

Ультраструктурные перестройки миокарда молодых и старых крыс после экстремальной криотерапии

UDC 612.015.3:615.014.41:57.084

V.G. BABIYCHUK

Ultrastructural Re-arrangements of Myocardium of Young and Aged Rats After Extreme Cryotherapy

У молодых и старых крыс исследовали влияние экстремальных низких температур (-120°C) на динамику ультраструктурной перестройки кардиомиоцитов и эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда в зависимости от количества сеансов охлаждения. После 9 сеансов охлаждения в криокамере у молодых крыс выявлено развитие ультраструктурных перестроек, характерных для повышения активности внутриклеточных метаболических процессов, которое структурно выражается в повышении количества крист митохондрий, количества деконденсированного хроматина, гранул гликогена, рибосом и полисом. В архитектонике кардиомиоцитов старых крыс после охлаждения отмечены перестройки компенсаторного типа: увеличение количества митохондрий и крист в них, уменьшение количества очагов деструкции и дегенерации митохондрий. В саркоплазме увеличивается количество рибосом и полисом, гликогена, что указывает на повышение метаболической активности кардиомиоцитов. Уменьшается количество митохондрий с деструкциями мембран. Повышается активность трансцеллюлярного транспорта веществ, о чем свидетельствует увеличение количества микропиноцитозных пузырьков в цитоплазме отростков эндотелиоцитов. Анализ изменения ультраструктуры миокарда указывает на возможность использования криотерапии как стимулирующего фактора, повышающего функциональную активность миокарда.

Ключевые слова: ритмические холодовые воздействия, гематоэнцефалический барьер, ультраструктурные перестройки миокарда, кардиомиоциты, эндотелиоциты кровеносных капилляров.

У молодих і старих щурів досліджували вплив екстремальних низьких температур (-120°C) на динаміку ультраструктурної перебудови кардіоміоцитів і ендотеліоцитів, кровоносних капілярів міокарда в залежності від кількості сеансів охолодження. Після 9 сеансів охолодження у молодих щурів виявлено розвиток ультраструктурних перебудов, характерних для підвищення активності внутрішньоклітинних метаболічних процесів, що структурно виявляється у збільшенні кількості крист митохондрий, кількості деконденсованого хроматину, гранул глікогену, рибосом і полісом. В архітектоніці кардіоміоцитів старих щурів після охолодження помічено перебудови компенсаторного типу: збільшення кількості митохондрий і крист в них, зменшення кількості очагів деструкції і дегенерації митохондрий. У саркоплазмі збільшується кількість рибосом і полісом, глікогену, що вказує на підвищення метаболічної активності кардіоміоцитів. Зменшується кількість митохондрий з деструкціями мембран. Зростає активність трансмембранного транспорту речовин, про що свідчить збільшення кількості мікропіноцитозних пухирків у цитоплазмі відростків ендотеліоцитів. Аналіз зміни ультраструктури міокарда вказує на можливість використання криотерапії як стимулюючого фактора, який підвищує функціональну активність міокарда.

Ключові слова: ритмічні холодові впливи, гематоенцефалічний бар'єр, ультраструктурні перебудови міокарда, кардіоміоцити, ендотеліоцити кровоносних капілярів.

The effect of extreme low temperatures (-120°C) in young and aged rats on dynamics of ultrastructural re-arrangement of cardiomyocytes and endotheliocytes of myocardium capillaries depending on the number of cooling sessions was studied. After 9 cooling sessions in cryochamber in young rats there was found the development of ultrastructural re-arrangements characteristic for an increased activity of intracellular metabolic processes, which is structurally expressed in a rise in the number of mitochondria cristas, amount of decondensated chromatin, glycogen granules, ribosomes and polysomes. In architecture of cardiomyocytes of aged rats after cooling there were noted the re-arrangements of compensatory type: an increase in the number of mitochondria and cristas in them, lessening of the number of destruction and degeneration mitochondria foci. In sarcoplasm the number of ribosomes and polysomes, glycogen, that points to a rise in metabolic activity of cardiomyocytes. The quantity of mitochondria with membrane destructions decreases. Activity of transcellular transport of substances that is confirmed with the rise in the quantity of micropinocytotic vesicles in cytoplasm of endotheliocytes of out-growings. Analysis of change in ultrastructure of myocardium emphasizes the possibility of using cryotherapy as stimulating factor increasing functional activity of myocardium.

Key-words: rhythmic cold effects, blood brain barrier, ultrastructural re-arrangements of myocardium, cardiomyocytes, endotheliocytes of blood capillaries.

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Адрес для корреспонденции: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-30-07, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

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

* Address for correspondence: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3007, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

В современной науке большой интерес вызывает исследование действия холода на организм человека и животных.

Установлено [3-5], что холодовые воздействия синхронизируют активность ряда физиологических процессов в организме, синергизм которых приводит к активации реакций гомеостаза.

Важной особенностью экстремальных холодовых воздействий является способность модулировать, повышать активность ГЭБ и осуществлять коррекцию нарушенных функциональных систем организма, когда собственные регуляторные системы теряют пластичность, а уровень компенсаторных реакций существенно снижен.

По наблюдениям [1, 2, 6] непродолжительное действие низких температур на организм не опустошает энергетические и другие его функциональные резервы, активно влияя на вегетативно-нервную систему и повышая ее активность.

Данные о характере влияния экстремальной криотерапии на сердечно-сосудистую систему требуют дальнейшего уточнения и проверки, особенно при изучении сравнительных ультраструктурных перестроек миокарда у животных различных возрастных групп.

Цель исследования – изучение динамики ультраструктурных перестроек кардиомиоцитов и эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда молодых и старых крыс, подверженных экстремальной криотерапии, в зависимости от количества сеансов пребывания их в камере с температурой -120°C .

Материалы и методы

Опыты проводили на 28 молодых и 28 старых крысах-самцах линии Вистар с соблюдением принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1985 г). Животные были разделены на 4 группы по 7 молодых и 7 старых в каждой. Первая группа служила контролем, животные второй группы подвергались трехкратному охлаждению, третьей группы – шестикратному, а четвертой – девятикратному охлаждению в криокамере с температурой -120°C . Длительность каждого сеанса охлаждения – две минуты.

Для предварительной фиксации кусочки ткани помещали в 3%-й раствор глутарового альдегида на буферном растворе на 3-4 часа при температуре 4°C , затем ткань отмывали в буферном растворе и помещали для окончательной фиксации в 1%-й раствор четырехоксида осмия на буферном растворе на 3-4 часа при температуре 4°C . После этого кусочки ткани обезвоживали в растворах этанола возрастающей концентрации и ацетоне, пропиты-

For contemporary science the researches in cold effect on human and animal organisms are of great interest.

