

## Возрастные особенности роли оксида азота в механизмах адаптации животных к ритмическим холодовым воздействиям.

Сообщение I. Содержание конечных продуктов обмена NO в сыворотке крови и миокарде молодых и старых животных после ритмических холодовых воздействий

UDC 612.015.3:615.014.41:57.084

V.G. BABIICHUK

## Age Peculiarities of Nitrogen Oxide Role in Adaptation Mechanisms of Animals to Rhythmic Cold Effects. Report 1. Content of Final Products of NO Exchange in Blood and Myocardium of Young and Aged Animals after Rhythmic Cold Effects

Исследовали влияние ритмических холодовых воздействий ( $-120^{\circ}\text{C}$ ) на содержание конечных продуктов обмена оксида азота (NO) в сыворотке крови и миокарде молодых и старых крыс. Предполагается, что активность NO играет роль патогенетического регуляторного фактора, активность которого снижена у старых крыс. Отмечается повышение содержания конечных продуктов обмена NO в сыворотке крови после 6 сеансов экстремальных криовоздействий у молодых и 6-9 сеансов у старых животных. Снижение содержания нитритов в миокарде крыс может свидетельствовать об интенсивном расходе NO миокардиальными клетками. Подобный эффект у старых крыс в динамике эксперимента “запаздывает”, что связано со снижением адаптационных возможностей стареющего организма.

**Ключевые слова:** ритмические холодовые воздействия, оксид азота, нитриты, сыворотка крови, миокард, NO-синтаза.

Досліджували дію ритмічних холодових впливів ( $-120^{\circ}\text{C}$ ) на вміст кінцевих продуктів обміну оксиду азоту (NO) в сироватці крові та міокарді молодих і старих щурів. Припускається, що активність NO відіграє роль патогенетичного регуляторного фактора, активність якого знижена у старих щурів. Відзначається підвищення вмісту кінцевих продуктів NO у сироватці крові після 6 сеансів екстремальних криовпливів у молодих і 6-9 сеансів у старих тварин. Зниження вмісту нітритів у міокарді щурів може свідчити про інтенсивну витрату NO міокардіальними клітинами. Подібний ефект у старих щурів у динаміці експерименту “запізнюється”, що пов’язано зі зниженням адаптаційних можливостей старіючого організму.

**Ключові слова:** ритмічні холодові впливи, оксид азоту, нітрити, сироватка крові, міокард, NO-синтаза.

Influence of rhythmical cold effects ( $-120^{\circ}\text{C}$ ) on content of final products of nitrogen oxide (NO) exchange in blood serum and myocardium of young and aged rats has been studied. NO activity is supposed to play a role of pathogenic regulatory factor, whose activity is reduced in aged rats. The rise in the content of NO exchange final products in blood serum after 6 sessions of extreme cryoeffects in young rats and after 6-9 sessions in aged ones has been noted. The reduction of the content of nitrites in myocardium of rats can indicate an NO intensive expenditure by myocardial cells. The similar effect for aged rats in the dynamics of experiment is “delayed”, that is related to a decline in adaptive possibilities of ageing organism.

**Key-words:** rhythmical cold effects, nitrogen oxide, nitrites, blood serum, myocardium, NO-synthase.

Как свидетельствуют древние рецепты, холод был одним из наиболее распространенных терапевтических приемов в медицине.

Достижения в области криобиологии и криогеники, познание механизмов действия различных способов и режимов гипотермических и более низких температур на гомеостаз организма животных и человека предопределили перспективу и интерес практической медицины к активному поиску новых возможностей лечения холодом [2].

Использование в практическом здравоохранении методов экстремальной криотерапии не бази-

Ancient recipes testify to the fact that cold was one of the most spread therapeutic means in medicine.

Achievements in cryobiology and cryogenics, understanding the effect mechanisms of different ways and regimens of hypothermal and lower temperatures on homeostasis of animal's and human organisms preconditioned the perspective and interest of practical medicine to an active search of new possibilities of treating with cold [2].

Use of the methods of extreme cryotherapy in practical health care was not based on profound fundamental researches, and this did not allow to substantiate the

ровалось на глубоких фундаментальных исследованиях, что не позволило обосновать способы направления научно-методических исследований, отработать показания и противопоказания к ее применению. Следует признать, что тонкие механизмы действия экстремально низких температур на субклеточном, клеточном, тканевом, органном и организменном уровнях системно начали изучать совсем недавно [1, 2].

Было обнаружено, что при ритмических холодных воздействиях (РХВ) улучшается регуляция отдельных, наиболее ослабленных физиологических систем организма [6]. При охлаждении свойства гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) изменяются настолько, что повышается его проницаемость для биологически активных веществ. Это может стабилизировать многие функциональные системы, активировать запуск компенсаторных реакций, направленных на поддержание гомеостаза в организме.

Функциональное состояние центральной нервной и сердечно-сосудистой систем исследовали на различных этапах РХВ. Показано, что наблюдаемые изменения соответствуют быстрой мобилизации адаптационных систем, функции которых направлены на оптимизацию уровня гомеостатического регулирования вегетативных функций. Эти изменения характеризуются биологической целесообразностью, особенно у старых животных [1]. В этом случае отмечается стабилизация деятельности вегетативной нервной системы, предопределяющей физиологические отношения тормозных и возбуждающих медиаторов, что благоприятно сказывается на соотношении функции перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы, играющих ведущую роль в процессах старения.

Учитывая, что при охлаждении изменяется проницаемость ГЭБ для различных биологически активных веществ, в том числе для пара- и симпатомиметиков, влияющих на состояние ряда органов, можно предположить наличие в организме факторов, относящихся к категории ретроградных мессенджеров, регулирующих функциональную пластичность терморегуляторных функций ЦНС [10]. Таким физиологическим посредником может быть оксид азота (NO), относящийся к биологическим медиаторам. По данным [10] NO как вторичный мессенджер уникален по своей природе в механизмах памяти, вазодилатации, нейротрансмиссии, деятельности иммунной системы, агрегации тромбоцитов, регуляции тонуса гладких мышц.

Установлено, что NO синтезируется при окислении аминокислоты L-аргинина при непосредственном участии фермента NO-синтазы. При

ways to orientate R&D studies, master the indication and contra-indications to its application. It should be accepted that the studying of fine mechanisms of low temperature effect as a system at subcellular, cellular, tissue and organ levels have been started just recently [1, 2].

It has been found that under rhythmic cold effects (RCE) the regulation of some the most weakened physiological systems of an organism improved [6]. During cooling the properties of blood brain barrier (BBB) change in such an extent that its permeability increases for biologically active substances. This may stabilize many functional systems, activate the triggering of compensatory reactions, directed to supporting homeostasis in an organism.

Functional state of central nervous and cardiovascular systems was investigated at various stages of RCE. It has been shown that observed changes correspond to a rapid mobilization of adaptation systems, whose functions are directed to optimizing the level of homeostatic regulation of vegetative functions. These alterations are characterized with biological expediency, especially in aged animals [1]. In this case the stabilization of activity of vegetative nervous system, determining physiological relationship between inhibiting and exciting mediators is noted. This favourably affects the ratio of the function of lipid peroxidation and anti-oxidative system playing a leading role in ageing processes.

Taking into account that during cooling the BBB permeability for different biologically active substances varies, including para- and sympathomimetics, affecting the state of some organs, it is possible to suppose the presence in an organism of the factors referred to the category of retrograde messengers regulating functional plasticity of CNS thermoregulatory functions [10]. Such a physiological mediator may be nitrogen oxide (NO), referred to biological ones. According to the data [10] NO as a secondary messenger is unique on its origin in the mechanisms of memory, vasodilatation, neurotransmission, activity of immune system, aggregation of platelets, regulation of smooth muscles tonus.

