

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

ARKTIČKA PODZEMNA VJEVERICA (*SPERMOPHILUS PARRYII*) I CRNI
MEDVJED (*URSUS AMERICANUS*) KAO MODELI ZA ISTRAŽIVANJE
HUMANE KRIOGENEZE

ARCTIC GROUND SQUIRREL (*SPERMOPHILUS PARRYII*) AND AMERICAN
BLACK BEAR (*URSUS AMERICANUS*) AS MODELS FOR HUMAN
CRYOGENICS RESEARCHES

SEMINARSKI RAD

Lucija Kotarski
Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)
Mentor: doc.dr.sc.Duje Lisičić

Zagreb, 2018.

Sadržaj:

1. UVOD	1
1.1. Hibernacija.....	1
1.2. Kriogeneza.....	1
2. ARKTIČKA PODZEMNA VJEVERICA	3
2.1. Specifične prilagodbe na hibernaciju	4
2.1.1. Spontane faze zagrijavanja	4
2.1.2. Plastičnost mozga.....	5
2.1.3. Smanjenje potrošnje kisika	5
2.1.4. Proizvodnja topline	6
2.1.5. Proces pothlađenja	6
2.1.6. Prijenos akcijskog signala.....	7
3. AMERIČKI CRNI MEDVJED	8
3.1. Specifične prilagodbe na hibernaciju	9
3.1.1. Skeletni mišići.....	9
3.1.2. Srčani mišić.....	10
4. HUMANA KRIOGENEZA	12
4.1. Postupak.....	12
4.2. Budućnost	13
4.3. Važnost upotrebe znanja hibernirajućih sisavaca	14
5. ZAKLJUČAK	14
6. LITERATURA.....	15
7.SAŽETAK.....	19
8. SUMMARY	20

1. UVOD

1.1. Hibernacija

Hibernacija je fiziološki proces koji se javlja kod homeotermnih životinja kao odgovor na ekstremne zimske uvjete – nedostatak hrane te iznimno niske temperature. Hibernirajuće životinje prilagođavaju se navedenim uvjetima reverzibilnim snižavanjem vlastite tjelesne temperature i stope metabolizma te povišenjem ili sniženjem težine (Sherwood i sur., 2013).

Kako bi jedinka preživjela u nepovoljnim zimskim uvjetima mora izabrati jedan od dva moguća ishoda: samostalna proizvodnja energije ili manja potražnja za energijom. Velik broj organizama, tijekom godine, stvara zalihi masti ili migrira u toplije krajeve, ali samo pravi hibernatori imaju mogućnost snižavanja vlastitih potreba za energijom. Pravim hibernatorima smatraju se životinje odrasle mase do 5 kg dok ostale hibernirajuće životinje održavaju tjelesnu temperaturu i pomoću drugih prilagodba (Hill i sur., 2012).

Hibernirajući organizmi razvili su sposobnost drastičnog spuštanja i podizanja temperature tijela bez naznaka oštećenja tkiva i organa (Zancanaro i sur., 1999; Arendt i sur., 2003; Sandovici i sur., 2004; Fleck i Carey, 2005; Talaei i sur., 2011). Nehibernirajući organizmi spuštanjem tjelesne temperature razvijaju disfunkciju ventrikula i aritmiju što može dovesti do smrti (Fedorov i sur., 2008).

Istraživanje procesa hibernacije, prilagodbi organizama te potisnuta metabolička potražnja dovode do važnih spoznaja koje imaju primjenu u predoperativnoj medicini, intenzivnoj njezi pacijenata te kriogenezi ljudskih organa i cijeloga tijela (Quinones i sur., 2014).

1.2. Kriogeneza

Kriogeneza je proces koji omogućava dugotrajno očuvanje organa ili tijela na iznimno niskim temperaturama. Potencijalna upotreba ovoga procesa vrlo je važna u medicinskoj primjeni, bioinženjerstvu tkiva, transplantaciji organa te u svrhu postizanja dugovječnosti organizama. Ipak, važno je naglasiti mogućnost fizikalno-kemijskih i biofizikalnih promjena tijekom procesa krioprezervacije koje mogu dovesti do oštećenja stanica, tijekom zamrzavanja ili odmrzavanja (Karlsson i Toner, 1996).

Krioprezervacija organa sisavaca, suočava se s problemom prilagodbe organa na brzu, ali značajnu promjenu temperature te razvoja kristala leda koji dovode do strukturnih promjena u makromolekulama, smanjenju volumena stanica te osmotskog šoka stanice. Hibernirajuće životinje reguliraju navedene procese ekspresijom specifičnih gena te upotrebom krioprotektanata, supstanci koje onemogućavaju stvaranje kristala leda i time sprječavaju oštećivanje stanica uslijed smrzavanja i odmrzavanja. Specifični molekularni mehanizmi koji održavaju metabolički integritet zamrznutog tkiva vode do novih znanja u primjeni tehnologije za krioprezervaciju organa sisavaca (Storey, 1990).

Modeli hibernirajućih životinja omogućavaju uvid u fiziološke mehanizme pojedinih organa i cjelokupnih organizama koji na prirodan način preživljavaju i ponovno se aktiviraju nakon izloženosti vrlo niskim temperaturama. Nove informacije, dobivene istraživanjima modela, o različitim hipometaboličkim strategijama unaprijeđuju krioprezervacijske metode u zdravstvene svrhe (Carey i sur., 2003).

Unutar skupine sisavaca došlo je do razvoja niza prilagodbi bitnih za preživljavanje u uvjetima sniženih vanjskih temperatura. Dva vrlo korisna i međusobno različita modela su američki crni medvjed te arktička podzemna vjeverica. Sam tijekom hibernacije kao i prilagodbe na proces razlikuju se u ova dva modela, a omogućavaju dobivanje korisnih informacija koje predstavljaju korak dalje u unaprijeđivanju tehnologije humane kriogeneze.

2. ARKTIČKA PODZEMNA VJEVERICA

Arktička podzemna vjeverica, *Spermophilus parryii* (Slika 1.) pripada porodici Sciuridae, redu Rodentia i razredu Mammalia. Krzno joj je crvenkasto-smeđe boje s bijelim točkama na leđnoj strani tijela te svijetlo smeđe na šapama. Veličine su od 30 do 45 centimetara te težine od 550 do 850 grama. Žive u kolonijama u kompleksnim sustavima jazbina dubine i do 1 metar u području Aljaske i Kanadskog teritorija. Nastanjuju različite biotope kao što su tundra, šumovita livadna područja, riječne doline te livade alpskih i subalpskih zona. Prema načinu prehrane ubrajaju se u omnivore (www.iucnredlist.org).



