

NO-залежні механізми дії ритмічних холодових впливів на функціональну архітектуру мікрогемодинамічного русла головного мозку шурів

UDC 612.015.3:615.014.41:57.084

D.G. LUTSENKO*, V.S. MARCHENKO, V.G. BABYCHUK

NO-Dependent Mechanisms of Rhythmic Cold Exposures on Functional Architectonics of Microhemocirculatory Bed in Rat Brain

Ритмічні холодові впливи викликають підвищення концентрації нітрит-іонів у сироватці крові і корі головного мозку шурів, що призводить до перерозподілу крові в мікроциркуляторному руслі мозку. Внаслідок особливостей мікрогемодинаміки у головному мозку кількісно ці зміни можна оцінити методами фрактального аналізу.

Ключевые слова: оксид азоту, ритмічні холодові впливи, мікрогемодинаміка головного мозку, фрактальна розмірність.

Ритмические холодовые воздействия приводят к повышению уровня нитрит-ионов в сыворотке крови и коре головного мозга крыс, что влияет на перераспределение крови в микроциркуляторном русле мозга. Вследствие особенностей микрогемодинамики головного мозга количественно эти изменения можно оценить методами фрактального анализа.

Ключові слова: оксид азота, ритмічні холодові впливи, мікрогемодинаміка головного мозку, фрактальна розмірність.

Rhythmic cold exposures lead to increasing of nitrite ion concentration in rat blood serum and brain cortex, resulting in redistribution of blood in brain microcirculatory bed. Fractal analysis admits to give a quantitative assessment for this alteration.

Key words: nitrogen oxide, rhythmic cold exposure, brain microhemocirculation, fractal dimension.

Гіпотермічний вплив викликає комплекс адаптаційно-компенсаторних реакцій організму. Однією з систем, яка оперативно реагує на гіпотермію, є серцево-судинна система і, зокрема, мікроциркуляторне русло, в якому виявляються відповідні реакції організму на будь-який зовнішній і внутрішній вплив [12, 13].

Мікрогемодинамічна система головного мозку забезпечує швидкий перерозподіл крові між ділянками, не призводячи до небезпечних рівнів ішемії тканини. Але через істотні методичні труднощі, пов'язані з необхідністю реєстрації практично миттєвих змін кровотока, інтимні механізми цих процесів вивчені недостатньо [5, 12]. Відомо, що оксид азоту без перешкод проникає в ендотеліальні клітини та викликає вазодилатацію і розслаблення гладком'язових клітин і тканин, тим самим впливає на регуляцію загального периферійного опору судин і перерозподіл крові в мікроциркуляторному руслі шкіри та м'язів [5, 17]. Також було показано, що NO відіграє значну роль у механізмах підтримки температурного гомеостазу [8, 10, 14, 19]. Тому ми припускаємо, що саме NO забезпечує механізм

Hypothermic exposure causes the complex of adaptive-compensatory reactions of an organism. One of the systems which responds promptly to the hypothermia is cardio-vascular system and, in particular, microcirculatory bed wherein the appropriate reactions of an organism occur as a response to any external or internal influence [12, 13].

Brain microhemocirculatory system provides a rapid blood redistribution between the regions without appearance of any dangerous levels of tissue ischemia. However, because of essential methodological difficulties associated with the necessity of recording nearly immediate blood flow changes, the intimate mechanisms of these processes have been studied insufficiently [5, 12]. It is known that nitric oxide easily penetrate into the endothelial cells and causes vasodilatation and relaxation of smooth-muscle cells and tissues and thereby affects the regulation of general resistance of peripheral vessel and blood redistribution in microcirculatory bed of skin and muscles [5, 17]. There was also shown that NO played an important role in the mechanisms of temperature homeostasis maintenance [8, 10, 14, 19]. So we suggest that namely NO

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України, м. Харків

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

* Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:
вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015; тел.: (+38 057) 372-74-35, факс: (+38 057) 373-30-84, електронна пошта: ludg@list.ru

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 372 7435, fax: +380 57 373 3084, e-mail: ludg@list.ru

перерозподілу кровообігу в головному мозку за умов гіпотермічних впливів.

Відомі три форми NO-синтаз (NOS) – ендотеліальна (eNOS), макрофагальна (mNOS) і нейрональна (nNOS), але в цих назвах не відображено місце їх точної локалізації. Іноді тканини мозку і серця ссавців містять всі три ізоформи NOS, які навіть можуть бути розташовані в одних і тих же клітинах [16]. Відомо, що активність цих ферментів може змінюватися під впливом стресу [23], гіпоксії [15], гемодинамічного стресу зсуву [18] та інш. Оскільки для активації індукцйбельної NO-синтази (iNOS) потрібен тривалий час (4–6 годин), можна стверджувати, що у зміні концентрації кінцевих продуктів синтезу NO при ритмічних холодкових впливах (РХВ) головну роль відіграють конститутивні NO-синтази (cNOS), які функціонально пов'язані з плазматичною мембраною, постійно експресовані та забезпечують базальне вивільнення NO.

