

# Влияние ритмического экстремального охлаждения на показатели вегетативной регуляции сердечного ритма у людей пожилого возраста

В.Г. БАБИЙЧУК, Г.А. БАБИЙЧУК, В.В. МАМОНТОВ

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

## Effect of Rhythmic Extreme Cooling on Indices of Vegetative Regulation of Cardiac Rhythm in Aged People

V.G. BABYCHUK, G.A. BABYCHUK, V.V. MAMONTOV

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

С возрастом, наряду с ослаблением обмена веществ и других функций организма, мобилизуются важные приспособительные механизмы. Старение может перерасти в болезнь или быть причиной ее неизбежного развития. Успешное использование в медицине различных форм искусственной гипотермии позволило раскрыть ряд особенностей возникновения и развития ответных реакций организма, возникающих при охлаждении. Появление новых технологий в медицинской практике дало возможность применять низкие и сверхнизкие температуры ( $-120^{\circ}\text{C}$ ) с целью создания условий для генерализованного специфического воздействия на гомеостатические регуляторные системы. Такие экстремальные температурные воздействия отличаются физиологической целесообразностью, особенно в пожилом возрасте, когда собственные системы регуляции теряют «пластичность».

Цель данной работы – изучить влияние ритмических экстремальных холодных воздействий (РЭХВ) на некоторые показатели спектрального анализа вариабельности сердечного ритма (ВСР) у людей пожилого возраста.

Обследована группа пожилых мужчин, которые получили 9 сеансов 2-минутного охлаждения в криокамере при температуре  $-120^{\circ}\text{C}$ . В соответствии с существующими международными требованиями к медицинской технике было использовано криостатирование без применения жидкого азота. Регистрацию электрокардиограммы осуществляли на электрокардиографе «Поли-Спектр» в 6-ти стандартных отведениях. Спектральный анализ ВСР проводили с помощью программы «Поли-Спектр-Ритм».

Оценивая показатели спектрального анализа ВСР у группы мужчин пожилого возраста до РЭХВ, можно установить характерный для данного возраста переход процесса управления ритма сердца посредством нервных структур с вегетативного уровня регуляции на менее специфичный и избирательный – гуморально-метаболический. После 9-го сеанса РЭХВ, а также в отдаленные сроки наблюдения (через неделю и месяц после последней процедуры охлаждения) значения общей спектральной мощности нейрогуморальной регуляции были намного выше контрольных. Отмечался сбалансированный вклад в структуру спектра как гуморального звена регуляции, так и вегетативной нервной системы. Установлено, что у лиц пожилого возраста на фоне РЭХВ процесс управления ритма сердца переходит с медленного гуморально-метаболического уровня регуляции, на быстрый вегетативный уровень, не свойственный стареющему организму.

Таким образом, можно сделать вывод, что РЭХВ за счет активации высших вегетативных центров способны значительно повышать адаптационные возможности пожилого организма.

With aging, along with the weakening of metabolism and other functions of an organism, important adaptive mechanisms are mobilized. Aging may transform into a disease or be the cause of its inevitable development. Successful application of various artificial hypothermia methods in medicine allowed to disclose some peculiarities of the origin and development of organism responses occurring during cooling. Introduction of new technologies in medical practice provided the possibility of applying low and ultra-low temperatures ( $-120^{\circ}\text{C}$ ) to create the conditions for a generalized specific effect on homeostatic regulatory systems. Such extreme thermal effects are differed by physiological expediency, particularly in aged people, when own regulation systems lose a ‘flexibility’.

The research aim was to study the effect of rhythmic extreme cold exposures (RECEs) on some indices of spectral analysis of heart rate variability (HRV) in aged people.

The group of aged men exposed to nine sessions of 2-min-long coolings in cryochamber at  $-120^{\circ}\text{C}$  was observed. Cryostatting without liquid nitrogen was used according to the accepted international standards for medical equipment. Electrocardiograms were recorded with electrocardiograph Poly-Spectrum in 6 standard leads. Spectral analysis of HRV was performed with Poly-Spectrum-Rhythm software.

Evaluating the indices of spectral analysis of HRV in the group of aged men prior to RECEs, we can establish the characteristic for this age transition of process of heart rate control by nervous structures from regulation of vegetative level of regulation to the less specific and selective: humoral-metabolic one. After the 9<sup>th</sup> session of RECE, as well as long-term observation (a week and a month after the last cooling) values of total spectral power of neurohumoral regulation were much higher than the control ones. There was established a balanced contribution to the spectrum structure in both regulation of humoral component and vegetative nervous system. It has been found that in aged people with RECE a cardiac rhythm control transformed from slow humoral-metabolic regulation level to rapid vegetative one, being not characteristic for aging organism.

Thus, we can conclude that RECEs due to activation of the highest vegetative centers can significantly improve adaptative abilities of aged organism.

## Структурно-функціональний стан внутрішньої мембрани мітохондрій гепатоцитів за моделювання гіпобіозу у щурів

С.Д. Мельничук, С.В. Хижняк, В.С. Морозова, В.М. Войцицький  
Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ

## Structure-Functional State of Internal Mitochondrial Membrane of Hepatocytes during Modeling of Hypobiosis in Rats

S.D. MELNYCHUK, C.V. KHYZHNYAK, V.S. MOROZOVA, V.M. VOYTSITSKY  
National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Формування штучного гіпобіотичного стану веде до гіпометаболізму, який супроводжується зниженням енергозабезпечення теплокровного організму і потребує дослідження протікання біоенергетичних процесів у клітинах. Найповніше уявлення про інтенсивність процесів перетворення енергії за участю мітохондрій дає комплексний підхід, який включає дослідження активності ферментів дихального ланцюга, вмісту цитохромів, а також аналіз структурного стану внутрішньої мембрани мітохондрій, що і обумовило мету даного дослідження за моделювання вуглекислотного гіпобіозу у щурів.

В стан штучного гіпобіозу (протягом 2,5–3 годин) щурів вводили методом «закритої судини» Бахмет'єва-Джайя-Анжуса. Об'єктом дослідження були препарати внутрішньої мембрани мітохондрій гепатоцитів. Активність ферментів дихального ланцюга та вміст цитохромів у мембрані визначали спектрофотометрично за стандартними методиками. За допомогою 1-анілінонафталін-8-сульфонату (АНС) та пірену оцінювали структурно-динамічні властивості мембран. Зміни мікров'язкості ліпідної компоненти мембран визначали за ступенем ексімеризації пірену, що локалізується у зоні жирно кислотних ланцюгів фосфоліпідів. Конформаційні модифікації білкових молекул у мембранах оцінювали за ефективністю гасіння акриламідом триптофанової флуоресценції.

Розвиток гіпобіозу супроводжується неоднозначними змінами в активності ферментів дихального ланцюга мітохондрій гепатоцитів: активність ферментів перших ланок спряження дихального ланцюга (НАДН-КоQ-оксидоредуктази та КоQ-цитохром *c*-оксидоредуктази) дещо зростає, в той час як активність цитохром *c*-оксидоредуктази (кінцева ланка спряження) знижується в середньому на 37%. Подібні зміни характерні для вмісту функціонально-активних цитохромів: вміст цитохромів груп *b* та *c* зростає, а групи *a* знижується у середньому на 26%. Крім того, показано пригнічення АТФ-синтетазної активності мітохондрій.

Методом флуоресцентних зондів встановлено зниження мікров'язкості анулярних (приблизкових) ліпідів внутрішньої мембрани мітохондрій в умовах гіпобіозу. Зміни параметрів флуоресценції мембранозв'язаного АНС вказує на модифікацію поверхневої (полярної) ділянки мембран. Результати вимірювання триптофанової флуоресценції свідчать про конформаційні зміни білкових молекул.

Таким чином, пригнічення енергетичної здатності мітохондрій гепатоцитів за умов гіпобіозу обумовлено зниженням функціональної активності кінцевої ланки спряження дихального ланцюга та перенесення електронів від субстрату окислення, в тому числі, можливо, і в результаті структурної модифікації внутрішньої мітохондріальної мембрани, про що свідчать зміни упорядкованості ліпідного та білкового компонент мембрани.

