

УДК 615.832.9:612.111.085.1

О.В. Кудокоцева^{1*}, И.Ф. Коваленко², И.И. Ломакин¹, Г.А. Бабийчук¹

Продолжительность общего аэрокриовоздействия (–120°C) влияет на некоторые свойства эритроцитов мыши

UDC 615.832.9:612.111.085.1

O.V. Kudokotseva^{1*}, I.F. Kovalenko², I.I. Lomakin¹, G.A. Babijchuk¹

Duration of Whole-Body Air-Cryo-Exposure (–120°C) Affects Some Properties of Murine Erythrocytes

Реферат: В работе изучали влияние общего аэрокриовоздействия (АКВ) (–120°C) в криокамере для экспериментальных животных на популяционный состав, осмотическую хрупкость и уровень гемолиза эритроцитов периферической крови (ПК) мышей. Анализ полученных результатов показал, что продолжительность одного сеанса АКВ (40, 60 и 90 с) влияет на качественный и количественный состав эритроцитов: снижение их общего количества в ПК, в частности дискоцитов, значимое увеличение доли обратимо измененных форм (стоматоцитов). Общее АКВ приводило к повышению осмотической хрупкости и усилению гемолиза эритроцитов. Через час после АКВ не происходит нормализации количественного и популяционного состава эритроцитов ПК мышей. Исходя из полученных нами результатов по влиянию охлаждения организма на степень гемолиза эритроцитов можно констатировать, что более длительное (60 и 90 с) пребывание животных при температуре –120°C оказывает меньшее воздействие на эритроциты, чем кратковременное общее экстремальное охлаждение в течение 40 с.

Ключевые слова: аэрокриотерапия, эритроциты, форма эритроцитов, осмотическая хрупкость, гемолиз, мыши.

Реферат: У роботі вивчали загальний аерокріовплив (АКВ) (–120°C) у криокамері для експериментальних тварин на популяційний склад, осмотичну крихкість і рівень гемолізу еритроцитів периферичної крові (ПК) мишей. Аналіз отриманих результатів показав, що тривалість одного сеансу АКВ (40, 60 та 90 с) впливає на якісний та кількісний склад еритроцитів: зниження їх загальної кількості у ПК, зокрема дискоцитів, значне збільшення частки оборотнозмінених форм (стоматоцитів). Загальне АКВ приводило до підвищення осмотичної крихкості та посилення гемолізу еритроцитів. Через годину після АКВ не відбувається нормалізації кількісного та популяційного складу еритроцитів ПК мишей. Виходячи з отриманих нами результатів щодо впливу охолодження організму на ступінь гемолізу еритроцитів можна констатувати, що триваліше (60 та 90 с) перебування тварин за температури –120°C чинить менший вплив на еритроцити, ніж короткочасне загальне екстремальне охолодження протягом 40 с.

Ключові слова: аерокріотерапія, еритроцити, форма еритроцитів, осмотична крихкість, гемолиз, миші.

Abstract: An influence of whole-body air-cryo-exposure (ACE) (–120°C) performed in cryochamber for experimental animals rendered on the populations, osmotic fragility and the hemolysis level in erythrocytes of peripheral blood (PB) of mice was studied. The analysis of our findings showed that the duration of one session of ACE (40, 60 and 90 sec) affected the qualitative and quantitative composition of erythrocytes, *i. e.* their total number in the PB was reduced, in particular on an account of discocytes, the part of reversibly modified forms (stomatocytes) was significantly increased. Whole-body ACE led to an increased osmotic fragility and elevated hemolysis of erythrocytes. An hour following the ACE we have not found any normalization in quantitative and population composition of erythrocytes of mice PB. Thus the observed effect, rendered by a whole-body cooling on the hemolysis in erythrocytes, enabled to state that the longer (60 and 90 sec) staying of the animals at –120°C had less impact on erythrocytes comparing to whole-body short-term extreme cooling of mice for 40 seconds.

Key words: air-cryo-therapy, erythrocytes, erythrocyte shape, osmotic fragility, hemolysis, mice.

Нормальное функционирование любой биологической системы зависит от факторов внешней среды. Так, в ответ на изменение температурного режима в организме могут возникать различные приспособительные реакции, связанные с перестройками в центральной нервной и кроветворной системах, которые, как известно, поддерживают

Normal functioning of any biological system depends on environmental factors. Particularly, temperature alterations could lead to various adaptive responses in an organism associated with rearrangements in central nervous and hematopoietic systems, which are known to maintain homeostasis and regulate metabolic processes in tissues and cells [3, 18].

¹Отдел криофизиологии, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Отдел низкотемпературного консервирования, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:

ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52,
электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

Поступила 15.11.2016

Принята в печать 23.01.2017

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

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

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

²Department of Low Temperature Preservation, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavskaya str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 3737435, fax: +380 57 373 5952,
e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Received November, 15, 2016

Accepted January, 23, 2017

гомеостаз и регулируют метаболические процессы в тканях и клетках [3, 17].

Адаптивные реакции организма могут иметь повреждающий характер, если длительность действия раздражителя превышает резервные возможности организма. Резкие колебания температуры окружающей среды могут приводить к развитию патологических процессов в организме, оказывать существенное влияние на клеточные мембраны [10, 17]. С целью предотвращения вышеуказанных негативных эффектов температурного фактора следует учитывать продолжительность его воздействия на организм. В настоящее время искусственные гипотермические состояния и криотерапия (-120°C) с определенной частотой и временем аэрокриовоздействия (АКВ) широко используются в клинической практике для повышения уровня функционирования основных регуляторных и адаптационно-приспособительных систем организма и лечения психосоматических расстройств [1, 3, 5, 11].

Сохраняющийся многие десятилетия интерес к лечебной гипотермии объясняется тем, что в различных областях медицины активно применяется метод искусственного снижения температуры тела. Метод основан на свойстве гипотермии замедлять интенсивность обменных процессов, что приводит к повышению устойчивости организма к неблагоприятным условиям и, прежде всего, к гипоксии, которая обычно сопутствует различным видам патологии [1, 3, 5, 10].

При действии на организм экстремальных факторов, в частности низких и сверхнизких температур, происходят изменения гомеостатических показателей, относящихся к системе крови. Кровь, как саморегулирующаяся структура, обеспечивает способность организма противостоять экстремальным воздействиям благодаря совершенным механизмам регуляции физиологических функций, генетическому консерватизму рецепторов и пластичности исполнительного аппарата [14]. Кроме того, кровеносная система объединяет работу всех функциональных звеньев организма, задействованных в поддержании гомеостаза. Таким образом, характеристики крови могут служить чувствительными показателями стресса и быть пригодными для изучения процессов адаптации, резистентности и сохранения постоянства внутренней среды организма.

Самая многочисленная популяция форменных элементов крови (эритроциты) одной из первых включается в ответную реакцию организма на различные воздействия и факторы. В последние десятилетия установлена взаимосвязь между изменениями свойств мембран эритроцитов и характеристиками гомеостаза клеток внутренних органов [7–9, 14].

Adaptive responses appearing in an organism may gain a damaging effect, if the action of the stimulus or duration of its exposure exceed the certain limits. Sharp fluctuations in ambient temperature can lead to the development of pathological processes in the body, in particular to affect significantly cell membranes [11, 18]. Preventing the above mentioned negative effects of the temperature changes should consider the duration of its impact on the body. To date the clinicians widely apply artificial hypothermic states and cryotherapy (-120°C) utilizing a certain frequency and duration of air-cryoexposure (ACE); usually these are used both for a general improvement of the functioning of main regulators of the organism's adaptive systems, or in the cycle of treatment of psychosomatic disorders [1, 3, 6, 12].