Матеріали і методи

Експерименти проводили на 6-місячних щурах-самцях відповідно до “Загальних принципів експериментів на тваринах”, схвалених I Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001) та погоджених з положенням “Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей” (Страсбург, Франція, 1986).

Сеанс ритмічних холодкових впливів (РХВ) проводили за допомогою програмованого охолоджуючого пристрою (СКТБ ІПКіК НАН України), модифікованого для переривчастого подавання хладоагента – холодного повітря з температурою $5 \pm 1^\circ\text{C}$. Ритмічні холодкові впливи ненаркотизованим тваринам проводили з періодичністю один вплив кожні 10 с тривалістю 15, 25 та 65 хв [3].

Для дослідження мікрогемодинаміки тканин головного мозку в тім'яній ділянці черепа висвердлювали отвір площею близько 1 cm^2 , тверду мозкову оболонку видаляли. Піальну судинну мережу досліджували методом вітальної мікроскопії за допомогою мікроскопа Люмам К-1 (ЛОМО, Росія), оснащеного засобами фото- і відеореєстрації [7]. Отримані зображення аналізували з використанням комп'ютерної програми “FRAM” [11], призначеної для розрахунків морфометричних характеристик об'єкта, а також фрактальної розмірності D, яка є інтегральним показником стану мікрогемодинаміки органа.

Відомо, що NO – газ з досить коротким “часом життя” (період напіввиведення складає близько 6 с [5]) і високою реакційною здатністю, тому достат-

проvides the mechanism of blood flow redistribution in brain under conditions of hypothermic exposures.

There are known three forms of NO-synthase (NOS): endothelial (eNOS), macrophagal (mNOS) and neuronal (nNOS), but these names do not reflect the place of their exact localization. Sometimes mammalian brain and heart tissues contain all three NOS isoforms which even may be located in the same cells [16]. It is known that the activity of these enzymes may change under influence of stress [23], hypoxia [15], hemodynamical shift stress [18] *etc.* As the activation of inducible NOS-synthases (iNOS) requires a long time period (4–6 hrs), we may suggest that the changes in the concentrations of NO synthesis final products under rhythmic cold exposures (RCE) are mainly stipulated by constitutive NO-synthases (cNOS) that are functionally associated with plasma membrane, are constantly expressed and provide basal release of NO.

Materials and methods

Experiments were carried-out in 6-month-old male rats according to the General Principles of Experiments in Animals approved by the 1st National Congress on Bioethics (Kiev, Ukraine, 2001) and agreed with the regulation of European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Use for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, France, 1986).

The series of rhythmic cold exposures (RCE) was carried-out with programmed cooler (Special Design and Technology Bureau at the IPC&C of the NAS of Ukraine), modified for oscilating supply of cold agent (cold air with the temperature of $5 \pm 1^\circ\text{C}$). Rhythmic cold effects in unanesthetized animals were carried-out with the periods of one exposure per 10 sec during 15, 25 and 65 min [3].

For investigation of brain tissue microhemocirculation in vertex region of cranium we drilled out the hole with square of about 1 cm^2 and removed *dura mater*. Pial vascular net was investigated by vital microscopy with the microscope Lumam K-1 (LOMO, Russia) equipped for photo- and video registration [7]. The images were analyzed with the computer program FRAM [11] developed for the estimations of object's morphometric characteristics as well as fractal dimension D which is the integral index of organ's microhemocirculatory state.

It is known that NO is the gas with short "life time" (period of semi-excretion is about 6 sec [5]) and high reactivity, therefore its stable metabolites, such as nitrate and nitrite, are usually being assessed. It is suggested that nitrite level depends not only on the activity of specific synthases but also on their distribution in different organs and tissues and the rate of nitrite ex-

ньо широко використовуються різні варіанти вимірювання його стабільних метаболітів – нітрату і нітриту. Вважається, що рівень нітриту залежить не тільки від активності специфічних синтаз, але й від їх розподілу в різних органах і тканинах та від швидкості виведення нітриту нирками, тому по концентрації кінцевих продуктів обміну NO достатньо точно можна оцінити загальний рівень продукції NO [22].

Рівень NO за вмістом нітриту (кінцевого продукту обміну NO) в сироватці крові, тканинах мозку (кора, гіпоталамус) та серці оцінювали фотометричним методом за реакцією Гресса. Зразки тканин гомогенізували у Na-фосфатному буфері, pH 7,4 при температурі 4–6°C, депротейнізували 75 ммоль/л ZnSO₄ і 55 ммоль/л NaOH у співвідношенні 1:1:1,2 за об'ємом відповідно, центрифугували 15 хв при 3000 об/хв на центрифугі PC-6 (ТНК "Дастан", Киргизстан); до 200 мкл супернатанту послідовно додавали 20 мкл 1%-го сульфонаміду (ICN, США) і 20 мкл 0,1%-го N-1-нафтилетилендіаміндігидрохлориду (ICN, США) в 5%-му розчині HCl [4]. Оптичну щільність визначали через 20 хв при 540 нм за допомогою багатоканального мікроспектрофотометра ("Flow", Велика Британія).