It has been shown that NO is synthesized during oxidation of L-arginine amino acid with a direct participation of NO-synthase enzyme. At intracellular rise in  $Ca^{2+}$  ions to NO-synthase molecule calmodulin is joined that resulted in the activation of enzyme and NO synthesis. This process depends on functional state of a cell [11].

Nitrogen oxide is synthesized with different cell types [19, 22], that enabled to find-out three main isoforms of NO-synthases [15]: NOS-1 – neuronal (nNOS) or brain (bNOS); NOS-2 – inducible (iNOS) or macrophage (mNOS); NOS-3 – endothelial (eNOS), being the products of different genes. Due to the

внутриклеточном повышении ионов  $\text{Ca}^{2+}$  к молекуле NO-синтазы присоединяется кальмодулин, в результате чего фермент активируется и происходит синтез NO. Этот процесс зависит от функционального состояния клетки [11].

Оксид азота синтезируется различными типами клеток [19, 22], что позволило выделить три основные изоформы NO-синтаз [15]: NOS-1 – нейрональную (nNOS) или мозговую (bNOS); NOS-2 – индуцибельную (iNOS) или макрофагальную (mNOS); NOS-3 – эндотелиальную (eNOS), являющихся продуктами различных генов. В связи с особенностями механизмов действия и локализации изоформы NOS также подразделяют на конститутивную (cNOS), которая включает 2 изоформы (NOS-1 и NOS-3) с локализацией в цитоплазме, и индуцибельную NOS (iNOS), являющуюся кальцийнезависимой, которая активируется при повышении генной транскрипции, играет важную роль в подавлении активности бактериальных и опухолевых клеток, развитии артериальной гипертензии, нарушении перекисного окисления липидов [17].

Биологическое действие NO осуществляется благодаря его способности быстро диффундировать через мембраны синтезирующей его клетки в межклеточное пространство и без участия соответствующих рецепторов проникать в клетки-мишени, где активируют необходимые ферменты.

Нитраты относятся к умеренно токсическим веществам и не могут отвечать за широкий спектр действия нитросоединений. Удалось показать, что в основе универсального механизма действия нитритов в организме млекопитающих лежит реакция превращения ионов  $\text{NO}_2^-$  в NO.

Способность оксида азота проникать в миокардиальные клетки позволяет при участии цГМФ снижать концентрацию внутриклеточного кальция, вызывая вазодилатацию и расслабление гладкомышечных клеток и тканей, обеспечивая регуляцию общего периферического сопротивления сосудов и перераспределения крови в сосудах [14]. Кроме модуляции тонуса сосудов, NO участвует в регуляции сократительной функции миокарда [16, 21].

Гипотермия активирует разные изоформы NO-синтаз, создавая условия для повышенной проницаемости ГЭБ. Показано [13], что при нарастании гипоксии и гипокании на фоне охлаждения не происходит существенного нарушения обмена NO в клетках гибернирующих. Отмеченные изменения имеют адаптивный характер и исчезают в течение 2-х часов.

Цель данного исследования – изучение влияния РХВ на содержание нитратов в сыворотке крови, миокарде молодых и старых крыс.

peculiarities of effect mechanisms and localization the NOS isoforms are also divided into constitutive one (cNOS), comprising 2 isoforms (NOS-1 and NOS-3) with localization in cytoplasm and inducible NOS (iNOS) being calcium-independent, being activated under a rise in gene transcription, plays an important role in suppressing bacterial and tumour cells, development of arterial hypertension, disorder of lipid peroxidation [17].

NO biological effect is performed due to its ability of rapid diffusion via membranes of the cell synthesizing it into intercellular space and with no participation of corresponding receptors to penetrate into target cells, where they activate essential enzymes.

Nitrates are referred to moderately toxic substances and not able to be responsible for a wide spectrum of the effect of nitrocompounds. It was successfully demonstrated that in the base of universal mechanism of nitrates' effect in mammalian organism was the reaction of transferring  $\text{NO}_2^-$  ions into NO.

Ability of nitrogen oxide to penetrate into myocardial cells enables with the presence of cGMP the reduction of concentration in intracellular calcium by causing vasodilatation and relaxing of smooth muscle cells and tissues, by providing the regulation of general peripheral impedance of vessels and redistribution of blood in them [14]. In addition to modulation of vessel tonus NO participates in regulation of contractile myocardium function [16, 21].

Hypothermia activates various isoforms of NO-synthases by creating the conditions for an increased BBB permeability. It has been shown [13], that under enhancing hypoxia and hypokapnia on the background of cooling no significant disorder in NO exchange in the cells of hibernating occur. The found alterations are of adaptive character and disappear within 2 hrs.

This research aim was to investigate the effect of RCE on content of nitrates in blood serum, myocardium of young and aged rats.

### Materials and methods

The research was performed in white Wistar male rats of two age groups: the first one was mature young animals (YA) of 6 month's age and the second one was aged animals (AA) of 2-2.5 years. The experiments were conducted according to General principles of experiments in animals approved by the 1<sup>st</sup> national congress on bioethics (Kiev, 2001) and co-ordinated with the statements of European convention on protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (Strasbourg, 1985). Rhythmic cryoeffects were performed in cryochamber with the ambient temperature of  $-120^\circ\text{C}$  for 1.5-2 min. Rectal temperature of animals' bodies was controlled with temperature gauge. It remained stable within cryo-effect process. Each group of animals was divided into

## Материалы и методы

Исследования проводили на белых крысах-самцах линии Вистар двух возрастных групп: первая – половозрелые молодые животные (МЖ), возраст 6 месяцев, вторая – старые (СЖ), возраст 2-2,5 года. Эксперименты проведены в соответствии с Общими принципами экспериментов на животных, одобренными 1 Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2001) и согласованными с положениями Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1985). Ритмические криовоздействия осуществляли в криокамере с температурой воздушной среды  $-120^{\circ}\text{C}$  в течение 1,5-2 минут. Ректальную температуру тела животных контролировали температурным датчиком. Она оставалась постоянной в процессе криовоздействия. Каждая группа животных была разбита на четыре подгруппы (по шесть животных в каждой): первая – интактные животные, вторая, третья, четвертая – крысы получили три, шесть, девять сеансов РХВ соответственно. В каждой подгруппе содержалось по 7 животных.

Базальную секрецию стабильных метаболитов NO в сыворотке крови, тканях сердца оценивали фотометрическим методом по реакции Грисса. Для определения функциональной активности NOS применяли агонист L-аргинин в количестве 100 мг/100 г массы животного. Блокаду iNOS осуществляли введением крысам внутрибрюшинно диэтилдитиокарбаминовой кислоты из расчета 50 мг/100 г массы, а cNOS – с помощью блокатора N-омега-нитро-L-аргинин-метил-эстер из расчета 5 мг/100 г массы животного. Образцы тканей гомогенизировали в Na-фосфатном буфере, pH 7,4 при температуре  $4-6^{\circ}\text{C}$ , после чего депротенизировали 75 ммоль/л  $\text{ZnSO}_4$  и 55 ммоль/л NaOH в соотношении 1:1:1,2 по объему соответственно, центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин на центрифуге PC-6. К 200 мкл супернатанта последовательно добавляли 20 мкл 1%-го сульфонида и 20 мкл 0,1%-го N-(1-нафтил)-этилендиаминдигидрохлорида в 5% HCl [1]. Оптическую плотность определяли через 20 мин при 540 нм с помощью многоканального микроспектрофотометра фирмы “Flow” (Великобритания). При проведении исследования использовали N-(1-нафтил)-этилендиаминдигидрохлорид, сульфонида фирмы ICN (США), остальные реагенты – отечественного производства.

Статистическая обработка данных проведена методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA).

four subgroups (6 animals in each): the first one was intact animals, the second, third and fourth groups comprised the rats treated with three, six and ten sessions, correspondingly. In each subgroup there were 7 animals.

