

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
Національна академія наук України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

МАРТИНОВА ЮЛІЯ ВІКТОРІВНА

УДК 616-001.18/19:612.649.011.87:612.67.019

ДИСЕРТАЦІЯ

ВПЛИВ РИТМІЧНОГО ЕКСТРЕМАЛЬНОГО ОХОЛОДЖЕННЯ ТА
КОРДОВОЇ КРОВІ НА СТАН СИСТЕМ НЕЙРОГУМОРАЛЬНОЇ
РЕГУЛЯЦІЇ В ДИНАМІЦІ СТАРІННЯ ЩУРІВ

03.00.19 – кріобіологія

біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії)

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ (підпис, ініціали та прізвище здобувача)

Науковий керівник Бабійчук Владислав Георгійович, доктор медичних наук,
старший науковий співробітник

Харків – 2018

АНОТАЦІЯ

Мартинова Ю. В. Вплив ритмічного екстремального охолодження та кордової крові на стан систем нейрогуморальної регуляції в динаміці старіння щурів. — Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.19 «Кріобіологія». — Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2018.

Старіння не є патологічним станом, а являє собою послідовний природний фізіологічний процес, який супроводжується виснаженням захисних і регуляторних механізмів, зменшенням пластичності адаптаційних процесів, зниженням загальної життєздатності організму, і, як наслідок, розвитком гострих і хронічних захворювань різних органів і систем.

Відомо, що загальне екстремальне охолодження (-120°C) активує процеси саморегуляції організму і збільшує його адаптаційні резерви. Окрім того, для покращення саморегуляції, можуть використовуватися біологічні засоби (клітини, тканини, екстракти рослинного і тваринного походження). У якості перспективного геропротектора можна розглядати кордову кров (КК), до складу якої входять стовбурові клітини (СК) і велика кількість ростових факторів, які при введенні в літній організм, імовірно, здатні надавати «омолоджуючий» вплив на власні СК, кількість, різноманітність і активність котрих знижується з віком.

На сьогодні фундаментальні дослідження, які розкривають механізми дії ритмічного екстремального охолодження (-120°C), а також ядровмісних клітин кордової крові (ЯВК КК), перебувають на стадії ретельного вивчення, а експериментальних даних про їхній вплив на організм як цілісну саморегулюючу систему за поєднаного застосування немає.

З огляду на вищенаведене доцільним є визначення дії ритмічних екстремальних холодових (-120°C) впливів (РЕХВ), кріоконсервованих ЯВК КК (кЯВК КК) і їх поєднаного застосування на структурно-функціональний стан систем нейрогуморальної регуляції в динаміці старіння щурів.

У дисертаційній роботі вперше дана оцінка структурно-функціональним змінам, які відбуваються в регуляторних системах організму тварин після РЕХВ, введення кЯВК КК та за їх поєднання в динаміці природного старіння, починаючи з 6-місячного віку. Уперше показана ефективність самостійного й поєднаного застосування РЕХВ і кЯВК КК, починаючи з молодого віку, з метою підвищення власних адаптаційно-регуляторних можливостей організму, які істотно знижуються з віком.

Для оцінки стану адаптаційних резервів та нейрогуморальної регуляції організму тварин досліджено показники (TP, HF, LF, VLF) спектрального аналізу варіабельності серцевого ритму (BCP), визначено концентрацію тиреоїдних (тироксину (T_4), трийодтироніну (T_3)) і статевих (тестостерону (T_c), естрадіолу (E_c) та дегідроепіандростерон-сульфату) гормонів, співвідношення тестостерону до естрадіолу (T_c/E_c) як показника андроген-естрогенного балансу, вміст кінцевих метаболітів оксиду азоту (NO) у сироватці крові. Проведені гістологічні (з оцінкою морфометричних показників) та ультрамікроскопічні дослідження будови міокарда як одного із головних маркерів, який відображає процес старіння. Усі дослідження, окрім спектрального аналізу BCP (який виконували в різні строки після впливу, до місяця включно), проводили через місяць після відповідного впливу.

Встановлено, що в процесі природного старіння щурів значення загальної спектральної потужності BCP (TP) знижуються внаслідок зменшення тонуусу симпатичного й парасимпатичного відділу вегетативної нервової системи (ВНС) (показники LF і HF). Одноразове використання РЕХВ, кЯВК КК та їх поєднання в старих тварин супроводжується збільшенням TP (в 1,5, 2,3 та 2,6 рази, відповідно) завдяки підвищенню активності або гуморально-

метаболічної ланки регуляції (у разі РЕХВ), або обох показників активності ВНС (у разі кЯВК КК та поєднаного впливу), проте не призводить до збалансованої активації всіх регуляторних ланок, що свідчить про виснаження адаптаційно-компенсаторних резервів організму.

Уперше встановлено, що повторні процедури РЕХВ, введення кЯВК КК та їх поєднання протягом життєвого циклу, здатні підвищувати адаптаційно-компенсаторні можливості організму експериментальних тварин незалежно від їхнього віку завдяки збільшенню активності всіх регуляторних ланок (зазначена динаміка зберігається у віддалені терміни спостережень). Водночас поєднане застосування екстремального охолодження і кЯВК КК у динаміці старіння щурів має більш виражений позитивний вплив на стан систем нейрогуморальної регуляції експериментальних тварин: відносно контрольних показників ТР підвищується у 8,6 раза, LF — у 10,6 раза, HF — у 9,7 раза, VLF — у 2,9 раза.

В динаміці старіння щурів виявлено зниження рівня тироксину у тварин 24-місячного віку в 1,5 та 2 раза відносно 6- та 12- (18)- місячних щурів, відповідно. Показано, що самостійне й поєднане з РЕХВ застосування кЯВК КК супроводжувалось збільшенням концентрації тироксину в сироватці крові старих щурів за одноразового (в 1,07 та 1,4 раза, відповідно) і повторних застосувань (в 1,3 та 2,3 раза, відповідно), що свідчить про підвищення функціональної активності щитоподібної залози завдяки відновлення її гормонсинтезуючої здатності.

Вміст тестостерону і співвідношення гормонів тестостерон/естрадіол у сироватці крові щурів контрольної групи зменшувалися з віком у 1,6–2,2 та 1,9–2,4 раза відповідно. На тлі РЕХВ відбувалося зниження концентрації Тс у 6- і 12- місячних тварин (в 1,8 та 1,9 раза відповідно). Проте у 18-місячних щурів зареєстровано статистично значуще підвищення Тс в 1,6 раза. За одноразового застосування у 24-місячному віці рівень Тс залишався на контрольному рівні. Одноразове використання кЯВК КК сприяло підвищенню концентрації Тс у старих щурів у 2,6 раза, а за повторного застосування — у 18-місячних у 3,4

раза. Одноразове поєднане застосування РЕХВ і кЯВК КК викликало підвищення утричі рівня як Тс, так і Ес (завдяки чому співвідношення цих гормонів було незмінним проти контрольного).

Після поєданого використання РЕХВ і кЯВК КК у динаміці старіння щурів збільшення вмісту Тс (у 1,4–3,1 раза) та співвідношення Тс/Ес (у 1,7–2,2 раза) спостерігалось у всіх вікових групах, за винятком 12-місячних тварин. У тварин 24-місячного віку на тлі повторного поєданого застосування РЕХВ і кЯВК КК, на відміну від самотійного, підвищувалися не тільки концентрація Тс (у 1,9 раза), а і співвідношення Тс/Ес (у 2,1 раза), що підтверджує доцільність поєданого застосування зазначених процедур, починаючи з молодого віку.

Рівень дегідроепіандростерон-сульфату у сироватці крові щурів у динаміці природного старіння значуще не змінювався.

Таким чином, у результаті дослідження рівня тиреоїдних і статевих гормонів сироватки крові щурів уперше встановлено, що РЕХВ стимулюють синтетичну активність щитоподібної та статевих залоз у старіючих тварин, проте як стресовий вплив помірної інтенсивності, вони все ж сприяють зниженню рівня тестостерону в молодих щурів. Введення кЯВК КК не спричиняє функціональних порушень щитоподібної і статевих залоз та покращує їхній функціональний стан у старих тварин завдяки відновленню гормонсинтезуючої здатності. Поєднане використання РЕХВ і кЯВК КК призводить до нормалізації гормонального гомеостазу завдяки збільшенню концентрації тироксину, тестостерону і співвідношення тестостерон/естрадіол в сироватці крові, тоді як у щурів контрольної групи виявлено достовірне зниження їхнього вмісту.

Показано, що вміст оксиду азоту знижується в сироватці крові старих щурів у 3,1 раза. Уперше виявлено, що ведення кЯВК КК, а також поєднане використання РЕХВ і кЯВК КК у динаміці старіння сприяє відновленню його концентрації, має стимулюючий вплив на синтез NO у разі його дефіциту й не

призводить до надлишку цієї молекули. Це може бути пов'язано з активацією NO- синтаз та експресією їхніх генів.

За результатами гістологічного дослідження серцевого м'яза в динаміці природного старіння щурів встановлено, що перші морфологічні ознаки, які свідчать про вікові зміни судинного русла, виявлялись у 12-місячних тварин. Зрив компенсаторних можливостей міокарда в щурів відбувався до 24-місячного віку.

Уперше показано, що починаючи з 12-місячного віку, на тлі PEXB поліпшувалася трофіка серцевого м'яза завдяки збільшенню кількості капілярів на одиницю площі тканини, проте у 18-місячних щурів все ж відбувалося зменшення кількості та площі ядер кардіоміоцитів. Після введення кЯВК КК ознаки порушення кровообігу, набряк, кардіосклероз у 24-місячних тварин були виражені помірно, лімфо-гістіоцитарні інфільтрати відсутні. Значно зростали площа та кількість ядер кардіоміоцитів. Відзначалася тенденція до збільшення кількості капілярів. Істотно збільшувалася кількість капілярів у 12- та 18-місячних щурів.