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою комп'ютерного пакету програм "Statistica v. 6.0". Дані представляли у вигляді $M \pm s$ і оцінювали за непараметричним критерієм Манна-Уїтні.

Результати і обговорення

Нами встановлено [6], що після проведення ритмічної гіпотермії діаметр мікросудин одного порядку практично не змінювався, на відміну від значення фрактальної розмірності (табл. 1).

У 6-місячних щурів мікрогемодинамічне русло головного мозку характеризується широкою розгалуженою мережею. Спостерігаючи за конвексальною поверхнею головного мозку при РХВ, ми неодноразово фіксували "плазматичні капіляри" [6]. Цей феномен, а також локальні зміни в кровонаповненні мікросудин впливають на розподілення значень фрактальної розмірності в полі зору, яке аналізується. Як видно з гістограм і даних аналізу селективного зображення (рис. 1), зсув середніх значень відбувається за рахунок збільшення значення фрактальної розмірності на рівні артеріол, капілярів та венул. Подібні зміни можуть пояснюватися локальним впливом оксиду азоту на міоцити мікросудин, періцити та на прекапілярні і капілярні сфінктери [5].

Для перевірки цього припущення ми визначили рівень кінцевого продукту обміну NO (нітриту) в

cretion by kidney as well. So general level of NO production can be estimated with sufficient accuracy by measuring the concentration of final metabolic products of nitric oxide [22].

Level of NO was assessed using photometric method (Griess test) by the content of nitrite (one of NO metabolic final products) in blood serum, brain tissues (cortex, hypothalamus) and heart. Tissue samples were homogenized in Na-phosphate buffer, pH 7.4 at 4–6°C, then deproteinized by 75 mmol/l of ZnSO₄ and 55 mmol/l of NaOH in ratio of 1:1:1.2 (vol/vol), accordingly, centrifuged for 15 min with 3000 rpm on centrifuge PC-6 (Dastan, Kyrgyzstan); thereafter 200 μl of supernatant were gradually supplemented with 20 μl of 1% sulfonamide (ICN, USA) and 20 μl of 0.1% N-1-naftylethylendiamine dihydrochloride (ICN, USA) in 5% HCl solution [4]. Optical density was determined in 20 min at 540 nm in the multi-channel microspectrophotometer (Flow, Great Britain).

Statistical processing of the data was carried-out with the "Statistica v. 6.0". The data were presented as $M \pm s$ and evaluated by non-parametric Mann-Whitney criterion.

Results and discussion

We have found [6] that after performing of rhythmic hypothermia the diameter of microvessel of the same order was almost not changed unlike the fractal dimension (Table 1).

Brain microhemodynamic bed of 6-month-old rats is characterized by highly branched network. Observing the convexal brain surface during RCE we repeatedly noticed the "plasmatic capillaries" [6]. This phenomenon as well as local changes in blood filling of

Таблиця 1. Морфометричні показники мікрогемодинамічного русла головного мозку щурів після РХВ

Table 1. Morphometric indices of rat brain microhemodynamic bed after RCE

Показники Indices	Контроль Control	Після РХВ After RCE
Діаметр артеріол, мкм Diameter of arterioles, μm	18–27	18–28
Діаметр прекапілярних артеріол, мкм Diameter of pre-capillary arterioles, μm	13,4 ± 4,2	14,5 ± 3,8
Діаметр посткапілярних артеріол, мкм Diameter of post-capillary arterioles, μm	15,0 ± 8,4	14,8 ± 4,7
Діаметр венул, мкм Diameter of venules, μm	20–60	22–58
Фрактальна розмірність D Fractal dimension D	1,28 ± 0,01	1,34 ± 0,04