The persistent interest within many decades to a therapeutic hypothermia is explained by the fact that in various fields of medicine the method of artificial lowering of body temperature has been widely applied. The method is based on the feature of hypothermia to slow metabolic rate, and in such a way to increase an organism resistance to adverse conditions and, above all, to hypoxia, which is usually accompanied with various pathologies [1, 3, 6, 11].

Extreme factors, in particular, low and ultra-low temperatures act on an organism resulting in the changes in homeostatic indices of the blood system. Blood is a self-regulating structure and therefore could make the body able to resist the extreme influences due to improved regulation of physiological functions, genetic conservatism of receptors and plasticity of executive apparatus [15]. Furthermore, the blood circulatory system integrates the activity of all the functional links of an organism involved into homeostasis. Thus, blood characteristics can serve as sensitive indicators of stress and could be used when studying the processes of adaptation, resistance and constancy of inner environment of the body.

The largest population of blood cells (erythrocytes) is the first one involved into the body's response to various influences and factors. Numerous recent reports described the relationship between the changes in erythrocyte membrane properties and homeostasis characteristics of the cells of internal organs [8–10, 15].

In this regard, the revealing of changes in structural-functional organization of erythrocytes under temperature stress conditions is important for investigation of the consequences appeared due to the extremely low temperatures exposure of an organism at the level of biological membranes, as well as for assessing the individual and species-specific resistance to air-cryotherapy.



В этой связи выявление изменений в структурно-функциональной организации эритроцитов при температурном стрессе имеет существенное значение для изучения последствий действия экстремально низких температур на организм на уровне биомембран, а также для оценки индивидуальной и видовой резистентности к аэрокриотерапии.

В настоящее время рекомендованной продолжительностью терапевтического воздействия при температуре -120°C на человека является 60–180 с [3, 5, 11], на крыс – 90–120 с [3]. Исследования по влиянию АКВ на мышей до сих не проводились.

Цель работы – изучить влияние продолжительности общего экстремального аэрокриовоздействия (-120°C) на осмотическую хрупкость, уровень гемолиза и соотношение форм эритроцитов мыши по индексу сферичности. Необходимость данных исследований заключалась в подборе оптимального для этих животных времени пребывания в криокамере (-120°C) с целью проведения последующих экспериментов.

Материалы и методы

Работа выполнена в осенне-зимний период на 3-месячных мышах линии СВА ($n = 34$) массой 18–20 г. Животных содержали в условиях вивария при естественном световом режиме (температура $22...24^{\circ}\text{C}$) на стандартном рационе питания.

Эксперименты проведены в соответствии с «Общими принципами работы на животных», одобренными VI Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2016) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Аэрокриовоздействие на мышей осуществляли в криокамере для экстремального охлаждения экспериментальных животных, разработанной в отделе криофизиологии ИПКиК НАН Украины [12, 18]. Для чистоты эксперимента в криокамеру помещали по одному животному. Поскольку рекомендованная средняя продолжительность одной процедуры для человека и крыс при температуре воздействия -120°C составляет 120 с [3, 5, 11], то в предварительных исследованиях мышей помещали в ячейку экспериментальной криокамеры на 120 с. Указанное время пребывания мелких грызунов в течение 120 с при температуре -120°C вызывало у них фибриллярные подергивания мышц и синюшную окраску ушной раковины, что свидетельствовало о сильном переохлаждении организма, поэтому такая продолжительность воздействия в дальнейших экспериментах не исследовалась.

Исходя из видовых различий в устойчивости животных ко многим неблагоприятным факторам,

Now, the recommended duration of therapeutic exposure with the temperature of -120°C in humans is 60–180 seconds [3, 6, 12] and in rats it is 90–120 seconds [3]. No studies on the ACE effect have been performed in mice so far.

The research aim was to study the effect of duration of whole-body extreme air-cryo-exposure (-120°C) on osmotic fragility, hemolysis level and the occurrence of mouse erythrocyte shapes estimated by sphericity index. The need of these studies consisted in the selection of the optimal for these animals time of staying in cryochamber (-120°C) to perform further investigations.

Materials and methods

The research was performed in autumn-winter period in 3-month-old CBA mice ($n = 34$), weighing 18–20 g. The animals were housed in the animal facility with natural light/dark cycle (at temperature of $22...24^{\circ}\text{C}$) and a standard diet.

The experiments were carried out in accordance with the General Principles of Experiments in Animals, approved by the 6th National Congress in Bioethics (Kyiv, 2016) and consistent with the statements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

Air-cryo-exposure of mice was performed in cryochamber for extreme cooling of the experimental animals developed at the Department of Cryophysiology of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine [4, 13]. For the independence of the experimental conditions just one animal was placed into the cryochamber. Assuming that the average duration of a single recommended procedure for humans and rats at an exposure temperature of -120°C makes 120 seconds [3, 6, 12], in preliminary studies the mice were placed into the experimental well of cryochamber for 120 seconds. The mentioned time of staying for small rodents during 120 seconds at a temperature of -120°C caused a fibrillar twitching of their muscles and bluish coloring of ears, indicating a strong overcooling of the body, due to these facts we have not used this duration of exposure in further experiments.

Based on the differences between species as for the resistance of animals to many adverse factors including cold [14], we have decided to reduce the duration of the ACE session for mice from 120 down to 90, 60 and 40 seconds.

The animals were divided into the following groups: the 1st one was the control without ACE (intact mice); the 2nd group had ACE for 40 seconds; in the 3rd one the ACE lasted 60 seconds; and in the 4th the ACE duration was 90 seconds; there were the sub-



в том числе и к холоду [13], мы решили снизить продолжительность сеанса АКВ мышей с 120 до 90, 60 и 40 с.

Животные были разделены на следующие группы: 1 – контрольная без АКВ (интактные мыши); 2 – АКВ в течение 40 с; 3 – АКВ в течение 60 с; 4 – АКВ в течение 90 с, а также подгруппы: 2А – через час после АКВ в течение 40 с; 3А – через час после АКВ в течение 60 с; 4А – через час после АКВ в течение 90 с.

У животных всех групп измеряли ректальную температуру, определяли количество эритроцитов в периферической крови (ПК), а также изучали динамику трансформации формы эритроцитов ПК. Животных выводили из эксперимента путем декапитации.

Исследования динамики трансформации эритроцитов проводили методом малоуглового рассеяния света на приборе «Криокон» (Украина), разработанном в ИПКиК НАН Украины [6]. Изучали зависимость интенсивности рассеяния света суспензией эритроцитов под углом 9° по направлению к падающему лучу от количества клеток в этой суспензии. В измерительную ячейку, содержащую 3,0 мл раствора NaCl разной концентрации (от 0,15 до 0,05 моль/л), вносили 3 мкл эритромаксы, полученной после отстаивания крови и аспирации плазмы. Все исследования проводили при температуре 37°C . Определяли количество сохранных эритроцитов (%). Распределение эритроцитов по индексу сферичности (ИС) устанавливали по зависимости осмотической хрупкости, используя физико-математическую модель гипотонического гемолиза эритроцитов в растворе непроницающего вещества [6, 19, 20]. Значения ИС прямо пропорциональны поверхностно-объемному соотношению (S/V) и характеризуют форму клеток. Преобладающие формы эритроцитов соответствовали следующим интервалам ИС: сфероциты – 1–1,3; стоматоциты – 1,3–1,7; нормальные дискоциты – 1,7–2,1; уплощенные дискоциты – 2,1–3.