Basal secretion of NO stable metabolites in blood serum, heart tissues was assessed with photometric method on Griess reaction. To examine functional activity of NOS L-arginine agonist in the amount of 100 mg/100 g of animal's mass was used. iNOS blockade was performed with intraperitoneal introduction of diethyldithiocarbamic acid to rats in respect of 50 mg/100g of an animal's mass and cNOS with blocker N-omega-nitro-L-arginine-methyl-ester in respect of 5mg/100 g of an animal's mass. Tissue samples were homogenized in Na-phosphate buffer, pH 7.4 at  $4-6^{\circ}\text{C}$  then they were deproteinized with 75 mmol/l  $\text{ZnSO}_4$  and 55 mM/l NaOH in the 1:1:1.2 ratio (v/v), correspondingly, centrifuged for 15 min at 3,000 rot/min with centrifuge PC-6. To 200 ml of supernatant gradually there were added 20 ml of 1% sulphone amide and 20 ml of 0.1% N-(1-naphtyl)-ethylendiaminedihydrochloride in 5% NaCl [1]. Optical density was found in 20 min at 540 nm with multichannel microspectrophotometer (“Flow”, Great Britain). When performing the studies we used N-(1-naphtyl)-ethyleneaminehydrochloride, sulphonamide (ICN, USA), the rest reagents were of home production.

The data were statistically processed with the method one-factor dispersion analysis (ANOVA).

## Results and discussion

During the development of pathological process in an organism NO acts as regulatory factor including ischemic states of different genesis. It should be noted that that NO possesses a high diffusive ability and instability as a result of that it may release rapidly and affect a cell and later decay.

A big number of selective NOS inhibitors is known that testifies to a competitive mechanism of inhibiting related to the effect on active centre of enzyme. N-omega-nitro-L-arginine-methylester is an inhibitor of endothelial and neuronal enzymes, has a high specificity in respect of NOS isoforms and plays an important pathogenetic role at myocardium ischemia. In vascular wall for NO generation the activation with acetyl choline of endothelial muscarine receptors is likely important as a result of that with the triggering of phosphoenosite cycle the generation of  $\text{Ca}^{2+}$  takes place, which stimulates the reaction of vasodilatation.

Study of final products of NO exchange gives the possibility to judge on the state and possible determined role of NO in pathogenesis of impairments of

## Результаты и обсуждение

При развитии патологического процесса в организме NO выступает как регуляторный фактор, в том числе и при ишемических состояниях различного генеза. Следует учитывать, что NO обладает высокой диффузионной способностью и нестабильностью, вследствие чего может быстро высвобождаться и оказывать действие на клетку и распадаться.

Известно большое количество селективных ингибиторов NOS, что свидетельствует о конкурентном механизме ингибирования, связанного с влиянием на активный центр фермента. N-омеганитро-L-аргинин-метил-эстер является ингибитором эндотелиального и нейронального ферментов, обладает высокой специфичностью по отношению к изоформам NOS и играет важную патогенетическую роль при ишемии миокарда. Возможно, в сосудистой стенке для генерации NO важна активация ацетилхолином мускариновых рецепторов эндотелия, вследствие чего включением фосфогенозитидного цикла происходит генерация  $Ca^{2+}$ , который стимулирует реакцию вазодилатации.

Изучение конечных продуктов обмена NO позволяет судить о состоянии и возможной детерминированной роли NO в патогенезе нарушений сердечной деятельности как у животных, так и у людей разных возрастных групп.

Нами установлено, что в контрольной группе молодых животных исходная концентрация конечных продуктов обмена NO в сыворотке крови была выше, чем в миокарде (рис. 1, 2).

Наблюдаемые изменения свидетельствуют о том, что NO как вторичный мессенджер активно

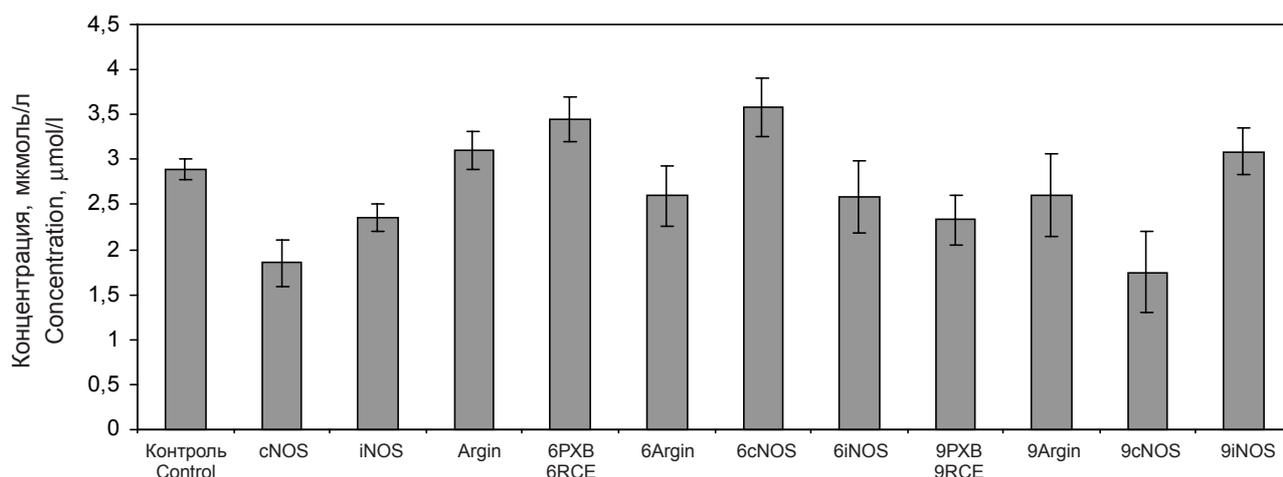
cardiac activity both in animals and humans of various age groups.

We have found that in control group of young animals an initial concentration of final products of NO exchange in blood serum was higher than in myocardium (Fig. 1, 2).

Observed changes testify to the fact that NO as a secondary messenger actively functions in cells and tissues of the animals under study. Characteristic values of nitrites in blood and myocardium enable the supposing the presence of a substance in them (probably NO) which is produced by endothelial cells. The process noted in control experiments regulated, since it may be inhibited with selective NOS inhibitors and activated with the progenitor of enzyme synthesis, agonist-L-arginine.

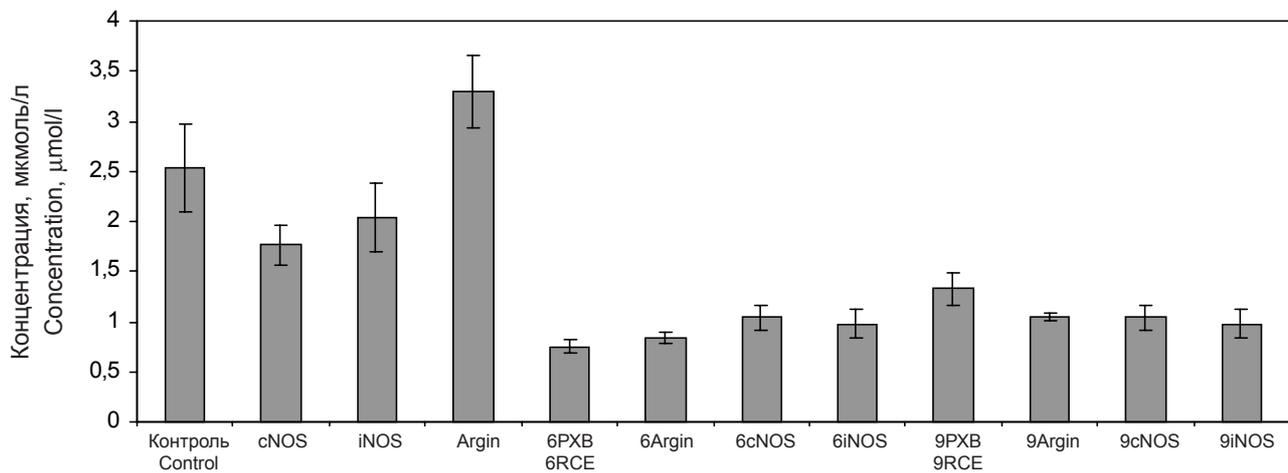
Under the same experimental conditions Fig. 2 and 3 show in myocardium tissues of aged animals a significant difference in the content of nitrites from their concentration in myocardium tissues of young animals ( $1.37 \pm 0.22$  and  $2.53 \pm 0.44 \mu\text{mol/l}$ ,  $p < 0.05$ ). This reduction in nitrites in aged animals is likely related to that fact that NO plays a significant role in regulation of one of the main heart functions: pumping, provides a contractile myocardium function [20], strengthens relaxation of ventricles and provides diastolic expansibility, is an essential component in performing  $\beta$ -adrenergic ino- and chronotropic effects [18]. It is evident that due to the manifested in any extent dystrophic processes and myocardium ischemia in aged rats the ability of cells to NO synthesis is reduced.