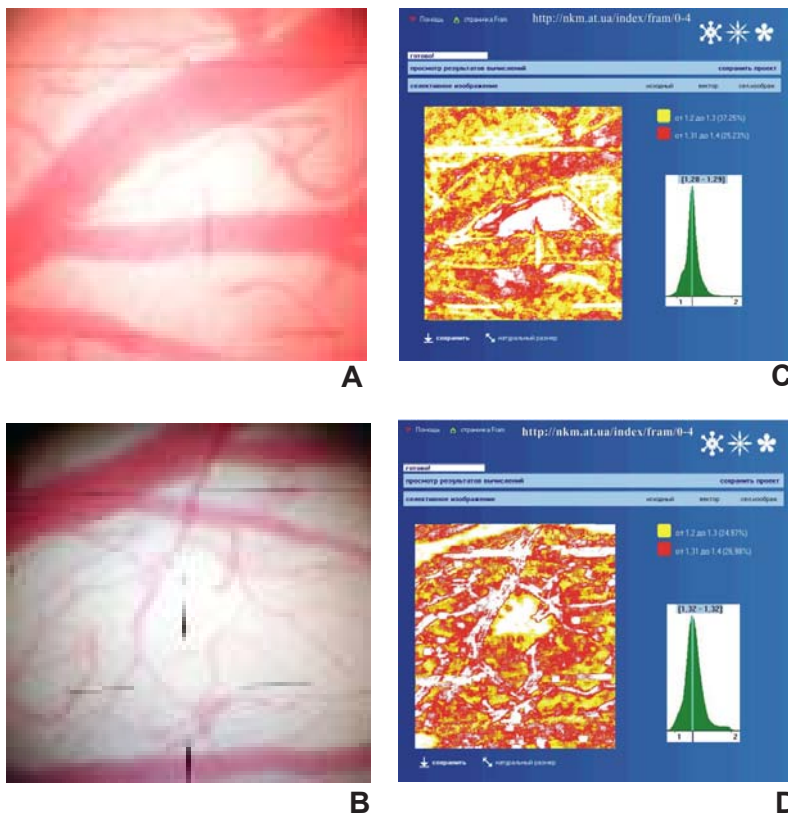


Рис. 1. Характерні ділянки мікро-циркуляторного русла м'якої оболонки головного мозку 6-місячних щурів до (А) і після (В) РХВ та їх селективні зображення з гістограмами розподілення фрактальної розмірності D до (С) (N = 188000) і після (D) (N = 266000) РХВ відповідно. Наведено у інтерфейсі програми "ФРАМ".

Fig. 1. Characteristic regions of microcirculatory bed of *pia mater* in 6-month-old rats prior to (A) and after (B) RCE and their selective figures and histograms of fractal dimension D distribution prior to (C) (N = 188000) and after RCE (D) (N = 266000), correspondingly; presented in interface of FRAM software.

ЦНС, міокарді та сироватці крові 6-місячних щурів при РХВ залежно від тривалості ритмічної гіпотермії (табл. 2).

Слід відзначити, що при всіх видах РХВ спостерігалися зниження концентрації продуктів обміну оксиду азоту в гіпоталамусі ($p < 0,01$) і підвищення у корі і сироватці крові ($p < 0,01$).

Важливо, що рівень дериватів NO в тканинах міокарда знижувався в перші 15 хв РХВ ($p < 0,01$),

microvessels affect the distribution of fractal dimension values in the analyzed vision field. As it is seen from histograms and data of selective image analysis (Fig. 1) the shift of average indices occurs due to the increase of fractal dimension value at the level of arterioles, capillaries and venules. Such changes may be explained by the local influence of nitric oxide on microvessel myocytes, pericytes and pre-capillary and capillary sphincters [5].

Таблиця 2. Концентрація нітрит-аніонів (мкмоль/л) у тканинах 6-місячних щурів після РХВ (M ± s)

Table 2. Concentration of nitrite anions (μmol/l) in tissues of 6-month-old rats after RCE (M ± s)

Групи тварин Groups of animals	Гіпоталамус Hypothalamus	Кора мозку Brain cortex	Сироватка крові Blood serum	Міокард Myocardium
Контроль Control	1,50 ± 0,18	3,73 ± 1,39	1,42 ± 0,23	1,71 ± 0,46
Контроль з L-аргініном Control with L-arginine	1,50 ± 0,11	3,23 ± 1,01	2,24 ± 0,44 ²	1,13 ± 0,22 ²
Контроль з cNOS-блокатором Control with cNOS-blocker	1,18 ± 0,15 ²	3,39 ± 0,16	2,29 ± 0,42 ²	1,20 ± 0,40 ¹
РХВ 15 хв RCE for 15 min	0,97 ± 0,18 ²	4,37 ± 0,48 ³	2,71 ± 0,19 ¹	1,02 ± 0,32 ¹
РХВ 25 хв RCE for 25 min	1,17 ± 0,16 ²	5,71 ± 0,90 ³	2,64 ± 0,07 ¹	1,55 ± 0,48
РХВ 65 хв RCE for 65 min	1,03 ± 0,28 ²	5,87 ± 1,12 ³	3,31 ± 0,36 ¹	1,44 ± 0,45

Примітка: ^{1, 2} – $p < 0,05$, $p < 0,01$ відносно контролю відповідно; ³ – $p < 0,05$ відносно контролю з cNOS-блокатором.

Note: ^{1,2} – $p < 0.05$, $p < 0.01$ as compared to the control, correspondingly; ³ – $p < 0.05$ as compared to the control with cNOS-blocker.