Slika 1. Arktička podzemna vjeverica (*Spermophilus parryii*).

(www.animalspot.net)

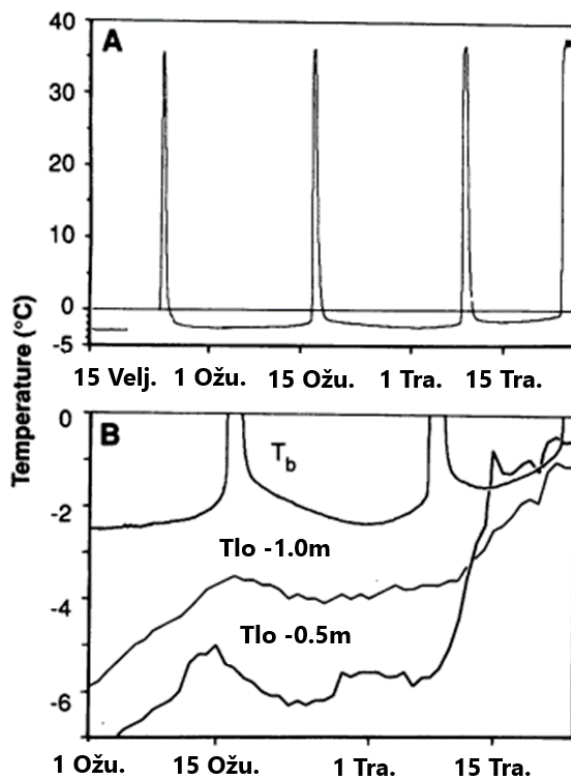
Arktička podzemna vjeverica ubraja se u prave hibernatore. Započinje s procesom hibernacije krajem kolovoza te miruje do travnja. Jedini su hibernatori kojima se temperatura tijela spušta na temperaturu nižu od točke smrzavanja od čak $-2,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Barnes, 1989). Razvila je sposobnost izravnog opstanka na vanjskoj temperaturi i do $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ prilikom čega se zadržava u položaju spuštene glave prema nogama s repom na glavi (www.animalspot.net). Po završetku hibernacije arktičkoj podzemnoj vjeverici

potrebna su 3 sata kako bi se u potpunosti zagrijala i povratila funkcije svih organa i tkiva (www.bbc.com).

2.1. Specifične prilagodbe na hibernaciju

2.1.1. Spontane faze zagrijavanja

Tijekom hibernacije arktička podzemna vjeverica prolazi kroz nekoliko spontanih faza buđenja prilikom čega joj temperatura tijela poraste (Slika 2.). Proces traje 1-2 dana nakon čega se temperatura tijela ponovno spušta na niske temperature. Tijekom hibernacije temperatura tijela ne varira više od 1 °C te je za 3-10 °C viša od temperature tla, sve do posljednjeg buđenja koje se događa neposredno prije konačnog prestanka hibernacije kada su temperatura tla i životinje približno jednake (Barnes, 1989).



Slika 2. Temperatura tijela ženke arktičke podzemne vjeverice zabilježena pomoću temperaturno-senzitivnih radiotransmitera u posljednja četiri buđenja tijekom hibernacije (A) te temperatura tla zabilježena tijekom istog razdoblja (B), T_b predstavlja temperaturu jedinke.

(Barnes, 1989).

Povišenje temperature tijekom svakog buđenja događa se zbog spontanog procesa drhtanja prilikom čega dolazi do proizvodnje topline. Proces drhtanja nastupa zbog aktivacije adenozin A1 receptora u lateralnom ventrikulu mozga (Quinones i sur., 2014). Energija nastaje u mitohondrijima koji su smješteni u smeđem masnom tkivu. Na taj način životinja dobiva i do 90 % energije koju koristi tijekom hibernacije (Popov i sur., 2011). Proces traje od 12 do 15 sati te se pretpostavlja da je važan za normalno funkcioniranje mozga jednom kad završi proces hibernacije. Nakon procesa buđenja ponovno nastupa razdoblje spuštanja temperature tijela (www.scientificamerican.com).

2.1.2. Plastičnost mozga

Mozak arktičkih podzemnih vjeverica vrlo je otporan i plastičan. Tijekom hibernacije smanjuje se broj dendrita na neuronima zbog čega pucaju sinapse, ipak po završetku procesa vjeverice mogu normalno funkcionirati. Razlog tome je što u vrlo kratkom vremenskom periodu dolazi do iznenadnog rasta neurona te umnožavanja neuralnih veza čime se nadoknađuje gubitak nastao tijekom mjeseci provedenih u hibernaciji. Izvor novih neurona su nezrele, mitotske stanice, smještene u dentatnom girusu, podregiji hipokampusa (Popov i sur., 2011). Novonastali neuroni stvaraju bolja umreženja nego ona u vjeverica koje još nisu ušle u proces hibernacije. Znanstvenici sa Sveučilišta u Leipzigu, pod vodstvom Thomasa Arendta, pretpostavljaju da je protein tau važan za oporavak mozga, tj. za niz strukturnih promjena koje se događaju u stanicama mozga (Arendt i Bullmann, 2013), ali i za smanjenje efikasnosti neurona tijekom hibernacije koja se događa zbog hiperfosforilacije proteina tau. Inače, osnovna je funkcija proteina tau stabilizacija i učvršćivanje aksonalnih mikrotubula te signalizacija unutar i između neurona (Guo i sur., 2017) .

2.1.3. Smanjenje potrošnje kisika

Arktička podzemna vjeverica tijekom hibernacije, zbog smanjene stope metabolizma, ima smanjenu potražnju kisika. Broj otkucaja srca se spušta s 200-300 otkucaja u minuti tijekom ljetnih mjeseci na svega 3-4 otkucaja u minuti tijekom mjeseci provedenih u hibernaciji. Također, disanje postaje periodično, praćeno apnejama. Smanjenje krvnoga tlaka za 80-90 % ne uzrokuje prekid moždane aktivnosti upravo zbog 98-99 %-tnog pada moždane metaboličke brzine, a time i potražnje za kisikom (Boyer i Barnes, 1999). Zbog smanjene količine krvi, koja oplakuje mozak, može se javiti cerebralna ishemija

te posljedično smrt. Ova pojava ne javlja se kod arktičkih podzemnih vjeverica zbog reduciranog broja leukocita na svega 10 % od izvorne koncentracije (Yasuma i sur., 1997). Nereducirani broj leukocita mogao bi dovesti do upalne kaskade zbog čega se velika koncentracija leukocita pohranjuje u slezeni i jetri (Boyer i Barnes, 1999). U uvjetima slabog protoka krvi, hibernirajući sisavci mogli bi imati povećan rizik nastanka venskih tromba te formacije fibrina zbog akumulacije koagulacijskih produkata (Mackman i Davis, 2011; Rana i Neeves, 2016). Ipak, hibernatorima se na nižoj temperaturi tijela smanjuju i primarna i sekundarna hemostaza smanjenjem aktivnosti enzima i receptora uključenih u proces zgrušavanja krvi (Van Poucke i sur., 2014). Tijekom spontanih faza buđenja dolazi do značajnog porasta koncentracije kisika zbog čega se očekuje povećana količina radioaktivnih kisikovih radikala koji dovode do oštećenja stanica i staničnih struktura. Međutim, radioaktivni kisikovi radikali nisu pronađeni u svim tkivima arktičke podzemne vjeverice, već samo u smeđem masnom tkivu (Carey i sur., 2000; Ma i sur., 2005).