На тлі поєданого застосування PEXB і кЯВК КК підвищувалися компенсаторні можливості серцевого м'яза завдяки збільшенню як кількості, так і площі ядер кардіоміоцитів, поліпшувалася трофіка внаслідок утворення нових капілярів. Це підтверджувалося проліферацією в інтерстиціальній тканині фібробластів, які, як відомо, продукують проангіогенні фактори. Описані зміни перешкоджають розвитку ішемії міокарда, кардіосклерозу й некрозу.

У щурів контрольної групи, починаючи з 18-місячного віку, виявлялися ознаки розвитку дистрофічних процесів на субклітинному рівні: набухання мітохондрій (Мт), вогнищеве просвітлення їхнього матриксу, деструкція деяких крист. У 24-місячних щурів траплялися також тотально зруйновані Мт. Дегенеративно-деструктивні зміни Мт свідчили про істотні порушення внутрішньоклітинної біоенергетики і зниження скоротливої здатності кардіоміоцитів. Спостерігалися й ознаки досить високої активності

катаболічних процесів: включення ліпідів і ліпофусцину, зниження кількості рибосом, полісом і гранул глікогену.

Уперше встановлено, що застосування повторних сеансів РЕХВ і введення кЯВК КК у динаміці старіння тварин супроводжується підвищенням активності метаболічних і синтетичних процесів у тканинах та судинах міокарда завдяки нормалізації внутрішньоклітинної біоенергетики, пов'язаної зі структурно-функціональним станом Мт. Зростала кількість Мт і крист у них. Кардіоміоцити й ендотеліоцити здебільшого містили Мт з перетяжками. Найбільш виражені зміни репаративного характеру виявлялися у 24-місячних щурів групи поєднаного застосування: набагато рідше траплялися вторинні лізосоми і включення ліпідів, зростала кількість рибосом, полісом і гранул глікогену, що є показником збільшення резервних скорочувальних механізмів міокарда.

Отже, застосування кЯВК КК, спільно з РЕХВ, протягом життєвого циклу тварин здатне тривалий час зберігати «молоду» ритміку нейрогуморальних впливів на організм, сприяти реалізації гормональної ланки вітаукту, стимулювати синтез NO у разі його дефіциту, активувати метаболічні та синтетичні процеси на мікроскопічному та субмікроскопічному рівні.

Виявлені в дослідженні прояви впливу РЕХВ (-120°C) і кЯВК КК на структурно-функціональний стан систем нейрогуморальної регуляції в динаміці старіння щурів обґрунтовують перспективність їх самостійного та поєднаного застосування в геронтології та геріатрії. Отримані експериментальні дані, розкривають спрямованість і рівень активності адаптаційних і компенсаторних процесів, які відбуваються в регуляторних системах організму тварин на тлі РЕХВ, введення кЯВК КК, а також їх поєднання, характеризують можливий механізм дії, доводять доцільність використання РЕХВ і кЯВК КК, починаючи з молодого віку.

Ключові слова: кріоконсервовані ядровмісні клітини кордової крові, ритмічні екстремальні холодові впливи, нейрогуморальна регуляція, міокард, старіння, щури.

Список публікацій здобувача

Статті у фахових журналах України

1. Состояние вегетативной и гуморальной регуляции сердечного ритма молодых и старых крыс на фоне ритмического экстремального охлаждения в сочетании с введением ядросодержащих клеток кордовой крови / **Ю. В. Руднева**, В. Г. Бабийчук, Е. А. Чернявская, В. В. Кулик // Проблемы криобиологии и криомедицины. 2013. Т. 23, № 4. С. 318–325. (*Scopus*)

2. Особенности изменений ультраструктурной организации кардиомиоцитов и эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда крыс в динамике старения / **Ю. В. Руднева**, В. П. Невзоров, В. Г. Бабийчук, Е. А. Чернявская, В. В. Кулик // Вісник проблем біології і медицини. 2014. Вип. 4, Т. 2 (114). С. 253–258.

3. **Мартынова Ю. В.**, Бабийчук Л. В. Оценка нейрогуморальной регуляции сердечного ритма в динамике старения крыс на фоне повторного введения ядросодержащих клеток кордовой крови // Вісник Луганського національного університету імені Тараса Шевченка. 2014. Частина I: Біологічні науки. № 12 (295). С. 14–22.

4. Особенности изменений ультраструктурной организации кардиомиоцитов и эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда крыс в динамике старения после сочетанного применения кордовой крови и экстремального охлаждения (-120°C) / **Ю. В. Мартынова**, В. П. Невзоров, В. Г. Бабийчук, Е. А. Чернявская, В. В. Кулик // Вісник проблем біології і медицини». 2015. Вип. 2, Т. 1 (118). С. 244–250.

5. Ультраструктурная организация эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда в динамике старения крыс на фоне применения кріоконсервованного препарата кордовой крови / **Ю. В. Мартынова**,

В. П. Невзоров, В. Г. Бабийчук, Е. А. Чернявская, В. В. Кулик // Світ медицини та біології. 2015. №2(49). С. 104–107.

Статті в журналах та збірках матеріалів конференцій інших країн, які входять до міжнародних наукометричних баз

6. Neurohumoral changes in rats of different age groups on the background of injection of cryopreserved cord blood nucleated cells / **Yu. V. Martynova**, V. G. Babiychuk, L. A. Sirotenko, N. G. Malova, L. V. Babiychuk // *Advances in Gerontology*. 2016. Vol. 6, No. 4. P. 304–310. (*Scopus*)

7. Impact of Frozen-Thawed Cord Blood Nucleated Cells Combined with Extreme Whole Body Cooling on Rat's Neurohumoral Regulation in Dynamics of Aging / **Yu. V. Martynova**, L. V. Babiychuk, V. G. Babiychuk, L. A. Sirotenko, N.G. Malova // *Cold Applications in Life Sciences: proceedings of the IIR Workshop (Dresden, 08–09 September 2016)*. P. 40–44. DOI: 10.18462/iir.cals.2016.0010 (*Scopus*)

Статті в наукових періодичних виданнях інших країн

8. **Руднева Ю. В.**, Бабийчук В. Г., Чернявская Е. А. Влияние ядродержащих клеток кордовой крови на показатели спектрального анализа вариабельности сердечного ритма у молодых и старых крыс // «Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі»: Серия биологических наук; серия медицинских наук. 2014. Ч. 4., прил. С.131–135. (*“Перечень научных изданий Республики Беларусь для опубликования результатов диссертационных исследований”*)

9. Влияние ритмических экстремальных холодовых воздействий и кордовой крови на состояние вегетативной регуляции сердечным ритмом у животных различных возрастных групп в норме и при алиментарном ожирении / **Ю. В. Руднева**, В. Г. Бабийчук, Е. А. Чернявская, В. В. Кулик, Л. В. Бабийчук // *Криоконсервация генетических ресурсов. Современное состояние, проблемы*

и перспективы: материалы науч.-практ. конф. с междунар. участ. (г. Пущино, 28–30 окт. 2014 г.). Биофизика живой клетки. 2014. Т.10. С. 171–173.

Статті в збірках матеріалів конференцій

10. Влияние ритмических экстремальных холодовых воздействий (-120°C) и кордовой крови на состояние вегетативной регуляции сердечного ритма в динамике старения крыс / Е. А. Чернявская, В. Г. Бабийчук, **Ю. В. Руднева**, В. В. Кулик, В. В. Мамонтов // Теоретические и практические аспекты современной криобиологии: материалы междунар. заочн. науч.-практ. конф. (Россия — Украина, 24 марта 2014 г.). Сыктывкар, 2014. С. 392–398.

11. **Руднева Ю. В.** Состояние нейрогуморальной регуляции сердечным ритмом в динамике старения крыс при повторных сеансах ритмического общего экстремального (-120°C) охлаждения // Адаптация биологических систем к естественным и экстремальным факторам среды: материалы V междунар. науч.-практ. конф. (г. Челябинск, 2–3 окт. 2014 г.). Челябинск, 2014. С. 219–224.

12. **Руднева Ю. В.**, Бабийчук В. Г. Влияние кордовой крови и ритмического экстремального охлаждения (-120°C) на состояние основных показателей спектрального анализа вариабельности сердечного ритма в динамике старения крыс // Вариабельность сердечного ритма: теоретические и прикладные аспекты: материалы Всероссийской заочн. науч.-практ. конф. (г. Чебоксары, 1 ноября 2014 г.). Чебоксары, 2014. С. 138–142.

13. **Мartiнова Ю. В.**, Невзоров В. П., Бабийчук В. Г. Изменение ультраструктурной организации кардиомиоцитов после применения кордовой крови в динамике старения крыс // Микро- и макроанатомия: материалы II межкафедр. науч.-практ. конф. с междунар.участ. студентов и молодых ученых, посвящен. памяти Лойко Ромуальда Михайловича (г. Гомель, 13 марта 2015г.). Гомель, 2015. С. 64–69.

Тези конференцій

14. **Руднева Ю. В.**, Бабийчук В. Г., Чернявская Е. А. Состояние вегетативной регуляции сердечного ритма у старых крыс при сочетанном применении ритмических экстремальных холодовых воздействий (-120°C) и криоконсервированного препарата кордовой крови // Актуальные проблемы геронтологии и гериатрии: от теории к практике: материалы научно-практ. конф. и школы, посвящен. памяти академика В. В. Фролькиса (г. Киев, 16–17 мая 2013 г.). Проблемы старения и долголетия. 2013. Том 22, прил. С. 56.

15. **Руднева Ю. В.**, Бабийчук В. Г., Чернявская Е. А. Влияние ритмического экстремального охлаждения (-120°C) и ядросодержащих клеток кордовой крови на функциональное состояние систем нейрогуморальной регуляции у молодых и старых крыс // Холод в биологии и медицине — 2013: Актуальные проблемы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии: материалы 37-ой ежегодн. конф. молодых ученых (г. Харьков, 20–21 мая 2013 г.). Проблемы криобиологии и криомедицины. 2013. Т. 23, № 2. С. 16.