It has been found that cold effects synchronize the activity of some physiological processes in an organism, the synergism of those results in activation of homeostasis reactions.

Peculiarity of extreme cold effects is the capability of modulating, increasing BBB and correcting the impaired functional systems of an organism, when own regulatory systems lose their plasticity and the level of compensatory reactions is significantly reduced.

According to our observations a short effect of low temperatures on an organism does not exhaust energetic and other functional reserves with an active influence of vegetative and nervous system, enhancing its activity.

Data on the character of the effect of extreme cryotherapy on cardio-vascular system requires the further elucidation and checking, especially when studying comparative ultrastructural re-arrangements of myocardium of animals of different age groups.

The research aim is to investigate the dynamics of ultrastructural re-arrangements of cardiomyocytes and endotheliocytes of blood capillaries of myocardium of young and aged rats subjected to extreme cryotherapy depending on the number of sessions of their staying in the chamber with the temperature of -120°C .

Materials and methods

The experiments were performed in 28 young and 28 aged Wistar male rats with keeping the principles of European Convention on protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (Strasbourg, 1985). The groups included 7 young and 7 aged animals. The first session was the control one, the second one comprised three-fold cooling, the third one did six-fold cooling and the fourth one did none-fold with the temperature of -120°C . Duration of each session is 2 min.

For preliminary fixation the tissue pieces were placed into 3% buffered solution of glutar aldehyde for 3-4 hrs at 4°C , then the tissue was washed-out in buffered solution and placed for final fixation in 1% buffered solution of osmium quadroxide for 3-4 hrs at 4°C . The tissue pieces were dehydrated in alcohols with ascending concentrations and acetone, moistened with the mixture of epoxy resins (epon araldite) and embedded into the blocks. Polymerization of blocks was performed in thermostate at 60°C for 48 hrs.

Ultra-thin slices were made of the obtained blocks with UMTP-6 ultra-microtome (Sumy, Ukraine), then they were adjusted on electrolytic grids and after contrasting with lead they were studied with EMB-100 BR electron microscope with accelerating voltage 75 kV.

вали в смеси эпоксидных смол (эпон-аралдит) и помещали в блоки. Полимеризацию блоков производили в термостате при температуре 60°C в течение 2-х суток.

Из полученных блоков на ультрамикротоме УМТП-6 (Украина) изготавливали ультратонкие срезы, монтировали их на электролитические сеточки и после контрастирования цитратом свинца, изучали под электронным микроскопом ЭМВ-100 БР (Украина) при ускоряющем напряжении 75 кВ.

Результаты и обсуждение

В группе экспериментальных молодых животных, подвергавшихся трехкратному охлаждению в криокамере при температуре -120°C, ядра кардиомиоцитов имели удлиненную округлую форму с резко просветленным матриксом. Хроматин ядра преимущественно располагался в виде кольца вдоль ядерной мембраны. Миофибриллы располагались параллельными рядами с четкой поперечной исчерченностью (рис. 1, а).

В саркоплазме наблюдали многочисленные гранулы гликогена, рибосомы и полисомы. Пластинчатый цитоплазматический комплекс Гольджи хорошо развит, стенки параллельно ориентированных мембран окружены большим количеством мелких везикул. Многочисленные митохондрии располагались параллельными рядами между пучков миофибрилл. Матрикс митохондрий имел мелкозернистую структуру и умеренную электронную плотность. Цистерны саркоплазматического ретикулума и Т-системы имели вид электронно-прозрачных вакуолей. Гиалоплазма кардиомиоцитов обладала средней электронной плотностью. Митохондрии содержали большое количество четко контурированных крист, ориентированных перпендикулярно длинной оси органелл.

Ядра эндотелиальных клеток имели неправильную форму и содержали конденсированный хроматин. Митохондрии эндотелиоцитов умеренно набухшие с просветленным матриксом. Гранулярный эндоплазматический ретикулум развит хорошо.

На мембранах гранулярного эндоплазматического ретикулума выявлено множество рибосом. Деструкции внутриклеточных мембран не обнаружено.

В цитоплазме отростков эндотелиоцитов видны были многочисленные микропиноцитозные пузырьки.

В группе молодых крыс, подвергшихся 6-кратному охлаждению в камере с температурой -120°C, ядра кардиомиоцитов имели четко контурированную ядерную мембрану. Перинуклеарные

Results and discussion

In the group of experimental young animals subjected to 3-fold cooling in cryochamber at -120°C, the nuclei of cardiomyocytes were of elongated roundish shape with a sharp lightened matrix. Nucleus chromatin was concentrated predominantly along nuclear membrane with the formation of a ring. Myofibrillae were located by parallel rows with distinct lateral banding (Fig. 1, a).

In sarcoplasm there were found multiple granules of glycogen, ribosomes and polysomes. Lamellar cytoplasm Golgi complex is well developed, the walls of the membranes orientated in parallels are surrounded with a big number of small vesicles. Multiple mitochondria were located in parallel rows between the myofibrilla bunches. Mitochondria matrix had a closed-grained structure and moderate electron density. Cisterns of sarcoplasm reticulum and T-system had the appearance of electron transparent vacuoles. Hyaloplasma of cardiomyocytes had an average electron density. Mitochondria comprised a big number of the cristas with distinct contours, orientated athwart to a long axis of organelles.

Nuclei of endothelial cells were of an improper shape and comprised condensed chromatin. Mitochondria of endotheliocytes were moderately swollen with enlightened matrix. Granular endoplasmic reticulum was well developed.

On membranes of granular endoplasmic reticulum lots of ribosomes observed. No destruction of intracellular membranes was revealed.

In cytoplasma of endotheliocyte out-growings multiple micropinocytotic vesicles were observed.

In the group of young rats subjected to 6-fold cooling in the chamber with the temperature of -120°C the nuclei of cardiomyocytes had distinct contours of nuclear membrane. Perinuclear spaces were of similar width. There was found a moderate chromatin condensation. Nucleus matrix was of enlighten type (Fig. 1, b). Significant rise in the number of cristas in mitochondria was observed. Mitochondria matrix gained small-granular structure and average electron density. Outer membranes have distinct contours (Fig 1, c).

Many cardiomyocytes contained mitochondria with osmiophilic outer membrane. Sarcoplasm reticulum is represented with a big number of vacuole, filled with soft fibrous substance. Lamellar cytoplasm Golgi complex is moderately hypertrophied. In sarcoplasm there is observed an increase of glycogen granules, ribosomes and polysomes. Sarcoplasm membrane has with not significant changes.