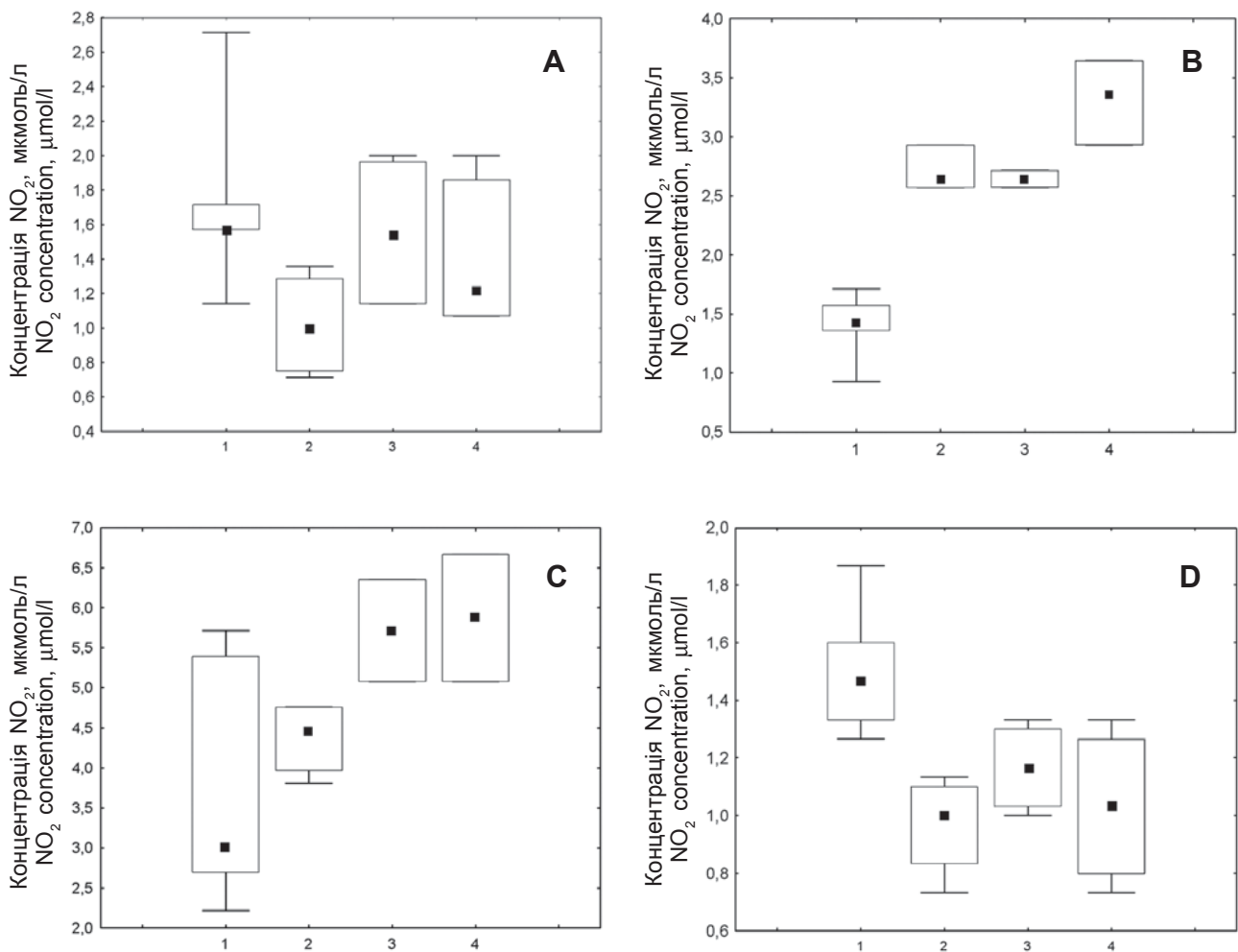


Рис. 2. Концентрація нітрит-іонів у міокарді (А), сироватці крові (В), корі головного мозку (С) та гіпоталамусі (D) щурів при РХВ різної тривалості: 1 – контроль; 2 – 15 хв РХВ; 3 – 25 хв РХВ; 4 – 65 хв РХВ; – мінімум-максимум; – 25–75%; – медіана.

Fig. 2. Concentration of nitrite ions in rat myocardium (A), blood serum (B), brain (C) and hypothalamus (D) during RCE of different duration: 1 – control; 2 – 15 min; 3 – 25 min; 4 – 65 min; – min-max; – 25–75%; – median.

а до 25 хв концентрація нітрит-іонів поверталася до рівня контрольної групи і дещо знижувалася до 65 хв РХВ (рис. 2).

Різде зниження рівня дериватів NO в міокарді після початку РХВ можна пояснити підвищеною витратою оксиду азоту тканинами серця для забезпечення адекватної адаптаційної реакції серцево-судинної системи. Відомо, що NO відіграє істотну роль у регуляції насосної функції серця, забезпечує контрактильну функцію міокарда, посилює релаксацію шлуночків і є необхідним компонентом у здійсненні альфа-адренергічного іно- і хронотропного ефектів [20]. Оскільки в нашому експерименті використовується незначний стресовий вплив на організм, то виснаження не відбувається і вже через 25 хв пул NO в міокарді практично відновлюється.

Аналізуючи підвищення концентрації продуктів обміну NO в сироватці крові (рис. 2B) при збіль-

To check this suggestion we determined the level of NO metabolism final product (nitrite) in CNS, myocardium and blood serum in 6-month-old rats after RCE depending on the duration of rhythmic hypothermia (Table 2).

It should be noted that during all types of RCE we observed the decrease of concentration of NO metabolism final products in hypothalamus ($p < 0.01$) and its increase in cortex and blood serum ($p < 0.01$).

Of importance is the fact that the level of NO derivatives in myocardium tissues decreased during the first 15 min of RCE ($p < 0.01$) and to the 25th min the nitrite ion concentration returned to the control level and decreased insignificantly till the 65th min of RCE (Fig. 2A).