16. **Руднева Ю. В.**, Бабийчук В. Г., Чернявская Е. А. Влияние ядросодержащих клеток кордовой крови на показатели спектрального анализа вариабельности сердечного ритма у молодых и старых крыс // Молодежь в науке – 2013: материалы междунар. науч.-практ. конф., (г. Минск, 19–22 ноября 2013 г.). Минск, 2013. С. 270–273.

17. **Руднева Ю. В.**, Бабийчук В. Г., Чернявская Е. А. Особенности состояния вегетативной регуляции сердечного ритма у молодых крыс при сочетанном применении ритмических экстремальных холодовых воздействий (-120°C) и ядросодержащих клеток кордовой крови // матеріали ХІХ з'їзду Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнар. участю, (м. Львів, 26–29 травня 2014 р.). Фізіологічний журнал. 2014. Т. 60, № 3, дод. С. 92.

18. Вариабельность сердечного ритма в динамике старения крыс на фоне повторных сеансов ритмических экстремальных криовоздействий / **Ю. В. Руднева**, В. Г. Бабийчук, Е. А. Чернявская, В. В. Кулик // Холод в

биологии и медицине — 2014: Актуальные проблемы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии: тезисы 38-ой ежегодн. конф. молодых ученых (г. Харьков, 21–22 мая 2014 г.) Проблемы криобиологии и криомедицины. 2014. Т. 22, № 2. С. 169.

19. **Мартинова Ю. В.** Гематоенцефалічний бар'єр та його зміни в умовах ритмічних холодових впливів // Біологічні дослідження — 2015: зб.наук. праць наук.-практ. конф. для молодих учених і студентів (м. Житомир, 11–12 березня 2015 р.). Житомир, 2015. С. 390–394.

20. **Martynova Yu. V.**, Babiichuk V. G., Nevzorov V. P. Influence of repeated sessions of rhythmic extreme whole-body cooling (-120°C) on features of cardiomyocyte's ultrastructure in dynamics of rats' aging // The 52nd Annual Meeting of the Society for Cryobiology: conference proceedings (Ostrava, 26–29 July, 2015). Cryobiology. 2015. Vol. 71, Is. 3. P. 561.

21. **Мартынова Ю. В.**, Бабийчук В. Г. Влияние повторных циклов ритмических криовоздействий (-120°C) на ультраструктурную организацию эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда в динамике старения крыс // Холод в биологии и медицине — 2015: Актуальные проблемы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии: материалы 39-ой ежегодн. конф. молодых ученых, посвящ. 70-летию ЮНЕСКО (г. Харьков, 20–21 мая 2015 г.). Проблемы криобиологии и криомедицины. 2015. Т. 25, № 2. С. 166.

22. **Мартынова Ю. В.**, Бабийчук В. Г. Ультраструктурные перестройки эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда в динамике старения крыс на фоне сочетанного применения экстремального охлаждения (-120°C) и клеток кордовой крови // Ендотеліальна дисфункція при вік-залежній патології — діагностика, профілактика, лікування: матеріали конф. (м. Київ, 12–13 листопада 2015 р.). Кровообіг та гемостаз. 2015. № 1–2 (47–48). С. 120–121.

23. **Мартынова Ю. В.**, Бабийчук В. Г., Сиротенко Л. А. Содержание тиреоидных гормонов в сыворотке крови крыс на фоне ритмического экстремального охлаждения (-120°C) // Advances in Science and Technology:

материалы II междунар. науч.-практ. телеконф. (г. Пенза, 25 декабря 2015 г.). Actualscience. 2015. Т. 1, № 5 (5). С. 10–11.

24. **Мартынова Ю. В.,** Бабийчук В. Г. Влияние ритмических экстремальных холодовых воздействий на состояние вегетативной и гуморально-метаболической регуляции сердечного ритма старых крыс // Біологічні дослідження — 2016: збірник наук. праць VII всеукраїнськ. наук.-практ. конф. для молодих учених і студентів (м. Житомир, 10-11 березня 2016 р.). Житомир: ПП «Рута», 2016. С. 278–280.

25. **Мартынова Ю. В.,** Бабийчук В. Г. Содержание тиреоидных гормонов в сыворотке крови крыс в динамике старения на фоне сочетанного применения экстремального охлаждения и ядросодержащих клеток кордовой крови // Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології: матеріали IV міжнар. наук. конф. студентів, аспірантів і молодих вчених (м. Вінниця, 12–14 квітня 2016 р.). Вінниця: ДРУК, 2016. С. 360–361.

26. **Мартынова Ю. В.,** Бабийчук В. Г. Влияние повторных циклов ритмических экстремальных холодовых воздействий (-120°C) на структурное состояние миокарда в динамике старения крыс // Холод в биологии и медицине — 2016: Актуальные проблемы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии: материалы 40-ой ежегодн. конф. молодых ученых (г. Харьков, 23–24 мая 2016 г.). Проблемы криобиологии и криомедицины. 2016. Т. 26, № 2. С. 159.

27. **Martynova Yu. V.,** Babiychuk V. G. Effects of repeated cycles of rhythmic extreme whole body cooling on indices of neurohumoral regulation in rat's aging // SLTB Symposium 2016: Book of abstracts annual meeting of the Society of Low Temperature biology (Dresden, 7 September 2016). Dresden, 2016. P. 13.

28. **Martynova Yu.,** Babiichuk V. Vegetative regulation of heart rhythm and myocardium structure after whole-body cryostimulation in dynamics of aging in rats: remote effect // LIMSC 2017: Book of abstracts Leiden International (bio-)Medical Student Conference (Leiden, 16–19 March 2017). Leiden, 2017. P. 184.

29. **Мартынова Ю. В.** Влияние ядродержащих клеток пуповинной крови на морфометрические показатели миокарда крыс в динамике их старения // Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье: тезисы XX междунар. мед.-биолог. конф. молодых исследователей (г. Санкт-Петербург, 22 апреля 2017 г.). Санкт-Петербург: Изд-во СПбГУ, 2017. С. 348–349.

30. **Мартынова Ю. В.,** Бабійчук В. Г. Вплив екстремального охолодження (-120°C) на функціональний стан організму молодих та старих щурів // VIII МАК 2017: тези VIII Міжнар. Антарктичн. Конф., присвяч. 25-ій річниці приєднання України до Договору про Антарктику (17 вересня 1992 р.) (м. Київ, 16–18 травня 2017 р.). Київ, 2017. С. 71–73.

31. **Мартынова Ю. В.,** Бабійчук В. Г., Логінова О. О. Вплив ритмічного екстремального охолодження (-120°C) на функціональний стан організму щурів у динаміці їх старіння // Холод в біології та медицині — 2017: Актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології: матеріали 41-ої щорічн. конф. молодих учених (м. Харків, 24–25 травня 2017 р.). Проблемы криобиологии и криомедицины. 2017. Т. 27, № 2. С. 159.

ANNOTATION

Martynova Yu.V. Effect of rhythmic extreme cooling and cord blood on state of neurohumoral regulation systems in dynamics of rats' aging. – The qualifying scientific paper as a manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Biological Science (Philosophy Doctor) in specialty 03.00.19 “Cryobiology”. — Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2018.

Aging is not a pathological state, it is a progressive natural physiological process which is accompanied by an exhaustion of protective and regulatory mechanisms, a decrease in the plasticity of adaptation processes, the overall viability of the organism, and, thereby, the development of acute and chronic diseases of various organs and systems.

It is known that extreme whole body cooling (-120°C) activates the processes of self-regulation of the body and expands its adaptive reserves. Besides, biological agents (cells, tissues, extracts of plant's and animal's origin) can be used to improve self-regulation of the body. Cord blood (CB) comprises stem cells (SCs) and a large number of growth factors. After introduction into the aged body, these are likely to be able to provide a "rejuvenating" effect on own recipient's SCs, the number, variety and activity of those decreases with age. In view of that, cord blood can be considered as a promising geroprotective agent.

Nowadays, fundamental investigations discovering the mechanisms of action of rhythmic extreme cooling (-120°C), as well as of cord blood nucleated cells (CBNCs), are at the stage of profound study, and there are no experimental data on their combined application on the body as on the holistic self-regulating system.

In view of the mentioned above, it is advantageous to determine an impact of rhythmic extreme whole body cooling (RE WBC), cryopreserved CBNCs (cCBNCs) and their combined application on the structural and functional state of neurohumoral regulation systems in the dynamics of aging in rats.

In the thesis the structural and functional changes taking place in the regulatory systems of an animal's body after the use of RE WBC, injection of cCBNCs and their combination in the dynamics of natural aging, starting from the 6 months age, have been estimated for the first time. The efficacy of separate and combined use of RE WBC and cCBNCs, starting from the young age, in order to increase animal's adaptive and regulatory abilities of the body, significantly decreasing with age, has been shown for the first time.

The indices (TP, HF, LF, VLF) of spectral analysis of heart rate variability (HRV), the concentrations of thyroid (thyroxine (T_4), triiodothyronine (T_3)) and sex

(testosterone (Ts), estradiol (Es) and dehydroepiandrosterone sulfate) hormones, the ratio of testosterone to estradiol (Ts/Es) as an index of androgen-estrogen balance, the content of terminal metabolites of nitric oxide (NO) in blood serum were investigated to estimate the state of both adaptive reserves and neurohumoral regulation of an animal's body. Histological (with morphometric parameters evaluation) and ultramicroscopic studies of the myocardium structure as one of the key markers, reflecting the aging process, were carried out. All the studies, except the HRV spectral analysis (performed at different times after exposure, up to a month inclusive), were performed one month after the corresponding manipulation.