Статистическую обработку полученных результатов проводили по методу Стьюдента-Фишера после проверки нормальности распределения с использованием программного обеспечения «Excel» («Microsoft», США). Различия между выборками считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Последствия действия холода на организм зависят от длительности охлаждения [3, 5, 11]. В результате действия АКВ на экспериментальных животных ректальная температура статистически незначимо снижалась во всех опытных группах сразу после проведения одного сеанса общего

groups as follows: 2A was assessed 1 hr later ACE performed during 40 seconds; the 3A subgroup was tested 1 hr after ACE lasted 60 seconds; and in 4A the indices were measured 1 hr after ACE with duration of 90 seconds.

In all the groups of animals the rectal temperature was measured, the number of erythrocytes in peripheral blood (PB) was counted, and the transformation of the shapes of PB erythrocytes was studied. The animals were sacrificed by decapitation.

The dynamics of erythrocyte transformation was investigated by small-angle light scattering with the Cryocon device (Ukraine), developed at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine [7]. The light scattering intensity in erythrocyte suspension depending on the number of cells in the suspension was studied at an angle of 9° to the falling beam. Measuring well was filled with 3.0 ml NaCl solution of various concentrations (from 0.15 to 0.05 mol/L) and 3 μl of erythrocyte mass obtained after sedimentation of blood and plasma aspiration were introduced. All the studies were carried out at a temperature of 37°C . The number of survived erythrocytes (%) was counted. Distribution of erythrocytes by sphericity index (SI) was determined using the dependence of osmotic fragility and physical-mathematical model of hypotonic hemolysis of red blood cells in the solution of non-penetrating substance [7, 19, 20]. The SI values are directly proportional to the surface-to-volume ratio (S/V), and characterize the shape of cells. The pre-dominant shapes of red blood cells corresponded to the following SI intervals: spherocytes (1–1.3), stomatocytes (1.3–1.7), normal (1.7–2.1) and flattened (2.1–3) discocytes.

The results were statistically processed by Student-Fisher test after checking the distribution normality using the Excel software (Microsoft, USA). Differences between the samples were considered as statistically significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

The consequences of cold effect on a body depend on the duration of cooling [3, 6, 12]. As a result of ACE in experimental animals their rectal temperature decreased insignificantly in all experimental groups immediately after a session of general extreme cooling at -120°C (Table 1). An hour after the ACE procedure this index restored in all experimental groups.

The blood system counts have long been used to assess the state of an organism. The study of quantitative and qualitative states of erythrocytes during hypothermia is of particular interest, since hypothermia and hypoxia increase an organism demand for oxygen [6, 9, 11].



Таблица 1. Влияние продолжительности одного сеанса в криокамере (-120°C) на ректальную температуру и количество эритроцитов в ПК мышей сразу после процедуры АКВ и через час ($n = 5, M \pm SE$)

Table 1. Effect of duration of one stay in cryochamber (-120°C) on rectal temperature and erythrocyte counts in the PB of mice immediately after the ACE and following one hour ($n = 5, M \pm SE$)

Показатели Indices	Группы Groups						
	1	2	3	4	2A	3A	4A
Ректальная температура, $^{\circ}\text{C}$ Rectal temperature, $^{\circ}\text{C}$	$37,43 \pm 0,37$	$36,89 \pm 0,33$	$37,01 \pm 0,25$	$36,93 \pm 0,27$	$37,27 \pm 0,28$	$37,53 \pm 0,19$	$37,67 \pm 0,23$
Количество эритроцитов, $10^9/\text{мл}$ Number of erythrocytes, $10^9/\text{ml}$	$7,93 \pm 0,35$	$6,21 \pm 0,47^*$	$6,56 \pm 0,24^*$	$6,78 \pm 0,51^*$	$8,79 \pm 0,27^*$	$8,64 \pm 0,21^*$	$8,69 \pm 0,35^*$

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

Note: * – statistically significant changes as compared with the control, $p < 0.05$.

экстремального охлаждения при -120°C (табл. 1). Через час после процедуры АКВ этот показатель восстанавливался у всех экспериментальных групп.

Показатели системы крови давно используются для оценки состояния организма. Изучение количественного и качественного состояния эритроцитов при гипотермии представляет определенный интерес, поскольку при гипотермии и гипоксии повышается потребность организма в кислороде [5, 8, 10].

В наших экспериментах количество эритроцитов ПК во всех опытных группах животных статистически значимо снижалось непосредственно после АКВ и увеличивалось через час после проведения экстремальной гипотермии (табл. 1).

С целью исследования возможных причин значимых изменений в количестве эритроцитов периферической крови мышей после АКВ была проведена серия экспериментов по изучению их осмотической резистентности, поскольку данные исследования отражают не только качественный состав функционирующих клеток крови и структурно-функциональное состояние их мембран, но и свидетельствуют об изменениях в других органах и тканях [7–9].

Уровень осмотической хрупкости эритроцитов принято считать величиной, численно равной концентрации NaCl, при которой происходит гемолиз 50% клеток. Полученные экспериментальные кривые осмотической хрупкости эритроцитов мыши (рис. 1–3, А) и графики плотности распределения клеток по ИС (рис. 1–3, В) показывают, что после АКВ осмотическая хрупкость эритроцитов снижается, но в разной степени. Так, 50%-й гемолиз эритроцитов мыши в контрольной группе наступает при 0,486% NaCl. После нахождения мыши в криокамере в течение 40 с 50%-й гемолиз суспен-

In our experiments, the number of erythrocytes in PB in all experimental groups of animals was significantly decreased immediately after the ACE and increased one hour later an extreme hypothermia (Table 1).

To investigate the possible causes of strong changes in the number of peripheral blood erythrocytes in mice we have carried out the studies of their osmotic resistance after the ACE, because these studies could reflect not only the qualitative composition of functioning blood cells and the structural-functional state of their membranes, but also to reveal the changes in other organs and tissues [8–10].

The level of erythrocyte osmotic fragility is assumed as numerical value of NaCl concentration in a solution where 50% hemolysis occurs. The obtained experimental curves of mouse erythrocyte osmotic fragility (Figs. 1–3A) and the diagrams of density distribution of murine erythrocytes by the SI (Figs. 1–3B) showed that following the ACE the osmotic fragility of mouse erythrocytes was reduced, but the extent varied among the groups. In particular, 50% hemolysis of mouse erythrocytes in the control group was observed in 0.486% NaCl solution. After staying of a mouse in the cryochamber for 40 seconds the 50% hemolysis of erythrocyte suspension occurred in 0.526% NaCl solution (Fig. 1A), after 60 seconds of exposure the threshold was found at 0.543% concentration (Fig. 2A), and in case of 80 seconds duration this was at 0.508% NaCl (Fig. 3A).

Normally, the majority of erythrocytes are represented by discocytes. A discocyte is highly deformable and flexible, that allows it to move in both large vessels and small capillaries. The ability to change shape may decrease as a consequence of various extreme exposures such as an abrupt alteration in ambient temperature [8, 9, 11, 15].