It is known that in time there are qualitative and quantitative changes in the integrity of an organism,



**Рис. 1.** Содержание конечных продуктов обмена NO в сыворотке крови молодых крыс: cNOS – после применения специфического блокатора констатативной NOS; iNOS – после применения специфического блокатора индуцибельной NOS; Argin – после применения стимулятора NOS; 6PXB – шестое ритмическое холодовое воздействие; 9PXB – девятое ритмическое холодовое воздействие.

**Fig. 1.** Content of final products of NO exchange in blood serum of young rats: cNOS – after application of specific blocker of constitutive NOS; iNOS – after application of specific blocker of inducible NOS; Argin – after application of NOS stimulator; 6RCE– 6<sup>th</sup> RCE; 9RCE– 9<sup>th</sup> RCE;



**Рис. 2.** Содержание конечных продуктов обмена NO в миокарде молодых крыс. Обозначения те же, что и на рис. 1.  
**Fig. 2.** Content of final products of NO exchange in myocardium of young rats. Legends are the same as in Fig 1.

функционирует в клетках и тканях исследуемых животных. Характерные величины нитритов в крови и миокарде позволяют предположить присутствие в них вещества (возможно NO), которое продуцируется эндотелиальными клетками. Процесс, отмеченный в контрольных опытах, регулируемый, так как может тормозиться селективными ингибиторами различных NOS и активироваться предшественником синтеза ферментов, агонистом-L-аргинином.

Как видно из рис. 2 и 3, при тех же условиях эксперимента в тканях миокарда старых животных содержание нитритов существенно отличалось от их концентрации в тканях миокарда у молодых ( $1,37 \pm 0,22$  и  $2,53 \pm 0,44$  мкмоль/л,  $p < 0,05$ ). Такое снижение нитритов у старых животных, возможно, связано с тем, что NO играет существенную роль в регуляции одной из главных функций сердца – насосной, обеспечивает контрактильную функцию миокарда [20], усиливает релаксацию желудочков и увеличивает диастолическую растяжимость, является необходимым компонентом в осуществлении  $\beta$ -адренергического ино- и хронотропного эффектов [18]. Очевидно, что в связи с выраженными в той или иной степени дистрофическими процессами и ишемией миокарда у старых крыс способность клеток к синтезу NO снижена.

Известно, что со временем происходят качественные и количественные изменения целостности организма, отмечается перестройка внутренней структуры, что ведет к иной реакции старого организма на многие внешние и внутренние влияния. Применение в экспериментах специфических блокаторов изоформ cNOS и iNOS подтверждает наши предположения.

Более низкое содержание конечных продуктов обмена NO в миокарде крыс, особенно старых, по сравнению с их содержанием в сыворотке крови объясняется интенсивным потреблением его на

there is noticed the re-arrangement of inner structure leading to other reaction of aged organism to many external and internal effects. Use in experiments of specific blockers of cNOS and iNOS isoforms confirm our supposition.

Lower content of final products of NO exchange in rat's myocardium, especially of aged ones in comparison with their content in blood serum is explained by its intensive consumption for maintaining intracellular metabolism in myocytes to improve trophics directed to providing an oxygen transport by not only to myocytes but an organism in a whole.

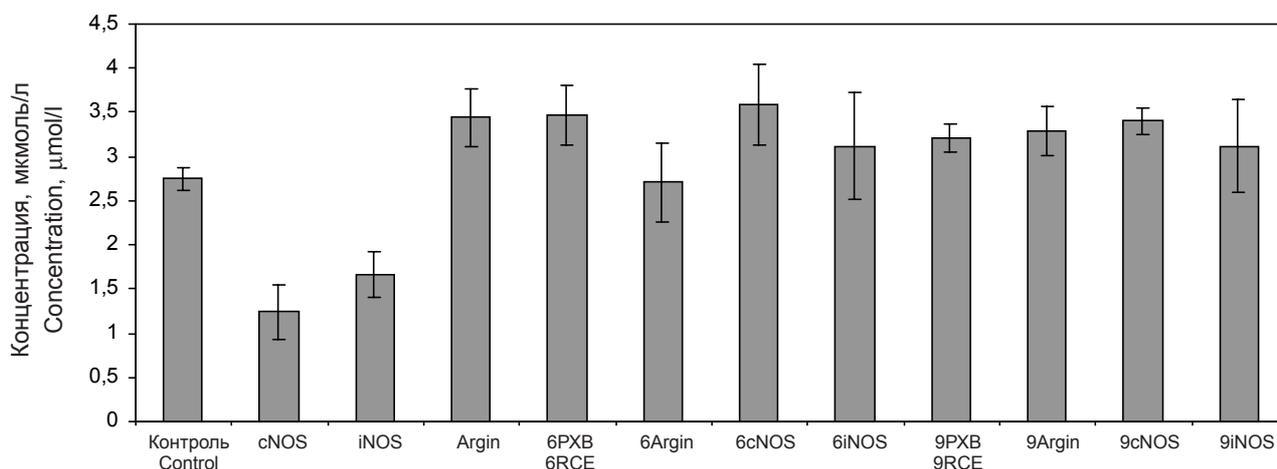
Under conditions of human organism ageing with intracellular impairments of metabolism the application of different pharmacological formulations and other methods increasing the resistance of myocardium to oxygen deficit is quite actual. In this case the ways enhancing an organism resistance, forming adaptation reactions capable of providing an adequate functioning of main systems, including cardio-vascular as a result of activation of universal regulation factors gain an important value.

In response to the effect of extreme factors (hypoxia, cold, heat) in an organism NO production by cells is strengthened [4] due to an increase of intracellular concentration of calcium ions, level of which correlates with a release of endothelial NO.

We have found that RCEs result in a rise in BBB permeability for para- and sympathomimetics, synchronize the function of vegetative nervous system and normalize cardiac rhythm, especially in aged animals. The peculiarities of NO role, its final products in myocardium function and blood of aged and young rats after RCE were investigated.

It should be taken into account that NO role in normal physiological and pathological states of an organism is not the same and determined by its concentration.

During the diseases in the base of which there is noted the development of oxidative stress, accompa-



**Рис. 3.** Содержание конечных продуктов обмена NO в миокарде старых крыс. Обозначения те же, что и на рис. 1.  
**Fig. 3.** Content of final products of NO exchange in myocardium of aged rats. Legends are the same as in Fig 1.

поддержание внутриклеточного метаболизма в миоцитах для улучшения трофики, направленной на обеспечение транспорта кислорода не только миоцитам, но и организму в целом.

В условиях старения организма у людей с внутриклеточными нарушениями метаболизма чрезвычайно актуально применение различных фармакологических средств и других методов, повышающих устойчивость миокарда к дефициту кислорода. В этом случае важное значение приобретают способы, повышающие резистентность организма, формирующие адаптационные реакции, которые способны обеспечить адекватное функционирование основных систем, в том числе и сердечно-сосудистой в результате активации универсальных факторов регуляции.