It has been established that in natural aging of rats the value of total spectral power of HRV (TP) decreased as a result of a reduction of the tone of the sympathetic and parasympathetic divisions (LF and HF indices) of the autonomic nervous system (ANS). A single use of RE WBC, cCBNCs and their combination in aged animals was accompanied by an increase in TP (in 1.5, 2.3 and 2.6 times, respectively) due to an increased activity or humoral-metabolic regulation link (in the case of RE WBC), or both activity indices of ANS (in the case of cCBNCs and combined application), however, did not lead to a balanced activation of all the regulatory units, that indicated the exhaustion of adaptive compensatory reserves of the body.

It has been for the first time found, that the repeated application of RE WBC, injection of cCBNCs and their combined use during the life cycle, could enhance the adaptive compensatory capacities of the body of experimental animals regardless of their age, due to the increase of activity of all the regulatory units (the indicated dynamics was kept at long-term observation). At the same time, the combined use of extreme cooling and cCBNCs in the dynamics of aging in rats has had a more pronounced positive effect on the state of neurohumoral regulatory systems in experimental animals: compared to the control indices TP was 8.6 times increased, 10.6 times for LF, 9.7 times for HF, 2.9 times for VLF.

In the dynamics of aging in rats, the 1.5 and 2 times decrease in thyroxine levels in 24 months aged animals compared to 6 and 12 (18) months aged ones were found,

respectively. It was shown that the separate application of cCBNCs and the one combined with RE WBC were accompanied by the increase of thyroxin concentration in blood serum of aged rats at a single (in 1.07 and 1.4 times, respectively) and repeated applications (in 1.3 and 2.3 times, respectively), evidenced to an enhance of the functional activity of the thyroid gland due to recovery of its hormone synthesis ability.

The level of testosterone and testosterone to estradiol ratio in rat's blood serum of the control group decreased with the age in 1.6–2.2 and 1.9–2.4 times, respectively. On the background of RE WBC, Ts concentration in 6 and 12 months aged animals decreased (in 1.8 and 1.9 times, respectively). However, in the 18 months aged rats a statistically significant 1.6 times increase in the Ts concentration was recorded. At a single use in age of 24 months, the Ts was kept at the control level. A single use of cCBNCs contributed to a 2.6 times increase in the Ts concentration in the aged rats, and a 3.4 times increase after re-use in the 18 months aged rats. A single combined use of RE WBC and cCBNCs resulted in a three-fold increase in both Ts and Es levels (due to this the ratio of the hormones was unchanged versus the control one).

After a combined use of RE WBC and cCBNCs in the dynamics of aging in rats, the increases in the Ts concentration (in 1.4–3.1 times) and the Ts/Es ratio (in 1.7–2.2 times) were observed in all age groups, except the one 12 months aged animals. In 24 months aged animals on the background of a combined use of RE WBC and cCBNCs, in contrast to the separate application, there were increased not only the Ts concentration (in 1.9 times) but also the Ts/Es ratio (in 2.1 times), that confirmed usefulness of the combined application of these procedures, starting from the young age.

The level of dehydroepiandrosterone sulfate in rat's blood serum did not change significantly in the dynamics of natural aging.

Thus, as a result of studying the level of thyroid and sex hormones in rat's blood serum, it has been for the first time established that RE WBC stimulated the synthetic activity of the thyroid gland and gonads in aging animals, but as a stressful influence

of moderate intensity, it still contributed to a decrease of testosterone levels in young rats. Injection of cCBNCs did not cause functional disorders of the thyroid gland and gonads, and improved their functional state in the aged animals due to the recovery of the hormones synthesis ability. The combined use of RE WBC and cCBNCs led to the normalization of hormonal homeostasis due to an increase in the serum concentration of thyroxine, testosterone and the ratio of testosterone to estradiol, while in the control group, significant decreases in their levels were found.

It was shown that the level of nitric oxide in blood serum of the aged rats was 3.1 times decreased. It has been discovered that the use of cCBNCs, as well as the combined use of RE WBC and cCBNCs in the dynamics of aging, contributed to the recovery of its concentration, had a stimulating effect on the synthesis of NO in case of its deficiency and did not lead to an overexpression of this molecule. This might be caused by an activation of NO-synthases and the expression of their genes.

According to the results of histological study of the myocardium in the dynamics of rat's natural aging, it was found that the first morphological signs, indicating the age-related changes in the vessels, took place in 12 months aged animals. A failure of the myocardium compensatory mechanisms in rats occurred at 24 months of age.

It has been for the first time shown that on the background of RE WBC the trophy of the myocardium was improved starting from the age of 12 months, due to an increase in the number of capillaries per tissue area, but in the 18 months aged rats, however, there was a decrease in the number and area of cardiomyocyte nuclei. After injection of cCBNCs the signs of circulatory disorders, edema, cardiosclerosis in 24 months aged animals were moderate, lympho-histiocytic infiltrations were absent. The area and the number of cardiomyocyte nuclei were significantly increased. There was a tendency to an increase in the number of capillaries. The number of capillaries in the 12 and 18 months aged rats was significantly increased.

On the background of the combined use of RE WBC and cCBNCs the myocardium compensatory capacities were enhanced due to an increase in both the number and area of cardiomyocyte nuclei, an improvement of the trophy due to

neoangiogenesis. This was confirmed by proliferation of fibroblasts in the interstitial tissue, these cells are known to produce proangiogenic factors. The described changes might prevent the development of myocardial ischemia, cardiosclerosis and necrosis.

In rats of the control group, signs of the development of degenerative processes at the sub-cellular level were revealed starting from the age of 18 months, there were swelling of mitochondria (Mt), focal illumination of their matrix, destruction of some cristae. There were also noticed the totally destroyed Mt in 24 months aged rats. The degenerative-destructive changes of Mt signified serious disorders of intracellular bioenergetics and a decrease in the contractile capacity of cardiomyocytes. There were also the signs of a high activity of catabolic processes, such as an inclusion of lipids and lipofuscin, a decrease in the number of ribosomes, polysomes and glycogen granules.

It was for the first time found that the use of repeated sessions of RE WBC and injection of cCBNCs in the dynamics of aging in animals was accompanied by an increase in the activity of metabolic and synthetic processes in the myocardium tissues and vessels due to normalization of intracellular bioenergetics associated with the structural and functional state of Mt. The number of Mt and cristae inside of them were increased. Cardiomyocytes and endotheliocytes often contained Mt with constrictions. The most pronounced reparative changes were found in 24 months aged rats, there were smaller number of the secondary lysosomes and lipid inclusion, the increased number of ribosomes, polysomes and granules of glycogen, that was the index of an increase in the reserve contractile mechanisms of the myocardium.

Thus, the use of cCBNCs, combined with RE WBC, during the life cycle of animals could maintain for a long time the “young” rhythm of neurohumoral effects on the body, promoted the implementation of the hormonal link of the “antiaging”, stimulated the synthesis of NO in case of its deficiency, activated metabolic and synthetic processes at microscopic and submicroscopic level.

The findings of the influence of RE WBC ($-120\text{ }^{\circ}\text{C}$) and cCBNCs on the structural and functional state of the neurohumoral regulation systems in the

dynamics of aging in rats substantiated the perspective of their separate and combined application in gerontology and geriatrics. The obtained experimental data revealed the direction and the level of activity of the adaptative and compensatory processes that occurred in regulatory systems of an animal's body on background of the RE WBC, the injection of cCBNCs, as well as their combinations, characterized the possible mechanism of their action, proved the usefulness of RE WBC and cCBNCs application, starting from the young age.

Keywords: cryopreserved cord blood nucleated cells, rhythmic extreme whole body cooling, neurohumoral regulation, myocardium, aging, rats.

Зміст

АНОТАЦІЯ	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	25
ВСТУП.....	26
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	36
1.1 Старіння людини — закономірний етап онтогенезу. Основні гіпотези старіння	36
1.2 Терморегуляція організму на тлі дії низьких температур. Роль гематоенцефалічного бар'єра у формуванні адаптивних реакцій організму за ритмічного охолодження.....	43
1.3 Загальне екстремальне охолодження організму. Фізіологічні та терапевтичні аспекти застосування кріотерапії.....	47
1.4 Застосування кордової крові як джерела стовбурових клітин і біологічно активних речовин у клітинній терапії.....	51
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ Й МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	60
2.1 Схема експерименту та кількість досліджуваних тварин.....	60
2.2 Методика охолодження та введення кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові.....	66
2.3 Електрофізіологічні методи дослідження	68
2.4 Біохімічні методи дослідження	70
2.4.1 Методика визначення концентрації тиреоїдних і статевих гормонів у сироватці крові	70
2.4.2 Методика визначення сумарних метаболітів оксиду азоту в сироватці крові.....	73
2.5 Гістологічні методи дослідження	74
2.6 Електронно-мікроскопічні методи дослідження	75
2.7 Статистична обробка отриманих результатів	76

РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ РИТМІЧНОГО ЕКСТРЕМАЛЬНОГО ОХОЛОДЖЕННЯ (–120 °C), КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЯДРОВМІСНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ ТА ЇХ ПОЄДНАННЯ НА СТАН ВЕГЕТАТИВНОЇ РЕГУЛЯЦІЇ СЕРЦЕВОГО РИТМУ В ДИНАМІЦІ СТАРІННЯ ЩУРІВ.....	77
3.1 Вплив ритмічного екстремального охолодження на стан вегетативної регуляції серцевого ритму щурів.....	80
3.1.1 Вплив одноразового застосування циклу ритмічного екстремального охолодження на стан вегетативної регуляції серцевого ритму старих щурів.....	80
3.1.2 Вплив повторних циклів ритмічного екстремального охолодження на стан вегетативної регуляції серцевого ритму в динаміці старіння щурів.....	81
3.2 Особливості стану вегетативної регуляції серцевого ритму щурів після введення кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові.....	85
3.2.1 Особливості стану вегетативної регуляції серцевого ритму старих щурів після одноразового введення кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові.....	85
3.2.2 Особливості стану вегетативної регуляції серцевого ритму в динаміці старіння щурів після повторних введень кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові.....	86
3.3 Динаміка змін основних показників спектрального аналізу варіабельності серцевого ритму щурів на тлі поєданого застосування ритмічного екстремального охолодження і кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові.....	91
3.3.1 Динаміка змін основних показників спектрального аналізу варіабельності серцевого ритму старих щурів на тлі одноразового поєданого застосування циклу ритмічного екстремального охолодження і кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові	92