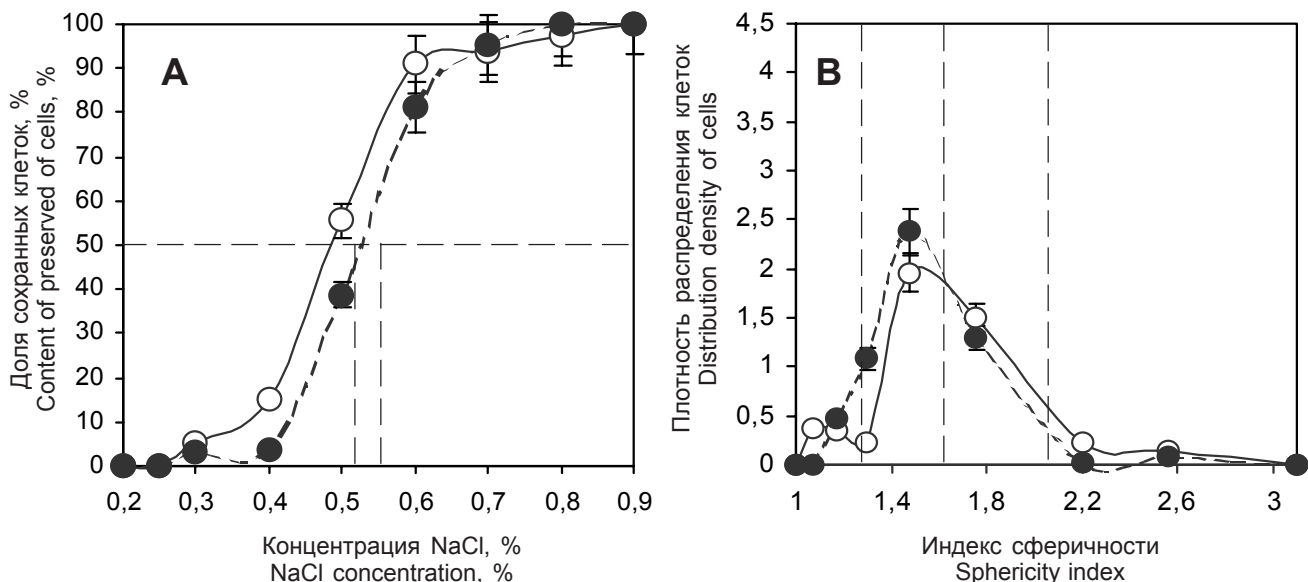


Рис. 1. Осмотическая хрупкость (А) и плотность распределения эритроцитов по индексу сферичности (В). Пребывание мыши в криокамере (-120°C) в течение 40 с: \circ – контроль; \bullet – после криокамеры.

Fig. 1. Osmotic fragility (A) and density of erythrocyte distribution by sphericity index (B). The mouse was in cryochamber (-120°C) for 40 seconds: \circ – control; \bullet – after cryochamber.

зии эритроцитов происходит при 0,526% NaCl (рис. 1, А), через 60 с – при 0,543% (рис. 2, А) и через 80 с – при 0,508% NaCl (рис. 3, А).

В норме основная масса эритроцитов представлена дискоцитами. Дискоцит обладает высокой степенью деформируемости и эластичности, что позволяет ему продвигаться в крупных сосудах и мелких капиллярах. Способность к изменению формы может снижаться при воздействии экстре-

As Table 2 shows, staying in the cryochamber for 40 seconds led to an appearance of prehemolytic shapes of erythrocytes (spherocytes), the number of those increased twice if compared to the control (Table 2).

Simultaneously, the number of normal and flattened discocytes significantly reduced, which might serve as an evidence of an increased osmotic fragility of erythrocytes in Group 2.

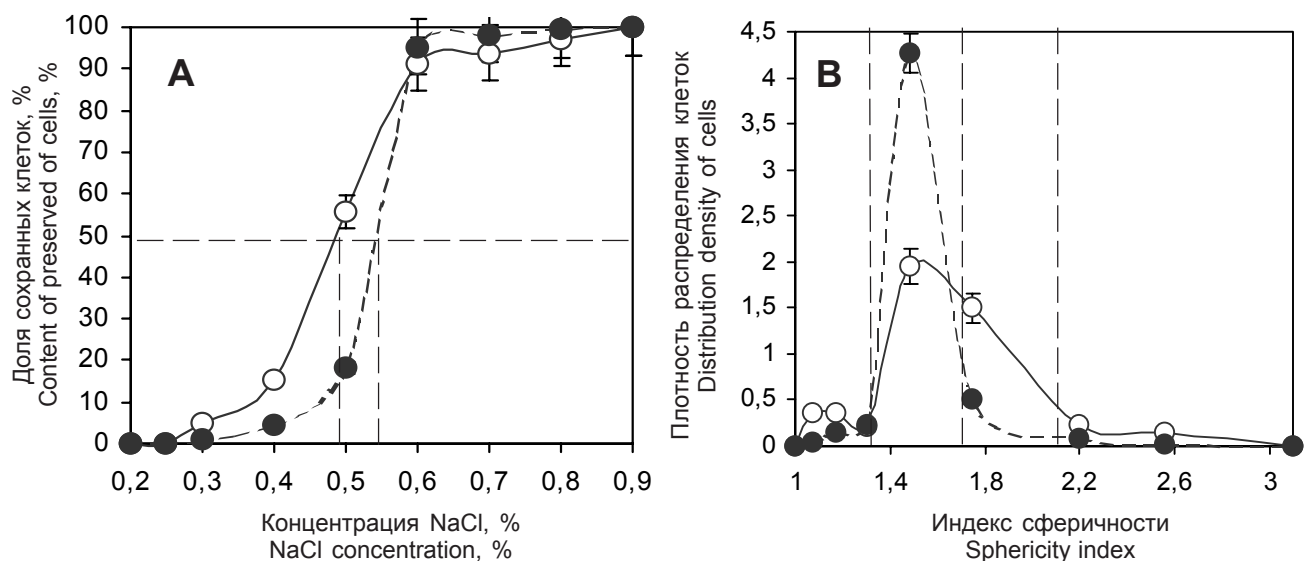


Рис. 2. Осмотическая хрупкость (А) и плотность распределения эритроцитов по индексу сферичности (В). Пребывание мыши в криокамере (-120°C) в течение 60 с: \circ – контроль; \bullet – после криокамеры.

Fig. 2. Osmotic fragility (A), density of erythrocyte distribution by sphericity index (B). The mouse was in cryochamber (-120°C) for 60 seconds: \circ – control; \bullet – after cryochamber.



мальных факторов, таких как резкое изменение температурного режима окружающей среды [7, 8, 10, 14].

Как видно из табл. 2, пребывание в криокамере в течение 40 с приводит к появлению предгемолитических форм эритроцитов (сфероцитов), количество которых увеличивается в 2 раза по сравнению с контролем (табл. 2). Одновременно с этим значительно уменьшается количество нормальных и уплощенных дискоцитов, что может служить доказательством повышенной осмотической хрупкости эритроцитов в группе 2. Через 60 с пребывания животных в криокамере при температуре -120°C популяция эритроцитов становится более однородной (рис. 2, В; табл. 2), клетки мышей группы 3 представлены в основном стоматоцитами ($(86,68 \pm 4,78)\%$) (вариант обратимой трансформации эритроцитов). Количество нормальных и уплощенных дискоцитов, а также сфероцитов (терминальная стадия развития эритроцитов, в которую переходят эхиноциты, акантоциты и стоматоциты при необратимом повреждении и естественном старении) при этом снижено ($p < 0,05$). Холодовое воздействие длительностью 90 с способствовало статистически значимому снижению содержания сфероцитов и уплощенных дискоцитов, а уровень стоматоцитов и дискоцитов не отличался от контроля (рис. 3, В; табл. 2). Через час после АКВ количество нормальных дискоцитов в группах 2А и 4А значимо не изменялось по сравнению с данными, полученными непосредственно после криотерапии, тогда как в группе 3А возрастало ($p < 0,05$) количество нормальных дискоцитов (по сравнению с группой 3).