В ответ на действие экстремальных факторов (гипоксия, холод, тепло) в организме усиливается продукция NO клетками [4] за счет увеличения внутриклеточной концентрации ионов кальция, уровень которого коррелирует с высвобождением эндотелиального NO.

Нами установлено, что РХВ приводят к повышению проницаемости ГЭБ для пара- и симпатомиметиков, синхронизируют функцию вегетативной нервной системы, нормализуют сердечный ритм, особенно у старых животных. Были изучены особенности роли NO, его конечных продуктов в функции миокарда и крови старых и молодых крыс после РХВ.

Следует учитывать, что роль NO в нормальных физиологических и патологических состояниях организма не одинакова и определяется его концентрацией.

При заболеваниях, в основе которых отмечается развитие оксидантного стресса, сопровождающегося накоплением свободнорадикальных соединений, NO взаимодействует с активными формами кислорода, образуя реакционное соеди-

няя с накоплением свободных радикалов, NO взаимодействует с активными формами кислорода путем образования пероксинитратной реактивной соединения, которое может либо повлиять на интенсивность развития стресса и тяжести заболевания [3] или путем генерирования NO оказать защитное действие. Согласно данным [5] различные периодические экстремальные воздействия приводят к нарушению суточного стереотипа и могут сопровождаться нарушениями адаптивных механизмов, выполняющих поиск и формирование оптимальных форм взаимодействия организма с окружающей средой после воздействия стрессовых факторов.

При холодных воздействиях в адаптивных механизмах особую роль играет норадренергическая система гипоталамуса, медирующая стрессовый ответ организма и участвующая в специфических реакциях.

Работы [7-9] показывают, что норадренергическая активация вегетативных функций во время охлаждения обеспечивается за счет повышения проницаемости BBB. Примерно через 24 часа после охлаждения наблюдается повторное изменение активности функциональных систем, готовящих организм к аналогичному воздействию на «ожидательный» тип на нейрохимическом уровне. Комбинация, обеспечивающая сохранение в течение 24 часов после холодных воздействий высокого уровня катехоламинов в крови и гипоталамусе, вероятно, формируется. Характерно, что после повторного охлаждения активность норадренергической системы мозга аналогична первой.

Установлено, что через 24 часа после появления «ожидательной реакции» на воздействие стрессового фактора, включая холодный у животных, наблюдается повторная активация нейроэндокринной системы, адаптивная реакция, готовящая организм к повторному «встречению» с воздействием, уже пережитым [12], однако существует впечатление, что адаптивные системы готовы ответить на повторное охлаждение в течение 24 часов более специфично и экономно.

«Ожидательная реакция на повторное воздействие» происходит в основном из-за внутриклеточных перестроений, синтеза адаптивных ферментов, включая NO-синтазы. Это

нение пероксинитрат, которое может оказывать существенное влияние на интенсивность развития стресса и тяжесть заболеваний [3], или, генерируя NO, осуществляет защитный эффект. По данным [5] различные периодические экстремальные воздействия приводят к нарушению суточного стереотипа и могут сопровождаться расстройствами адаптационных механизмов, осуществляющих поиск и формирование оптимальных форм взаимодействия организма с окружающей средой после действия стрессовых факторов.

При холодовых воздействиях в механизмах адаптации особая роль принадлежит норадренергической системе гипоталамуса, которая опосредует стрессовый ответ организма и участвует в специфических ответных реакциях.

В работах [7-9] показано, что норадренергическая активация вегетативных функций при охлаждении обеспечивается за счет повышения проницаемости ГЭБ. Приблизительно через сутки после охлаждения наблюдается повторное изменение активности функциональных систем, которые подготавливают организм к аналогичному воздействию по типу “реакции ожидания” на нейрхимическом уровне. По-видимому, формируется комплекс условий, обеспечивающий сохранение через 24 ч после холодовых воздействий высокого уровня катехоламинов в крови и гипоталамусе. Характерно, что после повторного охлаждения активность норадренергической системы мозга аналогична первому.

Установлено, что через сутки после возникновения “реакции тревоги” на действие фактора стресса, в том числе и холодового, у животных происходит повторная активация нейроэндокринной системы, формируется приспособительная реакция, которая готовит организм к повторной “встрече” с имевшим место воздействием [12], однако складывается впечатление, что адаптивные системы, готовые реагировать на повторное охлаждение, через сутки более специфичны и экономичны.

“Реакция ожидания повторного воздействия” происходит, в основном, за счет внутриклеточных перестроек, синтеза адаптивных ферментов, в том числе NO-синтаз. Эта реакция, как правило, формируется в ограниченном временном интервале. В “реакции ожидания” важное значение в поддержании гомеостаза, нормальной функции сердечно-сосудистой системы имеет гипоталамус, в котором сосредоточены регуляторные центры многих вегетативных функций, в том числе и функции сердца. Особая роль в этих механизмах принадлежит NO как ретроградному мессенджеру.

Учитывая вышеизложенное, образцы тканей для исследования у экспериментальных животных забирали через сутки после РХВ.

reaction as a rule is formed within a limited time interval. In “waiting reaction” an important value in keeping homeostasis, normal cardiovascular system functioning belongs to hypothalamus, where regulatory centres of many vegetative functions, including heart function, are concentrated. A special role in these mechanisms is played by NO as retrograde messenger.

Taking into account above mentioned the tissue samples were derived for examination from experimental animals in 24 hrs after RCE.

Fig. 1 shows that content of final products of NO exchange in blood serum, procured for the studying in 24 hrs after 6 RCEs in young animals significantly differed from the obtained results in control animals. Basal level of nitrites in them was twice higher than in the control animals.

After application of specific blocker instead of expected as in the control suppression we have found a rise in the enzyme cNOS activity. At the same time in blood serum of these animals no statistical and significant differences in the content of final products of NO exchange were revealed after blockade of iNOS function if compared with the control. With using L-arginine the content of final products of NO exchange was not increased and was lower in the studied sample in comparison with the control.

Basal level of nitrites increased after the 6<sup>th</sup> session of RCE in blood serum of young animals up to  $3.442 \pm 1.26$  from  $2.53 \pm 0.44$   $\mu\text{mol/l}$  in the control ( $p < 0.05$ ). After the 9<sup>th</sup> RCE session there was no reduced dynamics of nitrates both in respect of previous research stage and to the control ( $2.33 \pm 0.27$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $p < 0.05$ ).

The activity of cNOS with using blockers after the 9<sup>th</sup> RCE session decreases if compared with the previous stage in 1.5-2 times, with no difference from the control.

At the same time iNOS blockers not only reduce the content of nitrites but also significantly increase their concentration in the samples under study that enables the supposing of an increase in enzyme activity as a result of formation of protective effects of adaptation, activation of functioning of all organism systems, where an important role is played by common regulation factors of physiological systems.

The number of metabolites after intraperitoneal introduction of L-arginine remained practically at the same level as after 6 RCE session. When studying the content of nitrites in blood serum after 6 RCE session in aged animals there was found a rise in their level in respect of the control, as well as in young animals (Fig. 3).

The same growth dynamics for nitrites in animals was observed and after 9 RCE sessions. Within these terms we have noticed a negative correlation between the content of NO stable metabolites and application of blockers of cNOS and iNOS synthesis that gives the possibility to suppose the rise in blood serum of aged animals of both constitutive and inducible NOS

Как видно из рис. 1, содержание конечных продуктов обмена NO в сыворотке крови, забранной для исследования через сутки после шести РХВ у молодых животных, достоверно отличалось от полученных результатов у контрольных животных. Базальный уровень нитритов у них был в два раза выше, чем у контрольных.