3.3.2 Динаміка змін основних показників спектрального аналізу варіабельності серцевого ритму в процесі старіння щурів на тлі повторних поєднаних застосувань циклу ритмічного екстремального охолодження і кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові	94
РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ РИТМІЧНОГО ЕКСТРЕМАЛЬНОГО ОХОЛОДЖЕННЯ (-120°C), КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЯДРОВМІСНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ ТА ЇХ ПОЄДНАННЯ НА РІВЕНЬ ТИРЕОЇДНИХ І СТАТЕВИХ ГОРМОНІВ СИРОВАТКИ КРОВІ В ДИНАМІЦІ СТАРІННЯ ЩУРІВ	100
4.1 Динаміка змін вмісту тиреоїдних гормонів у сироватці крові щурів після самостійного та поєданого застосування циклу ритмічного екстремального охолодження і кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові	104
4.2 Динаміка змін вмісту статевих гормонів у сироватці крові щурів після самостійного та поєданого застосування циклу ритмічного екстремального охолодження і кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові	107
РОЗДІЛ 5. ВМІСТ КІНЦЕВИХ ПРОДУКТІВ МЕТАБОЛІЗМУ ОКСИДУ АЗОТУ СИРОВАТКИ КРОВІ В ПРОЦЕСІ СТАРІННЯ ЩУРІВ ПІСЛЯ РИТМІЧНИХ ЕКСТРЕМАЛЬНИХ ХОЛОДОВИХ ВПЛИВІВ (-120°C), ВВЕДЕННЯ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЯДРОВМІСНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ ТА ЇХ ПОЄДНАНОГО ЗАСТОСУВАННЯ	114
РОЗДІЛ 6. ОСОБЛИВОСТІ ГІСТОЛОГІЧНОГО СТАНУ МІОКАРДА В ДИНАМІЦІ СТАРІННЯ ЩУРІВ ПІСЛЯ РИТМІЧНИХ ЕКСТРЕМАЛЬНИХ ХОЛОДОВИХ ВПЛИВІВ (-120°C), ВВЕДЕННЯ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЯДРОВМІСНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ ТА ЗА ЇХ ПОЄДНАННЯ	118
6.1 Структурна організація міокарда в динаміці старіння щурів	118
6.2 Структурна організація міокарда щурів після ритмічного екстремального охолодження	124
6.3 Морфологічний стан міокарда щурів після введення кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові	127

6.4 Морфологічний стан міокарда щурів на тлі поєднаного застосування ритмічних екстремальних холодкових впливів та ядровмісних клітин кордової крові.....	132
РОЗДІЛ 7. СУБМІКРОСКОПІЧНІ ПЕРЕБУДОВИ ТКАНИН І СУДИН МІОКАРДА ЩУРІВ У ДИНАМІЦІ ЇХНЬОГО СТАРІННЯ ПІСЛЯ РИТМІЧНИХ ЕКСТРЕМАЛЬНИХ ХОЛОДОВИХ ВПЛИВІВ (–120 °С), ВВЕДЕННЯ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЯДРОВМІСНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ ТА ЇХ ПОЄДНАНОГО ВИКОРИСТАННЯ.....	138
7.1 Ультрамікроскопічна організація тканин і судин міокарда щурів контрольної групи.....	139
7.2 Ультраструктурні зміни кардіоміоцитів і ендотеліоцитів кровоносних капілярів міокарда щурів після ритмічних екстремальних холодкових впливів.....	147
7.3 Ультраструктура кардіоміоцитів і ендотеліоцитів кровоносних капілярів міокарда щурів на тлі введення кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові.....	153
7.4 Перебудови органел кардіоміоцитів і ендотеліоцитів міокарда щурів після поєднаного застосування екстремального охолодження і кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові	161
УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	170
ВИСНОВКИ.....	182
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	184
Додаток А. Список публікацій здобувача за темою дисертації	222
Додаток Б. Відомості про апробацію результатів дисертації.....	229
Додаток В. Матеріал допоміжного характеру.....	231

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ВНС	—	вегетативна нервова система
ВСР	—	варіабельність серцевого ритму
ГЕБ	—	гематоенцефалічний бар'єр
ГСК	—	гемопоетичні стовбурові клітини
Гт	—	гіпоталамус
ДГЕА(С)	—	дегідроепіандростерон-(сульфат)
ЕКГ	—	електрокардіограма
ЕПР	—	ендоплазматичний ретикулум
Ес	—	естрадіол
ЗКС	—	загальна кріостимуляція
ЗКТ	—	загальна кріотерапія
КК	—	кордова кров
кЯВК КК	—	кріоконсервовані ядровмісні клітини кордової крові
Мт	—	мітохондрії
РЕХВ	—	ритмічні екстремальні холодів впливи
СК	—	стовбурові клітини
ССС	—	серцево-судинна система
T ₃	—	трийодтиронін
T ₄	—	тироксин
Tс	—	тестостерон
ЦНС	—	центральна нервова система
ЯВК КК	—	ядровмісні клітини кордової крові
HF	—	потужність високочастотного компонента спектра ВСР
HLA	—	лейкоцитарні антигени людини
LF	—	потужність низькочастотного компонента спектра ВСР
NO	—	оксид азоту
TP	—	загальна потужність спектра ВСР
VLF	—	потужність дуже низькочастотного компонента спектра ВСР

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. У зв'язку з глобальним старінням населення планети, ще наприкінці 20 століття перед вченими та медиками виникла серйозна проблема, пов'язана з пошуком нових методів, спрямованих на збереження й покращення якості життя літніх людей. Широкого поширення набули геронтологічні програми, у межах яких відбувається вивчення різних аспектів у цій галузі, проводяться глибокі фундаментальні та прикладні дослідження [4, 5, 67, 155, 189].

Старіння — це процес поступової деградації, який починається з пубертату. У цей період відбувається перемикання організму на репродуктивну функцію. Надалі починають діяти механізми старіння. У період статевого дозрівання спостерігається оптимізація й синхронність систем організму, що зачіпає циркадні ритми фізіологічних процесів, концентрацію гормонів у крові й нейромедіаторів у тканинах головного мозку. У постпубертатний період онтогенезу настає час порушення зазначених оптимумів, однак на даному етапі можлива корекція цих змін.

Відомо, що старіння організму людини тісно пов'язане зі зниженням його опірності до дії негативних чинників зовнішнього і внутрішнього середовища [39].

Старіння не є патологічним станом, а являє собою послідовний природний фізіологічний процес, який супроводжується виснаженням захисних і регуляторних механізмів [38, 169], зменшенням пластичності адаптаційних процесів [30, 44, 60], зниженням загальної життєздатності організму [68], і, як наслідок, розвитком гострих і хронічних захворювань різних органів і систем.

На сьогодні профілактика багатьох захворювань, які асоційовані зі старінням, можлива завдяки підвищенню власних адаптаційно-регуляторних можливостей літнього організму [155]. У зв'язку з цим надзвичайно перспективним для медико-біологічних цілей є пошук нових способів впливу

на організм, здатних надавати генералізований, стимулюючий вплив на гомеостатичні регуляторні системи.

Одним із таких методів є холодкові впливи [8]. Для медичних цілей низькі температури використовувалися ще кілька тисячоліть тому, а зараз їх активно застосовують у трансплантології, фармакології, хірургії, а також терапії соматичних і психічних розладів [217]. Значний науковий прогрес у галузі комп'ютерних технологій дозволяє використовувати широкий спектр різноманітних холодкових впливів, які відрізняються не тільки абсолютними показниками температури, але й режимами проведення процедур. Ритмічні гіпотермічні впливи, як сенсорні і систематично діючі подразники, зумовлюють зрушення в терморегуляторних системах мозку й підвищують проникність гематоенцефалічного бар'єра (ГЕБ) для біологічно активних речовин. Резонансна дія холоду спрямована на синхронізацію активності низки функціональних систем організму. І хоча пошуки оптимальних способів охолодження, які б активували функціональні можливості організму людини, тривають [11, 209], відомо, що низькі [143] та наднизькі температурні впливи (-120°C), які використовуються в медичній практиці, надають специфічну, стимулюючу дію на гомеостаз [2, 8, 29, 217].

Загальне екстремальне охолодження (-120°C) активує процеси саморегуляції організму і збільшує його адаптаційні резерви [1]. Вплив кріотерапії на організм являє собою системний фізіологічний процес, який протікає на різних організаційних і регуляторних рівнях [29]. Ритмічне екстремальне охолодження, яке є модулятором активності власних ендогенних ритмів, підвищує лабільність регуляторних процесів у центральній нервовій і серцево-судинній системах (ЦНС і ССС), стимулює їхні прямі та зворотні зв'язки, нормалізує симпато-парасимпатичний баланс вегетативної нервової системи (ВНС) з подальшою оптимізацією механізмів гомеостазу [8].

Окрім фізичних методів впливу, для поліпшення саморегуляції, можуть використовуватися біологічні (клітини, тканини, екстракти рослинного і тваринного походження). Протягом останніх десятиліть увага вчених і

клініцистів усього світу прикута до клітинно-тканинної терапії. З погляду фундаментальних досліджень і практичного використання, одним із найбільш перспективних напрямів у цій галузі, є стовбурові клітини (СК) [42, 57, 101]. Накопичено велику кількість даних, які свідчать про позитивний вплив СК як на різні органи й системи, так і на організм уцілому [139, 288]. СК успішно застосовуються при лікуванні різноманітних захворювань [139], проте необхідно враховувати, що пластичність і високий потенціал диференціювання СК зменшуються з віком. Кордова кров (КК) має у своєму складі СК [40, 248, 286], у тому числі гемопоетичні клітини-попередники [40, 41, 56, 113, 161, 288], які вирізняються більш вираженою здатністю до проліферації й диференціації, порівнюючи зі СК, виділеними з кісткового мозку дорослого організму [42, 139, 219]. Окрім того, вона містить велику кількість ростових факторів [52, 113], які при введенні в літній організм, імовірно, здатні надавати «омолоджуючий» вплив на власні СК, кількість, різноманітність і активність котрих знижується з віком [198, 202]. Така особливість КК дає змогу розглядати її як перспективний геропротектор, котрий може запобігти або уповільнити розвиток і прогресування вікової патології.