В.В. Ломако и соавт. [13] показали, что независимо от глубины (ректальную температуру снижали до $32,5$, $27,5$ и $16,5^{\circ}\text{C}$) и способа достижения гипотермии (краниоцеребральная, общая и общая в условиях гипоксии-гиперкапнии) у крыс наблюдалось повышение осмотической хрупкости эритроцитов и усиливался их гемолиз. В то же время осталось невыясненным, как влияла длительность умеренной гипотермии на осмотическую стойкость эритроцитов периферической крови.

На основании анализа полученных экспериментальным путем кривых осмотической хрупкости мы определили уровень гемолиза эритроцитов в зависимости от времени пребывания мышей в экспериментальной криокамере с температурой -120°C (табл. 3).

Можно предположить, что степень изменения осмотической резистентности эритроцитов зависит от длительности гипотермии. Нами показано, что динамика трансформации эритроцитов не находилась в прямой зависимости от продолжительности низкотемпературного воздействия. Так, зна-

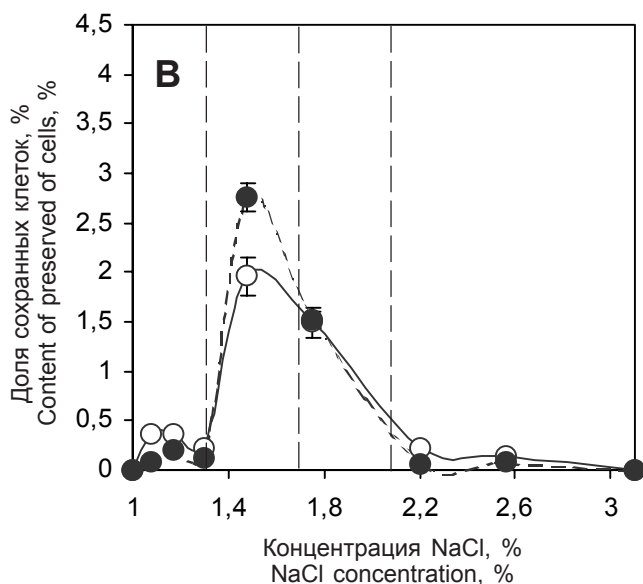
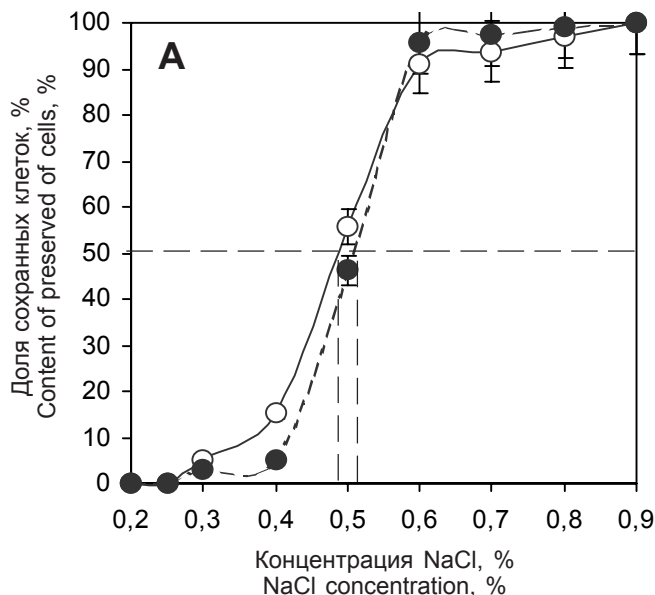


Рис. 3. Осмотическая хрупкость (А) и плотность распределения эритроцитов по индексу сферичности (В). Пребывание мыши в криокамере (-120°C) в течение 90 с: —○— — контроль; -●- - после криокамеры.

Fig. 3. Osmotic fragility (A), density of erythrocyte distribution by sphericity index (B). The mouse was in cryochamber (-120°C) for 90 seconds: —○— — control; -●- - after cryochamber.

After 60 seconds of the animals' staying in the cryochamber at -120°C the erythrocyte population was more homogeneous (Fig. 2, B; Table 2), the cells of Group 3 mice were mainly stomatocytes ($(86,68 \pm 4,78)\%$) (possible reversible transformation of erythrocytes). The number of normal and flattened discocytes as well as spherocytes (terminal stage of development of red blood cells, *i. e.* of echinocytes, acanthocytes and stomatocytes in case of irreversible damage

Таблица 2. Влияние продолжительности одного сеанса в криокамере (-120°C) на соотношение форм эритроцитов мыши по индексу сферичности сразу после процедуры АКВ и через час ($n = 5, M \pm SE$)

Table 2. Effect of duration of one stay in cryochamber (-120°C) on the ratio of murine erythrocyte shapes estimated by sphericity index immediately after the ACE procedure and following one hour ($n = 5, M \pm SE$)

Группы Groups	Формы эритроцитов Erythrocyte shapes			
	Сфероциты Spherocytes	Стоматоциты Stomatocytes	Нормальные дискоциты Normal discocytes	Уплощенные дискоциты Flattened discocytes
1	5,01 \pm 1,44	45,57 \pm 10,50	38,32 \pm 7,18	11,10 \pm 5,64
2	10,5 \pm 7,61*	61,31 \pm 5,35*	25,38 \pm 5,23*	3,28 \pm 0,49*
3	2,67 \pm 2,88*	86,68 \pm 4,78*	8,16 \pm 6,65*	2,50 \pm 1,17*
4	2,81 \pm 3,73*	63,62 \pm 15,72	29,80 \pm 16,17	3,77 \pm 1,40*
2A	5,11 \pm 2,95	63,39 \pm 9,64*	25,35 \pm 6,24*	6,15 \pm 2,44
3A	5,42 \pm 5,31	71,74 \pm 10,67*	19,99 \pm 4,86*	2,84 \pm 1,96*
4A	8,43 \pm 4,90	61,56 \pm 3,45*	24,63 \pm 2,23*	5,39 \pm 1,62*

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

Note: * – statistically significant changes as compared with the control, $p < 0.05$.

чимый гемолиз эритроцитов в группе 2 начинался уже при 0,6% NaCl и продолжал возрастать при снижении осмолярности среды (табл. 3), что могло быть связано со статистически значимым увеличением содержания сфероцитов в популяции эритроцитов непосредственно после одного сеанса АКВ (см. табл. 2). В группе 3 при снижении концентрации NaCl до 0,5% наблюдали гемолиз большей части клеток ($81,75 \pm 8,27$), тогда как в группе 4 значимых изменений уровня гемолиза эритроцитов по сравнению с контролем не регистрировалось.