2.1.4. Proizvodnja topline

Kako bi opstale u ekstremnim uvjetima niske vanjske temperature arktičke podzemne vjeverice prije hibernacije udvostruče svoju tjelesnu masu, nagomilavajući masti. Masno tkivo predstavlja najefikasniji oblik hrane tvari za prezimljavanje životinja jer se radi o hidrofobnim trigliceridima koji se pohranjuju nevezani za vodu te oksidacijom osiguravaju dva puta više energije od ugljikohidrata. U slučaju produljenog perioda gladovanja, nakon što se potroše sve tjelesne masti, procesom glukoneogeneze protein može poslužiti kao izvor ugljika za sintezu ugljikohidrata. Smeđe masno tkivo osigurava metaboličku toplinu te je glavno termogeno tkivo kod hibernirajućih glodavaca. U velikim se količinama nakuplja na području ramena i srca (Boyer i Barnes, 1999). Tijekom ljetnih mjeseci razina inzulina u krvi vrlo je visoka. Inzulin stimulira sintezu i sprječava razgradnju glikogena, triglicerida i proteina te djeluje na aktivnost lipoprotein lipaze u masnim stanicama gdje potiče taloženje lipida u masti (Wilson i sur., 1992).

2.1.5. Proces pothlađenja

Pothlađenje je jedna od najvažnijih prilagodbi arktičke podzemne vjeverice na ekstremne uvjete niske vanjske temperature gdje temperatura njihova tijela dostiže i do $-2,9^{\circ}\text{C}$. Dok većina organa usporava s radom te gotovo i da miruje, sve tjelesne tekućine

opstaju u tekućem obliku upravo zahvaljujući procesu pothlađenja. Radi se o metastabilnom stanju, fizikalnom stanju u kojem sustav ima veću energiju nego u stabilnom stanju, a koje nastupa kad su tekućine ohlađene na temperaturu ispod njihove temperature smrzavanja pri čemu još uvijek ne dolazi do promjene agregatnog stanja. Tjelesne tekućine dovedene su u ovo stanje dovoljno pažljivo da to stanje još nije postalo nestabilno, tj. da se tekućine još nisu zamrznule. Ovaj proces omogućava arktičkim podzemnim vjevericama da se odupru zamrzavanju te da prilagode tijelo na najniže mjerene temperature u sisavaca (Lee i Costanzo, 1998). Ipak, radi se o opasnom stanju u kojem su jedinke vrlo osjetljive na endogene i egzogene nukleacije zamrzavanja, iz čega slijedi da minimalna promjena položaja može dovesti do zaleđivanja tjelesnih tekućina.

2.1.6. Prijenos akcijskog signala

Stanični membranski potencijal važan je za stvaranje i prenošenje impulsa kao i transport tvari preko membrane. Pri sniženim temperaturama smanjuje se potencijal mirovanja zbog čega se smanjuje i depolarizacijski prag što može rezultirati fibrilacijom ventrikula (Wang i sur., 2002). Arktičke podzemne vjeverice, za razliku od svih ostalih organizama, na vrlo niskim temperaturama mogu kontrolirati i održavati membranske potencijale blizu normalnim vrijednostima što im omogućava normalan rad srca. Ovaj im je proces omogućen zbog poboljšane kontrole prijenosa elektrolita, pretežito Ca^{2+} i Na^{+} (Quinones i sur., 2014).

3. AMERIČKI CRNI MEDVJED

Američki crni medvjed, *Ursus americanus* (Slika 3.), poznat i pod imenom crni medvjed pripada porodici Ursidae, redu Carnivora i razredu Mammalia. Boja krzna varira od crne do smeđe te rjeđe, sive i bijele boje, broji 16 podvrsta. Ova je vrsta medvjeda široko rasprostranjena unutar Sjedinjenih Američkih Država gdje nastanjuje različite biotope, od pustinja do kišnih prašuma. Prema načinu prehrane ubraja se u omnivore (www.iucnredlist.org).



Slika 3. Američki crni medvjed (*Ursus americanus*).

(www.iucnredlist.org)

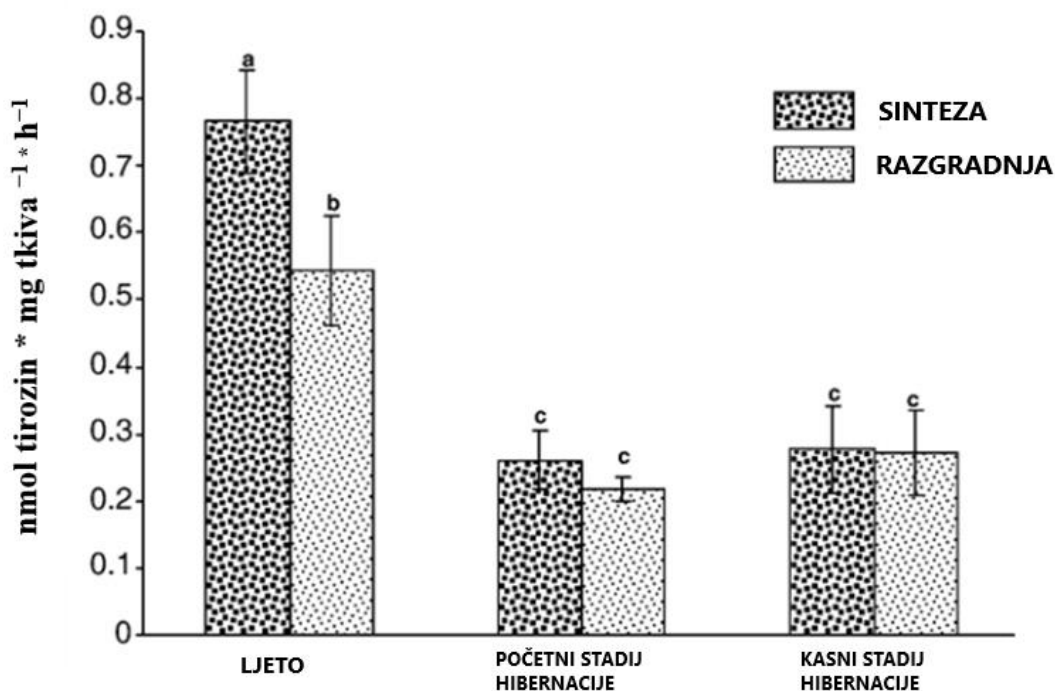
Tijekom zime većina podvrsta hibernira od 4 do 7 mjeseci dok podvrste lokalizirane na samom jugu države zimi gotovo da i ne hiberniraju. Američki crni medvjed tijekom hibernacije snizi stopu metabolizma na 25 % bazalnog metabolizma prilikom čega održava temperaturu tijela između 30 °C i 36 °C tijekom dnevnih ciklusa (Toien, 2011). Američkog crnog medvjeda ne ubrajamo u prave hibernatore zbog nemogućnosti efikasnog snižavanja temperature tijela. Kod većine podvrsta nisu uočeni karakteristični hibernirajući mehanizmi te stoga ove podvrste ne ulaze u proces hibernacije, već letargije (Hill i sur., 2012).