Наукові дослідження, проведені в ІПКіК НАН України, дозволили розробити технології виділення та кріоконсервування ядровмісних клітин кордової крові (ЯВК КК), до складу яких входять гемопоетичні стовбурові клітини [128, 129].

Фізіологічні особливості реакцій організму і його функціональних систем на ритмічні екстремальні холододові впливи (РЕХВ) (-120°C) і введення ЯВК КК передбачають не тільки їх індивідуальне застосування, але й поєднане. У такому випадку можливе взаємне потенціювання їхньої дії з урахуванням можливостей і особливостей кожного методу.

На сьогодні фундаментальні дослідження, які розкривають механізми дії ритмічного екстремального охолодження (-120°C), а також ЯВК КК, перебувають на стадії ретельного вивчення, а експериментальних даних про

їхній вплив на організм як цілісну саморегулюючу систему за поєднаного застосування немає.

З огляду на вищенаведене доцільним є визначення дії РЕХВ, кріоконсервованих ЯВК КК (кЯВК КК) і їх поєднаного застосування на структурно-функціональний стан систем нейрогуморальної регуляції в динаміці старіння щурів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.

Робота виконана в рамках відомчих НДР відділу кріофізіології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України № 63: «Особливості фізіологічних і патофізіологічних механізмів регуляції гомеостазу організму гомойо- і гетеротермних тварин при різних видах охолодження» (шифр — 2.2.6.63, № державної реєстрації 0111U001195); № 103: «Формування адаптаційних реакцій організму експериментальних тварин в умовах дії штучного охолодження і кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові при старінні і патологічних станах» (шифр — 2.2.6.103, № державної реєстрації 0116U003493).

Мета і завдання дослідження.

Мета роботи — визначити дію ритмічних екстремальних холодових впливів (-120°C), кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові та їх поєднання на структурно-функціональний стан систем нейрогуморальної регуляції в динаміці старіння щурів.

Для досягнення поставленої мети передбачалося вирішити такі завдання:

1. Вивчити вплив РЕХВ (-120°C), введення кЯВК КК та їх поєднаного застосування на стан вегетативної регуляції серцевого ритму в динаміці старіння щурів.

2. Оцінити рівень дегідроепіандростерон-сульфату (ДГЕАС), тиреоїдних і статевих гормонів сироватки крові в процесі старіння тварин, на тлі РЕХВ (-120°C), введення кЯВК КК та їх поєднаного застосування.

3. Визначити концентрацію кінцевих метаболітів оксиду азоту (NO) сироватки крові в динаміці старіння щурів, після РЕХВ (-120°C), введення кЯВК КК та їх поєднаного застосування.

4. Провести гістологічну оцінку міокарда в динаміці старіння щурів, після РЕХВ (-120°C), введення кЯВК КК та їх поєднаного застосування.

5. Дослідити динаміку ультраструктурних перебудов тканин і судин міокарда в процесі старіння тварин, на тлі РЕХВ (-120°C), введення кЯВК КК та їх поєднаного застосування.

Об'єкт і предмет дослідження.

Об'єкт дослідження — структурно-функціональний стан систем нейрогуморальної регуляції організму тварин у динаміці старіння, після РЕХВ (-120°C), введення кЯВК КК та їх поєднаного застосування.

Предмет дослідження — електрофізіологічні, біохімічні, морфологічні та електронно-мікроскопічні показники стану регуляторних систем організму щурів у процесі старіння й динаміка їхніх змін на тлі самостійного й поєднаного застосування РЕХВ (-120°C) та кЯВК КК.

Методи дослідження. У роботі були використані кріобіологічні (методика РЕХВ як різновид загального екстремального охолодження організму тварин за температури (-120°C)), електрофізіологічні (реєстрація електрокардіограми (ЕКГ) з подальшим спектральним аналізом варіабельності серцевого ритму (ВСР)), електронно-мікроскопічні та гістологічні методи дослідження тканин і судин міокарда, імуноферментні та спектрофотометричний методи дослідження сироватки крові. За допомогою статистичних методів проведено аналіз отриманих експериментальних даних.

Наукова новизна отриманих результатів. У дисертаційній роботі *вперше дана оцінка* структурно-функціональним змінам, які відбуваються в регуляторних системах організму тварин після РЕХВ (-120°C), введення кЯВК КК та за їх поєднання в динаміці природного старіння. *Уперше показана* ефективність самостійного й поєднаного застосування РЕХВ і кЯВК КК, починаючи з молодого віку, з метою підвищення власних адаптаційно-

регуляторних можливостей організму, які істотно знижуються з віком. *Уперше встановлено*, що повторні процедури РЕХВ, введення кЯВК КК та їх поєднання протягом життєвого циклу, здатні підвищувати адаптаційно-компенсаторні можливості організму експериментальних тварин, оцінені за даними спектрального аналізу варіабельності серцевого ритму, незалежно від їхнього віку завдяки збільшенню активності всіх регуляторних ланок, тоді як у процесі природного старіння щурів спостерігається зниження всіх досліджуваних параметрів варіабельності серцевого ритму. Водночас поєднане застосування екстремального охолодження та кЯВК КК має більш виражений позитивний вплив на стан систем нейрогуморальної регуляції експериментальних тварин. Одноразове використання РЕХВ, кЯВК КК та їх поєднання в старих тварин не призводить до збалансованої активації всіх регуляторних ланок організму. *Уперше показано*, що поєднане використання РЕХВ і кЯВК КК призводить до нормалізації рівня тироксину, тестостерону і співвідношення тестостерон/естрадіол з віком. *Уперше встановлено*, що введення кЯВК КК, а також поєднане застосування РЕХВ та кЯВК КК у динаміці старіння тварин має стимулюючий вплив на синтез NO в разі його дефіциту, але не призводить до надлишку цієї молекули. *Уперше виявлено*, що застосування РЕХВ призводить до збільшення кількості капілярів у міокарді старіючих тварин на тлі зменшення кількості та площі ядер кардіоміоцитів. Введення кЯВК КК, а також поєднане використання РЕХВ і кЯВК КК супроводжується поліпшенням трофіки серцевого м'яза завдяки утворенню нових капілярів і підвищенню його компенсаторних можливостей, унаслідок збільшення як кількості, так і площі ядер кардіоміоцитів. *Уперше встановлено*, що застосування повторних сеансів РЕХВ і введення кЯВК КК у динаміці старіння тварин супроводжується підвищенням активності метаболічних і синтетичних процесів у кардіоміоцитах та ендотеліоцитах кровоносних капілярів міокарда завдяки нормалізації внутрішньоклітинної біоенергетики, пов'язаної зі структурно-функціональним станом мітохондрій. *Уперше показано*, що поєднане застосування РЕХВ і кЯВК

КК має найбільш виражений позитивний вплив на ультраструктурну організацію цих клітин.

Практичне значення отриманих результатів. Виявлені в дослідженні прояви впливу РЕХВ ($-120\text{ }^{\circ}\text{C}$) і кЯВК КК на структурно-функціональний стан систем нейрогуморальної регуляції в динаміці старіння щурів обґрунтовують перспективність їх самостійного та поєднаного застосування в геронтології та геріатрії. Отримані експериментальні дані, що розкривають спрямованість і рівень активності адаптаційних і компенсаторних процесів, які відбуваються в регуляторних системах організму тварин на тлі РЕХВ, введення кЯВК КК, а також їх поєднання, характеризують можливий механізм дії, доводять доцільність використання РЕХВ і кЯВК КК, починаючи з молодого віку. Встановлені особливості самостійного та поєднаного впливу РЕХВ і кЯВК КК можуть бути використані в освітніх програмах кафедр геронтології та кріобіології.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійним і оригінальним науковим дослідженням. Автором проаналізована сучасна вітчизняна й зарубіжна наукова література з досліджуваної проблеми, обґрунтовано вибір теми, проведені статистична обробка й аналіз отриманих результатів, інтерпретовано їх, підготовлено матеріал для публікацій. Основна частина експериментальних досліджень виконана здобувачем особисто. Спільно з науковим керівником сформульовані мета й завдання роботи, визначені методи їх вирішення, обговорено інтерпретовані результати, сформульовані висновки.

Електронно-мікроскопічні, гістологічні та біохімічні дослідження виконані за безпосередньої участі автора. Зважаючи на використання суміжних дисциплін, дисертаційна робота виконувалася за консультативної допомоги співробітників ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України», на базі лабораторії морфології сполучної тканини ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М. І. Ситенка НАМН України».

Опубліковані в співавторстві наукові статті відображають концепцію роботи, підтверджують ідеї й рішення поставлених дисертантом завдань. Допомога співавторів у спільних статтях була спрямована на виконання окремих методичних завдань або консультування.

