Vol. 305. – P. F1521–F1532.
9. Kobori H., Nangaku M., Navar L.G., Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease // Pharmacol. Rev. – 2007. – Vol. 59, №3. – P. 251–287.
10. Lyman C.P. Hibernation in Mammals // Circulation. – 1961. – Vol. 24, №8. – P. 434–445.
11. Zancanaro C., Malatesta M., Mannello F. et al. The kidney during hibernation and arousal from hibernation. A natural model of organ preservation during cold ischaemia and reperfusion // Nephrol. Dial. Transplant. – 1999. – Vol. 14, №8. – P. 1982–1990.
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. Jani A., Martin S.L., Jain S. et al. Renal adaptation during hibernation. Am J Physiol Renal Physiol 2013; 305: F1521–F1532.
4. Kobori H., Nangaku M., Navar L.G., Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. Pharmacol Rev 2007; 59(3): 251–287.
5. Kozlova V.F., Yurchenko T.N. Structural aspects of adaptation in hibernators. Probl Cryobiol 1996; (3): 44–51.
6. Lomako V.V., Shilo O.V., Kovalenko I.F. Structural and functional changes in the heart of hetero- and homoiothermal animals under artificial and natural hypometabolism. Probl Cryobiol Cryomed 2016; 26(4): 308–321.
7. Lyman C.P. Hibernation in Mammals. Circulation 1961; 24(8): 434–445.
8. Volkova O.V., Eletskiy Yu.K. Fundamentals of histology and histological techniques. Moscow: Meditsina; 1982: 304.
9. Samokhina L.M., Lomako V.V., Shylo O.V. Chymase, tonin and calpains under artificial hypometabolic state in hamster. Probl Cryobiol 2007; 17(4): 347–355.
10. Samokhina L.M., Lomako V.V., Shylo O.V. Chymase, tonin and calpains under conditions of natural hibernation in hamsters. Dosyagnennya Biol Med 2010; (2): 29–32.
11. Zancanaro C., Malatesta M., Mannello F. et al. The kidney during hibernation and arousal from hibernation. A natural model of organ preservation during cold ischaemia and reperfusion. Nephrol Dial Transplant 1999; 14(8): 1982–1990.