Formation of artificial hypobiotic state leads to hypometabolism accompanied by a decrease in energy supply of homoiothermic organism and requires the study of bioenergetic processes course in cells. The profound understanding of the intensity of energy conversion with mitochondria is given by complex approach including the investigation of the activity of respiratory chain enzymes, cytochrome content and the analysis of structural state of mitochondria internal membrane, this has stipulated the research aim to model carbon dioxide hypobiosis in rats.

An artificial hypobiotic state (within 2.5–3 hours) in rats was induced by Bakhmet'ev-Andjus-Gaja method of 'close tank'. The research objects were preparations of internal membrane of hepatocyte mitochondria. The activity of respiratory chain enzymes and cytochrome content in the membrane were determined spectrophotometrically by standard methods. Structural and dynamical properties of membranes were evaluated with 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate (ANS) and pyrene. The changes in microviscosity of membrane lipid components were determined by the degree of eximerization of pyrene localized in the area of fatty acid chains of phospholipids. Conformational modifications of protein molecules in membranes were assessed by the efficiency of quenching with acrylamide of tryptophan fluorescence.

The development of hypobiosis is accompanied by ambiguous changes in the activity of respiratory chain enzymes of hepatocyte mitochondria: the enzyme activity of first links in coupling of respiratory chain (NADH-Q oxidoreductase and Q-cytochrome *c*-oxidoreductase) is slightly increased, while the activity of cytochrome *c*-oxidoreductase (coupling final link) is reduced by about 37%. Such changes are characteristic for content of functionally active cytochromes: content of cytochromes *b* and *c* increases and decreases in *a* group by 26% in average. Moreover the inhibition of ATP-synthetase activity of mitochondria has been shown.

By the method of fluorescent probes we have established the decrease in microviscosity of anular lipids of mitochondria internal membrane during hypobiosis. The changes in fluorescence parameters of membrane-connecting ANS indicate the modification of membrane surface (polar) sites. The results of tryptophan fluorescence measurement testify to the conformational changes of protein molecules.

Thus, inhibition of energy capacity of hepatocyte mitochondria during hypobiosis is stipulated by decreased functional activity of final link in the coupling of the respiratory chain and transfer of electrons from oxidation substrate, including, possibly as a result of structural modification of mitochondria internal membrane, as evidenced by the changes in orderliness of membrane lipid and protein components.

# Фрактальная геометрия гематоэнцефалического барьера при холодной акклимации, эстивации, гибернации

В.С. МАРЧЕНКО, Г.А. БАБИЙЧУК, Д.Г. ЛУЦЕНКО

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

## Fractal Geometry of Blood-Brain Barrier during Cold Acclimation, Estivation, Hibernation

V.S. MARCHENKO, G.A. BABIYCHUK, D.G. LUTSENKO

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

Уникальная природная адаптация теплокровных, сезонная спячка, осуществляется за счет регуляторных механизмов, функционирующих и у негиберирующих животных. К таким системам центральной регуляции относится гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), который следует рассматривать как комплекс фракталоподобных структур, хаотичность их функционирования усиливается при квазициклических режимах акклимации, что определяет избыточную робастность центров терморегуляции как стратегию адаптации.

При обработке данных электронной и конфокальной микроскопии мозга хомяков и крыс подсчитывали фрактальную размерность ( $D$ ) как тангенс угла наклона графика логарифмической зависимости площади перепадов яркости изображений от стороны квадрата, который ее ограничивает.

Форсированная акклимация (ФА) проводилась на протяжении 6 недель путем обдувания животных (6 односекундных воздействий в минуту) холодным воздухом ( $10^{\circ}\text{C}$ ) по 15 мин в начале каждого из 9 дневных часов и непрерывно в последующие 15 ч в случайном режиме (4–12 воздействий по 5–60 мин), при этом хомяки впадали в нехарактерную для них спячку летом. Эта методика могла бы служить основой для модели эстивации (Э), если бы были определены структурные особенности ГЭБ данного торпидного состояния и гибернации (Г), что и явилось целью работы.

На начальных этапах ФА увеличивается степень хаотичности микрогемодикуляции. Био- и электронная микроскопия выявляет вокруг эритроцитов и микровилллей эндотелиоцитов фрактальный ареол ( $D \sim 1,7$ ), не характерный для Г, но типичный для Э. При Г и в меньшей степени при Э имеются очевидные признаки редукции ( $D \sim 1,2$ ) элементов дендритного дерева, происходит фрагментация синаптических бутонов. При Э у большинства нейронов сохраняются фрактальные особенности структурных возмущений поверхности, характерные для активного состояния ( $D \sim 1,4$ ), и способность к росту шипиков. После ФА и 1–2 баутов Э в синаптическом аппарате у ~25% синапсов (при Г – у 10%) формируется шипиковый аппарат, состоящий из цистерн с разными значениями  $D$  (при Г  $D$  пре- и постсинапса одинаково  $\sim 1,3$ ), что может явиться коррелятом вегетативной памяти. При ФА «синхронизируется» геометрия эндотелиоцитов и синапсов, увеличивается транзитоз и уровень проницаемости ГЭБ для нейромедиаторов и, возможно, гормонов спячки. Эти структуры приобретают одинаковую размерность ( $\sim 1,7$  или  $\sim 1,3$ ) при снижении резистентности ГЭБ к ацетилхолину или норадреналину соответственно. При Г отсутствуют пиноцитоз и активные перicyты, как при ФА и Э, но активируются перикапиллярные макрофаги.

Таким образом,  $D$  может быть важным параметром функциональной геометрии мозга, а ФА – основой первых моделей эстивации.

Unique natural adaptation of homoiothermic, seasonal hibernation, is accomplished by regulatory mechanisms functioning in non-hibernating animals. To these systems of central regulation the blood-brain barrier (BBB) is referred, which should be considered as a complex of fractal-like structures, their functioning randomness increases at quasi-cyclic regimens of acclimation, which determines excessive M-estimator of thermoregulation center as an adaptation strategy.

When processing the data of electron and confocal microscopy of rats' and hamsters' brain there was calculated fractal dimension ( $D$ ) as the slope ratio of the logarithmic dependence diagram of the area of leaps in image brightness vs. the size of the square, limiting it.

Forced acclimation (FA) was performed for 6 weeks by blowing the animals (6-second actions per min) with cold air ( $10^{\circ}\text{C}$ ) for 15 minutes at the beginning of each of the nine day hours and continuously in following 15 hrs in a random mode (4–12 impacts by 5–60 min), herewith the hamsters fell into uncharacteristic for them hibernation in summer. This method could serve as the base for estivation (E) model if there would be determined the structural features of the BBB for this torpid state and hibernation (H), which was the purpose of the work.

At initial stages of FA the degree of randomness of microhemocirculation increases. Bio- and electron microscopy reveals around red blood cells and endothelial microvilli the fractal areola ( $D \sim 1,7$ ), not characteristic for H, but typical for E. At H and in less extent at E there are evident signs of reduction ( $D \sim 1,2$ ) of dendritic tree elements, the fragmentation of synaptic buds occurs. At E in most neurons the fractal features of structural surface disturbances have remained, which are characteristic for an active state ( $D \sim 1,4$ ), and the ability of spines growth as well. After FA and 1–2 bouts E in synapsis apparatus at ~25% synapses (at H – 10%) there is formed spinulose apparatus consisting of cisterns with different values of  $D$  (at H the dimension of  $D$  of pre- and postsinapse is similar  $\sim 1,3$ ), that may be a correlate of vegetative memory. At FA geometry of endothelial cells and synapses is 'synchronized', transcytosis and BBB permeability rate to neurotransmitters and likely hibernation hormones increase. These structures gain the same dimension ( $\sim 1,7$  and  $\sim 1,3$ ) with a decrease in BBB resistance to acetylcholine or norepinephrine, respectively. At H there are no pinocytosis and active pericytes both at FA and E, but pericapillary macrophages are activated.