После применения специфического блокатора вместо ожидаемого, как в контроле угнетения, нами отмечено увеличение активности фермента cNOS. В то же время в сыворотке крови этих животных не обнаружено достоверных различий в содержании конечных продуктов обмена NO после блокады функции iNOS по сравнению с контролем. С применением L-аргинина содержание конечных продуктов обмена NO не увеличивалось и было в исследуемом образце ниже, чем в контроле.

Базальный уровень нитритов повышался после 6-го сеанса РХВ в сыворотке крови молодых животных до  $3,442 \pm 1,26$  от  $2,53 \pm 0,44$  мкмоль/л в контроле ( $p < 0,05$ ). После 9-го сеанса РХВ отмечена динамика снижения нитритов как по отношению к предыдущему этапу исследований, так и к контролю ( $2,33 \pm 0,27$  мкмоль/л,  $p < 0,05$ ).

Активность cNOS с применением блокаторов после 9-го сеанса РХВ снижается по сравнению с предыдущим этапом в 1,5-2 раза, практически не отличаясь от контроля.

В то же время блокаторы iNOS не только не уменьшают содержание нитритов, но существенно увеличивают их концентрацию в исследуемых образцах, что позволяет предположить повышение активности фермента в результате формирования защитных эффектов адаптации, активизацию функционирования всех систем организма, в которых важную роль играют универсальные факторы регуляции физиологических систем.

Количество метаболитов после внутрибрюшинного введения L-аргинина практически оставалось на том же уровне, что и после 6-го сеанса РХВ. При исследовании содержания нитритов в сыворотке крови после 6-го сеанса РХВ у старых животных отмечено повышение их уровня по отношению к контролю, как и у молодых животных (рис. 3).

Аналогичная динамика роста нитритов у животных наблюдалась и после 9 сеансов РХВ. В эти сроки нами отмечена отрицательная корреляция между содержанием стабильных метаболитов NO и применением блокаторов синтеза cNOS и iNOS, что дает возможность предположить о повышении в сыворотке крови старых животных как констативной, так и индуцибельной изоформ NOS. Введение крысам L-аргинина не только не увеличивало количество нитритов, а наоборот снижало их содержание.

isoforms. Introduction of L-arginine to rats did not increase the number of nitrites and vice a versa reduced their content.

Thus after 9 session of RCE in aged animals all the studied indices in blood serum significantly exceed the same in control ones.

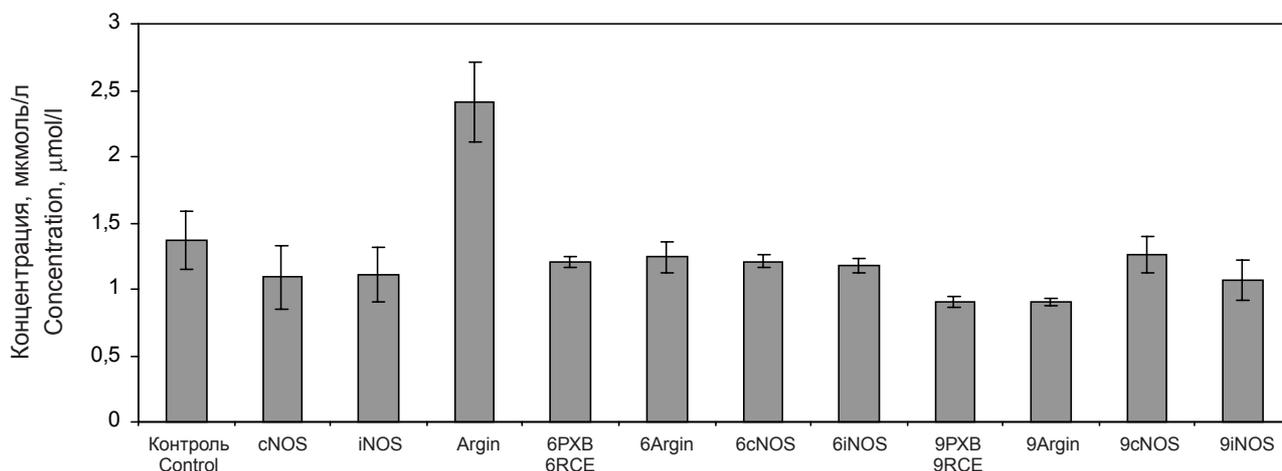
Growing interest to ageing problem is mainly stipulated by the need in development of flexible adequate methods of the correction of impaired function of organ and systems, including cardiovascular one. In these processes an important role may be played by aggravation of endothelium-dependent vasodilatation, stipulated by absolute or relative deficits of nitrogen oxide.

Homeostasis in animals of various age groups under different environmental conditions is supported by multifactor regulation in the course of which a new state is achieved, more advantageous to an organism in the arisen conditions. One of these regulation mechanisms is NO formation from L-arginine, when in an organism due to some reasons in some extent a manifested state of hypoxia is developed. No recovery from nitrites is less energy-spending mechanism if compared with the synthesis from L-arginine. Cells obtain the possibility from NO metabolic products (nitrites and nitrates) to form NO, using energetically more economic mode.

Summarizing the obtained experimental results in aged and young animals one can suppose that activity of NO plays a role of pathogenetic regulatory factors, the activity of which reduces in aged intact animals (Fig. 3, 4).

Of special interest is the fact of a rise in the content of final products of NO exchange after 6 sessions of extreme cryoeffects in young rats and after 6-9 sessions in aged ones.

It has been found that NO plays an important role in blood circulation, because it is a powerful vasodilating agent. Endothelium of vessels produce the release of some NO amount into blood, performing the function of effective biological mediator, however in aged organism this function reduces in the result of that many important physiological processes slow down, among them the ratio of oxidant and anti-oxidant protective systems, impairment in stability of which is extremely dangerous if to take into account that lipid peroxidation is one of the main causes of organism ageing and disease development. The fact that in contrast to young, in aged animals after 9 RCE sessions we suppose the content of nitrites is increased and this may testify to activation of NO-constitutive synthase. Taking into account that nitrites and nitrates participate in many pathophysiological processes, an increase in the content of these products in blood serum of aged rats after extreme cryoeffects is physiologically expedient, directed to the improvement of trophics and



**Рис. 4.** Содержание конечных продуктов обмена NO в сыворотке крови старых крыс. Обозначения те же, что и на рис. 1.  
**Fig. 4.** Content of final products of NO exchange in blood serum of aged rats. Legends are the same as in Fig 1.

Таким образом, после 9-го сеанса РХВ у старых животных все исследуемые показатели в сыворотке крови существенно превышали аналогичные у контрольных.

Возрастающий интерес к проблеме старости во многом обусловлен необходимостью разработки гибких адекватных методов коррекции нарушенной функции органов и систем, в том числе и сердечно-сосудистой. В этих процессах важную роль может играть ухудшение эндотелийзависимой вазодилатации, обусловленной абсолютным или относительным дефицитом окиси азота.

Гомеостаз у животных различных возрастных групп в условиях действия различных факторов среды поддерживается мультифакторным регулированием, в процессе которого достигается новое состояние, более выгодное организму в создавшихся условиях. Одним из таких механизмов регулирования является образование NO из L-аргинина, когда в организме в силу ряда причин развивается в той или иной степени выраженное состояние гипоксии. Восстановление NO из нитритов – менее затратный в энергетическом отношении механизм, чем синтез из L-аргинина. Клетки получают возможность из продуктов метаболизма NO (нитриты и нитраты) образовывать NO, используя энергетически более экономный путь.

Обобщая полученные результаты экспериментов у старых и молодых животных, можно предположить, что активность NO играет роль патогенетического регуляторного фактора, активность которого снижается у старых интактных животных (рис. 3, 4).