Za vrijeme hibernacije američki crni medvjed se u potpunosti savine, kako bi održao tjelesnu temperaturu, te zadržava jedan položaj nekoliko dana nakon čega mijenja položaj te ukoliko je potrebno preslaguje jazbinu. Dnevne oscilacije temperature, sa snižene na uobičajenu temperaturu, nisu uočene kod promatrane vrste medvjeda. Mogući je razlog taj što početno sniženje temperature kod medvjeda nije značajno kao što je kod arktičke podzemne vjeverice (Toien, 2011).

3.1. Specifične prilagodbe na hibernaciju

3.1.1. Skeletni mišići

Nekorištenjem određene skupine mišića dolazi do degradacije proteina koji izgrađuju mišić što rezultira atrofijom mišića. Ipak, uočeno je da Američki crni medvjed tijekom hibernacije spremno odgovara na fizički napad iznenađujuće visokom mobilnosti. Uz vrlo velike endogene zalihe lipida ova vrsta ima i vrlo specifičan profil skeletnih mišića. Tijekom hibernacije, američki crni medvjed izgubi 4-11 % mišićnih proteina (Tinker i sur., 1998) dok većina ostalih hibernirajućih životinja, primjerice šišmiš, *Eptesicus fuscus*, izgubi i do 40 % mišićnih proteina (Yacoe, 1983). Razgradnjom proteina oslobađaju se aminokiseline te se formira otrovni plin, amonijak. U jetri se amonijak pretvara u ureu odakle prelazi u krv, a iz organizma se izlučuje putem urina. Stvaranje uree ovisi o dnevnom unosu proteina te endogenom metabolizmu proteina (Guyton i Hall, 2012). Američki crni medvjed ne pokazuje povišenu razinu uree ili amonijaka što je vjerojatni rezultat recikliranja postojećih produkata za novu sintezu proteina skeletnih mišića tijekom hibernacijskog perioda (Barboza i sur., 1997). Za proces hibernacije karakteristično je smanjenje sinteze proteina te povećanje katabolizma proteina što u konačnici rezultira očekivanim gubitkom mišićnog tkiva. Ipak, navedene promjene nisu uočene kod američkog crnog medvjeda (Waterlow, 1984). Uočena je ravnoteža sinteze i razgradnje proteina te stalna razina proteina mišića, vidljivo na Slici 4.



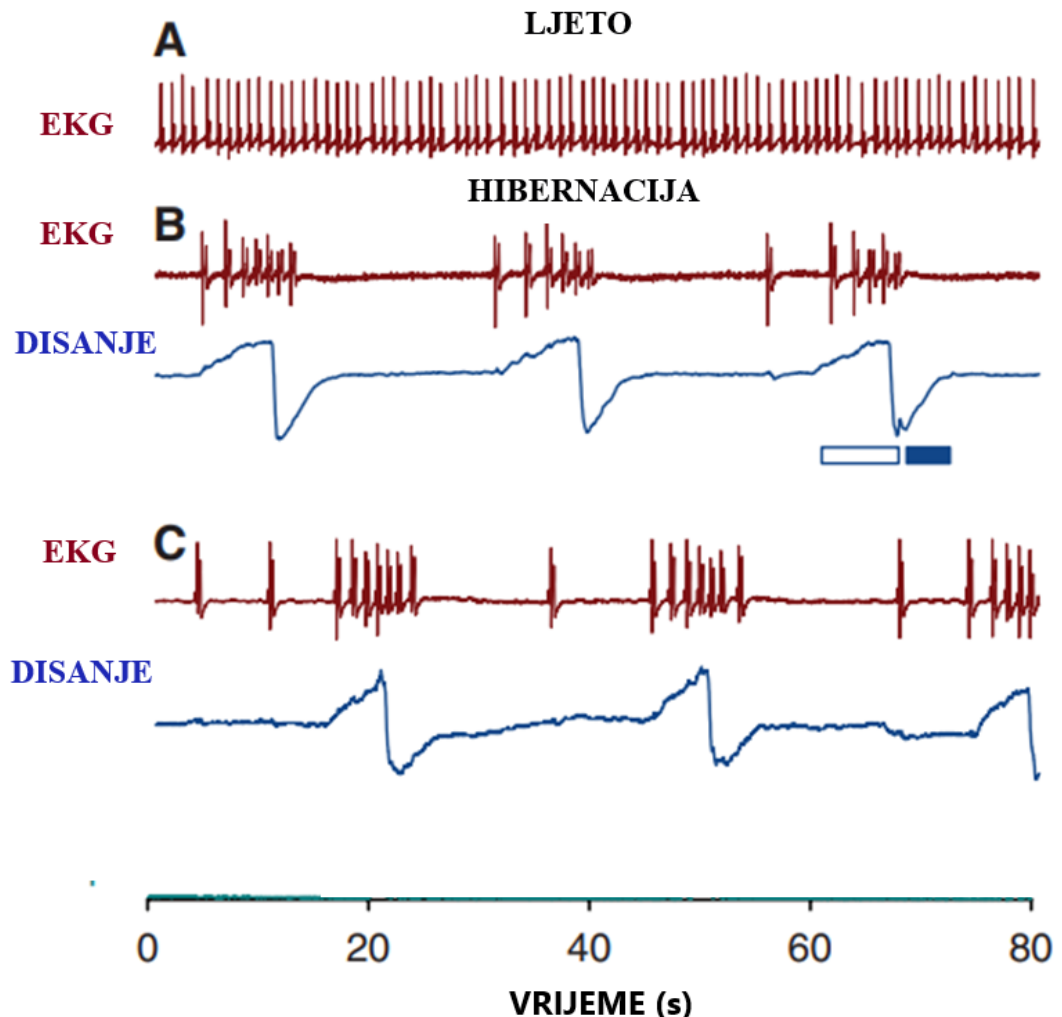
Slika 4. Omjer sinteze (tamno obojan stupac) i razgradnje (svjetlo obojan stupac) proteina mjereno po stopi ugradnje i otpuštanja tirozina ($\text{nmol tirozin} \cdot \text{mg tkiva}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) mišića *vastus lateralis* kod američkih crnih medvjeda aktivnih tijekom ljeta (lijevi stupci), medvjeda u početnom stadiju hibernacije (srednji stupac) te medvjeda u kasnom stadiju hibernacije (desni stupac). (Lohuis, 2007).