Ultrastructural organization of endotheliocytes of blood capillaries was not subjected to alterations. No dystrophic and destructive changes of submicroscopic architecture of endothelial embedding of blood capillaries were revealed.

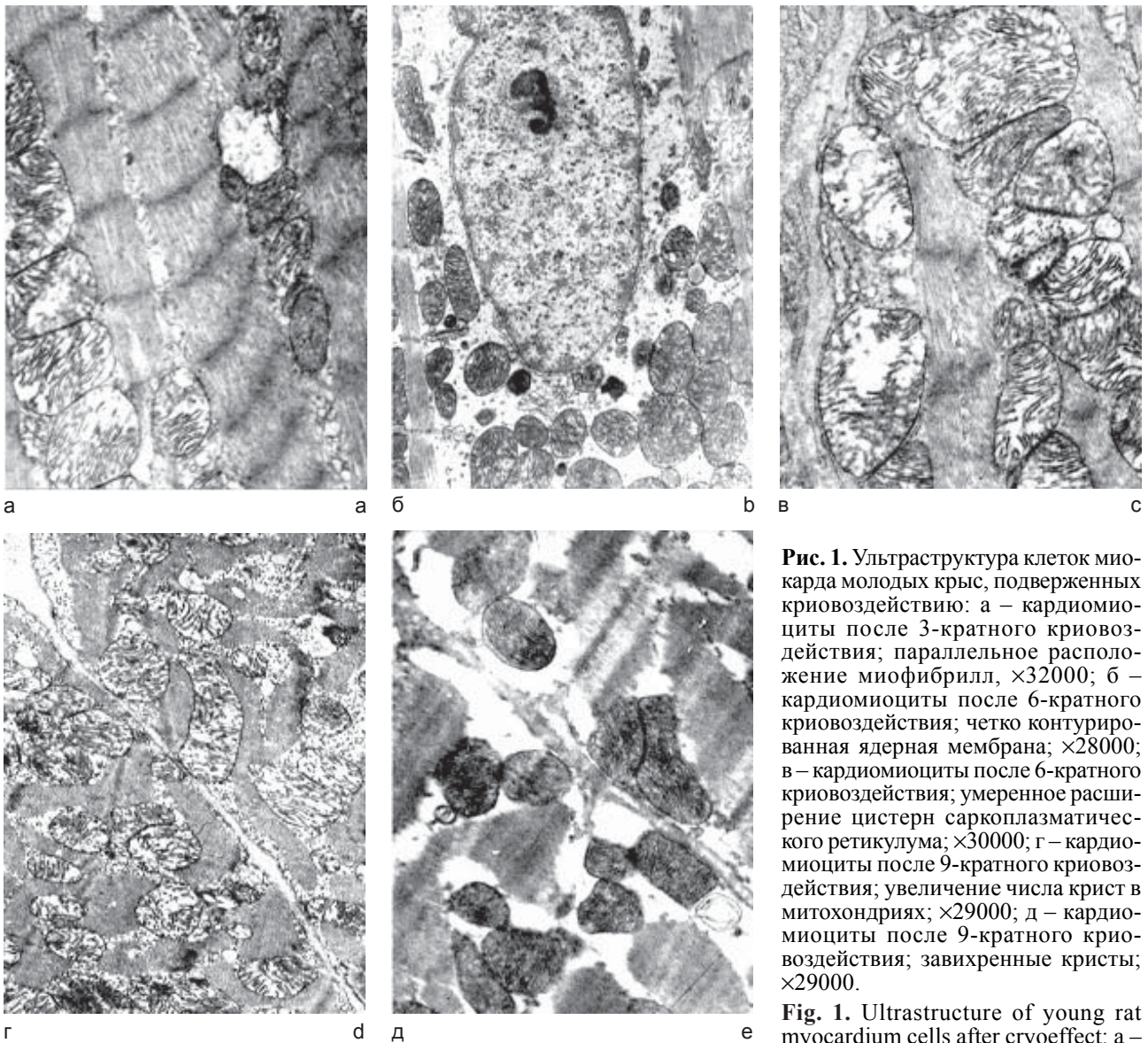


Рис. 1. Ультраструктура клеток миокарда молодых крыс, подверженных криовоздействию: а – кардиомиоциты после 3-кратного криовоздействия; параллельное расположение миофибрилл, $\times 32000$; б – кардиомиоциты после 6-кратного криовоздействия; четко контурированная ядерная мембрана; $\times 28000$; в – кардиомиоциты после 6-кратного криовоздействия; умеренное расширение цистерн саркоплазматического ретикулума; $\times 30000$; г – кардиомиоциты после 9-кратного криовоздействия; увеличение числа крист в митохондриях; $\times 29000$; д – кардиомиоциты после 9-кратного криовоздействия; завихренные кристы; $\times 29000$.

Fig. 1. Ultrastructure of young rat myocardium cells after cryoeffect: a – cardiomyocytes after 3-fold cryoeffect; parallel location of myofibrillae; $\times 32000$; b – cardiomyocytes after 6-fold cryoeffect; nuclear membrane; $\times 28000$; c – ultrastructure of cardiomyocytes after 6-fold cryoeffect; moderate expansion of sarcoplasmic reticulum cisterns; $\times 30000$; d – ultrastructure of cardiomyocytes after 9-fold cryoeffect; increase of cristis amount in mitochondria; $\times 29000$; e – ultrastructure of cardiomyocytes after 9-fold cryoeffect; whirled cristas; $\times 29000$.

parallel location of myofibrillae; $\times 32000$; b – cardiomyocytes after 6-fold cryoeffect; nuclear membrane; $\times 28000$; c – ultrastructure of cardiomyocytes after 6-fold cryoeffect; moderate expansion of sarcoplasmic reticulum cisterns; $\times 30000$; d – ultrastructure of cardiomyocytes after 9-fold cryoeffect; increase of cristis amount in mitochondria; $\times 29000$; e – ultrastructure of cardiomyocytes after 9-fold cryoeffect; whirled cristas; $\times 29000$.

пространства были одинаковой ширины. Отмечалась умеренная конденсация хроматина. Матрикс ядра имел просветленный вид (рис. 1, б). Наблюдали существенное увеличение количества крист в митохондриях. Матрикс митохондрий имел мелкогранулярное строение и среднюю электронную плотность. Наружные мембраны четко контурированы (рис. 1, в).

Значительное количество кардиомиоцитов содержали митохондрии с осмофильной наружной мембраной. Саркоплазматический ретикулум представлен большим количеством вакуолей с мелковолокнистым содержимым. Пластинчатый саркоплазматический комплекс Гольджи умеренно гипертрофирован. В саркоплазме отмечено увели-

Endotheliocyte nuclei corresponded to typical ultrastructural organization, their matrix remained electron-dense one.