Thus,  $D$  may be an important parameter of brain functional geometry, and FA can be the basis of the first models of estivation.



## Холодовая адаптация пойкилотермных и гетеротермных животных

А.К. ГУЛЕВСКИЙ, И.И. ШЕНЬЯВСКИЙ, Л.И. РЕЛИНА, Е.А. ГРИШЕНКОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

### Cold Adaptation of Poikilothermic and Heterothermic Animals

A.K. GULEVSKY, I.I. SCHENYAVSKY, L.I. RELINA, E.A. GRISCHENKOVA

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Представлены результаты исследований механизмов адаптации к низким температурам некоторых пойкило- и гетеротермных животных. На примере личинок большого мучного хрущака *Tenebrio molitor*, являющегося классическим объектом исследований избегающих заморзания организмов, установлено, что в условиях охлаждения и холодной акклимации сохраняется синтез белков, связанный с транскрипцией. В условиях холодной акклимации при 5°C он сохраняется в течение 2 недель, причем количество новообразованных белков постоянно увеличивается. Кроме основного пула белков, синтезирующихся в процессе жизнедеятельности *T. molitor*, у акклимированных особей наблюдается также синтез специфического белка с молекулярной массой 65 кДа, который может относиться к классу белков-шаперонов.

Перестройка биосинтеза белков в процессе холодной акклимации наблюдается также у более высокоорганизованных пойкилотермных животных, в частности у карася серебряного *Carassius auratus*, у которого экспериментально показано появление в зимний период белков с молекулярными массами 205 кДа в красных мышцах и миокарде и 172 кДа в печени.

Приспособительные механизмы метаболизма, вызванные колебаниями температуры, тесно связаны с процессами генерирования энергии в метаболических путях гликолиза и цикла трикарбоновых кислот. Наши исследования показали, что в ходе акклимации изменяется содержание АТФ в сторону его понижения в красных мышцах и печени в зимний период, а также активности лактатдегидрогеназы, которая является ферментом заключительного этапа гликолиза и используется в качестве показателя интенсивности анаэробного обмена в сторону повышения в красных мышцах и печени.

Существенную роль в механизмах холодоустойчивости пойкилотермных животных играет изменение спектра регуляторных молекул, в частности нами было обнаружено, что фракция до 5 кДа из мозга холодаадаптированных *C. auratus* способна повысить выживаемость рыб в условиях холодного стресса, что, судя по полученным экспериментальным данным, связано с воздействием на энергетический обмен, в частности на утилизацию АТФ.

Исследования, проведенные на гетеротермных животных – длиннохвостых сусликах *Citellus undulatus* – показали, что в ходе холодной акклимации и подготовки их к гипобии происходят существенные структурно-функциональные перестройки внутриклеточных систем, в том числе и белок-синтезирующего аппарата на уровне транскрипции и трансляции. Выяснено, что важным механизмом в функционировании белоксинтезирующего аппарата является процесс запасаения пула мРНК в виде информосом. Как и у пойкилотермных животных значительную роль в перестройке белок-синтезирующего аппарата и ионтранспортирующих систем, обеспечивающих гомеостаз организма, играют регуляторные соединения пептидной природы с молекулярной массой до 10 кДа.

The results of investigations on the mechanisms of low temperature adaptation of some poikilo- and hetero-thermic animals are presented. On the example of larvae of flour-beetle *Tenebrio molitor*, which is a traditional object for research of organisms avoiding freezing we have found that synthesis of proteins associated with transcription is preserved during cooling and cold acclimation. During cold acclimation at 5°C it is preserved for 2 weeks moreover the number of newly formed proteins constantly increases. Except the main pool of proteins synthesizing during life of *T. molitor*, acclimated species have synthesis of specific protein with a molecular mass of 65 kDa which may relates to the class of chaperone proteins.

The restructuring of protein biosynthesis during cold acclimation is also observed in more highly organized poikilothermic animals, particularly in the goldfish *Carassius auratus*, which has been shown experimentally in winter to have the appearance of proteins with molecular mass of 205 kDa in red muscles and myocardium and 172 kDa in liver.

Adaptive mechanisms of metabolism caused by fluctuations in temperature are closely related to energy generation in the metabolic ways of glycolysis and the citric acid cycle. Our research has shown that during acclimation the content of ATP changes towards its decrease in red muscles and liver in winter and the activity of lactate dehydrogenase, which is the enzyme of the glycolysis final stage and is used as the index of anaerobic metabolism intensity towards the increase in red muscles and liver.

The change in the spectrum of regulatory molecules plays a significant role in the cold resistance mechanisms of poikilotherms, in particular we have revealed that the fraction up to 5 kDa from the brain of cold resistant *C. auratus* can increase the survival rate of fishes during cold stress that evidently from the obtained experimental data is associated with effect on energy metabolism, in particular utilization of ATP.

The studies performed in heterothermic animals long-tailed ground squirrels *Citellus undulatus* have shown that during cold acclimation and preparing those to hypobiosis significant structural and functional reorganizations of intracellular systems including protein-synthesizing apparatus at the level of transcription and translation occur. We have found that an important mechanism in the functioning of the protein-synthesizing apparatus is the accumulation of mRNA pool as informosomes. As well as in poikilotherms a significant role in the restructuring of the protein-synthesizing apparatus and ion-transport systems providing an organism homeostasis is played by regulatory peptide compounds with 10 kDa molecular mass.

## Сон в структуре адаптивного ответа организма на холодовые воздействия

А.В. Шило, Е.А. Венцковская, Г.А. Бабийчук

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

### Sleep in Adaptive Response Structure of Organism to Cold Effects

A.V. SHILO, E.A. VENTSKOVSKAYA, G.A. BABYCHUK

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine*

*of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine*

Ответная реакция организма на любое воздействие, в том числе и холодовое, зависит от многих факторов. Так, в зависимости от силы (дозы), длительности и кратности воздействия в организме могут развиваться минимум три различные адаптационные реакции: на слабые; на воздействия средней силы; на сильные, чрезвычайные воздействия. И хотя сон часто рассматривается как антистрессорный механизм, обеспечивающий восстановление функциональных возможностей организма после стрессовых воздействий, его роль в структуре ответной реакции организма на различные по интенсивности и/или длительности холодовые воздействия остается малоизученной.

Цель работы – изучить изменения цикла бодрствование-сон у крыс после различных видов холодовых воздействий в зависимости интенсивности и/или длительности холодового воздействия.

Было изучено влияние следующих видов охлаждения: длительное холодовое воздействие (ДХВ) – животных содержали при температуре 4°C в течение 30–40 дней и ритмические холодовые воздействия (РХВ) – животных подвергали в течение 2-х дней двум сериям из 9 охлаждений по 15 мин при температуре –12 или 10°C с интервалами по 45 мин при температуре 23°C. В сыворотке крови измеряли концентрацию тиреоидных гормонов и конечных продуктов обмена оксида азота. Адаптационные способности животных оценивали по тесту вынужденного плавания в холодной воде. Анализ изменений цикла бодрствование-сон осуществляли по общепринятым критериям.

Во всех случаях холодовые воздействия приводили к формированию устойчивости к последующей тестовой холодовой нагрузке через 24, 48 ч или через месяц после повторения воздействия. Все использованные холодовые воздействия приводили к активации ряда NO-зависимых процессов и повышению активности тиреоидной системы, которая была максимально выражена при ДХВ, менее – при РХВ –12°C и не отличалась от контрольных уровней при РХВ 10°C. При этом после ДХВ увеличивалась длительность медленноволнового (МВС) и парадоксального сна (ПС), после РХВ –12°C возрастала длительность только ПС в светлое время суток и длительность эпизодов МВС, а после РХВ 10°C – длительность МВС и его эпизодов. В ряде случаев отмечено изменение временной организации цикла бодрствование-сон.