Tijekom ljetnih mjeseci američki crni medvjed akumulira proteine u svome tijelu. Zatim slijedi tranzitna faza koja ovisi o dostupnosti hrane te okolišnim uvjetima koja postepeno prelazi u rani stadij hibernacije (Nelson i sur., 1984). U ranoj fazi hibernacije dolazi do smanjenja koncentracije proteina mišića, ali s vremenom se sinteza i razgradnja proteina uravnoteže te nema značajnih promjena zimi u odnosu na aktivne ljetne mjesec (Slika 2.). Dakle, zadržavanje proteina i mišićnog integriteta omogućuje očuvanje skeletnih mišića te predstavlja vrlo važnu prilagodbu američkog crnog medvjeda na proces hibernacije.

3.1.2. Srčani mišić

Smanjen metabolizam reducira potrebu za transportom kisika i nutrijentata zbog čega se mijenjaju brojne fiziološke komponente praćene biokemijskim promjenama na staničnoj i molekularnoj razini (Storey i Storey, 2004). Smanjuje se broj otkucaja srca i

inspiracija, usporava probava i funkcija bubrega i slično. Kod američkog crnog medvjeda uočeno je da se tijekom hibernacije broj otkucaja srca smanjuje s uobičajenih 55 na 9 otkucaja u minuti uz pojavu duboke sinusne aritmije (Slika 5.). Podaci su prikupljeni pomoću radio odašiljača za elektromiogram te elektrokardiogram operativno ugrađenih pod kožu životinja (Toien i sur., 2011).



Slika 5. Prikaz EKG-a *Ursus americanus* tijekom ljeta (gore, A) te EKG-a zimi, tijekom hibernacije (dolje, B, C) zabilježenih kod dva različita medvjeda. Plava linija predstavlja udisaj te izdisaj tijekom disanja.

(Toien i sur., 2011)

Zbog sniženja tjelesne temperature kod američkog crnog medvjeda javljaju se ekstremne varijacije u srčanome ritmu koje se očituju kao snažna aritmija ili asistola (Buresh i sur., 2010). Ubrzani otkucaji srca pojavljuju se po završetku inspiracije. Broj otkucaja srca hibernirajućih medvjeda smanjuje se na 26,2 % dok se tijekom izlaska iz

hibernacije povećana na 43,0 % u odnosu na ljeto (Toien i sur., 2011). Uočeno je da prilagodbu srčanoga ritma na sniženu temperaturu imaju samo mali hibernatori, malenog omjera mase i površine tijela te maloga volumena srca. Nehibernirajući organizmi nemaju prilagodbu srčanoga ritma na sniženu temperaturu koja je povoljna jer dovodi do smanjenja stope metabolizma (Bigelow i sur., 1954; Bigelow, 1984). Pretpostavka je da se radi o dvama nepovezanim procesima gdje prvo dolazi do smanjenja broja otkucaja srca te stope metabolizma, a potom do smanjenja temperature tijela (Elvert i Heldmaier, 2005).

4. HUMANA KRIOGENEZA

Kriogeneza je proces koji se detaljno istražuje i kontinuirano donosi nova otkrića. Do današnjega dana, jednostavne strukture kao što su stanice, tkiva i organi već su zamrznuti, pohranjeni te odmrznuti i korišteni. Već se desetljećima vrši krioprezervacija matičnih stanica, spermija i embrija. Razvoj metoda krioprezervacije omogućio je osnivanje banaka srčanih zalistaka, rožnica i arterija. Već je ostvaren i značajan napredak u krioprezervaciji srca štakora, jetre i maternice svinje, jajnika ovce, udova glodavaca te krioprezervacija i uspješna transplantacija bubrega zeca (Alvarez, 2015.) Povezivanjem znanja te procesa koji se zbivaju u jednostavnim strukturama u budućnosti možemo očekivati i kriogenezu živoga čovjeka.

4.1. Postupak

Ljudsko tijelo prije početka postupka kriogeneze mora biti legalno mrtvo. Legalno mrtvo tijelo daljnja briga ili reanimacija ne vraćaju u život. Obično se radi o pacijentu kojem je utvrđen prestanak disanja ili pojavnost pulsa. Krvna cirkulacija i disanje se mogu umjetno obnoviti te se stanice mozga i tijela mogu održavati funkcionalnima tijekom početnog postupka krioprezervacije tijekom kojeg se tijelo stavlja u ledenu kupku. Računalnim postupkom mijenja se dio tjelesnih tekućina s krioprotektantom te pohranjuje na temperaturi od -125 °C koju održavaju ventilatori koji cirkuliraju plin dušika. Cilj je ohladiti cijelo tijelo na temperaturu nižu od -124 °C pri tome pazeći da ne bi došlo do formiranja kristalića leda. Po završetku procesa tijelo se nalazi u stabilnom stanju bez leda. Tijelo se dalje hladi na temperaturu od -196 °C na tekućem dušiku tijekom približno dva tjedna. Tekući dušik se pohranjuje u specijaliziranim vakuumskim spremnicima koji se nadopunjuju svakih nekoliko tjedana te su opremljeni

senzorima i alarmima. Tijelo ostaje pohranjeno u takvim spremnicima do konačnog dana odmrzavanja (www.alcor.org).