Perinuclear spaces kept constant width along the whole section. Cytoplasm membrane was of distinct structure. Mitochondria comprised outer membrane and cristas. Grainy endoplasmic reticulum was well developed. On their membranes there are ribosomes and cisterns were moderately widened. In cytoplasm of endothelial out-growings there were observed multiple micropinocytotic vesicles.

After 9-fold of maintaining young rats in the chamber with the temperature of -120°C there were found the changes characteristics for the activation of intracellular metabolic processes.

чение количества гранул гликогена, рибосом и полисом. Саркоплазматическая мембрана без существенных изменений.

Ультраструктурная организация эндотелиоцитов кровеносных капилляров изменениям не подвергалась. Дистрофических и деструктивных изменений субмикроскопической архитектоники эндотелиальной выстилки кровеносных капилляров не выявлено.

Ядра эндотелиоцитов соответствовали типичной ультраструктурной организации, их матрикс оставался электронно-плотным.

Перинуклеарные пространства сохраняли постоянную ширину на всем протяжении среза. Цитоплазматическая мембрана имела четкую структуру. Митохондрии содержали четко контурируемую наружную мембрану и кристы. Зернистый эндоплазматический ретикулум умеренно развит. На его мембранах присутствовали рибосомы, а цистерны были умеренно расширенными. В цитоплазме отростков эндотелиоцитов наблюдались многочисленные микропиноцитозные пузырьки.

После девятикратного пребывания молодых крыс в камере с температурой -120°C наблюдались изменения, характерные для активации внутриклеточных метаболических процессов.

Ядра кардиомиоцитов содержали преимущественно деконденсированный хроматин. Его гранулы диффузно распределялись по площади среза ядра. Ядерная мембрана приобрела четко контурированную структуру. Перинуклеарные пространства сохраняли постоянную ширину. Митохондрии имели большое количество крист. Матрикс митохондрий обладал умеренной электронной плотностью и мелкозернистой структурой. Наружные мембраны митохондрий четкие, без очагов деструкции (рис. 1, г). Сохранялось умеренное просветление саркоплазмы. Значительное количество митохондрий, располагающихся в виде скоплений, имело завихренные кристы (рис. 1, д). Цистерны саркоплазматического ретикулума несколько уплощены и электронно-прозрачны. На их мембранах выявлено множество рибосом. В саркоплазме присутствовали гранулы гликогена, рибосомы, полисомы. Следует отметить увеличение толщины миофибрилл.

Ядра эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда молодых крыс имели вытянутую форму. Ядерная мембрана четкая, без очагов деструкции. Перинуклеарные пространства не расширены. Ядерный хроматин частично конденсирован, его гранулы располагались преимущественно в периферических отделах матрикса ядра, который обладает умеренной электронной плотностью.

Пластинчатый цитоплазматический комплекс Гольджи существенно гипертрофирован, стопки его гладких параллельно ориентированных мем-

Nuclei of cardiomyocytes contained mainly decondensed chromatin. Its granules were diffusively spread along the area of nucleus section. Nuclear membrane gained a distinct structure. Perinuclear spaces kept a constant width. Mitochondria had a big number of cristas. Mitochondria matrix possessed a moderate electron density and small-grain structure. Mitochondria outer membranes are sharply defined with no destruction foci (Fig. 1, d). Moderate enlightenment of sarcoplasm was observed. Significant number of mitochondria located as clusters had whirling cristas (Fig. 1, f). Cisterns of sarcoplasm reticulum are somewhat flattened and electron-transparent. On their membranes there are found lots of ribosomes. In sarcoplasm there were present the granules of glycogen, ribosomes, polysomes. Some increase in microfibrillae width should be noted.

Nuclei of endotheliocytes of myocardium blood capillaries of young rats were of elongated shape. Nuclear membrane was distinct with no destruction foci. Perinuclear spaces were not widened.

Nuclear chromatin was partially condensed, its granules were partially condensed, its granules were mainly located in peripheral compartments of nucleus matrix, which possessed a moderate electron density.

Laminar cytoplasm Golgi complex is considerably hypertrophied, piles of its smooth parallel oriented membranes were surrounded with electron-transparent small vesicles. In localization site of Golgi complex there were found primary lisosomes. Cytoplasm of endotheliocytes contained lots of ribosomes and polysomes and possessed an average electron density. In nuclei there were 1-2 nucleoli. Endotheliocyte mitochondria as well as granular endoplasm reticulum had a typical for these cells structure.

Narrow band of endotheliocyte out-growings of blood capillaries were filled with multiple micro-pinocytotic vesicles. Cytoplasm membrane was with no destruction foci.

In the group of aged rats not subjected to cryoeffect ultrastructural organization of cardiomyocytes and endotheliocytes of blood capillaries had vividly manifested changes in organelles, characteristic for an ageing organism.

Nuclei of cardiomyocytes of aged rats were of roundish shape. Chromatin granules were in a condensed state. Nuclear membranes were distinct with no visible destruction foci. There were observed quite deep invaginations of nuclear membrane. In perinuclear area of sarcoplasm there was located significantly reduced laminar Golgi complex, consisting of small amount of smooth membranes, surrounded with small electron-transparent vesicles. Between the tracts of microfibrillae there were widened cisterns of sarcoplasm reticulum and T-system, filled with electron-transparent substance. Mitochondria possessed polymorphism.

бран окружены множеством электронно-прозрачных мелких везикул. В области локализации комплекса Гольджи видны первичные лизосомы. Цитоплазма эндотелиоцитов содержала много рибосом и полисом, обладала средней электронной плотностью. В ядре присутствовали 1-2 ядрышка. Митохондрии эндотелиоцитов и зернистый эндоплазматический ретикулум имели типичное для этих клеток строение.

Узкая полоска отростков эндотелиоцитов кровеносных капилляров была заполнена множеством микропинцитозных пузырьков. В цитоплазматической мембране очагов деструкции не обнаружено.

В группе старых крыс, не подвергавшихся криовоздействию, ультраструктурная организация кардиомиоцитов и эндотелиоцитов кровеносных капилляров имела ярко выраженные изменения органелл, характерные для стареющего организма (рис. 2, а).