Таким образом, холодовые воздействия, приводя к повышению устойчивости организма, могут вовлекать адаптивные механизмы сна для оптимизации приспособления организма к встрече с последующим/ми воздействием. Степень вовлечения этих механизмов определяется интенсивностью и/или длительностью холодового воздействия и может проявляться как в увеличении длительности всего сна, так и отдельных его стадий, а также изменением временной организации цикла бодрствование-сон.

The response of an organism to any effect, including cold one, depends on many factors. Thus depending on a strength (dose), duration and multiplicity of the effect at least three different adaptation responses may develop in the organism: to weak, middle, strong and extreme effects. Although the sleep is often considered as antistress mechanism, providing the recovery of functional possibilities of an organism after stress effects, its role in the structure of an organism response to different by intensity and/or duration cold exposures has remained poorly studied.

This research was aimed to study the changes in wake-sleep cycle in rats after different cold effects depending on the intensity and/or duration of cold effect.

There was studied the effect of the following cooling types: long-term cold effect (LTCE) – animals were kept at 4°C for 30–40 days and rhythmic cold effects (RCE) – animals underwent within 2 days two series of 9 coolings by 15 min at –12 or 10°C with 45 min intervals at 23°C. The concentration of thyroid hormones and final products of nitric oxide metabolism was measured in blood serum. Adaptive capabilities of animals were evaluated in the forced swimming test in cold water. Changes in the wake-sleep cycle were analyzed according to the standard criteria.

In all the cases the cold effects resulted in forming the resistance to following test cold load in 24, 48 hrs or 1 month after repeated exposure. All used cold effects activated a number of NO-dependent processes and increased the thyroid system activity, that was most pronounced under LTCE, less at RCE –12°C, and did not differ from the control levels at RCE 10°C. In this case after LTCE there was an increase in duration of slow-wave sleep (SWS) and paradoxical one (PS), after RCE –12°C there were an increase in only PS duration in the daytime and that for SWS episode, but after RCE 10°C – the SWS duration and its episodes. In some cases, a change in temporal organization of the wake-sleep cycle was noted.

Thus, the cold effects, by leading to an increased resistance of an organism, may involve the sleep adaptive mechanisms to optimize an organism adaptation to be faced to following one or many effects. The involvement degree of these mechanisms is determined by the intensity and/or duration of cold effect and may be manifested in both increased whole sleep duration and its separate stages, as well as in a changed temporal organization of the wake-sleep cycle.

## Применение криотерапии в реабилитации пациентов с астеноневротическим синдромом

О.А. ПАНЧЕНКО, Т.Э. ЧУМАК, Л.В. ПАНЧЕНКО

Донецкий национальный медицинский университет им. М.Горького

ГУ «Научно-практический медицинский реабилитационно-диагностический центр МЗ Украины», г. Донецк

## Use of Cryotherapy in Rehabilitation of Patients with Asthenoneurotic Syndrome

O.A. PANCHENKO, T.E. CHUMAK, L.V. PANCHENKO

M. Gorky Donetsk National Medical University

Scientific-Practical Medical Rehabilitation-Diagnostic Center

of the Ministry of Health Care of Ukraine, Donetsk, Ukraine

Цель исследования – оценить эффективность криотерапии в реабилитации пациентов с астеноневротическим синдромом.

Проведено клиническое, экспериментально-психологическое, функционально-диагностическое обследование 74 человек с астеноневротическим синдромом, в комплексном лечении которых применялась криотерапия. Контрольную группу составили 70 пациентов дневного стационара психоневрологического отделения ГУ «НПМ РДЦ МЗ Украины».

Для криотерапии использовалась криокамера «Cryo Therapy Chamber» («Zimmer Medizin Systeme», Германия) –110°C. Криотерапия осуществлялась по авторской методике R. Fricke (1989). Применяли структурированное клиническое диагностическое интервью, САН, шкалу астенических состояний, шкалу нервно-психического напряжения, методику для исследования личностной и реактивной тревожности Spielbergera-Ханина.

Астенические нарушения выявлены у 64 пациентов (86,5%) основной группы, 56 пациентов (80%) контрольной группы, у 19 пациентов (25,7%) основной группы и 18 обследуемых (25,7%) – нервно-психическое напряжение. У 42 обследуемых (56,8%) основной группы и 35 пациентов (50%) контрольной группы установлен высокий уровень личностной тревожности, у 59 пациентов (79,7%) основной группы и 56 пациентов (80%) контрольной группы – высокий уровень ситуативной тревожности. Неудовлетворительное самочувствие было у 19 пациентов (25,7%) основной группы и 20 пациентов (28,6%) контрольной, 39 пациентов (52,7%) основной; 35 обследуемых (50%) контрольной группы оценили свою активность как неудовлетворительную; неудовлетворительное настроение имели 9 пациентов (12,2%) основной группы и 7 пациентов (10%) контрольной группы; 54 пациента (73%) основной группы и 50 пациентов (71,4%) контрольной группы отмечали средний уровень качества жизни.

Положительная динамика психического состояния пациентов отмечалась с 6-го дня криовоздействия и опережала таковую в контрольной группе. Изменения психического состояния больных проявлялись в улучшении самочувствия, активности и настроения; снижении личностной и реактивной тревожности, астенических проявлений нервно-психического напряжения, повышении работоспособности ( $p < 0,05$ ). Улучшение состояния отмечалось у 63 пациентов (85,1%) при выписке.

Таким образом, криотерапия в системе лечения и реабилитации лиц с астеноневротическими нарушениями является безопасным, эффективным методом и может применяться для данной категории пациентов.

The research aim was to evaluate the efficacy of cryotherapy in rehabilitation of patients with asthenoneurotic syndrome.

Clinical, experimental, psychological, functional and diagnostic testing of 74 people with asthenoneurotic syndrome was held and cryotherapy was applied in their complex treatment. The control group consisted of 70 in-hospital patients of psychoneurological department of Scientific-Practical Medical Rehabilitation-Diagnostic Center of Ministry of Health Care of Ukraine.

Cryo Therapy Chamber (Zimmer Medizin Systeme, Germany) –110°C was used for cryotherapy. Cryotherapy was performed by the author's method of R. Fricke (1989). Structured clinical diagnostic interview, WAM, scale of asthenic states, the one of mental stress, methodology for the study of personal and reactive anxiety by Spielberger-Hanin were used.

Asthenic disorders were found in 64 patients (86.5%) of the main group, 56 patients (80%) of the control group, 19 patients (25.7%) of the main group and 18 examined patients (25.7%) had the neuropsychic stress. The main group of 42 examined patients (56.8%) and the control group of 35 patients (50%) had higher levels of personal anxiety, 59 patients (79.7%) of the main group and 56 patients (80%) of the control group had high level of situational anxiety. Unsatisfactory health was in 19 patients (25.7%) of the main group and 20 patients (28.6%) of the control group, 39 patients (52.7%) of the main group; 35 examined patients (50%) of the control group rated their activity as unsatisfactory, 9 patients (12.2%) of the main group and 7 patients (10%) of the control group had unsatisfactory mood, 54 patients (73%) of the main group and 50 patients (71.4%) of the control group reported an average level of life quality.

The positive dynamics of the mental state of patients was from the 6<sup>th</sup> day of cryotherapy and advanced one in the control group. Altered mental status of patients manifested in the improving of health, activity and mood; reducing personal and state anxiety, asthenic signs of neuropsychic stress, improving the performance capability ( $p < 0.05$ ). Improving of the state was observed in 63 patients (85.1%) at discharge.

Thus, cryotherapy as a part of the systemic treatment and rehabilitation of people with asthenoneurotic disorders is safe, effective method and can be used for this category of patients.



## Кислородный режим скелетных мышц морских рыб в условиях экспериментальной гипотермии

А.А. СОЛДАТОВ

Институт биологии южных морей НАН Украины, г. Севастополь

## Oxygen Regimen of Skeletal Muscles of Sea Fishes During Experimental Hypothermia

A.A. SOLDATOV

*Institute of Biology of the Southern Seas  
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Sevastopol, Ukraine*

Содержание теплолюбивых видов рыб при температуре воды менее 5...7°C часто сопровождается развитием асфиксии. Эта реакция парадоксальна, так как развивается в условиях, когда кислородные потребности организма снижены, а растворимость кислорода в воде и тканевых средах повышена.