4.2. Budućnost

Nekolicina bolesti danas se ne može izlječiti, ali u budućnosti postoji nada za pronalaskom rješenja i izlječenja tih bolesti. Ipak, tijelo umrle osobe treba moći očuvati i omogućiti mu ponovni povratak u život sve dok se ne pronađe odgovarajući lijek. Ljudsko tijelo pohranjeno na niskim temperaturama može opstati stoljećima, ali samo ako je na pravilan način pohranjeno. Iz takvog stadija stanične i biokemijske strukture i funkcije mogu se ponovno pokrenuti. Danas je na ovaj način pohranjeno oko 100 ljudskih tijela, no niti jedno još nije vraćeno u život. Prilikom ponovne aktivacije životnih funkcija postoji velika mogućnost pojave oštećenja staničnih struktura, no pobornici ove metode smatraju da će se u budućnosti razviti nove molekularne, nanotehnologijske metode koje će riješiti takva oštećenja (www.alcor.org). Negativne posljedice hipotermije su povećani rizik od koagulopatije (Rajagopalan i sur., 2008), fatalne tromboze (Fanashawe i sur., 2001), povišen upalni odgovor, povećan rizik od infekcije i disfunkcija krajnjeg organa (Kourliouros i sur., 2010). Hibernatori su razvojem niza prilagodbi prevladali navedene rizike, ali za upotrebu inducirane hipotermije u rutinske kliničke svrhe moraju se nastaviti istraživanja na ovu temu. Danas se medicinski problemi nastali kod osoba s akutnim bolestima rješavaju postupcima povišenja krvnoga tlaka te pojačane dostave kisika na kritično mjesto u tijelu kako bi se vratila homeostaza tjelesnih procesa dok bi se u budućnosti takvi problemi mogli rješavati poticanjem hipometaboličkog stanja (Quinones i sur., 2014). Do današnjega dana terapijske strategije za smanjenje metaboličke potražnje korištene su u tri slučaja: hlađenje cijeloga tijela nakon srčanoga udara, hipotermija tijekom operacija srca i hlađenje organa za presađivanje (Quinones i sur., 2014). Tijekom pojave srčane aritmije tijelo se hladi ispod 24 °C (Fedorov i sur., 2005), tijekom složenih kirurških zahvata aorte koje zahtjevaju periode cirkulacijskog zaustavljanja tijelo se hladi na temperaturu između 14 i 20 °C (Ziganshin i Elefteriades, 2013) dok se očuvanje organa za odgođenu transplantaciju vrši na 4 °C (Quinones i sur., 2014). Jetra, gušterača i bubreg, uz ispiranje organa s otopinom za očuvanje organa, uspješno se mogu očuvati i do dva dana na navedenoj temperaturi (Southard, 1995).

4.3. Važnost upotrebe znanja hibernirajućih sisavaca

Sva znanja o prilagodabama hibernirajućih sisavaca mogu se upotrijebiti za unaprijeđenje zdravstveno-medicinskih usluga te otkrivanje i liječenje bolesti ljudi. Prilagodba hibernirajućih sisavaca da prežive vrlo niske temperature daje uvid u funkciju i fiziologiju stanica koje omogućavaju bolje očuvanje i prijenos ljudskih tkiva. Veći broj istraživanja hibernirajućih sisavaca omogućio bi bolje razumijevanje procesa koji se odvijaju pri sniženim temperaturama te omogućio bolju efikasnost transplantacijskih metoda jer bi se vrijeme čuvanja organa na hladnoći moglo produžiti. Razdoblje trajanja hladne ishemije, vremena koji organ provodi ohlađen, je jedini proces peritransplantacijskog razdoblja na kojeg se može utjecati i poboljšati ga (Debout i sur., 2015).

Činjenica da kod hibernirajućih sisavaca ne dolazi do pogoršanja mišića nakon dugog razdoblja nekretanja potencijalno može pomoći u sprječavanju atrofije mišića koja je česta u ležećih pacijenata u bolnicama te u liječenju poremećaja mišića (www.science.org).

Novostečena znanja o važnosti proteina tau mogu se upotrijebiti u praćenjima tijeka i posljedica neurodegenerativnih poremećaja kao što je Alzheimerova bolest, tijekom koje je protein tau abnormalno hiperfosforiliran i agregiran u snopove. Ipak, još uvijek nije poznato je li protein tau uzrok ili posljedica navedene bolesti (Guo, 2017.).

5. Zaključak

Hibernacija je proces koji sjedinjuje bihevioralne, fiziološke i molekularne prilagodbe organizama koji prkose energetske potrebama te fiziološkim procesima u ekstremnim zimskim uvjetima. Očituje se sniženjem tjelesne temperature gdje hipotermija uzrokuje smanjenje moždane potražnje za energijom što dovodi do smanjene stope metabolizma. Razumijevanje navedenih procesa može dovesti do razvoja preventivnih i terapijskih pristupa liječenju neurodegenerativnih bolesti, mišićnih atrofija, kardiovaskularnih bolesti itd. Za takav razvoj zdravstveno-medicinskih usluga potrebno je provesti još brojna istraživanja na hibernirajućim sisavcima. Unutar skupine sisavaca došlo je do razvoja niza prilagodljivih fenotipova. Mnoge od tih prilagodbi pojedinačno su potencijalne za liječenje specifičnih bolesti. Dva vrlo korisna i međusobno različita modela su američki crni medvjed te arktička podzemna vjeverica. Sam tijekom hibernacije kao i prilagodbe na proces razlikuju se u ova dva modela. Arktička podzemna vjeverica

ubraja se u prave hibernatore te se u potpunosti prilagodila procesu hibernacije spuštajući svoju temperaturu tijela na do tad neviđeno niske temperature. Iako, tijekom hibernacije izgledaju kao potpuno neaktivne, njihovi fiziološki procesi izuzetno su dinamični. Američki crni medvjed ne ubraja se u prave hibernatore jer nema mogućnost drastičnog spuštanja temperature i metabolizma. Važna značajka ova dva modela je opstanak u uvjetima snižene koncentracije kisika. U uvjetima hipoksije funkcija mozga je smanjena te može biti nepovratno oštećena, no navedeni modeli pokazuju izuzetnu specijalizaciju fiziologije mozga. Malo je vjerojatno da je proces hibernacije potaknut jednom aktivacijskom molekulom no poznato je da neki fiziološki procesi hibernatora mogu biti potaknuti i u nehibernirajućim organizmima. Potpuno razumijevanje hibernatora poboljšalo bi sigurnost i zaštitu organa te cijelih organizama u hipotermalnim uvjetima. Činjenica je da trošenjem manje energije možemo biti u mogućnosti postići više. Također, znanja o hibernirajućim sisavcima mogla bi omogućiti čovječanstvu produljenje životnoga vijeka.