Ядра кардиомиоцитов старых крыс имели округлую форму. Гранулы хроматина находились в конденсированном состоянии. Ядерная мембрана четкая, без видимых очагов деструкции. Наблюдались довольно глубокие инвагинации ядерной мембраны. В перинуклеарной области саркоплазмы располагался существенно редуцированный пластинчатый комплекс Гольджи, состоящий из небольшого количества гладких мембран, окруженных мелкими электронно-прозрачными везикулами. Между пучками миофибрилл находились расширенные цистерны саркоплазматического ретикулума и Т-системы, заполненные электронно-прозрачной субстанцией. Митохондрии обладали полиморфизмом.

В кардиомиоцитах отмечались различные по структуре митохондрии: одни с просветленным, почти электронно-прозрачным матриксом и многочисленными кристами; другие – имели неравномерно окрашенный матрикс с небольшими областями полной электронной прозрачности. Отдельные митохондрии содержали в матриксе миелоноподобные структуры (рис. 2, а).

В саркоплазме отдельных кардиомиоцитов обнаружены группы митохондрий с осмиофильной наружной мембраной, без деструкций и с более плотным мелкогранулярным матриксом. Часть таких митохондрий была заполнена многочисленными кристами; в другой кристы были разрушены, а в матриксе присутствовали электронно-прозрачные полости, окруженные элементарной мембраной (рис. 2, б).

Наряду с митохондриями, имевшими дегенеративные изменения, часто наблюдали митохондрии с завихренными кристами, осмиофильным матриксом и разрушенными наружными мембранами (рис. 2, в). Ультраструктурная организация

In one cardiomyocyte there were various on structure mitochondria: some of them were with enlightened, almost electron-transparent matrix, multiple cristas were found in them; others had unevenly stained matrix, in its structure small areas of complete electron transparency. Some mitochondria comprised myelin-like structures in matrix (Fig 2, a).

In sarcoplasm of some cardiomyocytes there were found the groups of mitochondria, possessing osmiophil outer membrane with no destruction and denser small granular matrix. Some of these mitochondria were filled with multiple cristas, another part contained cristas in a destroyed state. In their matrix there were formed electron-transparent cavities surrounded with elementary membrane (Fig. 2, b).

In accumulation of mitochondria along with degenerative changes the ones with whirling cristas, osmiophilic matrix and lysis of outer membranes were quite often revealed (Fig. 2, c). Ultrastructural organization of endotheliocytes had the features of dystrophic disorders as swelling of mitochondria with matrix enlightenment, loosening of intracellular membranes and plasmolemma.

Lysis foci of cytoplasm membrane were observed. In cytoplasm of out-growings of endothelial cells there were found small number of micropinocytotic vesicles.

In some endotheliocytes micropinocytotic vesicles were practically absent and hyaloplasm became an electron-transparent.

After 3 cooling sessions for aged rats in cryochamber with -120°C an ultrastructural architecture in general remained the same as in the group of control animals.

Nuclei of cardiomyocytes were of elongated shape. Nuclear membrane was distinct. Perinuclear spaces were unevenly widened.

Rate of chromatin condensation was somewhat reduced. Nucleus matrix was moderately enlightened. It should be noted that a rise in the number of cristas in mitochondria, decrease in the quantity of degeneration foci of membrane structures as well as inclusions of lipofuscin if compared with the control group.

Endotheliocytes of blood capillaries contained elongated nuclei with distinct contours of nuclear membrane and small granular matrix. Significant part of chromatin was in a condensed state. In cytoplasm of out-growings the number of micropinocytotic vesicles increased (Fig. 2, d). Endotheliocyte mitochondria contained small granular matrix and quite big amount of cristas. Granular endoplasm reticulum was well-developed on its membranes multiple ribosomes were found.

After 6 cooling sessions for aged rats in cryochamber with -120°C in submicroscopic structure of cardiomyocytes the compensatory-adaptation changes were observed.