В качестве модельного объекта была выбрана кефаль-сингиль, у которой развитие состояния асфиксии наблюдается при температуре воды ниже 5°C. Контрольная группа рыб содержалась при 15 ± 1°C, опытные – при 10, 5 и 1...2°C. Экспозиция составляла 41–46 суток.

Гипотермия (ниже 5°C) вызывала развитие тканевой гипоксии. В мышцах уменьшалось напряжение кислорода и увеличивалось число гипоксических (менее 8,0 ГПа) и аноксических зон, повышалась концентрация лактата. Это состояние определялось изменением функционального состояния кровеносных сосудов и циркулирующих эритроцитов: плотность капиллярной сети в мышцах уменьшалась; сосуды утрачивали способность активно реагировать на функциональные нагрузки, что связано с повышением содержания Ca<sup>2+</sup> в мышечной ткани; тепловой эффект реакции оксигенации гемоглобина существенно повышался; это определялось изменением характера взаимодействия пигмента с внутриэритроцитарным микроокружением и приводило к чрезмерному росту сродства цельной крови к кислороду.

При этом в организме кефалей были зарегистрированы изменения, компенсирующие негативное действие гипотермии. В 1-е сутки эксперимента отмечали увеличение кислородной емкости крови, что было связано с выбросом находящейся в селезенке эритроцитарной массы в кровоток. Затем происходило снижение сродства гемоглобина к кислороду, которое определялось повышением уровня нуклеотидтрифосфатов в клетках красной крови.

Гипотермия вызывала адаптивные сдвиги и в скелетных мышцах рыб. У кефалей увеличивалась тканевая концентрация миоглобина, липидов и суммарных цитохромов, что должно облегчать диффузию кислорода. Организация дыхательной цепи митохондрий при этом приобретала некомпенсированный характер. Отношение  $b/aa_3$  понижалось. Это отражало процесс ее адаптации к низкому напряжению кислорода в мышцах.

Все вышеперечисленные компенсационные процессы наблюдались при 5°C и способствовали частичному восстановлению напряжения кислорода в мышцах кефали в условиях гипотермии. При 1...2°C они не были выражены, что сопровождалось 100%-й гибелью рыб на 15-е сутки эксперимента.

Таким образом, в основе развития состояния тканевой гипоксии мышц у рыб в условиях гипотермии лежат два процесса: чрезмерная вазоконстрикция сосудов микроциркуляторного русла и крайне высокий тепловой эффект реакции оксигенации гемоглобина в области низких температур.

The maintenance of thermophilic fish species at water temperature less than 5...7°C is often accompanied by asphyxia development. This reaction is paradoxical as it develops in conditions when oxygen requirements of organism are decreased and solubility of oxygen in water and tissue media is increased.

Golden mullet was chosen as modeling object, with developed asphyxia state at water temperature below 5°C. The control group of fishes was kept at 15 ± 1°C, experimental group was at 10, 5 and 1...2°C. The exposure was 41–46 days.

Hypothermia (below 5°C) caused the development of tissue hypoxemia. In muscles the tension of oxygen decreased and the number of hypoxic (less than 8.0 hPa) and anoxic zones increased, the concentration of lactate raised. This state was determined by the change in functional state of blood vessels and circulating erythrocytes: the density of capillary network in muscles decreased; vessels lost the ability to respond actively to functional loadings that was associated with the increase of Ca<sup>2+</sup> content in muscular tissue; the thermal effect of reaction of hemoglobin oxygenation essentially raised; this was determined by the change in character of interrelation of pigment with endoglobular microenvironment and led to excessive growth of affinity of the whole blood to oxygen.

Moreover in the organism of mullets the changes compensating a negative effect of hypothermia were recorded. In the 1st day of experiment the increase in oxygen capacity of blood was noted that was associated with release of erythrocyte mass from spleen into blood flow. Then there was a decrease in affinity of hemoglobin to oxygen which was determined by the increase of nucleotide triphosphates level in the cells of red blood.

Hypothermia caused adaptive shifts in skeletal muscles of fish. Tissue concentration of myoglobin, lipids and cumulative cytochromes in mullets increased that could facilitate oxygen diffusion. Furthermore the organization of mitochondria respiratory chain gained non-compensated character. The ratio of  $b/aa_3$  is reduced. This reflected the process of its adaptation to low tension of oxygen in muscles.

All the above listed compensated processes were observed at 5°C and they promoted partial restoration of oxygen tension in mullet muscles during hypothermia. At 1...2°C they were not expressed that was accompanied by 100% death of fish to the 15<sup>th</sup> day of experiment.

Thus two processes form the base for development of muscle tissue hypoxia in fish at hypothermia, they are excessive vasoconstriction of vessels of the microcirculatory bed and the highest thermal effect of hemoglobin oxygenation in the area of low temperatures.

## Свободнорадикальные процессы в мозге сусликов в динамике пробуждения от зимней спячки

Н.К. КЛИЧХАНОВ, Ж.Г. ИСМАИЛОВА, М.Д. АСТАЕВА, З.М. ШИХАМИРОВА  
Дагестанский государственный университет, г. Махачкала, Россия

## Free Radical Processes in Brain of Ground Squirrels in Dynamics of Arousal from Winter Hibernation

N.K. KLICHKHANOV, Zh.G. ISMAILOVA, M.D. ASTAeva, Z.M. SHIKHAMIROVA  
Dagestan State University, Makhachkala, Russia

Зимняя спячка млекопитающих является адаптацией к бескормице и низким температурам среды обитания. Зимняя спячка мелких грызунов – сложный процесс, состоящий из чередующихся периодов (баутов) глубокого оцепенения и пробуждений. По данным литературы в ходе периодических пробуждений, в результате резкого увеличения скорости перфузии тканей и ускорения метаболических процессов может увеличиться продукция активных форм кислорода. Изменение степени окислительной модификации биомолекул клеток, с одной стороны, и активности антиоксидантной защиты, с другой стороны, на разных этапах пробуждения сусликов от зимней спячки остается мало изученным.

В данной работе изучена интенсивность свободнорадикальных процессов (СРП) в синапсосомах из коры головного мозга сусликов в динамике индуцированного пробуждения от зимней спячки.

Эксперименты проводили на малых сусликах *Spermophilus pigmaeus* Pall. После 2-месячной спячки животных с температурой тела 2°C для индукции пробуждения переносили в помещение с температурой 25°C и использовали в опыте по достижении температуры тела 10, 20, 25, 30 и 37°C. В синапсосомах определяли продукты окислительной модификации липидов и белков, содержание восстановленного глутатиона, а также активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы.

При глубокой зимней спячке процессы окислительной модификации липидов и белков мембран синаптических окончаний нейронов находятся на низком уровне. Об этом свидетельствует снижение содержания малонового диальдегида и карбонильных групп по сравнению с контролем (активные летом животные). Исследование содержания восстановленного глутатиона показало, что в состоянии спячки его уровень в синапсосомах превышает контроль в 2,8 раза. При глубокой спячке в синапсосомах активность СОД возрастает в 4,5 раза, а каталазы – в 2,8 раза. Следовательно, в состоянии спячки нейроны мозга имеют сильную антиоксидантную защиту.

В ходе пробуждения сусликов интенсивность окислительной модификации мембранных липидов и белков синапсосом существенно ускоряется при температуре тела 25°C, что свидетельствует о развитии окислительного стресса на этом этапе согревания. Последующее согревание животного приводит к постепенному снижению интенсивности СРП в мозге. В ходе пробуждения в синапсосомах максимум интенсивности СРП совпадал с минимумом содержания глутатиона, активности СОД и каталазы. Это свидетельствует о важной роли антиоксидантной системы в защите синаптических окончаний нейронов от окислительного повреждения при периодических пробуждениях сусликов от зимней спячки, когда резко изменяются физиологическое состояние и интенсивность метаболизма.