A dramatic drop in level of NO derivatives in myocardium after start of RCE may be explained by the elevated expenditure of nitric oxide in heart tissues due

шенні тривалості РХВ, можна зазначити, що ця зміна прогнозована. Подібна реакція спостерігалася і при інших видах гіпотермічних впливів [1, 2, 14]. Це можна пояснити тим, що саме серцево-судинна система першою реагує на холодний подразник, і оксид азоту бере активну участь у багатьох процесах, які забезпечують адаптивну терморегуляторну відповідь за рахунок розслаблення і регуляції тону судин, контролю вивільнення нейромедіаторів. Оксид азоту може модулювати судинну функцію також за допомогою контролю за експресією генів, які відповідають за синтез vasoактивних білків, наприклад ендотелінів, фактору росту судинних клітин та інш. [5, 16, 21, 24].

Збільшення концентрації нітрит іонів у корі мозку (рис. 2С) відповідає подібному її підвищенню при штучному гіпобіотичному стані [14]. Ми вважаємо, що гіпотермічні подразнення викликають активацію довготривалої потенціації в корі, пейсмейкером для запуску якої виступає оксид азоту. У гіпоталамусі процеси довготривалої потенціації менш виражені або відсутні, тому там концентрація продуктів обміну не підвищується, а навпаки спостерігається достовірне її зниження (рис. 2D), однак цей процес вимагає подальшого дослідження.

Ми вважаємо [9], що на початкових етапах РХВ активуються cNOS ендотеліоцитів. Одночасно для підтримки оптимального рівня NO в головному мозку завдяки механізмам довгострокової потенціації стимулюється нейрональна cNOS. Імовірно, саме ці механізми обумовлюють особливості зміни мікроангіоархітекτονіки в головному мозку щурів при РХВ.

Висновки

Ритмічні холодні впливи викликають підвищення концентрації нітрит іонів у сироватці крові і корі мозку, яке призводить до перерозподілу крові в мікроциркуляторному руслі головного мозку. Внаслідок особливостей мікрогемодинаміки у головному мозку кількісно ці зміни можна оцінити методами фрактального аналізу.

Ми висловлюємо щирі подяки канд. біол. наук Слеті Ірині Вадимовні за допомогу при проведенні мікроциркуляторних досліджень.

Литература

1. Бабийчук В.Г. Возрастные особенности роли оксида азота в механизмах адаптации животных к ритмическим холодным воздействиям. Сообщение 1. Содержание конечных продуктов обмена NO в сыворотке крови и миокарде молодых и старых животных после ритмичес-

to the providing of adequate adaptive reaction of cardiovascular system. It is known that NO plays an important role in regulation of heart pumping, provides myocardium contractile function, strengthens the ventricles relaxation and is an essential component in implementation of alpha-adrenergic ino- and chronotropic effects [20]. Since our experiment applied only slight stress influence on organism, the exhaustion does not occur and in 25 min the NO pool in myocardium is almost restored.

The analyzing of the rise in concentration of NO metabolism products in blood serum (Fig. 3) after increase of RCE duration allowed to suggest that this change is predictable. Similar reaction was observed also during other hypothermic exposures [1, 2, 14]. It can be well explained by the fact that namely cardiovascular system responds primarily to cold stimuli, and nitric oxide takes active part in a number of processes, providing adaptive thermoregulatory response due to the relaxation of vessels, regulation of vascular tonus and controlled release of neuromediators. Nitric oxide may modulate vascular function due to the controlled expression of genes, responsible for the synthesis of vasoactive proteins, e.g. endothelins, as well as of vascular growth factor etc. [5, 16, 21, 24].

The increase of nitrite ions concentration in brain cortex (Fig. 2C) corresponds to similar rise during artificial hypobiotic state [14]. We suggest that hypothermic stimuli cause the activation of long-term potentiation in cortex, for initiation of which the nitric oxide is the pacemaker. In hypothalamus the processes of long-term potentiation are less expressed or absent so the concentration of metabolic products does not rise, and *vice versa* a reliable decrease is observed (Fig. 2D), however, this process demands further investigation.

We suggest [9] that at initial stages of RCE the cNOS of endotheliocytes are activated. At the same time to maintain the optimal level of NO in brain the neuronal cNOS is stimulated due to the mechanisms of long-term potentiation. Probably namely these mechanisms stipulate the peculiarities of changes in microangiarchitectonics in rat brain during RCE.

Conclusions

Rhythmic cold exposures cause the rise of nitrite ions concentration in blood serum and brain cortex which leads to the blood redistribution in the microcirculatory brain bed. In consequence of microhemocirculation peculiarities in brain these changes may be quantitatively evaluated by the methods of fractal analysis.

We acknowledge Dr. Irina Sleta for the help in performing microcirculatory investigations.

ких холодовых воздействий // Проблемы криобиологии.– 2006.– Т. 16, №4.– С. 377–389.