6. LITERATURA

- Alvarez, L.M. (2015.) Compendium of organ & tissue banking concepts, Department of Defense live
- Arendt, T., Bullmann, T. (2013.) Neuronal plasticity in hibernation and the proposed role of the microtubule-associated protein tau as a “master switch” regulating synaptic gain in neuronal networks, *Integrative and Comparative Biology*, 305: R478–R489
- Arendt, T., Stieler, J., Strijkstra, A.M., Hut, R.A., Rudiger, J., Van der Zee, E.A., Harkany, T., Holzer, M., Hartig, W. (2003.) Reversible paired helical filament-like phosphorylation of tau is an adaptive process associated with neuronal plasticity in hibernating animals. *Journal of Neuroscience*, 6972–6981
- Barboza, P.S., Farley, S.D., Robbins, C.T. (1997.) Whole-body urea cycling and protein turnover during hyperphagia and dormancy in growing bears (*U. americanus* and *U. arctos*). *Canadian Journal of Zoology*, 75, 2129–2136
- Barnes, B.M. (1989.) Freeze avoidance in a mammal: body temperatures below 0 degree C in an Arctic hibernator, *Science*, 30;244(4912):1593-5
- Bigelow, W.G. (1984.) The pacemaker story: a cold heart spinoff, *Canadian Medical Association Journal*, 131:943–55.

- Bigelow, W.G., Mustard, W.T., Evans, J.G. (1954.) Some physiologic concepts of hypothermia and their applications to cardiac surgery, *The Journal of Thoracic Surgery*, 28:463–80.
- Boyer, B.B. i Barnes, B.M. (1999.) Molecular and Metabolic Aspects of Mammalian Hibernation: Expression of the hibernation phenotype results from the coordinated regulation of multiple physiological and molecular events during preparation for and entry into torpor, *BioScience*, 49(9): 713–724
- Buresh, C.T., Folk, G.E., Dickson, E.W., Thrift, D.L. (2010.) Comparing hypothermia in the human and the black bear (*Ursus americanus*), *Biological Rhythm Research*, 41:247–57
- Carey, H.V., Andrews, M.T., Martin, S.L. (2003.) Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature, *Physiological reviews.*, 83(4):1153-81
- Carey, H.V., Frank, C.L., Seifert, J.P. (2000.) Hibernation induces oxidative stress and activation of NK-kappaB in ground squirrel intestine, *Journal of Comparative Physiology*, 170:551–559
- Debout, A., Foucher, Y., Trébern-Launay, K., Legendre, C., Kreis, H., Mourad, G. (2014.) Each additional hour of cold ischemia time significantly increases the risk of graft failure and mortality following renal transplantation. *Kidney International*, 87(10):343–9
- Elvert, R., Heldmaier, G. (2005.) Cardiorespiratory and metabolic reactions during entrance into torpor in dormice *Glis glis*, *Journal of Experimental Biology*, 208:1373–83
- Fanashawe, M.P., Shore-Lesserson, L., Reich, D.L. (2001.) Two cases of fatal thrombosis after aminocaproic acid therapy and deep hypothermic circulatory arrest, *Anesthesiology*, 95:1525–7
- Fedorov, V.V., Glukhov, A.V., Sudharshan, S., Egorov, Y., Rosenshtraukh, L.V., Efimov, I.R. (2008.) Electrophysiological mechanisms of antiarrhythmic protection during hypothermia in winter hibernating versus nonhibernating mammals, *Heart Rhythm* 5:1587–1596
- Fleck, C.C., Carey, H.V. (2005.) Modulation of apoptotic pathways in intestinal mucosa during hibernation. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 289:R586–R595

- Guo, T., Noble, W. & Hanger, D.P. (2017.) Roles of tau protein in health and disease, *Acta Neuropathologica*, 133(5): 665–704
- Guyton, A.C., Hall, J.E. (2012.) *Medicinska fiziologija*, 12. izdanje. Medicinska naklada
- Hill, R.W., Wyse, G.A., Anderson, M. (2012.) *Animal Physiology*. 3. izdanje. Sunderland Sinauer Associates, Inc. Publishers
- Karlsson, J.O.M., Toner, M. (1996.) Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues, *Biomaterials*, 17(3):243-56
- Kourliouros, A., Valencia, O., Phillips, S.D., Collinson, P.O., van Besouw, J.P., Jahangiri, M. (2010.) Low cardiopulmonary bypass perfusion temperatures are associated with acute kidney injury following coronary artery bypass surgery, *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 37:704–9
- Lee, R.E. Jr, Costanzo, J.P. (1998.) Biological ice nucleation and ice distribution in cold-hardy ectothermic animals, *Annual Review of Physiology*, 60:55-72
- Lohuis, T.D., Harlowa, H.J., Beck, T.D.I. (2007.) Hibernating black bears (*Ursus americanus*) experience skeletal muscle protein balance during winter anorexia, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 147, 20–28
- Ma, Y.L., Zhu, X., Rivera, P.M., Toien, O., Barnes, B.M., LaManna, J.C., Smith, M.A., Drew, K.L. (2005.) Absence of cellular stress in brain after hypoxia induced by arousal from hibernation in Arctic ground squirrels., *American Journal of Physiology*, 289:R1297–1306.
- Mackman, N., Davis, G.E. (2011.) Blood coagulation and blood vessel development: is tissue factor the missing link?, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31:2364–2366
- Nelson, R.A., Steiger, D.L., Beck, T.D.I., (1984.) Neuroendocrine and metabolic interactions in the hibernating black bear, *Acta Zoologica Fennica*, 174, 137–141
- Popov, V.I., Kraev, I.V., Ignat'ev, D.A., Stewart, M.G. (2011.) Suspension of Mitotic Activity in Dentate Gyrus of the Hibernating Ground Squirrel, *Neural Plasticity*, 1-7
- Quinones, Q.J., Ma, Q., Zhang, Z., Barnes, B.M., Podgoreanu, M.V. (2014.) Organ Protective Mechanisms Common to Extremes of Physiology: A Window through Hibernation Biology, *Integrative and Comparative Biology*, volume 54, number 3, pp. 497–515