Mammalian winter hibernation is an adaptation to the lack of fodder and low temperatures of habitat. Hibernation of small rodents is a complicated process consisting of alternating periods (bouts) of deep torpor and arousal. According to the scientific literature during the periodic arousals as the result of sharp increase in tissue perfusion rate and acceleration of metabolic processes may increase the production of reactive oxygen species. Changes in the degree of oxidative modification of all biomolecules, on the one hand, and the activity of antioxidant protection, on another hand, at different stages of arousal from hibernation in ground squirrels have been poorly understood.

In this research we have studied the intensity of free radical processes (FRPs) in synaptosomes in cerebral cortex of ground squirrels in the dynamics of induced arousal from hibernation.

The experiments were performed in small ground squirrels *Spermophilus pigmaeus* Pall. After 2 months of hibernation to induce the arousal the animals with body temperature of 2°C were placed into a room with temperature of 25°C and used in the experiment until the body temperature became 10, 20, 25, 30 and 37°C. In synaptosomes we determined the products of oxidative modification of lipids and proteins, the content of reduced glutathione and the activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase.

During deep hibernation the oxidative modifications of lipids and membrane proteins of neuronal synaptic endings are at a low level. This is evidenced by the decrease of malondialdehyde and carbonyl groups content compared to the control (animals active in summer). The study of reduced glutathione content has shown that during hibernation its level in synaptosomes 2.8 times exceeds the control. During deep hibernation in synaptosomes SOD activity 4.5 times increases, and catalase 2.8 times does. Consequently, during hibernation brain neurons have a strong antioxidant protection.

During arousal of ground squirrels the intensity of oxidative modifications of membrane lipids and proteins of synaptosomes significantly accelerates at body temperature of 25°C testifying to the development of oxidative stress at this thawing stage. The following thawing of the animal results in gradual decrease of FRP intensity in the brain. During arousal in synaptosomes maximum FRP intensity coincides with the minimum of glutathione, SOD and catalase contents. This demonstrates the importance of antioxidant system in protecting synaptic endings of neurons from oxidative damage during periodic arousals of ground squirrels from hibernation when physiological state and metabolism intensity change rapidly.



# Влияние искусственной гибернации на соотношение форм эритроцитов в крови гомойо- и гетеротермных животных

В.В.ЛОМАКО, И.Ф.КОВАЛЕНКО, А.В.ШИЛО

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

## Effect of Artificial Hibernation on Erythrocyte Shape Ratio in Blood of Homoio- and Heterothermic Animals

V.V. LOMAKO, I.F. KOVALENKO, A.V. SHILO

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

Многие аспекты ответных реакций функциональных систем на действие факторов, индуцирующих гибернацию и в то же время являющихся потенциально опасными для организма, не выяснены. В поддержании постоянства внутренней среды организма значительная роль принадлежит эритроцитам – наиболее многочисленным форменным элементам крови, имеющим особую двояковогнутую форму дискоцита, благодаря чему осуществляется высокоспецифическая транспортная функция. В норме 80% эритроцитов составляют дискоциты (нормоциты), остальные – атипичные формы (физиологический пойкилоцитоз). Влияние на животных различных эндо- и экзогенных факторов способствует появлению обратимых (эхиноциты и стоматоциты) и необратимых (сфероциты, эллиптоциты, кодоциты) изменений форм эритроцитов. Такие переходные формы могут наблюдаться и при их старении.

Цель работы – изучить влияние искусственной гибернации (ИГ) на соотношение форм эритроцитов в крови гомойо- (крысы) и гетеротермных (хомяки) животных. Работа выполнена на 7-8-месячных самцах белых крыс и золотистых хомячков с соблюдением всех биоэтических норм. Состояние ИГ достигали методом «закрытого сосуда» Бахметьева-Анджуса-Джайя (гипотермия на фоне нарастающей гипоксии-гиперкапнии). Ректальную температуру (РТ) измеряли электронным термометром. Методом малоуглового рассеяния света суспензией эритроцитов определяли индекс сферичности (ИС) клеток, преобладающих в следующих интервалах: сфероциты (ИС = 1–1,3), стоматоциты (ИС = 1,3–1,7), нормальные (ИС = 1,7–2,1) и уплощенные (ИС = 2,1–3) дискоциты.

Уже в контроле (РТ 38°C) отмечались особенности соотношения форм эритроцитов у гомойо- и гетеротермных животных: у хомяков процент нормальных дискоцитов ниже, а стоматоцитов – выше, чем у крыс. При ИГ (РТ 19°C) у обоих видов животных резко падала доля нормальных дискоцитов, стоматоцитов сильно возрастала (у крыс значительно), заметно увеличивалось количество сфероцитов у хомяков. Через 2 ч после ИГ (РТ 33...34°C) тенденция была обратной (число дискоцитов увеличивалось, стоматоцитов снижалось), доля сфероцитов у крыс возрастала, у хомяков снижалась до 0,5%. Через 24 ч после ИГ (РТ 37°C) в обеих группах сфероциты (предгемолитическая форма) не определялись, стоматоциты возвращались к исходному уровню у хомяков, у крыс оставались на уровне 2 ч после ИГ, доля дискоцитов возрастала, но по-разному. У крыс преобладали уплощенные дискоциты (доля их увеличивалась до 53% при контроле  $5 \pm 2\%$ ), а у хомяков – нормальные (на 12%) дискоциты.

Таким образом, и в контроле, и при ответной реакции на ИГ в крови гомойо- и гетеротермных животных отмечены особенности в соотношении форм эритроцитов. Через 24 ч после ИГ сфероциты в крови не выявляются, а доля дискоцитов значительно превышает контрольные уровни (у хомяков за счет нормальных, у крыс – уплощенных форм).

Many aspects of responses of functional systems to the factors, inducing hibernation and at the same time being potentially dangerous for an organism have still remained unclear. In maintenance of a constant internal environment of organism a significant role belongs to erythrocytes: the most numerous formed elements, having a particular biconcave shape of discocyte, which allows a high specific transporting function. Normally, 80% of erythrocytes are discocytes (normocytes), the rest are the atypical shapes (physiological poikilocytosis). The effect on animals of various endo- and exogenous factors contributes to the emergence of reversible (echinocytes and stomatocytes) and irreversible (spherocytes, elliptocytes, kodocytes) changes in erythrocytes shapes. These transitional forms may be observed under their ageing as well. This research aim was to study the effect of artificial hibernation (AH) on the ratio of erythrocyte shapes in blood of homoio- (rats) and heterothermic (hamsters) animals. The research was carried out in 7–8-month-old male white rats and golden hamsters with observing the whole bioethical norms. The AH state was achieved by the method of 'closed vessel' of Bakhmet'ev-Andjus-Gaja (hypothermia at the background of increasing hypoxia-hypercapnia). Rectal temperature (RT) was measured with an electronic thermometer. Using the method of small-angle light scattering by erythrocyte suspension there was determined the sphericity index (SI) of cells, predominating within the following intervals: spherocytes (SI = 1–1.3), stomatocytes (SI = 1.3–1.7), normal (SI = 1.7–2.1) and flattened (SI = 2.1–3) discocytes. Even in the control (RT 38°C) we noted the peculiarities in the ratio of erythrocyte shapes in homoio- and heterothermic animals: in hamsters the percentage of normal discocytes was lower, but the one of stomatocytes was higher than in rats. Under AH (RT 19°C) in both animal species there was a sharp decrease in a part of normal discocytes, that of stomatocytes was strongly increased (much more in rats), the number of spherocytes was considerably augmented in hamsters. Two hours after AH (RT 33...34°C) the tendency was reversed (a number of discocytes increased, but stomatocytes decreased), a part of spherocytes increased in rats, but reduced in hamsters down to 0.5%. In 24 hrs after AH (RT 37°C) in both groups no spherocytes (prehemolytic shape) were defined, the stomatocytes returned to the initial level in hamsters, in rats it remained at the level of 2 hrs after AH, a part of discocytes augmented, but in a different way. The flattened discocytes predominated in rats (their part increased up to 53% at the control of  $5 \pm 2\%$ ), and in hamsters – the normal (12%) ones. Thus, both in the control and under response to AH in blood of homoio- and heterothermic animals there were noted the peculiarities in the ratio of erythrocyte shapes. In 24 hrs after AH no spherocytes in blood were detected, and a part of discocytes significantly exceeded the control levels (due to the normal forms in hamster and flattened ones in rats).