2. *Бабийчук В.Г., Марченко В.С., Бабийчук Г.А. и др.* Структурно-функциональные механизмы действия экстремального охлаждения на терморегуляторные центры гипоталамуса // Проблемы криобиологии.– 2004.– №2.– С. 62–70.
3. *Бабийчук В.Г., Марченко В.С., Марченко Л.М.* Структурно-функциональный стан гематоенцефаличного бар'єра при ритмічній дії позитивних (12°C) і екстремально низьких (–120°C) температур // Нейронауки: теоретичні та клінічні аспекти.– 2008.– Т. 4, №1.– С. 68–74.
4. *Ванханен В.Д., Суханова Г.А.* Техника санитарно-гигиенических исследований.– Киев: Вища шк., 1983.– С. 236–237.
5. *Лазерная доплеровская флуометрия микроциркуляции крови* / Под ред. А.И. Крупаткина и В.В. Сидорова.– М.: Медицина, 2005.– 126 с.
6. *Луценко Д.Г.* Микрогемодициркуляция головного мозга крыс после гипотермических воздействий // Проблемы криобиологии.– 2008.– Т. 18, №1.– С. 81–84.
7. *Луценко Д.Г., Марченко Н.В., Марченко В.С., Слета И.В.* Комплекс для фрактальной морфометрии микроциркуляторного русла *in vivo* // Проблемы криобиологии.– 2005.– Т. 15, №3.– С. 516–518.
8. *Марченко В.С.* Нейрональный газ – антиконвульсант в механизмах проницаемости гематоэнцефалического барьера охлажденного мозга // Проблемы криобиологии.– 1999.– №2.– С. 89–91.
9. *Марченко В.С.* Функціональна архітектура гемато-енцефаличного бар'єра в центральних механізмах терморегуляції при гіпотермії і гібернації // Науковий вісник НАУ.– 2008.– №126.– С. 88–97.
10. *Марченко В.С., Бабийчук Г.А., Шило А.В. и др.* К механизмам регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера охлажденного мозга. Сообщение 3. Оксид азота (II) – один из триггеров проницаемости гематоэнцефалического барьера в структуре сверхмедленной управляющей системы организма // Проблемы криобиологии.– 1995.– №3.– С. 10–19.
11. *Марченко Н.В., Дюбко Т.С., Марченко В.С. и др.* Применение фрактального анализа при оценке изменения макроструктуры дегидратированных биологических жидкостей // Проблемы криобиологии.– 2007.– Т. 17, №4.– С. 315–326.
12. *Мчедlishvili Г.И.* Приоткрывая покровы неизвестного в физиологии и патологии микроциркуляции крови // Патол. физиология и эксперим. терапия.– 1991.– №3.– С. 3–7.
13. *Чернух А.М., Александров П.Н., Алексеев О.В.* Микроциркуляция.– М.: Медицина, 1984.– 430 с.
14. *Шило А.В., Ломако В.В., Бондарь Т.Н., Бабийчук Г.А.* Конечные продукты метаболизма оксида азота при искусственном гипометаболизме у крыс и хомяков // Проблемы криобиологии.– 2005.– №1.– С. 3–13.
15. *Branco L.G., Carnio E.C., Barros R.C.* Role of the nitric oxide pathway in hypoxia-induced hypothermia of rats // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.– 1997.– Vol. 273, Issue 3.– P. 967–971.
16. *Bruhwyler J., Chleide E., Liegeois J.F., Carreer F.* Nitric oxide: a new messenger in the brain // Neurosci. Biobehav. Rev.– 1993.– Vol. 17, N4.– P. 373–384.
17. *Cardilo G., Panza J.A.* Impaired endothelial regulation of vascular tone in patients with systemic arterial hypertension // Vasc. Med.– 1998.– Vol. 3, N2.– P. 132–144.
18. *Davis M.E., Cai H., Drummond G.R., Harrison D.G.* Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase expression through c-Src by divergent signaling pathways // Circ. Res.– 2001.– Vol. 89, N11.– P. 1073–1080.