В опублікованих зі співавторами роботах особистий внесок здобувача полягає:

— у роботах [20, 26–27, 80–91, 106–107, 115–121, 127, 133, 214, 236–238, 252] — у плануванні експериментів, обговоренні та узагальненні отриманих результатів, формулюванні висновків, підготовці матеріалів до друку;

— у роботах [20, 26–27, 81–82, 85–90, 107, 115–116, 118–119, 121, 127, 214, 236–238] — у проведенні РЕХВ ($-120\text{ }^{\circ}\text{C}$);

— у роботах [26–27, 83–84, 88–89, 91, 107, 115, 117–121, 127, 133, 214, 252] — у розрахунку, підготовці і введенні кЯВК КК;

— у роботах [20, 26–27, 81–82, 87, 91, 115–121, 127, 214, 238, 252] у записі електрокардіограм, проведенні спектрального аналізу ВСР у щурів різного віку в умовах природного старіння, на тлі РЕХВ, введення кЯВК КК та їх поєднаного використання, проведенні статистичної обробки даних;

— у роботах [82, 88, 90, 214, 237, 252] — у заготівлі сироватки крові щурів та участі у виконанні експериментальних досліджень із визначення вмісту гормонів у ній, проведенні статистичної обробки даних (у динаміці старіння, після РЕХВ, введення кЯВК КК та їх поєднаного застосування);

— у роботах [83, 85, 89, 106–107, 133, 236] — в аналізі електронно-мікроскопічних фотографій кардіоміоцитів та ендотеліоцитів міокарда щурів у процесі старіння, на тлі РЕХВ, введення кЯВК КК та їх поєднання;

— у роботі [80] — в аналізі літературних даних щодо впливу РЕХВ ($-120\text{ }^{\circ}\text{C}$) на проникність гематоенцефалічного бар'єра;

— у роботах [84, 86, 238] — у заборі тканин, аналізі мікроскопічних фотографій, розрахунку морфометричних показників міокарда щурів у динаміці старіння та на тлі РЕХВ та кЯВК КК, проведенні статистичної обробки даних;

— у роботах [82, 237] — у заготівлі сироватки крові щурів та участі у виконанні експериментальних досліджень із визначення вмісту кінцевих метаболітів NO у ній ($-120\text{ }^{\circ}\text{C}$), проведенні статистичної обробки даних.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи доповідалися і обговорювалися на наукових форумах (усна або стендова доповідь): конференціях молодих вчених ІПКіК НАН України «Холод в біології та медицині» (Харків, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017); міжнародній науково-практичній конференції «Молодеж в науке — 2013» (Республіка Білорусь, Мінськ, 2013); міжнародній конференції «52nd Annual Meeting of the Society for Cryobiology and International Conference on Regenerative Medicine CRYO — 2015» (Чехія, Острава, 2015); міжнародній конференції «Cold Applications In Life Sciences» (Німеччина, Дрезден, 2016); міжнародній конференції «SLTB Symposium 2016» (Німеччина, Дрезден, 2016); Лейденській міжнародній біомедичній студентській конференції «Leiden International (bio-)Medical Student Conference LIMSC 2017» (Нідерланди, Лейден, 2017). А також були заочно представлені на 14 наукових форумах, зокрема на міжнародній заочній науково-практичній конференції «Теоретические и практические аспекты современной криобиологии» (Росія–Україна, Сиктивкар, 2014); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Криоконсервация генетических ресурсов. Современное состояние, проблемы и перспективы » (Росія, Пушино, 2014); конференції «Ендотеліальна дисфункція при вік-залежній патології — діагностика, профілактика, лікування» (Київ, 2015); IV міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів і молодих вчених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології» (Вінниця, 2016).

Публікація матеріалів. Основні положення дисертації викладені в 31 науковій роботі: 5 — у фахових наукових виданнях України (1 — входить до міжнародної наукометричної бази даних Scopus), 3 — у закордонних наукових періодичних виданнях (1 — входить до міжнародної наукометричної бази даних Scopus, 1 — входить до переліку іноземних фахових видань), 5 — у

збірниках матеріалів науково-практичних конференцій (один із яких входить до міжнародної наукометричної бази даних Scopus), опубліковано 18 тез доповідей.

Об'єм і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 232 сторінках (з яких 158 сторінок основної частини) і складається з анотації, вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, 5 розділів власних досліджень і їх обговорення, узагальнення, висновків, списку літератури та 3 додатків. Список літератури містить 310 джерел, у тому числі 167 зарубіжних, розміщених на 39 сторінках тексту. Робота ілюстрована 7 таблицями і 80 рисунками, з яких 62 — мікрофотографії.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Старіння людини — закономірний етап онтогенезу. Основні гіпотези старіння

За оцінками Комітету експертів ВООЗ, жителі України в середньому майже 12 % всього свого життєвого циклу (або 8 років) проводять у стані хвороб і стійких порушень здоров'я [35], а провідне місце (68 %) серед неінфекційних причин смертності зберігається за серцево-судинними захворюваннями [307], поширення яких істотно підвищується з віком.

Старість і старіння — різні поняття. Старість — це заключний період індивідуального розвитку будь-якого живого організму. Старіння — природний і мультифакторний біологічний процес [138], котрий залежить від чинників зовнішнього і внутрішнього середовища [228, 243] та який характеризується занепадом фізіологічних функцій [18, 309], що супроводжується, або не супроводжується розвитком різних захворювань. Процес старіння зумовлений генетично й містить у собі складні перебудови на молекулярному, клітинному, тканинному, органному й системному рівнях, які виникають задовго до настання старості. Проте варто зазначити, що генетична детермінанта забезпечує не більш як 25 % виживання [243].

У геронтологічній літературі використовуються терміни «фізіологічне» (природне) та «передчасне» (пришвидшене, або патологічне), старіння. Фізіологічне старіння — природний процес інволюційних змін, який притаманний певному біологічному виду та супроводжується зниженням адаптаційних можливостей [30, 44, 60], що чітко виявляється в умовах пізньої активності, напруженої діяльності. Передчасне старіння, що визначається у 85–90 % людей, виявляється в підвищеному (зокрема завдяки

дії соціально-економічних чинників та хвороб) темпі старіння та сприяє формуванню вік-залежної патології [60].

Функціональні зрушення, котрі відбуваються в організмі з віком на всіх рівнях його життєдіяльності та зумовлюють підвищення частоти розвитку характерних для старості захворювань і патологій [30], можна поділити на три основні типи змін [138]:

1 — ті, які прогресивно знижуються (гострота зору і слуху, скорочувальна здатність серця, працездатність нервових центрів і скелетної мускулатури, функція травних, статевих і деяких інших залоз внутрішньої секреції);

2 — ті, які істотно не змінюються (рівень цукру, морфологічний склад крові, мембранний потенціал клітин, показники кислотно-лужного балансу та ін.);

3 — ті, які прогресивно зростають (чутливість багатьох клітин і тканин до гуморальним, хімічним факторів, синтез деяких гормонів у гіпофізі, активність низки ферментів, вміст у клітині таких речовин як холестерин, лецитин та ін.) [138].

Окрім того, є параметри, які мають фазні зміни [138].

Під час старіння знижується потенціал і здатність клітин і тканин різних типів виконувати свої функції, що в кінцевому підсумку призводить до їх пошкодження та загибелі [4, 39, 291].

Вікові порушення в нервових, м'язових і проліферуючих популяціях клітин, таких як епітеліальні, остеогенні, кровотворні, призводять до розвитку низки захворювань: хвороби Альцгеймера й Паркінсона, інфаркту міокарда, мозкового інсульту, злоякісних новоутворень, імунодефіциту, остеопорозу, цукрового діабету тощо [167]. Страждають і периферичні стрес-реалізуючі системи — ССС, дихальна та інші [30, 225, 282]. Варто звернути увагу, що зміни, які відбуваються в ССС, багато в чому визначають інтенсивність розвитку старіння внаслідок обмеження адаптаційних можливостей старіючого організму і створення передумов для виникнення патології (таких як

атеросклероз, гіпертонічна хвороба, ішемічна хвороба серця), які залишаються [169, 206] основною причиною смерті людини.

У такий спосіб створюється порочне коло «старіння — хвороба — прискорене старіння» [60].

За даними [142], на 2008 р. у світі налічувалося понад 300 різновидів теорій старіння, однак вченими різних країн тривають пошуки нових, більш повних і точних пояснень розвитку цього процесу [4, 189]. Численні гіпотези розглядають старіння з погляду змін, які відбуваються на різних рівнях організації живої матерії.

Згідно з теломерною теорією, провідною причиною старіння є вкорочення теломери в клітинах з обмеженою здатністю до поділу, в результаті неактивності ферменту теломерази. Доповнює її центросомная гіпотеза, яка позначає центросоми головними органелами, які регулюють процес поділу клітин і визначають хід старіння організму: центросоми лімітують кількість поділів, впливаючи на обмеженість теломер [142].

Відповідно до адаптаційно-регуляторної теорії В. В. Фролькіса [138], будь-яку живу систему характеризують два основні принципи: перший — вона є саморегулюючою; другий — завдяки саморегуляції досягається пристосування, адаптація організму до нових умов існування. В організмі відбувається постійне протистояння двох рушійних сил — старіння і вітаукту (антистаріння), перше супроводжується зниженням функціональних можливостей організму, згасанням обміну, а другий із віком забезпечує мобілізацію адаптаційних механізмів. Водночас завжди мають місце вікові зміни адаптаційних і пристосувальних можливостей організму на основі зрушень у механізмах саморегуляції обміну і функцій.

Згідно з цією теорією, найважливішою ланкою саморегуляції виступають зворотні зв'язки, завдяки яким здійснюється інформування центру регуляції про зміни об'єкта регуляторних впливів і за допомогою яких мобілізуються процеси вітаукту в процесі старіння. Старіння призводить до порушення передачі інформації й на етапі зворотного зв'язку, у результаті чого

відбувається «дезінформація» системи та остання втрачає здатність до саморегуляції, що стає причиною обмеження її пристосувальних можливостей.

Автор зазначає, що оцінюючи гомеорезис (траєкторія зміни стану системи в часі; на відміну від «гомеостазу» — стабілізований потік, а не стан) необхідно пам'ятати такі обставини:

по-перше, один і той же рівень обміну і функції має неоднакове внутрішнє забезпечення в різні вікові періоди;

по-друге, початковий рівень низки функцій у різні вікові періоди на кривій гомеорезису несуттєво відрізняється, проте знижується надійність організму, його адаптаційно-регуляторні можливості.