## Особенности воздействия легкой гипотермии на костную ткань

Д.М. ПОШЕЛОК, Л.М. БЕНГУС, О.А. НИКОЛЬЧЕНКО

ГУ «Институт патологии позвоночника и суставов им. проф. М.И. Ситенко НАМН Украины», г. Харьков

## Peculiarities of Slight Hypothermia Effect on Bone Tissue

D.M. POSHELOK, L.M. BENGUS, O.A. NIKOLCHENKO

Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology

of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Распространенность костной патологии во всем мире является одной из основных медико-социальных проблем современности. Костная система активно взаимодействует с другими системами организма и в составе целостного организма реагирует на действие экзогенных и внутренних средовых факторов. Особенности ремоделирования костной ткани в условиях действия различных неблагоприятных факторов являются фундаментальной проблемой биологии и медицины.

Цель работы – изучить влияние легкой гипотермии на структуру компактной кости белых крыс.

Для моделирования гипотермии у крыс их стерильно помещали в отдельные контейнеры холодильной камеры при  $-20^{\circ}\text{C}$  на 5 ч в течение 4 суток. Ректальное измерение температуры показало ее снижение на  $1,5-2^{\circ}\text{C}$  по сравнению с показателями контрольной группы ( $37,5-38,3^{\circ}\text{C}$ ). Крыс выводили из эксперимента через 14 суток после моделирования гипотермии. Работа с животными проводилась в соответствии с требованиями биоэтики. Материал (диафизы бедренных костей) исследовали методом трансмиссионной электронной микроскопии.

У животных в компактной кости на данный срок наблюдений имели место значительные нарушения ультраструктурной организации. В костной ткани преобладали остециты с электронно-плотным ядром, представленным преимущественно гетерохроматином. В цитоплазме клеток отмечена низкая плотность мембранных органоидов, часто встречались вторичные лизосомы. На участках отмечен лизис цитоплазматической мембраны. Такие остециты располагались в расширенных костных лакунах резорбционного типа, имеющих неровные зубчатые края, что является свидетельством активизации остеоцитарной резорбции. Вблизи расширенных (по типу синусоидов) гемокapилляров костного мозга локализованы остеокласты, имеющие, как правило, два-три лопатных ядра и множество округлых и овальных митохондрий в цитоплазме.

Признаки активизации костной резорбции были также отмечены в области периоста, поверхность которого на значительном протяжении была бахромчатой, представленной множеством мелких костных фрагментов.

В зоне резорбции периоста выявлялись мононуклеарные фагоциты – клетки, играющие вспомогательную роль в процессе костной резорбции и включающиеся в этот процесс после завершения основной остеокластической резорбции.

В условиях легкой гипотермии в компактной кости крыс наблюдается активизация остеоцитарного остеолита и остеокластической костной резорбции. Имеет место периостальная резорбция с участием мононуклеарных фагоцитов.

Occurrence of bone pathology worldwide is known as one of basic medical and social problems today. Bone system actively interacts with other ones of an organism and as a part of whole body responses to the effect of exogenous and internal media factors. Peculiarities of bone tissue remodelling under the effect of unfavourable factors are the fundamental tasks of biology and medicine.

The research aim was to study the effect of slight hypothermia on structure of compact bone of white rats.

To simulate hypothermia in rats they were placed into sterile separate containers of freezing chamber at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 5 hrs during 4 days. Rectal temperature measurement has shown its reduction by  $1.5-2^{\circ}\text{C}$  of compared with the control group indices ( $37.5-38.3^{\circ}\text{C}$ ). The rats were withdrawn from the experiment in 14 days after hypothermia modelling. The work with the animals was performed according to bioethics requirements. The material (femur bone diaphyses) was investigated by transmission electron microscopy.

In animals in compact bone for this observation term significant disorders of ultrastructural organization took place. In bone tissue the osteocytes with electron dense nucleus represented mainly by heterochromatin predominated. In cell cytoplasm low density of membrane organoids was noted, the secondary lysosomes were frequently found. In the sites the lysis of cytoplasm membrane was noticed. These osteocytes were located in the widen bone lacunas of resorption type having irregular crenated edges, that is an evidence of activation of osteocyte resorption. Near the widen (on sinusoid type) hemocapillaries of bone marrow the osteoclasts having as a rule 2–3 lobate nuclei and numerous roundish and oval mitochondria in cytoplasm were localized.

The signs of activated bone resorption were also found in periosteum area, the surface of which at a significant length was fringy, represented by many bone fragments.

In resorption zone of periosteum there were revealed mononuclear phagocytes, the cells playing an assisting role during bone resorption and involving into this process after ceasing the main osteoclast resorption.

Under conditions of slight hypothermia in rat compact bone there was observed the activation of osteocytic osteolysis and osteoclast bone resorption. Periosteal resorption with participation of mononuclear phagocytes takes place.

## Влияние «Даларгина» на свободнорадикальные процессы в крови крыс при гипотермии

МАЯХИ МОХАММЕД Т. ДЖАБЕР, Ж.Г. ИСМАИЛОВА, М.Д. АСТАЕВА, Н.К. КЛИЧХАНОВ  
*Дагестанский государственный университет, г. Махачкала, Россия*

### Effect of Dalargin on Free Radical Processes in Rat Blood at Hypothermia

MAYANI MOHAMMED T. JABER, J.G. ISMAILOVA, M.D. ASTAYEVA, N.K. KLICHKHANOV  
*Dagestan State University, Makhachkala, Russia*

У ненаркотизированных гомеотермных животных при снижении температуры тела развивается мощная стрессорная реакция, которая способствует периферической вазоконстрикции и запуску сократительного и несократительного термогенеза. Энергетический обмен тесно связан с генерацией активных форм кислорода (АФК) и соответствующих свободнорадикальных процессов, которые представляют значительную угрозу нормальному функционированию клеточных механизмов. Поэтому поиск способов защиты структур клеток от окислительного повреждения при гипотермии представляет существенный интерес.

В данной работе изучена интенсивность свободнорадикальных процессов в эритроцитах крыс при гипотермии разной глубины и длительности, а также введении «Даларгина».

Исследования выполнены на самцах крыс линии Вистар. Гипотермию вызывали наружным охлаждением. Температуру тела крыс снижали до 30 и 20°C. Гипотермию 30°C пролонгировали также в течение 3 ч. Интенсивность генерации АФК оценивали по содержанию в плазме крови мочевой кислоты и стабильных продуктов оксида азота. В эритроцитах и их мембранах определяли продукты окислительной модификации липидов и белков, содержание восстановленного глутатиона, активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы.

Кратковременная гипотермия 30°C стимулирует образование АФК в крови, окислительную модификацию липидов и белков мембран эритроцитов, снижает содержание восстановленного глутатиона в эритроцитах. При пролонгировании гипотермии 30°C в течение 3 ч возрастает активность антиоксидантной защиты эритроцитов и снижается степень окислительной модификации мембранных белков. Глубокая гипотермия (20°C) уменьшает продукцию АФК в крови, степень окислительной модификации липидов и белков мембран эритроцитов. Таким образом, при кратковременной умеренной гипотермии в крови интенсифицируются свободнорадикальные процессы.