Исходя из полученных нами результатов по влиянию продолжительности острого общего охлаждения организма на степень гемолиза клеток можно констатировать, что более длительное (60 и 90 с) пребывание мышей при температуре -120°C оказывает меньшее воздействие на красные клетки, чем кратковременное охлаждение животных в течение 40 с (табл. 3). Это утверждение согласуется с данными J. Selfe и соавт. [21], которые показали, что для спортсменов-регбистов продолжительность одного сеанса АКВ (2 мин) является наиболее оптимальной и воспринимается организмом лучше, чем 1 или 3 мин острой гипотермии при температуре -135°C . Сходные результаты были получены М.А.М. Аль-Рабии и соавт. [2].

appearance and natural aging) herewith was reduced ($p < 0.05$). During 90 seconds the ACE contributed to a statistically significant reduction of spherocytes and flattened discocytes amount, the level of stomatocytes and discocytes did not differ from the control (Fig. 3B; Table 2). One hour later the ACE the amounts of normal discocytes in subgroups 2A and 4A were not significantly changed in comparison with the data obtained immediately after cryo-exposure, whereas in subgroup 3A the number of normal discocytes increased ($p < 0.05$, compared with group 3).

V.V. Lomako *et al.* [14] have shown that regardless of the depth (rectal temperature was lowered down to 32.5, 27.5 and 16.5 $^{\circ}\text{C}$) and the way of achieving the hypothermia (craniocerebral, general and total under hypoxia-hypercapnia) in rats an increase of erythrocyte osmotic fragility was observed and their hemolysis strengthened. At the same time there was remained unclear how the duration of mild hypothermia affected an osmotic resistance of peripheral blood erythrocytes.

The analysis of experimental curves of osmotic fragility allowed to determine the level of hemolysis of erythrocytes depending on the duration of mice staying in experimental cryochamber with the temperature of -120°C (Table 3).

It can be assumed that the depth of change of erythrocyte osmotic resistance depended on hypothermia duration. We have shown that the dynamics of erythrocyte transformation was not directly dependent on duration of exposure to low temperature. For example, a significant hemolysis in Group 2 was observed even in 0.6% NaCl solution and continuously increased with a decrease in the medium osmolarity (Table 3) that might be associated with a statistically significant increase in the percentage of spherocytes in the population of red blood cells immediately after one session of ACE (see Table 2). In Group 3, the reduction in NaCl concentration down to 0.5% led to the hemolysis of the majority of cells (81.75 ± 8.27), whereas in Group 4 we observed no significant changes of erythrocyte hemolysis level if compared with the control.

Our findings on the issue how the duration of acute whole-body cooling affects the degree of hemolysis allowed to state that longer (60 and 90 sec) staying of mice at -120°C had less impact on their red cells if compared with a short-term cooling of the animals during 40 seconds (Table 3). This statement is consis-



Температуру тела крыс снижали в течение 30 мин до 30°C (кратковременная умеренная гипотермия), в следующих сериях экспериментов эту температуру поддерживали в течение 90 и 180 мин (продолжительная умеренная гипотермия). По мнению авторов умеренная гипотермия в течение 90 мин приводила к повышению осмотической хрупкости эритроцитов, а ее продление до 180 мин способствовало снижению этого показателя.

Осмотическая стойкость клеток – величина относительно постоянная, однако она понижается при старении клетки, повышении ее функциональной активности, в условиях патологии или экстремальных воздействиях [8]. В нашем случае изменение осмотической хруп-

кости эритроцитов экспериментальных животных могло быть связано как с повышением функциональной активности клеток вследствие повышенной потребности организма в кислороде при гипотермии [5], так и с другими следствиями экстремального холодового стресса.

Известно [15], что осмотическая хрупкость эритроцитов отражает в основном состояние цитоскелета клеток и зависит от формы клетки и соотношения ее площади поверхности к объему. Повышение осмотической хрупкости эритроцитов видимо вызвано существенным снижением доли дискоцитов и ростом количества измененных форм эритроцитов (сфероцитов). Наличие сфероцитов служит показателем степени гемолиза, поскольку эти клетки образуются в результате утраты эритроцитами части плазматической мембраны. В связи с этим клетки становятся менее осмотически стойкими, что подтверждается нашими исследованиями и данными литературы [8, 14].

Установлено, что в экстремальных условиях, к которым относится и гипотермия, снижается активность антиоксидантной системы, усиливаются и становятся неконтролируемыми процессы перекисного окисления липидов, что приводит к модификации липидов и белков плазмы крови, мембран эритроцитов и, в конечном счете, к гемолизу последних [4, 16, 17].

М.А. Sroug и соавт. [22] подвергали эритроциты крыс инкубации с оксидантами (H₂O₂, аскорбат/Fe²⁺) с целью повышения их осмотической хрупкости. Полученные в работе данные позволили пред-

Таблица 3. Гемолиз эритроцитов мыши после нахождения в криокамере (–120°C) в течение 40, 60 и 90 с ($n = 5, M \pm SE$)

Table 3. Hemolysis of mouse erythrocytes after animal's stay in cryochamber (–120°C) for 40, 60 and 90 seconds ($n = 5, M \pm SE$)

Концентрация NaCl, % Concentration of NaCl, %	Группы Groups			
	1	2	3	4
0,2	100	100	100	100
0,3	94,32 ± 3,28	97,02 ± 0,37	99,23 ± 1,23	97,20 ± 1,40
0,4	81,93 ± 8,18	96,23 ± 0,71	95,42 ± 1,67	94,85 ± 1,77
0,5	36,62 ± 13,11	61,29 ± 6,45*	81,75 ± 8,27*	53,72 ± 12,35
0,6	5,73 ± 1,75	18,55 ± 8,85*	4,79 ± 4,01	4,12 ± 4,12
0,7	5,37 ± 1,31	4,66 ± 4,38	1,74 ± 1,7*	2,54 ± 2,54
0,8	1,65 ± 1,65	0,07 ± 0,07	0,33 ± 0,33	0,68 ± 0,67
0,9	-	-	-	-

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

Note: * – statistically significant changes as compared with the control, $p < 0.05$.

tent with the data of J. Selfe *et al.* [21] who showed that for rugby players the duration of one ACE session (2 minutes) was the most optimal, and perceived by their organism better than 1 or 3 minutes of an acute hypothermia at a temperature of –135°C.

Similar results were reported by M.A.M. Al-Rabia *et al.* [2]. Body temperature of rats was reduced within 30 min down to 30°C (short-term moderate hypothermia), in the following series of experiments this temperature was maintained for 90 and 180 minutes (prolonged moderate hypothermia). According to the study, moderate hypothermia for 90 minutes resulted in an increase of osmotic fragility of erythrocytes, and its prolongation up to 180 minutes allowed to reduce this value.

Cell osmotic resistance is a considerably constant value, nevertheless it decreases with the aging of cells, following its functional activation, as well as under pathology conditions or due to the extreme exposures [9]. In our case, an altered osmotic fragility of erythrocytes of experimental animals could be related both to a rise in functional activity of the cells resulted from an increased oxygen demand of an organism during hypothermia [6], as well as other consequences of extreme cold stress.

It is known [16] that an osmotic fragility of erythrocytes mainly reflects the state of cytoskeleton of cells as well as cell shape and depends on the surface-to-volume ratio. Rise in osmotic fragility of red blood cells is probably caused by significant reduction in the content of discocytes and elevated number of erythrocytes with altered shapes (spherocytes). Presence of spherocytes

положить, что активация процессов окислительных повреждений мембраны эритроцитов может быть основной причиной повышения осмотической хрупкости эритроцитов после гипотермии. Изменение осмотической хрупкости эритроцитов в динамике гипотермии, по мнению авторов, прямо зависит от состояния тиоловых групп белков мембраны эритроцитов. В результате этой работы также было установлено, что пролонгирование гипотермии способствовало нормализации как осмотической стойкости эритроцитов, так и количества тиоловых групп в белках их мембраны. Это свидетельствует о том, что у гомойотермных организмов при пролонгировании гипотермии могут включаться механизмы адаптивных перестроек метаболических процессов на уровне отдельных клеток [2, 21].