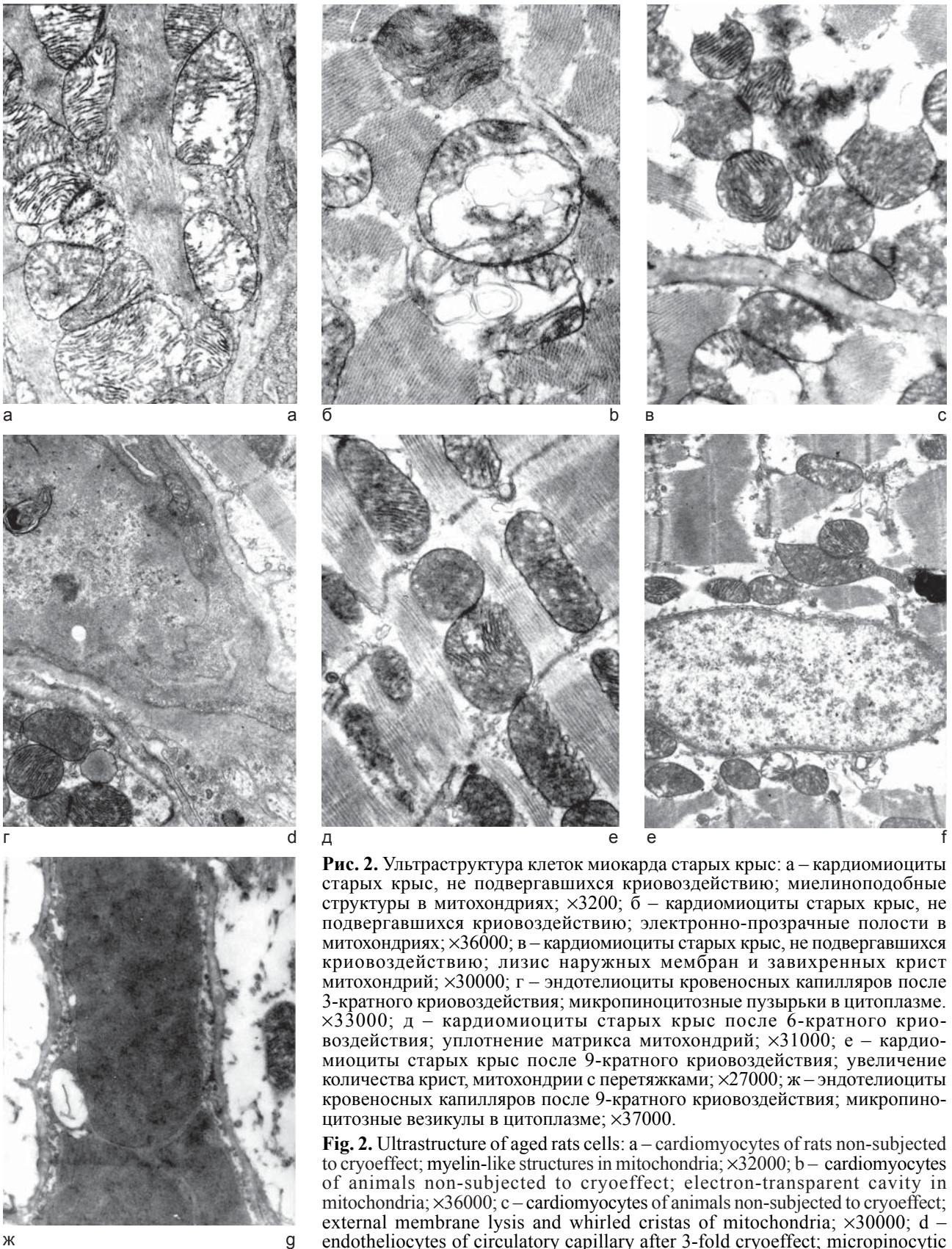


Рис. 2. Ультраструктура клеток миокарда старых крыс: а – кардиомиоциты старых крыс, не подвергавшихся криовоздействию; миелиноподобные структуры в митохондриях; $\times 3200$; б – кардиомиоциты старых крыс, не подвергавшихся криовоздействию; электронно-прозрачные полости в митохондриях; $\times 36000$; в – кардиомиоциты старых крыс, не подвергавшихся криовоздействию; лизис наружных мембран и завихренных крист митохондрий; $\times 30000$; г – эндотелиоциты кровеносных капилляров после 3-кратного криовоздействия; микропиноцитозные пузырьки в цитоплазме. $\times 33000$; д – кардиомиоциты старых крыс после 6-кратного криовоздействия; уплотнение матрикса митохондрий; $\times 31000$; е – кардиомиоциты старых крыс после 9-кратного криовоздействия; увеличение количества крист, митохондрии с перетяжками; $\times 27000$; ж – эндотелиоциты кровеносных капилляров после 9-кратного криовоздействия; микропиноцитозные везикулы в цитоплазме; $\times 37000$.

Fig. 2. Ultrastructure of aged rats cells: а – cardiomyocytes of rats non-subjected to cryoeffect; myelin-like structures in mitochondria; $\times 32000$; б – cardiomyocytes of animals non-subjected to cryoeffect; electron-transparent cavity in mitochondria; $\times 36000$; в – cardiomyocytes of animals non-subjected to cryoeffect; external membrane lysis and whirled cristas of mitochondria; $\times 30000$; д – endotheliocytes of circulatory capillary after 3-fold cryoeffect; micropinocytotic bubbles in cytoplasm; $\times 33000$; е – cardiomyocytes of animals after 6-fold cryoeffect; mitochondria matrix condensation; $\times 31000$; ф – cardiomyocytes of animals after 9-fold cryoeffect; increasing of crista's amount, mitochondria with constriction; $\times 27000$; г – endotheliocytes of circulatory capillary in animals after 3-fold cryoeffect; micropinocytotic vesicle in cytoplasm; $\times 37000$.

эндотелиоцитов имела черты дистрофических нарушений в виде набухания митохондрий с просветлением матрикса, разрыхлением внутриклеточных мембран и плазмолеммы.

Наблюдала очаги лизиса цитоплазматической мембраны. В цитоплазме отростков эндотелиальных клеток обнаруживалось небольшое количество микропиноцитозных везикул.

В отдельных эндотелиоцитах микропиноцитозные пузырьки практически отсутствовали, а гиалоплазма становилась электронно-прозрачной.

После 3-х сеансов охлаждения старых крыс в криокамере с температурой -120°C ультраструктурная архитектура в общих чертах оставалась такой же, как и в группе контрольных животных.

Ядра кардиомиоцитов имели вытянутую форму. Ядерная мембрана четкая. Перинуклеарные пространства неравномерно расширены.

Несколько снижалась степень конденсации хроматина. Матрикс ядра умеренно просветлен. Следует отметить увеличение количества крист в митохондриях, уменьшение количества очагов дегенерации мембранных структур, а также включений липофусцина в сравнении с контрольной группой.

Эндотелиоциты кровеносных капилляров содержали вытянутые ядра с четко контурируемой ядерной мембраной и мелкозернистым матриксом. Значительная часть хроматина находилась в конденсированном состоянии. В цитоплазме отростков увеличивалось количество микропиноцитозных пузырьков (рис. 2, г). Митохондрии эндотелиоцитов содержали мелкозернистый матрикс и довольно большое количество крист. Гранулярный эндоплазматический ретикулум хорошо развит, на его мембранах выявлялись многочисленные рибосомы.

После шести сеансов охлаждения старых крыс в криокамере с температурой -120°C в субмикроскопическом строении кардиомиоцитов наблюдались компенсаторно-адаптационные изменения (рис. 2, д).

Митохондрии в кардиомиоцитах располагались равномерными рядами вдоль миофибрилл, на их наружных мембранах очагов деструкции не наблюдалось. Матрикс митохондрий приобретал среднюю электронную плотность и содержал небольшое количество лизированных крист (рис. 2, е). Цистерны эндоплазматического ретикула менее расширены по сравнению с контрольными старыми крысами. В саркоплазме наблюдали группы рибосом и полисом. Уменьшилось количество включений липофусцина.

В ядрах эндотелиальных клеток наблюдалась деконденсация хроматина. Ядерная мембрана образовывала довольно глубокие инвагинации.

Mitochondria in cardiomyocytes were located by even rows along microfibrillae. Their outer membranes did not practically change the destruction foci. Mitochondria matrix gained an average electron density and contained small number of the cristas under lysis (Fig. 2, e). Cisterns of endoplasm reticulum became less widened. In sarcoplasm the groups of ribosomes and polysome were revealed. The number of lipofuscin inclusions decreased.

In nuclei of endothelial cells there was observed chromatin decondensation. Nuclear membrane formed quite deep invaginations. Mitochondria gained moderately enlightened small granular matrix with unchanged cristas. Endoplasm reticulum was well developed.

The number of ribosomes of both membrane bound endoplasm reticulum and free-laying in cytoplasm sharply increased. The concentration of micropinocytotic vesicles in cytoplasm of endotheliocytes out-growings considerably enhanced.

After 9 cooling sessions in cryochamber at -120°C in aged rats along with dystrophic processes the adaptation-compensatory and reparative ones developed.

Cardiomyocyte nuclei gain an incorrect shape. Nuclear membrane had deep invaginations. In perinuclear sarcoplasm zone there were present multiple organelles and membranes of sarcoplasm reticulum with adhered to them ribosomes. There was noted a decrease in the rate of condensed chromatin.

Mitochondria possessed small granular matrix, average electron density and had quite a big number of cristas.