Особенно интересным является факт повышения содержания конечных продуктов обмена NO после 6 сеансов экстремальных криовоздействий у молодых и после 6-9 сеансов у старых крыс.

function of cardiac muscle vessels. This is confirmed by the circumstance that decoding of the mechanisms of vasodilating effect of NO enabled to apply nitroglycerin as efficient medicine to stop the pain and spasm of coronary vessels.

Nitrogen oxide affects the interaction of blood cells with endothelium of vessels, by preventing the adhesion of blood plates, leukocytes and other blood cells to endothelium thereby preventing aggregation of latter and formation of thrombi. Such NO effect may have a big value at early genesis stages and development of atherosclerotic impairments of vascular wall, as well as act as anti-growth factor, preventing proliferation of smooth muscle cells of vessel walls.

Therefore, a rise in the content of nitrites under RCE effect may increase the resistance of aged organism, activity of intracellular systems, mobilization of system and protection of cells and tissues under hypoxia and extra pathophysiological loading.

Statistically significant reduction of the level of final products of NO exchange in myocardium of young rats after 6<sup>th</sup> session of cryoeffect may testify to its intensive expenditure by myocardial cells. Similar effect in aged animals starts just after 9<sup>th</sup> session of cold effect. This “slowing down” may probably be explained by a decrease in adaptive possibilities of ageing organism. Nitrogen oxide synthesizing from L-arginine with NO-synthases participation penetrates into myocardial cells where with the participation of guanine monophosphate reduces the concentration of intracellular calcium, causing vasodilatation and relaxation of smooth muscle cells and tissues, providing the regulation and redistribution of blood in vessels [16, 21].

Rhythmic cold effects increase the tonus of parasympathic compartment of vegetative nervous system and reduce the activity of humoral regulation link. In addition, they enhance total spectral power of parasymp-

Установлено, что NO играет важную роль в системе кровообращения, так как он является мощным сосудорасширяющим агентом. Эндотелий сосудов продуцирует выброс в кровь небольшого количества NO, выполняющего функцию эффективного биологического медиатора, однако в старом организме эта функция снижается, в результате чего замедляются многие важные физиологические процессы, среди которых соотношение оксидантной и антиоксидантной защитных систем, нарушение стабильности которого особенно опасно, если учесть, что перекисное окисление липидов является одной из важных причин старения организма и развития болезни. Тот факт, что в отличие от молодых у старых животных после 9 сеансов РХВ, по нашему предположению, содержание нитритов повышено и это может свидетельствовать об активации конститутивной NO-синтазы. Учитывая, что нитриты и нитраты участвуют во многих патофизиологических процессах, повышение содержания этих продуктов в сыворотке крови старых крыс после экстремальных криовоздействий физиологически целесообразно, направлено на улучшение трофики и функции сосудов сердечной мышцы. Это подтверждается и тем обстоятельством, что расшифровка механизмов сосудорасширяющего действия NO позволила применять как эффективное лекарственное средство нитроглицерин для снятия боли и спазма коронарных сосудов.

Оксид азота оказывает влияние на взаимодействие клеток крови с эндотелием сосудов, препятствуя прикреплению кровяных пластинок, лейкоцитов и других клеток крови к эндотелию, тем самым предотвращая агрегацию последних и образование тромбов. Такое действие NO может иметь большое значение на ранних этапах генеза и развития атеросклеротических повреждений сосудистой стенки, а также выступать в роли антиростового фактора, препятствующего пролиферации гладкомышечных клеток стенки сосудов.

Следовательно, увеличение содержания нитритов под влиянием РХВ может повышать резистентность старого организма, активность внутриклеточных систем, мобилизацию системы и защиты клеток и тканей в условиях гипоксии и чрезмерной патофункциональной нагрузки.

Статистически достоверное снижение уровня конечных продуктов обмена NO в миокарде молодых крыс после 6-го сеанса криовоздействия может свидетельствовать об интенсивном его расходовании миокардиальными клетками. Подобный эффект у старых животных наступает лишь после 9-го сеанса холодого воздействия. Такое "запаздывание", очевидно, можно объяснить снижением адаптивных возможностей стареющего

pathic and sympathetic regulation compartments of vegetative nervous system in aged animals, that testifies to a transition from slow humoral metabolic level to rapid vegetative regulation level which is characteristic to aged organism.

Applied RCEs cause "mild stress" due to activation of higher vegetative centers improve adaptive capabilities of aged animals and the revealed effects of neurohumoral regulation are notable for expedience, because are realized via autonomous nervous system. It could be supposed that NO role as a secondary messenger in these processes is especially important. Rhythmic cold effects contribute to a rise in NO activity in cells, improvement of trophics, intercellular communication, balanced functions of oxidative-antioxidant systems.

## References

1. Babijchuk G.A. Effect of extreme cryotherapy on morpho-functional state of the central nervous system // *Problems of Cryobiology.*— 2005.— Vol. 15, N3.— P. 458-464.
2. Babijchuk G.A., Shifman M.I. Neurochemical processes in central nervous system at a hypothermia.— Kiev: Naukova Dumka, 1989.— 152 p.
3. Gula N.M., Kosykova G.V., Kindruk N.L., Hmel T.O. Influence of the N-stearoilethanolamine on level of NO stable metabolites at different pathological states of organism, accompanied with oxidative stress // *Ukr. Biokhim. Zhurn.*— 2005. — T. 77, N3.— P. 113-119.
4. Kurgalyuk N.M., Serebrovskaya T.V., Nosar V.I. et al. Interval hypoxic trainings and L-arginine as correcting means of myocardium energy supply on condition of acute hypoxia // *Ukr. Biochim. Zhurn.*— 2002.— Vol. 74, N1.— P. 82-87.
5. Lomako V.V., Shilo A.V., Marchenko V.S. et al. Influence of repeated craniocerebral hypothermia on functional activity of noradrenergic system of rat's hypothalamus. // *Lechebnaya gipotermia. Collection of scientific works.*— Kharkov, 1992.— P. 134-139.
6. Marchenko V.S., Babijchuk G.A. Cardioregulatory function of blood brain barrier under resonance hypothermia // *Problems of Cryobiology.*— 2001.— N4.— P. 17-29.
7. Marchenko V.S. On the concept of the existoencephalic system of the cooled brain. Part 1 // *Problems of Cryobiology.*— 1997.— N4.— P. 14-20.
8. Marchenko V.S. Existoencephalic mechanisms of the increase in an organism's resistance to hypo- and hyperthermia // *Problems of Cryobiology.*— 1998.— N1.— P. 64-65.
9. Marchenko V.S., Babijchuk G.A., Shilo A.V. et al. On the mechanisms of regulation of blood-brain barrier permeability of the cooled brain. Report III. Is nitric oxide one of the triggers of BBB permeability in structure of ultralow controlling system of an organism? // *Problems of Cryobiology.*— 1995.— N3.— P. 10-19.
10. Raevsky K.S. Nitric oxide is a new physiological messenger, possible role at pathology of the central nervous system // *Bull. Experim. Biol. Med.*— 1997.— Vol. 123, N5.— P. 484-490.
11. Reutov V.P. A cycle of nitrogen oxide in the organism of mammals // *Uspekhi biolog. khimii.*— 1995.— Vol. 35.— P. 189-228.
12. Reushkin V.N. Mechanisms of adaptation in biorhythmological aspect // *Vestnik Meditsinskoy Akademii Nauk SSSR.*— 1981.— N12.— P. 50-53.
13. Shilo A.V., Lomako V.V., Bondar G.A., Babijchuk G.A. Nitric oxide derivatives at artificial hypometabolism in rats and hamsters // *Problems of Cryobiology.*— 2005.— N1.— P. 3-13.

организма. Оксид азота, синтезируемый из L-аргинина при участии NO-синтаз, проникает в миокардиальные клетки, где при участии гуанинмонофосфата снижает концентрацию внутриклеточного кальция, вызывая вазодилатацию и расслабление гладкомышечных клеток и тканей, обеспечивая регуляцию и перераспределение крови в сосудах [16, 21].