Сопоставляя полученные нами данные о количественном и качественном составе популяции эритроцитов после одного сеанса АКВ, мы пришли к выводу, что в зависимости от продолжительности процедуры экстремальной гипотермии можно добиться не только относительной гомогенности популяции (см. табл. 2), но увеличения количества эритроцитов в ПК уже через час после ее проведения (см. табл. 1). Вероятно, что статистически значимое увеличение количества эритроцитов в ПК экспериментальных мышей после АКВ может быть связано с элиминацией в результате гемолиза старых и трансформированных форм красных кровяных клеток и выбросом в кровяное русло ретикулоцитов.

Таким образом, исследование структурно-функциональной организации эритроцитов позволяет определить индивидуальную и видовую резистентность к воздействию экстремально низких температур и оптимальную для организма продолжительность аэрокриовоздействия. При использовании аэрокриотерапии в качестве оздоровительной или лечебной процедуры целесообразно проведение исследований для определения временного режима пребывания организма при температуре -120°C .

Выводы

1. В зависимости от продолжительности одного сеанса общего АКВ (40, 60 и 90 с) (-120°C) наблюдаются различные по степени выраженности изменения в количественном и качественном составе эритроцитов экспериментальных животных: снижается как общее количество эритроцитов ПК, так и количество дискоцитов, значимо увеличивается доля обратимо измененных форм (стомаатоцитов).

2. Экстремальное АКВ способствует повышению осмотической хрупкости и усилению гемолиза эритроцитов.

is indicative of the degree of hemolysis, as these cells are formed after erythrocytes losing the part of plasma membrane. In this connection, the cells become less osmotically resistant, as confirmed by our studies and other published reports [9, 15].

It has been found that under extreme conditions, including hypothermia, the activity of antioxidant system decreases, lipid peroxidation is getting stronger and uncontrollable, that leads to a modification of lipids and proteins of blood plasma, membranes, erythrocytes and, ultimately, to hemolysis of the latter [5, 17, 18].

M.A. Srouf *et al.* [22] incubated rat's erythrocytes with oxidants (H_2O_2 , ascorbate/ Fe^{2+}) to increase their osmotic fragility. The data obtained allowed to suggest that the activation of oxidative damage in erythrocyte membrane could be a major cause of an increased osmotic fragility of erythrocytes after hypothermia. The authors believed that altered osmotic fragility of erythrocytes in dynamics of hypothermia was directly dependent on the state of thiol groups of proteins in erythrocyte membranes. This study also demonstrated that the prolongation of hypothermia contributed to a normalization of both osmotic resistance of erythrocytes, and the number of thiol groups in proteins of their membrane. This indicated that prolonged hypothermia in homeothermic organisms could trigger the mechanisms of adaptive rearrangements of metabolic processes at the level of individual cells [2, 21].

Comparing our data on quantitative and qualitative compositions of erythrocyte population after one session of ACE, we have concluded that depending on duration of the procedure of extreme hypothermia one could achieve not only relative homogeneity of the population (see Table 2), but an increase in the number of erythrocytes in PB an hour later its performance too (see Table 1). A statistically significant increase in the erythrocyte count in PB of experimental mice after ACE was likely due to the elimination as a result of hemolysis of old and transformed shapes of erythrocytes and release of reticulocytes into the blood stream.

Thus, the study of structural-functional organization of erythrocytes enabled to determine the individual and species-specific resistance to the effect of extremely low temperatures and the duration of air-cryo-exposure being optimal for an organism. Using air-cryo-therapy as recreational or therapeutic procedures it is advisable to conduct studies to determine the duration of staying of an individual at a temperature of -120°C .

Conclusions

1. Depending on the duration of one session of general ACE (40, 60 and 90 seconds) (-120°C) different manifestation degrees of changes in quantitative and qualitative composition of erythrocytes of experimental animals were observed: both total number of erythrocytes in PB and the one of disco-



3. Через час после АКВ нормализации количественного и популяционного состава эритроцитов ПК у мышей не происходит, не зависимо от продолжительности экстремального охлаждения.

4. Кратковременное охлаждение в течение 40 с оказывает меньшее воздействие на красные кровяные клетки, чем более длительное (60 и 90 с) пребывание при температуре -120°C .

Литература

1. Алехин А.И., Денисов Л.Н., Исеев Л.Р. и др. Аэрокриотерапия в современной медицине: Практик. пособие / Под ред. И.С. Чернышева. – М.: Медицина, 2002. – С. 1–21.
2. Аль-Раби М.А., Чалабов Ш.И., Астаева М.Д., Кличханов Н.К. Осмотическая резистентность эритроцитов крыс и концентрация тиоловых групп белков их мембраны зависят от длительности умеренной гипотермии // Совр. проблемы науки и образования. – 2015. – №3. – С. 1–8.
3. Бабийчук В.Г. Влияние экстремальной криотерапии на морфофункциональное состояние центральной нервной и сердечно-сосудистой систем // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т. 15, №3. – С. 458–464.
4. Барабой В.А., Сутковой Д.А. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии. – К.: Наук. думка, 1997. – 220 с.
5. Баранов А.Ю., Кидалов А.Ю. Лечение холодом. Криомедицина. – СПб., 1999. – 272 с.
6. Гордиенко Е.А., Гордиенко О.И., Коваленко И.Ф., Розанов Л.Ф. Экспериментальное изучение кинетики гипотонического и кислотного гемолиза эритроцитов человека методом малоуглового рассеяния // Проблемы криобиологии. – 1994. – №1. – С. 32–39.
7. Зинчук В.В. Деформируемость эритроцитов: физиологические аспекты // Успехи физиол. наук. – 2001. – Т. 32, №3. – С. 66–78.
8. Кленова Н.А., Кленов Р.О. Строение, метаболизм и функциональная активность эритроцитов человека в норме и патологии. – Самара: Изд-во Самар. ун-та, 2009. – 116 с.
9. Кудокоцева О.В., Коваленко И.Ф., Ломакин И.И., Бабийчук Г.А. Коррекция анемии, развивающейся в результате токсического действия 5-фторурацила, криоконсервированными препаратами кордовой крови // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т. 24, №4. – С. 312–321.
10. Липунова Е.А., Скоркина М.Ю. Физиология крови: Монограф. исследование. – Белгород: Изд-во БелГУ, 2007. – 324 с.
11. Ломакин И.И., Кудокоцева О.В. Общая экстремальная аэрокриотерапия // Провизор. – 2006. – №3. – С. 14–16.
12. Ломакин И.И., Кудокоцева О.В., Бабийчук В.Г. Экспериментальная криокамера для изучения механизмов аэрокриотерапии лабораторных животных // Материалы VI междунар. науч.-практ. конф. «Криотерапия в России». – СПб., 2013. – С. 36–43.
13. Ломако В.В., Коваленко И.Ф., Шило А.В. Эритроциты периферической крови при разных вариантах гипотермии гомеотермного организма // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2012. – Т. 22, №4. – С. 398–409.
14. Мороз В.В., Голубев А.М., Афанасьев А.В. и др. Строение и функция эритроцита в норме и при критических состояниях // Общая реаниматология. – 2012. – Т. 8, №1. – С. 52–56.
15. Сахау Н.Р., Мирасаева Г.Х., Камиллов Ф.Х. и др. Клинико-диагностическая оценка состояния мембран эритроцитов у больных первичным хроническим пиелонефритом // Нефрология. – 2005. – Т. 9, №1. – С. 47–51.

cytes were reduced, the content of cells with reversibly modified shapes (stomatocytes) was significantly increased.