It should be emphasised that in this group of animals there have been appeared mitochondria with strangulation having a dumbbell shape (Fig. 2, f)

Some mitochondria were subjected to generative changes. In a whole the number of destructions of cardiomyocytes organelles was significantly less than in the group of intact aged rats.

Endotheliocytes of myocardium blood capillaries gained typical ultrastructural organization. In cytoplasm of endothelial cell out-growings there were present multiple micropinocytotic vesicles (Fig. 2, g).

Performed electron-microscopic study of the dynamics of the changes in ultrastructural organization of cardiomyocytes and endotheliocytes of blood capillaries of young rat's myocardium after 3-9 cooling sessions in cryochamber -120°C revealed the development of submicroscopic re-arrangements characteristics for activation of intracellular metabolic processes.

It has been after 3-fold cryoeffect the ultrastructure of capillaries and cardiomyocytes did not undergo dystrophic and destructive changes. Moderately manifested alterations in ultrastructure should be likely referred to stress reactions. Described changes are laid

Митохондрии приобретали умеренно просветленный мелкозернистый матрикс с неизменными кристами. Эндоплазматический ретикулум развит хорошо.

Резко увеличивалось число рибосом как связанных с мембранами эндоплазматического ретикула, так и свободно лежащих в цитоплазме. Значительно увеличивалась концентрация микропиноцитозных пузырьков в цитоплазме отростков эндотелиоцитов.

После 9 сеансов охлаждения в криокамере у старых крыс наряду с дистрофическими процессами развивались адаптационно-компенсаторные и репаративные.

Ядра кардиомиоцитов приобретали неправильную форму. Ядерная мембрана имела глубокие инвагинации. В перинуклеарной зоне саркоплазмы присутствовали многочисленные органеллы и мембраны саркоплазматического ретикула с прикрепленными к ним рибосомами. Степень конденсации хроматина уменьшилась.

Митохондрии обладали мелкогранулярным матриксом, средней электронной плотностью и имели большое количество крист. Следует особо подчеркнуть, что в этой группе животных появляются митохондрии гантелевидной формы с перетяжками (рис. 2, е).

Наблюдали отдельные митохондрии с дегенеративными изменениями. В целом количество выявленных нарушений в органеллах кардиомиоцитов этой группы животных было существенно меньшим, чем в группе интактных старых крыс.

Эндотелиоциты кровеносных капилляров миокарда приобретали типичную ультраструктурную организацию. В цитоплазме отростков эндотелиальных клеток присутствовали многочисленные микропиноцитозные пузырьки (рис. 2, ж).

Проведенное электронно-микроскопическое исследование динамики изменений ультраструктурной организации кардиомиоцитов и эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда молодых крыс после 3, 6 и 9 сеансов охлаждения в криокамере с температурой -120°C выявило развитие субмикроскопических перестроек, характерных для активации внутриклеточных метаболических процессов.

Установлено, что после 3-кратного криовоздействия ультраструктура капилляров и кардиомиоцитов не претерпевала дистрофических и деструктивных изменений. Умеренно выраженные изменения ультраструктуры, вероятно, следует отнести к стрессорной реакции. Описанные изменения лежат в физиологических пределах и свидетельствуют о протекании процессов компенсаторной адаптации.

within physiological limits and testify to the proceeding of compensatory adaptation processes.

With an increase in the number of cryoeffect sessions there was observed activation of metabolic intracellular processes that structurally was expressed in a rise of the number of mitochondria cristas, amount of decondensed chromatin, glycogen granules, ribosomes and polysomes as well as nucleoli in nucleus matrix.

Investigations of myocardium of intact aged animals revealed the presence of dystrophic and destructive impairments of organelles, characteristic for an ageing organism. Cardiomyocyte mitochondria has a great polymorphism. Part of mitochondria was very swollen with enlightened matrix. There were found mitochondria of various degeneration stages accompanying the cristas lysis and formation of myelin-like structures testifying to a degree of hypoxic damages. In cardiomyocytes there was observed quite a high activity of catabolic processes that structurally manifested in the presence in sarcoplasm of lipid inclusions and secondary lysosomes, filled with lipofuscin. Endotheliocytes of myocardium blood capillaries as well are subjected to the same changes

Depicted ultrastructural architecture of cardiomyocytes of aged rats after 9-fold placing them into the chamber with the temperature of -120°C the rearrangements of compensatory type are observed: an increase in the quantity of mitochondria and cristas in them, decrease of the number of destruction foci and mitochondria degeneration, pointing to a rise in the rate of redox reactions. Mitochondria renewal processes activated, that structurally was manifested in appearance of organelles with strangulation, testifying to their division. In sarcoplasm there have been appeared ribosomes, polysomes and glycogen granules, pointing to a rise in metabolic activity of cardiomyocytes. The number of lipofuscin and mitochondria with membrane destruction was reduced.

In ultrastructural organization of endotheliocytes of blood capillaries compensatory and regenerative processes activated, that indirectly is confirmed with an increase of the number of granular endoplasm reticulum and ribosomes.

The activity of transcellular transport of substances and electrolytes increases, this is supported by a rise in the number of micropinocytotic vesicles in cytoplasm of endotheliocytes out-growings.

Conclusions

Ultrastructural changes of cardiomyocytes and endotheliocytes of young rats' myocardium after 3-fold cooling in cryochamber at -120°C testify to a compensatory-adaptation re-arrangement, the manifestation rate of which is within physiological limits.

С увеличением количества сеансов криовоздействия наблюдалась активация метаболических внутриклеточных процессов, которая подтверждается увеличением количества крист митохондрий, количества деконденсированного хроматина, гранул гликогена, рибосом и полисом, а также ядрышек в матриксе ядра.

Исследования миокарда интактных старых животных выявили наличие дистрофических и деструктивных нарушений органелл, характерных для стареющего организма. Большим полиморфизмом отличались митохондрии кардиомиоцитов. Отдельные митохондрии были увеличены в размерах, их матрикс был менее плотным. Встречались митохондрии различных стадий дегенерации, сопровождавшейся лизисом крист и формированием миелиноподобных структур, что свидетельствовало о степени гипоксических повреждений. Наличие в саркоплазме кардиомиоцитов липидных включений липидов и вторичных лизосом, заполненных липофусцином, указывает на высокую активность катаболических процессов этих клеток. Аналогичные изменения наблюдали и в эндотелиоцитах кровеносных капилляров миокарда.

Описанную ультраструктурную архитектуру миокарда старых крыс и ее отклонение от типичной можно объяснить возрастными изменениями.