Ритмические холодовые воздействия повышают тонус парасимпатического отдела вегетативной нервной системы и снижают активность гуморального звена регуляции. Кроме того, увеличивают общую спектральную мощность парасимпатического и симпатического отделов регуляции вегетативной нервной системы у старых животных, что свидетельствует о переходе с медленного гуморального метаболического уровня на быстрый вегетативный уровень регуляции, который не свойственен старому организму. Применяемые РХВ вызывают “мягкий стресс” и за счет активации высших вегетативных центров улучшают адаптационные возможности старых животных, а отмеченные эффекты нейрогуморальной регуляции отличаются целесообразностью, поскольку реализуются через автономную нервную систему. Можно предположить, что роль NO как вторичного мессенджера в этих процессах особенно важна. Ритмические холодовые воздействия способствуют повышению активности NO в клетках, улучшению трофики, межклеточной коммуникации, сбалансированности функции оксидантно-антиоксидантной систем.

## Литература

1. *Бабийчук В.Г.* Влияние экстремальной криотерапии на морфофункциональное состояние центральной нервной и сердечно-сосудистой систем // Пробл. криобиологии.– 2005.– Т. 15, № 3.– С. 458-464.
2. *Бабийчук Г.А., Шифман М.И.* Нейрохимические процессы в центральной нервной системе при гипотермии.– Киев: Наук. думка, 1989.– 152 с.
3. *Гула Н.М., Косякова Г.В., Кіндрук Н.Л., Хмель Т.О.* Вплив N-стеароїлетаноламіну на рівень стабільних метаболітів NO за різних патологічних станів організму, що супроводжуються оксидативним стресом // Укр. біохім. журн.– 2005.– Т. 77, №3, С.-113-119.
4. *Кургалюк Н.М., Серебровська Т.В., Носар В.І. та інші.* Інтервальні гіпоксичні тренування та L-аргінін як засоби корекції енергозабезпечення міокарда за умов гострої гіпоксії // Укр. біохім. журн.– 2002.– Т. 74, №1.– С. 82-87.
5. *Ломако В.В., Шило А.В., Марченко В.С. и др.* Влияние повторного воздействия краниocereбральной гипотермии на функциональную активность норадренергической системы гипоталамуса крыс // Лечебная гипотермия. Сб. науч. трудов.– Харьков, 1992.– С. 134-139.
6. *Марченко В.С., Бабийчук В.Г.* Кардиорегуляторная функция гематоэнцефалического барьера при резонансной гипотермии // Пробл. криобиологии.– 2001.– №4.– С. 17-29.

14. *Cardilo G., Panza J.A.* Impaired endothelial regulation of vascular tone in patients with systemic arterial hypertension // Vasc. Med.– 1998.– Vol. 3, N2.– P. 132-144.
15. *Förstermann U., Closs E.I., Pollock J.S. et al.* Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and function // Hypertension.– 1994.– Vol. 23, N6, Pt. 2.– P. 1121-1131.
16. *Gewaltig M.T., Kojda G.* Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential // Cardiovasc. Res.– 2002.– Vol. 55, N2.– P. 250-260.
17. *Hunley T.E., Iwasaki S., Homma T., Kon V.* Nitric oxide and endothelin in pathophysiological setting // Pediatr. Nephrol.– 1995.– Vol. 9, N2.– P. 235-244.
18. *Inbrogno S., Cerra M.C., Tota B.* Angiotensin II-induced inotropism requires an endocardial endothelium-nitric oxide mechanism in the *in-vitro* heart of *Anguilla anguilla* // J. Exp. Biol.– 2003.– Vol. 206, Pt. 15.– P. 2675-2684.
19. *Nathan C.* Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells // FASEB J.– 1992.– Vol. 6, N12.– P. 3051-3064.
20. *Paulus W.J., Vantrimpont P.J., Shah A.M.* Acute effects of nitric oxide on left ventricular relaxation and diastolic distensibility in humans. Assessment by bicoronary sodium nitroprusside infusion // Circulation.– 1994.– Vol. 89, N5.– P. 2070-2078.
21. *Rakhit R.D., Marber M.S.* Nitric oxide: an emerging role in cardioprotection? // Heart.– 2001.– Vol. 86, N4.– P. 368-372.
22. *Wang Y., Marsden P.A.* Nitric oxide synthases: biochemical and molecular regulation // Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.– 1995.– Vol. 4, N1.– P. 12-22.

Accepted in 19.09.2006

7. *Марченко В.С.* К концепции экзистоэнцефалической системы охлаждения мозга. Часть 1 // Пробл. криобиологии.– 1997. – №4.– С. 14-20.
8. *Марченко В.С.* Экзистоэнцефалические механизмы повышения устойчивости организма к гипо- и гипертермии // Пробл. криобиологии.– 1998.– №1.– С. 64-65.
9. *Марченко В.С., Бабийчук Г.А., Шило А.В. и др.* К механизмам регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера охлажденного мозга. Сообщение 3. Оксид азота (II) – один из триггеров проницаемости гематоэнцефалического барьера в структуре сверхмедленной управляющей системы организма? // Пробл. криобиологии.– 1995.– №3.– С. 10-19.
10. *Раевский К.С.* Оксид азота – новый физиологический мессенджер, возможная роль при патологии центральной нервной системы // Бюл. exper. биол. и мед.– 1997.– Т. 123, №5.– С. 484-490.
11. *Реутов В.П.* Цикл окиси азота в организме млекопитающих // Успехи биол. химии.– 1995.– Т.35.– С. 189-228.
12. *Реушкин В.Н.* Механизмы адаптации в биоритмологическом аспекте // Вестник Академии мед. наук СССР.– 1981.– №12.– С. 50-53.
13. *Шило А.В., Ломако В.В., Бондарь Т.Н., Бабийчук Г.А.* Конечные продукты метаболизма оксида азота при искусственном гипометаболизме у крыс и хомяков // Пробл. криобиологии.– 2005.– №1.– С. 3-13.
14. *Cardilo G., Panza J.A.* Impaired endothelial regulation of vascular tone in patients with systemic arterial hypertension // Vasc. Med.– 1998.– Vol. 3, N2.– P. 132-144.
15. *Förstermann U., Closs E.I., Pollock J.S. et al.* Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and function // Hypertension.– 1994.– Vol. 23, N6, Pt. 2.– P. 1121-1131.
16. *Gewaltig M.T., Kojda G.* Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential // Cardiovasc. Res.– 2002. – Vol. 55, N2.– P. 250-260.
17. *Hunley T.E., Iwasaki S., Homma T., Kon V.* Nitric oxide and endothelin in pathophysiological setting // Pediatr. Nephrol.– 1995.– Vol. 9, N2.– P. 235-244.
18. *Inbrogno S., Cerra M.C., Tota B.* Angiotensin II-induced inotropism requires an endocardial endothelium-nitric oxide mechanism in the *in-vitro* heart of *Anguilla anguilla* // J. Exp. Biol.– 2003.– Vol. 206, Pt. 15.– P. 2675-2684.
19. *Nathan C.* Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells // FASEB J.– 1992.– Vol. 6, N12.– P. 3051-3064.
20. *Paulus W.J., Vantrimpont P.J., Shah A.M.* Acute effects of nitric oxide on left ventricular relaxation and diastolic distensibility in humans. Assessment by bicoronary sodium nitroprusside infusion // Circulation.– 1994.– Vol. 89, N5.– P. 2070-2078.
21. *Rakhit R.D., Marber M.S.* Nitric oxide: an emerging role in cardioprotection? // Heart.– 2001.– Vol. 86, N4.– P. 368-372.
22. *Wang Y., Marsden P.A.* Nitric oxide synthases: biochemical and molecular regulation // Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.– 1995.– Vol. 4, N1.– P. 12-22.

*Поступила 19.09.2006*