References

1. *Babijchuk V.G.* Age peculiarities of nitrogen oxide role in adaptation mechanisms of animals to rhythmic cold effects. Report 1. Content of final products of NO exchange in blood and myocardium of young and aged animals after rhythmic cold effects // Problems of Cryobiology.– 2006.– Vol. 16, N4.– P. 377–389.
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 V.G., Marchenko V.S., Marchenko L.M.* Structural-functional state of hematoencephalic barrier during rhythmic exposures of positive (12°C) and extremely low (–120°C) temperatures // Neyronauky: Teoretychni ta Klinichni Aspekty.– 2008.– Vol. 4, N1.– P. 68–74.
4. *Vankhanen V.D., Sukhanova G.A.* Technique of sanitary-hygienic investigations.– Kiev: Vyscha shkola, 1983.– P. 236–237.
5. *Laser Doppler fluorometry of blood microcirculation* / Ed. by A.I. Krupatkin and V.V. Sidorov.– Moscow: Meditsina, 2005.– 126 p.
6. *Lutsenko D.G.* Rat's brain microhemocirculation after hypothermic effect // Problems of Cryobiology.– 2008.– Vol. 18, N1.– P. 81–84.
7. *Lutsenko D.G., Marchenko N.V., Marchenko V.S., Sleta I.V.* Complex for fractal morphometry of microcirculatory bed *in vivo* // Problems of Cryobiology.– 2005.– Vol. 15, N3.– P. 516–518.
8. *Marchenko V.S.* Neuronal gas-anticonvulsant in mechanisms of BBB permeability of cooled brain // Problems of Cryobiology.– 1999.– N2.– P. 89–91.
9. *Marchenko V.S.* Functional architectonics of blood-brain barrier in central thermoregulation mechanisms during hypothermia and hibernation // Naukovy Visnyk NAU.– 2008.– N126.– P. 88–97.
10. *Marchenko V.S., Babijchuk G.A., Shilo A.V. et al.* On mechanisms of regulation of blood-brain barrier permeability of cooled brain. Report III. Is nitric oxide one of triggers of BBB permeability in structure of supraslow controlling system of brain? // Problems of Cryobiology.– 1995.– N3.– P. 10–19.
11. *Marchenko N.V., Dyubko T.S., Marchenko V.S. et al.* Application of fractal analysis to estimate macrostructure change of dehydrated biological fluids // Problems of Cryobiology.– 2007.– Vol. 17, N4.– P. 315–326.
12. *Mchedlishvili G.I.* Opening covers of unknown in physiology and pathology of blood microhemocirculation // Patol. Fiziologiya i Eksperim. Terapiya.– 1991.– N3.– P. 3–7.
13. *Chernukh A.M., Aleksandrov P.N., Alekseyev O.V.* Microcirculation. – Moscow: Meditsina, 1984.– 430 p.
14. *Shilo A.V., Lomako V.V., Bondar' T.N., Babijchuk G.A.* Metabolic final products of nitric oxide during artificial hypometabolism in rats and hamsters // Problems of Cryobiology.– 2005.– N1.– P. 3–13.
15. *Branco L.G., Carnio E.C., Barros R.C.* Role of the nitric oxide pathway in hypoxia-induced hypothermia of rats // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.– 1997.– Vol. 273, Issue 3.– P. 967–971.
16. *Bruhwyler J., Chleide E., Liegeois J.F., Carreer F.* Nitric oxide: a new messenger in the brain // Neurosci. Biobehav. Rev.– 1993.– Vol. 17, N4.– P. 373–384.
17. *Cardilo G., Panza J.A.* Impaired endothelial regulation of vascular tone in patients with systemic arterial hypertension // Vasc. Med.– 1998.– Vol. 3, N2.– P. 132–144.
18. *Davis M.E., Cai H., Drummond G.R., Harrison D.G.* Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase expression through c-Src by divergent signaling pathways // Circ. Res.– 2001.– Vol. 89, N11.– P. 1073–1080.
19. *Gerstberger R.* Nitric oxide and body temperature control // News Physiol. Sci.– 1999.– Vol. 14, N2.– P. 30–36.

19. *Gerstberger R.* Nitric oxide and body temperature control // *News Physiol. Sci.*– 1999.– Vol. 14, N2.– P. 30–36.
20. *Paulus W.J., Vantrimpont P.J., Shah A.M.* Acute effects of nitric oxide on left ventricular relaxation and diastolic distensibility in humans. Assessment by bicoronary sodium nitroprusside infusion // *Circulation.*– 1994.– Vol. 89, N5.– P. 2070–2078.
21. *Snyder S.H.* Nitric oxide: First in a new class of neurotransmitters? // *Science.*– 1992.– Vol. 257, N5069.– P. 494–496.
22. *Viinikka L.* Nitric oxide as a challenge for the clinical chemistry laboratory // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*– 1996.– Vol. 56, N7.– P. 577–581.
23. *Wang Y., Marsden P.A.* Nitric oxide synthases: biochemical and molecular regulation // *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*– 1995.– Vol. 4, N1.– P. 12–22.
24. *Yun H.-Y., Dawson V.L., Dawson T.M.* Nitric oxide in health and disease of the nervous system // *Molecular Psychiatry.*– 1997.– Vol. 2, N4.– P. 300–310.
20. *Paulus W.J., Vantrimpont P.J., Shah A.M.* Acute effects of nitric oxide on left ventricular relaxation and diastolic distensibility in humans. Assessment by bicoronary sodium nitroprusside infusion // *Circulation.*– 1994.– Vol. 89, N5.– P. 2070–2078.
21. *Snyder S.H.* Nitric oxide: First in a new class of neurotransmitters? // *Science.*– 1992.– Vol. 257, N5069.– P. 494–496.
22. *Viinikka L.* Nitric oxide as a challenge for the clinical chemistry laboratory // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*– 1996.– Vol. 56, N7.– P. 577–581.
23. *Wang Y., Marsden P.A.* Nitric oxide synthases: biochemical and molecular regulation // *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*– 1995.– Vol. 4, N1.– P. 12–22.
24. *Yun H.-Y., Dawson V.L., Dawson T.M.* Nitric oxide in health and disease of the nervous system // *Molecular Psychiatry.*– 1997.– Vol. 2, N4.– P. 300–310.

Accepted 01.03.2011

*Надійшла 01.03.2011
Рецензент В.І. Строна*