В ультраструктурной архитектонике кардиомиоцитов старых крыс после 9 сеансов охлаждения наблюдаются перестройки компенсаторного типа: увеличение количества митохондрий и крист в них, уменьшение количества очагов деструкции и дегенерации митохондрий, что указывает на рост скорости окислительно-восстановительных реакций. Появление митохондрий с перетяжками свидетельствует о процессе их деления и активации процессов обновления. В саркоплазме обнаружены рибосомы, полисомы и гранулы гликогена, что указывает на повышение метаболической активности кардиомиоцитов. Уменьшилось количество липофусцина и митохондрий с деструкциями мембран.

Увеличение количества гранулярной эндоплазматической сети и рибосом косвенно подтверждает активизацию компенсаторно-регенераторных процессов в этих клетках.

Возрастала активность трансцеллюлярного транспорта веществ и электролитов, на что указывает увеличение количества микропиноцитозных пузырьков в цитоплазме отростков эндотелиоцитов.

Выводы

Ультраструктурные изменения кардиомиоцитов и эндотелиоцитов миокарда молодых крыс после 3-кратного охлаждения в криокамере при темпера-

With a rise in the number of cryotherapy sessions the amount of micropinocytotic vesicles in cytoplasm of endotheliocytes out-growings of blood capillaries increases, intracellular metabolic reactions activate with simultaneous strengthening of transcellular transport of substances and electrolytes via capillary wall.

In ultrastructural organization of aged rats' myocardium there were found dystrophic and destructive impairments of subcellular structures as the destruction of membranes and degeneratively altered organelles as well as the presence of a big number of lipofuscin.

Nine-fold cooling of aged rats in cryochamber with the temperature of -120°C decreases the number of membrane destructions of degeneratively changed organelles and lipofuscin inclusions. There is observed the activation of reparative intracellular processes and transcellular transport of substances via capillary wall. There is observed the activation of reparative intracellular processes and transcellular transport substances via capillary wall. Activity of bioenergetic providing of metabolic processes enhances.

Positive effect of cryotherapy on aged rats has been revealed and it is not accompanied with a complete recovery of submicroscopic architecture of cardiomyocytes and endotheliocytes of blood capillaries.

Analysis of the change in myocardium ultrastructures points to the possibility of cryotherapy use as a powerful stimulating factor increasing myocardium activity.

References

1. Babijchuk V.G. Age peculiarities of lipid peroxidation in rats after extreme cryoeffects // *Problems of Cryobiology.*— 2006.— Vol. 16, N1.— P. 32-34.
2. Babijchuk V.G., Marchenko V.S., Babijchuk G.A. et al. Structural and functional effect mechanisms of extreme cooling on hypothalamus thermoregulatory centers // *Problems of Cryobiology.*— 2004.— N2.— P. 62-70.
3. Babijchuk G.A., Marchenko V.S., Pastukhov Yu.F. et al. To the mechanisms of BBB permeability regulation of cooled brain // *Problems of Cryobiology.*— 1995.— N1.— P. 3-10.
4. Babijchuk G.A., Marchenko V.S. Trigger function of blood brain barrier in neurotransmitter mechanisms of thermoregulation during hypothermia and hibernation // *Problems of Cryobiology.*— 1997.— N1-2.— P. 72-77.
5. Marchenko V.S., Babijchuk G.A., Shilo A.V. et al. To the of BBB permeability regulation of cooled brain. Report 3. Nitrogen oxide (II) is one of the triggers of blood brain barrier permeability in the structure of ultraslow controlling system of an organism // *Problems of Cryobiology.*— 1995.— N1.— P. 10-19.
6. Marchenko V.S., Babijchuk G.O., Marchenko L.M. To fractal mechanisms of structural and functional state of thermoregulation centers during hypothermia and hibernation // *Problems of Cryobiology.*— 2005.— Vol. 15, N3.— P. 503-508.

Accepted in 11.05.2006

туре -120°C вызывает компенсаторно-адаптационную перестройку, степень выраженности которой находится в физиологических пределах.

Охлаждение животных в криокамере приводит к увеличению количества микропиноцитозных везикул в цитоплазме отростков эндотелиоцитов кровеносных капилляров, что может свидетельствовать об активировании внутриклеточных метаболических реакций, усилении транспорта веществ и электролитов через капиллярную стенку.

В миокарде старых крыс выявлены деструкции мембран и дегенеративно измененные органеллы, а также наличие большого количества липофусцина.

Девятикратное охлаждение старых крыс в криокамере с температурой -120°C приводит к уменьшению количества структурных нарушений в мембранах, а также количества дегенеративно измененных органелл и включений липофусцина. Возрастает активность биоэнергетического обеспечения метаболических процессов.

Холодовое воздействие на старых крыс не полностью восстанавливает субмикроскопическую архитектуру кардиомиоцитов и эндотелиоцитов кровеносных капилляров.

Анализ изменения ультраструктур миокарда указывает на возможность использования криотерапии как мощного стимулирующего фактора, повышающего активность миокарда.

Литература

1. *Бабийчук В.Г.* Возрастные особенности перекисного окисления липидов у крыс после экстремальных криовоздействий // Пробл. криобиологии.– 2006. – Т.16, №1.– С. 32-44.
2. *Бабийчук В.Г., Марченко В.С., Бабийчук Г.А. и др.* Структурно-функциональные механизмы действия экстремального охлаждения на терморегуляторные центры гипоталамуса // Пробл. криобиологии.– 2004.– №2.– С. 62-70.
3. *Бабийчук Г.А., Марченко В.С., Пастухов Ю.Ф. и др.* К механизмам регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера охлажденного мозга. Сообщение 1// Пробл. криобиологии.– 1995.– №1.– С. 3-10.
4. *Бабийчук Г.А., Марченко В.С.* Триггерная функция гематоэнцефалического барьера в нейротрансмиттерных механизмах терморегуляции при гипотермии и гипертермии // Пробл. криобиологии.– 1997.– №1-2.– С. 72-77.
5. *Марченко В.С., Бабийчук Г.А., Шило А.В. и др.* К механизмам регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера охлажденного мозга. Сообщение 3. Оксид азота (NO) – один из триггеров проницаемости гематоэнцефалического барьера в структуре сверхмедленной управляющей системы организма? // Пробл. криобиологии.– 1995.– №3.– С. 10-19.
6. *Марченко В.С., Бабийчук Г.О., Марченко Л.М.* До фрактальних механізмів структурно-функціонального стану центрів терморегуляції при гіпотермії і гібернації // Пробл. криобиологии.– 2005. – Т. 15, №3.– С. 503-508.

Поступила 11.05.2006