2. Extreme ACE promoted an increase in osmotic fragility and strengthening of erythrocyte hemolysis.

3. One hour later the ACE there was no normalization of quantitative and population compositions of PB erythrocytes in mice, regardless of the used duration of extreme cooling.

4. Short-time cooling during 40 seconds rendered less impact on erythrocytes than longer (60 and 90 seconds) staying at a temperature of -120°C .

References

1. Alekhin A.I., Denisov L.N., Iseev L.R. et al. Aerocryotherapy in current medicine: Practice Guideline. Moscow: Meditsyna; 2002.
2. Al-Rabeei M.A.M., Chalabov S.I., Astaeva M.D., Klichkhanov N.K. Osmotic fragility of erythrocytes and plasma membrane thiol groups concentration depends on duration of mild hypothermia in rats. *Sovremennye Problemy Nauki i Obrazovaniya* 2015; 3: 1–8.
3. Babijchuk G.O., Kozlov O.V., Lomakin I.I., Babijchuk V.G. Cryochamber for experimental cooling of laboratory animals. Patent of Ukraine № 40168, IPCA61B 18/00. 2009 March 25.
4. Babijchuk V.G. Effect of extreme cryotherapy on morphofunctional state of central nervous and cardiovascular systems. *Probl Cryobiol* 2005; 15(3): 458–464.
5. Baraboy V.A., Sutkovoy D.A. Oxidative-antioxidative homeostasis in norm and pathology. Kyiv: Naukova Dumka; 1997.
6. Baranov A.Yu., Kidalov A.Yu. Treatment by cold. *Cryomedicine*. Saint-Petersburg; 1999.
7. Gordienko E.A., Gordienko O.I., Kovalenko I.F., Rozanov L.F. Experimental studies on the kinetics of hypotonic and acidic hemolysis of human erythrocytes by the method of small angle scattering. *Probl Cryobiol* 1994; 1: 32–39.
8. Zinchuk V.V. Deformability of erythrocytes: physiological aspects. *Uspekhi Fiziologicheskikh Nauk* 2001; 32(3): 66–78.
9. Klenov N.A., Klenov R.O. Structure, metabolism and functional activity of human erythrocytes in norm and pathology. Samara: Publishing House of Samara University; 2009.
10. Kudokotseva O.V., Kovalenko I.F., Lomakin I.I., Babijchuk G.A. Correction of anemia resulting from 5-fluorouracil toxic effect using cryopreserved preparations of cord blood. *Probl Cryobiol* 2014; 24(4): 312–321.
11. Lipunova E.A., Skorkina M.Yu. Physiology of blood: Monograph. Study. Belgorod: Publ. House of Belgorod State University; 2007.
12. Lomakin I.I., Kudokotseva O.V. General extreme aero-cryotherapy. *Provisor* 2006; 3: 14–16.
13. Lomakin I.I., Kudokotseva O.V., Babijchuk V.G. Experimental cryochamber to study mechanisms of aerocryotherapy of laboratory animals. Proc. of the 6th International Scientific-Practical Conference 'Cryotherapy in Russia'. Saint-Petersburg; 2013; 36–43.
14. Lomako V.V., Kovalenko I.F., Shilo A.V. Peripheral blood erythrocytes at various types of hypothermia of homoiothermal organism. *Probl Cryobiol* 2012; 22(4): 398–409.
15. Moroz V.V., Golubev A.M., Afanasyev A.V. et al. Structure and function of red blood cell in norm and under critical conditions. *General Reanimatology* 2012; 8(1): 52–56.
16. Sakhau N.R., Mirsaeva G.Kh., Kamilov F.Kh. et al. Clinical and diagnostic assessment of the state of erythrocyte membranes

16. Таджикива Л.Т., Астаева М.Д., Исмаилова Ж.Г. и др. Влияние даларгина на свободнорадикальные процессы в крови крыс при умеренной гипотермии // Бюл. эксперимент. биологии и медицины – 2010. – Т. 150, №9. – С. 271–274.
17. Эмирбеков Э.З., Клиханов Н.К. Свободнорадикальные процессы и состояние мембран при гипотермии. – Ростов-н/Д: Изд-во Юж. федерал. ун-та, 2011. – 200 с.
18. Пат. №40168, Украина, МПК А61В 18/00. Криокамера для экспериментального охлаждения лабораторных животных / Бабійчук Г.О., Козлов О.В., Ломакін І.І., Бабійчук В.Г.: № u200812930; заявл. 06.11.2008; опубл. 25.03.2009, Бюл. №6.
19. Gordienko E.A., Gordienko Yu.E., Gordienko O.I. The physico-mathematical theory of human erythrocyte hypotonic hemolysis phenomenon // *CryoLetters*. – 2003. – Vol. 24, №4. – P. 229–244.
20. Gordiyenko O.I., Gordiyenko Yu.E., Makedonska V.O. Estimation of erythrocyte population state by the spherical index distribution // *Bioelectrochemistry*. – 2004. – Vol. 62, №2. – P. 119–122.
21. Selfe J., Jill A., Costello J.T. et al. The effect of three different (–135°C) whole body cryotherapy exposure durations on elite rugby league players // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9, №1. – e86420.
22. Srour M.A., Bilto Y.Y., Juma M., Irhimeh M.R. Exposure of human erythrocytes to oxygen radicals causes loss of deformability, increased osmotic fragility, lipid peroxidation and protein degradation // *Clinical. Hemorheol. Microcircul.* – 2000. – Vol. 23, №1. – P. 13–21.
- in patients with primary chronic pyelonephritis. *Nephrology* 2005; 9(1): 47–51.
17. Tadzhibova L.T., Astaeva M.D., Ismailova Zh.G. et al. Effects of dalargin on free radical processes in the blood of rats exposed to moderate hypothermia. *Bul Exp Biol Med* 2010; 150(9): 271–274.
18. Emirbekov E.Z., Klichkhanov N.K. Free-radical processes and state of membranes under hypothermia. – Rostov-on-Don: Southern Federal University Publ. House; 2011.
19. Gordienko E. A., Gordienko Yu. E., Gordienko O. I. The physico-mathematical theory of human erythrocyte hypotonic hemolysis phenomenon. *CryoLetters* 2003; 24(4): 229–244.
20. Gordiyenko O.I., Gordiyenko Yu.E., Makedonska V.O. Estimation of erythrocyte population state by the spherical index distribution. *Bioelectrochemistry* 2000; 62(2): 119–122.
21. Selfe J., Jill A., Costello J.T. et al. The effect of three different (–135°C) whole body cryotherapy exposure durations on elite rugby league players. *PLoS One* 2014; 9(1): e86420.
22. Srour M. A., Bilto Y.Y., Juma M., Irhimeh M.R. Exposure of human erythrocytes to oxygen radicals causes loss of deformability, increased osmotic fragility, lipid peroxidation and protein degradation. *Clin Hemorheol Microcirc* 2000; 23(1): 13–21.