Для предупреждения развития окислительного стресса при кратковременной гипотермии 30°C животным за 30 мин до холодого воздействия внутрибрюшинно вводили синтетический аналог лей-энкефалина гексапептид «Даларгин» (100 мкг/кг). Установлено, что при гипотермии на фоне даларгина не повышается уровень карбонилирования белков мембран эритроцитов, не снижается содержание восстановленного глутатиона в эритроцитах, не изменяется активность СОД и достоверно возрастает активность каталазы в эритроцитах.

Таким образом, превентивное введение «Даларгина» предотвращает развитие окислительного стресса в крови крыс при кратковременной гипотермии 30°C.

In non-narcotized homeothermic animals under body temperature decrease there is developed a strong stress response, contributing to peripheral vasoconstriction and triggering shivering and non-shivering thermogenesis. Energy metabolism is closely related to generation of reactive oxygen species (ROS) and corresponding free radical processes, representing a significant threat for normal functioning of cell mechanisms. Therefore the search for ways to protect cell structures against oxidative damage during hypothermia is of considerable interest.

In this research we investigated the intensity of free radical processes in rat erythrocytes under hypothermia of different depth and duration, as well as Dalargin introduction.

The experiments were performed in Wistar male rats. Hypothermia was induced by external cooling. Rat's body temperature was reduced down to 30 and 20°C. Hypothermia of 30°C was also prolonged within 3 hrs. The intensity of ROS generation was assessed by the content of uric acid and stable products of nitric oxide in blood plasma. In erythrocytes and their membranes there were determined the products of oxidative modification of lipids and proteins, the content of reduced glutathione, superoxide dismutase (SOD) and catalase activity.

Short-term hypothermia of 30°C stimulates the ROS formation in blood, oxidative modification of lipids and proteins of erythrocyte membranes, decreases the content of reduced glutathione in erythrocytes. Under prolonged 30°C hypothermia within 3 hrs there is an increase in the activity of erythrocyte antioxidant protection and decrease in oxidative modification degree of membrane proteins. Deep hypothermia (20°C) reduces the ROS production in blood, the degree of oxidative modification of lipids and proteins of erythrocyte membranes. Thus, under a short-term moderate hypothermia there is the intensification of free radical processes in blood.

To prevent the oxidative stress development under a short-term 30°C hypothermia the animals 30 min prior to cold effect received intraperitoneally a synthetic analogue of leu-enkephalin: hexapeptide Dalargin (100 µg/kg). It was established, that under hypothermia at the background of dalargin there were no increase in protein carbonylation of erythrocyte membranes, no decrease in the content of reduced glutathione in erythrocytes, no change in SOD activity and statistically significant increase in catalase activity in erythrocytes.

Thus, a preventive introduction of Dalargin prevents the oxidative stress development in rat blood under a short-term 30°C hypothermia.



# Влияние криотерапии на опорно-двигательную и мышечную системы человека

О.А. ПАНЧЕНКО, С.М. РАДЧЕНКО

Донецкий национальный медицинский университет им. М.Горького  
ГУ «Научно-практический медицинский реабилитационно-диагностический центр МЗ Украины», г.Донецк

## Effect of Cryotherapy on Human Musculoskeletal and Muscular System

O.A. PANCHENKO, S.M. RADCHENKO

M. Gorky Donetsk National Medical University, Ukraine  
Scientific and Practical Medical Rehabilitation and Diagnostic  
Center of the Ministry of Health Care of Ukraine, Donetsk, Ukraine

Цель работы – изучить механизмы реакций опорно-двигательных и мышечных систем организма человека на криотерапевтическое воздействие.

В исследовании принимали участие 259 человек в возрасте 18–75 лет с патологией опорно-двигательной системы, из них 164 женщины (63,3%) и 95 мужчин (36,7%), которые проходили курс реабилитации на базе ГУ «НПМ РДЦ МЗ Украины». Пациенты были отобраны на основании критериев включения и исключения они давали добровольное информированное согласие на воздействие экстремально низкой температурой и обследования в процессе курса криотерапии.

В исследовании применялась криокамера «Cryo Therapy Chamber» («Zimmer Medizin Systeme», Германия) – 110°C. До и после курса криотерапии проводились миографические исследования на аппарате «MYOMED 932».

Объектом исследования при миографии являлись мышцы предплечья правой и левой руки, круглый пронатор (*M. pronator teres*). С помощью ЭМГ определялось минимальное время, достаточное для того, чтобы ток при удвоенной реобазе вызвал импульс возбуждения – показатель хронаксии. Этот показатель характеризует быстроту возникновения возбуждения: чем с большей интенсивностью и скоростью работает мышечная ткань, тем ее хронаксия меньше. Показатель хронаксии как временной параметр возбудимости характеризовал физиологические системы в условиях холодового стресса. Исходные значения хронаксии у женщин составляли  $210 \pm 42$  мс (95% ДИ 180; 480) после курса криовоздействия –  $200 \pm 46$  мс (95% ДИ 150; 400), эти значения статистически между собой не отличались ( $p > 0,05$ ). У мужчин среднее значение хронаксии до курса криовоздействия было зафиксировано на уровне  $200 \pm 35$  мс (95% ДИ 150; 280), после курса –  $130 \pm 61$  мс (95% ДИ 100; 300) ( $p > 0,05$ ). После курса криотерапии выявлено увеличение мышечной выносливости у мужчин в среднем на 4 с (95% ДИ 2; 6).

После одного сеанса криотерапии увеличивались мышечная сила и выносливость у пациентов обоих полов. Значения силы увеличивались в среднем на 1 кгс (95% ДИ 0; 2) ( $p < 0,05$ ). Мышечная выносливость у женщин изменялась в среднем на 2 с (95% ДИ 1; 3), у мужчин – на 1 с (95% ДИ 0; 4) ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, статистически достоверных изменений значений хронаксии после курса криовоздействия не выявлено как у мужчин, так и у женщин. Увеличение мышечной силы и выносливости у пациентов свидетельствует о стимулирующем воздействии сеанса криотерапии на организм человека.

The research aim was to study the mechanisms of response of musculoskeletal and muscular systems of human organism to cryotherapeutic effect.

The investigation involved 259 people of 18–75 years with the pathology of the musculoskeletal system, including 164 women (63.3%) and 95 men (36.7%) who were under rehabilitation at the Scientific and Practical Medical Rehabilitation and Diagnostic Center of the Ministry of Health Care of Ukraine.

The patients were selected by the inclusion and exclusion criteria. They gave free informed consent to the effects of extreme low temperature and examination during the course of cryotherapy.

Cryo Therapy Chamber Zimmer Medizin Systeme – 110°C (Germany) was used for investigation. Before and after cryotherapy myographic studies were performed using apparatus MYOMED 932.

The research object for myography were the muscles of forearm of right and left hand, round pronator (*M. pronator teres*). The minimum time period was determined with the help of EMG and was sufficient for the current at double rheobase to cause excitation pulse, chronaxia index. This index characterizes the speed of excitation: the more intensity and speed of working muscle tissue is the less chronaxia is. Chronaxia index as a temporary parameter of excitability characterized physiological system under cold stress. The initial values of chronaxia in women were  $210 \pm 42$  ms (95% CI 180, 480) after a course of cryotherapy they made  $200 \pm 46$  ms (95% CI 150, 400), these values were statistically not different ( $p > 0.05$ ). In men, the average rate of chronaxia before the cryotherapy course was recorded at the level  $200 \pm 35$  ms (95% CI 150, 280) after the course it made  $130 \pm 61$  ms (95% CI 100, 300) ( $p > 0.05$ ). After the course of cryotherapy increasing in muscle endurance in men in average by 4 s (95% CI 2, 6) was noted.

After one session of cryotherapy muscle strength and endurance in patients of both sexes increased. Strength values increased in average by 1 kgf (95% CI, 0, 2) ( $p < 0.05$ ). Muscular endurance in women varied in average by 2 s (95% CI 1, 3), in men 1 s (95% CI, 0, 4) ( $p < 0.05$ ).

Thus, statistically significant changes in the values of chronaxia after the cryotherapy were not found in both men and women. Increasing of muscle strength and endurance in patients suggests a stimulating influence of cryotherapy session on the human organism.