- Rajagopalan, S., Mascha, E., Na, J., Sessler, D.I. (2008.) The effects of mild perioperative hypothermia on blood loss and transfusion requirement, *Anesthesiology*, 108:71–7
- Rana, K., Neeves, K.B. (2016.) Blood flow and mass transfer regulation of coagulation, *Blood Reviews*, 30:357–368
- Sandovici, M., Henning, R.H., Hut, R.A., Strijkstra, A.M., Epema, A.H.van GH, Deelman, LE. (2004.) Differential regulation of glomerular and interstitial endothelial nitric oxide synthase expression in the kidney of hibernating ground squirrel, *Nitric Oxide* 11:194–200
- Sherwood, L., Klandorf, H., Yancey, P.H.(2013.) *Animal Physiology: From Genes to Organisms*. 2.izdanje. SAD : Brooks/Cole, Cengage learning
- Southard, J.H., Belzer, F.O. (1995.) Organ preservation, *Annual Review of Medicine*, 46:235-47
- Storey, K.B., Storey, J.M. (2004.) Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls, *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 79:207–33.
- Storey, K.B. (1990.) Biochemistry of natural freeze tolerance in animals: molecular adaptations and applications to cryopreservation, *Biochem Cell Biology*, 68(4):687-98
- Talaei, F., Hylkema, M.N., Bouma, H.R., Boerema, A.S., Strijkstra, A.M., Henning, R.H., Schmidt, M. (2011.) Reversible remodelling of lung tissue during hibernation in the Syrian hamster, *Journal of Experimental Biology*, 214:1276–1282
- Tinker, D.B., Harlow, H.J., Beck, T.D.I. (1998.) Protein use and muscle fiber changes in free ranging, hibernating black bears, *Physiological Zoology*, 71, 414–424.
- Toien, O., Blake, J., Edgar, D.M., Grahn, D.A., Heller, H.C., Barnes, B.M. (2011.) Hibernation in black bears: independence of metabolic suppression from body temperature, *Science*, 18;331(6019):906-9.
- Van Poucke, S., Stevens, K., Marcus, A.E., Lance, M. (2014.) Hypothermia: effects on platelet function and hemostasis, *Thrombosis Journal*, 12:31
- Wang, S.Q., Lakatta, E.G., Cheng, H., Zhou, Z.Q. (2002.) Adaptive mechanisms of intracellular calcium homeostasis in mammalian hibernators, *Journal Experimental Biology*, 205:2957–62.

- Waterlow, J.C. (1984.) Protein turnover with special reference to man, *Quarterly journal of experimental physiology and cognate medical sciences*, 69, 409–438.
- Yacoe, M.E., (1983.) Protein metabolism in the pectoralis muscle and liver of hibernating bats, *Eptesicus fuscus*, *Journal of comparative physiology*, 152, 137–144
- Yasuma, Y., McCarron, R.M., Spatz, M. i Hallenbeck, J.M. (1997.) Effects of plasma from hibernating ground squirrels on monocyte-endothelial cell adhesive interactions, *American Journal of Physiology*, R1861–R1869
- Zancanaro, C., Malatesta, M., Mannello, F., Vogel, P., Fakan, S. (1999.) The kidney during hibernation and arousal from hibernation. A natural model of organ preservation during cold ischemia and reperfusion., *Neprol Dial Transplant* 14:1982–1990
- Ziganshin, B.A., Elefteriades, J.A. (2013.) Deep hypothermic circulatory arrest, *Annals Cardiothorac Surg*, 2:303–15
- <http://www.animalspot.net/arctic-ground-squirrel.html> (21.8.2018.)
- <http://www.bbc.com/earth/story/20150218-arctic-ground-squirrels-supercool-slumber> (23.8.2018.)
- <https://alcor.org/> (24.8.2018.)
- <http://www.iucnredlist.org/details/summary/41687/0> (27.7.2018.)
- <http://www.iucnredlist.org/details/20488/0> (20.8.2018.)
- <https://www.science.org.au/curious/hibernation> (24.8.2018.)
- <https://www.scientificamerican.com/article/arctic-ground-squirrel-brain/> (23.8.2018.)

7. SAŽETAK

Hibernacija je proces od životne važnosti za organizme koji tijekom ekstremnih zimskih temperatura nemaju mogućnost migracije. Karakteristike svih hibernirajućih organizama su smanjen metabolizam, sniženje tjelesne temperature, povećana upotreba masnoća te još niz prilagodbi koje se razlikuju od jedinke do jedinke. Hibernacija sisavaca jedan je od najkompleksnijih oblika prirodnog hipometabolizma jer organizmi ne samo da su u stadiju mirovanja već periodično inhibiraju vlastitu termogenezu što omogućava drastični pad tjelesne temperature. Takvi procesi primjenjeni na čovjeka koriste se u svrhu ispitivanja kriogeneze koja u budućnosti obećava mnogo, od biotehnoške primjene do medicinskih ideja o dugovječnosti organizma. Proces

kriogeneze omogućio bi jedinki ulazak u stanje mirovanja gdje su fiziološke i biokemijske aktivnosti potisnute, a potrošnja energije minimalna te po želji, ponovni povratak u normalni život. Ipak, do ostvarenja takvih želja potrebno je proučiti još velik broj hibernirajućih modela i povezati njihove prilagodbe s mogućim primjenama na čovjeka. Dva vrlo različita modela korisna za pručavanje prilagodbi na hibernaciju su arktička podzemna vjeverica i američki crni medvjed. Iako svaki organizam ima razvijene vlastite prilagodbe, zajednička karakteristika oba modela je opstanak u uvjetima snižene koncentracije kisika. Navedena prilagodba je moguća jer oba modela smanjuju broj otkucaja srca što dovodi do smanjene stope metabolizma i potrebe za kisikom. Arktička podzemna vjeverica ima prilagodbu srčanoga ritma na smanjeni broj otkucaja srca, no američki crni medvjed nema zbog čega mu se javljaju snažne varijacije u srčanome ritmu.

Navedene prilagodbe te niz regulatornih molekula koje sudjeluju u procesima hibernacije, uz dodatni angažman i istraživanja, mogu se primjeniti na procese humane kriogeneze i medicinska unaprijeđenja.

8. SUMMARY

Hibernation is a process of vital importance to organisms that during extreme winter temperatures do not have the ability to migrate. Characteristics of all hibernating organisms are reduced metabolism, lowering body temperature, increased fat usage and a lot of adjustments that differ between individuals. Mammalian hibernation is one of the most complex forms of natural hypometabolism because organisms are not only in period of torpor but also periodically they inhibit their own thermogenesis, which allows drastic drop in body temperature.

Those processes are used for the purpose of human cryogenics researches, which promises a lot in the future especially from biotechnological applications to medical ideas regarding extending the human lifespan.

Cryogeneses would allow entry into a torpor where physiological and biochemical activities are suppressed, energy consumption is minimal and as desired, and returning to normal life in the desired moment. However, to achieve such a desire, it is necessary to study large number of hibernation models and to associate their adaptations with possible applications to humans. Two very different models useful for the research regarding the adjustments to hibernation are the Arctic ground squirrel and the American

black bear. Although each organism has developed its own adaptations, the common feature of both models is survival in conditions of reduced oxygen concentration. This adaptation is possible because both models lower heart beating rate, which results in reduced metabolism and decreased oxygen demand. The Arctic ground squirrel has adjusted heart rhythm to the lowered heart beating rate, but American black bear did not develop this adaptation so that is the reason why he experiences strong variations in heart rhythm.

The aforementioned adaptations and a set of regulatory molecules participating in hibernation processes, with additional engagement and research, can be applied to human cryogenic processes and the advancement of medical services.