Акцентується увага на тому, що найважливіші прояви старіння пов'язані з порушенням діяльності ЦНС, яка забезпечує процес стабілізації й підвищення життєдіяльності організму — вітаукту. Центральні нервові впливи реалізуються за участю ВНС, яка не тільки стимулює або пригнічує функції внутрішніх органів, але і прямо впливає на клітинний метаболізм.

Вищі вегетативні нервові центри через гіпоталамус (Гт) регулюють стан ендокринної системи, й у міру еволюційного розвитку організмів цей нейрогуморальний контроль збільшується. Саме тому на шляху вивчення вікових особливостей вегетативної регуляції функцій можуть бути розкриті найважливіші механізми старіння.

В. В. Фролькіс зазначає, що основним механізмом старіння, виявленим у різних тварин (щурів, кроликів, кішок, собак) і людини, є ослаблення нервового контролю над діяльністю внутрішніх органів. Водночас особлива увага приділяється лімбічній системі і Гт, як основному центру координації нервової й гуморальної регуляції внутрішнього середовища організму. Під час старіння знижується вплив Гт на генетичний апарат і біосинтез білка в клітинах, що відбувається в нормі за допомогою гормональних і нервових впливів. Це істотно змінює стан клітинного метаболізму. Старіння лімбічної системи і Гт, на думку автора, здебільшого є пусковим механізмом вікових зрушень в організмі [138].

Прихильники цієї теорії вважають, що злагодженість функціонування системи «вітаукту» визначається загалом системою нейрогуморальної регуляції і функціональним станом периферичних стрес-реалізуючих систем [30].

Згідно із загальнобіологічним підходом до вивчення природи старіння, воно починається від моменту статевого дозрівання й пов'язане з перемиканням організму на репродуктивну функцію, після чого починають діяти механізми старіння, які відрізняються в різних систематичних груп. На думку В. Є. Чернілевського [140] важливу роль у розвитку вікової патології відіграє десинхронізація біоритмів після статевого дозрівання, у період якого спостерігається оптимізація й синхронність циркадних ритмів фізіологічних процесів, концентрації гормонів у крові й нейромедіаторів у тканинах головного мозку.

Автори системної теорії [68] фундаментальним механізмом старіння називають збільшення хаосу й системну дезінтеграцію організму з віком, зумовлену другим законом термодинаміки — наростання ентропії у відокремлених неповністю відкритих системах, якими і є живі істоти. У межах загального механізму виділяють чотири типи та основні принципи старіння:

1 — «забруднення» організму з часом унаслідок принципово недостатності відкритості систем;

2 — принципова недостатність сил добору для збереження тільки «потрібних» структур у межах заданої системи [67, 68] (наприклад, з віком зменшується здатність клітин до апоптозу як реакції на стрес [4]);

3 — зниження кількості будь-яких структур, які не оновлюються, у системі, на всіх рівнях їхньої організації;

4 — порушення регуляції, спричене різноманітними причинами загального й часткового характеру, зокрема зниженням тиску еволюційного добору з віком (після статевого дозрівання) на чинники якості та гармонійності систем регуляції, та наявністю кінцевих програм розвитку (зростання, диференціювання тканин, статевого розвитку, імунітету і т. п.) [67, 68].

Зараз однією з причин старіння також вважається зменшення чисельності власних СК [139]. Водночас невелика кількість СК старіючого організму зберігають свій потенціал, який у разі створенні певних умов може бути спрямований на продукцію нових, молодих СК [167].

Старіння на сьогодні не є індивідуальною проблемою поодиноких осіб, воно несе істотні соціально-економічні наслідки, що визначає необхідність у поширенні геронтологічних програм у всьому світі [4, 5, 67].

Профілактика передчасного старіння виходить за межі суміжних біологічних наук і формується як новий напрям фундаментальної і прикладної науки, що розглядає нормальний природний процес старіння як «сверхпатологію» й базову причину розвитку хронічних захворювань і смерті людини. Основними завданнями геронтології та сучасної профілактичної медицини [3, 4] є вирішення таких проблем, як:

- 1 — різке старіння людської популяції, яке веде до швидкого збільшення частки осіб з істотно зниженими біологічними можливостями;
- 2 — збільшення тривалості й активного способу життя людини;
- 3 — подолання демографічної кризи.

Водночас важливо пам'ятати, що профілактика прискореного старіння найбільш ефективна на ранніх етапах його розвитку [60]. Тому знання й розуміння фізіологічних і патофізіологічних механізмів старіння, вікової інволюції різних систем організму і стану гомеостазу необхідні не тільки для правильного оцінювання різноманітних клінічних симптомів у літніх людей, а і для розв'язання питання щодо доцільності і вибору терапевтичного впливу.

Відомо, що низка речовин має геропротекторні або ревіталізуючі властивості [5, 60, 155, 156].

Можна не сумніватися, що здоровий спосіб життя надає істотного позитивного впливу на зміни, які відбуваються під час старіння [5, 225, 228]. Однак, незважаючи на це, він не дає змогу досягти бажаного ефекту, який можна здобути від застосування геропротекторів.

У той час як геріатричні засоби спрямовані на лікування захворювань і поліпшення якості життя літніх людей [298], цільовою групою для використання геропротекторів є пацієнти молодого і зрілого віку [3].

Ці засоби покращують регуляторні здібності, підвищують адаптаційний потенціал організму, у такий спосіб уповільнюють швидкість розвитку негативних функціональних змін [33, 60].

Як геропротектори застосовуються гормонозамісна терапія, засоби корекції психічного статусу, ноотропні та нейрометаболічні сполуки, антиоксиданти тощо [67]. Останнім часом у боротьбі із супутніми старінню захворюваннями увага вчених прикута до клітинних технологій, пов'язаних зі СК [60, 167]. Збільшується кількість робіт, які доводять здатність багатьох тканин до самовідновлення внаслідок зношування, хвороби або старіння завдяки наявності в них власного пулу тканиноспецифічних СК [167, 173].

На сьогодні із метою ревіталізації організму успішно використовується клітинна терапія, що перевершує за ефективністю багато геріатричних засобів [65, 74, 109]. Введення в організм молодих СК здатне запобігти або уповільнити прогресування захворювань, які асоційовані зі старінням [141].

Встановлено [167, 173], що в разі використанні гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) можливе відновлення багатьох диференційованих постмітотичних клітин, таких як гепатоцити, м'язові, гліальні, нервові, і, навіть, високоспеціалізовані клітини Пуркінє.

Кордова кров (КК) містить у своєму складі СК і гемопоетичні клітини-попередники, які відрізняються підвищеною здатністю до проліферації й диференціації, порівнюючи зі СК, виділеними із кісткового мозку дорослого організму [278, 286], а також велику кількість біологічно активних речовин [52, 65, 113, 124, 130]. Така особливість КК дає змогу розглядати її як перспективний геропротектор.

Окрім того, показано [4, 39], що малі дози стресових навантажень на організм підвищують його стійкість до подальшої дії стресу більш високої інтенсивності — ефект гормезису. Одним із методів стресового впливу є

кріотерапія, яка сприяє розвитку загальної адаптаційної відповіді й підвищенню функціональних можливостей організму.

Отже, чимале збільшення чисельності людей похилого віку, погіршення їхнього фізичного здоров'я, зниження працездатності вимагає подальшого докладнішого вивчення біологічних і фізіологічних механізмів, які регулюють індивідуальне старіння, з метою розробки нових методів впливу на організм, спрямованих на збереження здоров'я осіб похилого та старечого віку, зменшення смертності та поліпшення якості життя.

1.2 Терморегуляція організму на тлі дії низьких температур. Роль гематоенцефалічного бар'єра у формуванні адаптивних реакцій організму за ритмічного охолодження

За останні десятиліття значно зросла роль фізичних методів впливу на організм із метою збереження або відновлення здоров'я людини [17]. Серед них основне місце займає термічний метод, відмінною ознакою якого є застосування теплових або холодових агентів [15, 43, 136, 195, 258].

Низькі температури для оздоровлення людського організму використовували ще єгиптяни 4500 років тому. Упродовж багатьох століть цілющі властивості холоду застосовували для лікування різних захворювань, знеболювання, загартування, відновлення бадьорості духу [14, 64]. Уперше холод, як знеболюючий засіб застосував у військово-польових умовах М. І. Пирогов, а у 1855 р в Австрії був відкритий перший у світі інститут із загартування організму.

Важливу роль у забезпеченні нормального балансу між теплопродукцією й тепловіддачею під час охолодження відіграє система терморегуляції, яка запобігає порушенню теплового балансу або сприяє його відновленню. Терморегуляція здійснюється нервово-гуморальним шляхом [94] і являє собою сукупність фізіологічних процесів, спрямованих на підтримання порівняно

постійної температури ядра тіла в умовах зміни температури навколишнього середовища.

Система терморегуляції складається з низки взаємопов'язаних елементів, які відповідають за отримання інформації про температуру навколишнього середовища, передавання цієї інформації до ЦНС і відповідь на неї. Першою ланкою в цьому ланцюзі є терморецептори, які поділяються на теплові та холодкові [94, 258], а залежно від розташування, на екстрерорецептори (в шкірних покривах), інтерорецептори (у внутрішніх органах і судинах) і центральні терморецептори (у ЦНС) [94].

Холодових рецепторів у шкірі більше, ніж теплових (250 і 30 тис., відповідно), крім того, вони розташовуються більш поверхнево, ніж теплові (приблизно на рівні 0,17 і 0,3 мм від поверхні), і становлять собою закінчення А δ -нервових волокон периферійної нервової системи [94, 258]. Аферентний сигнал від периферійної нервової системи передається через А δ -мієлінові волокна в Гт, який є головним температурним регулятором [258]. Гт керує процесами теплопродукції й тепловіддачі через вплив на залози внутрішньої секреції, головно щитоподібну й наднирники. Руйнування гіпоталамічних центрів або порушення нервових шляхів супроводжується втратою здатності регулювати температуру тіла. Так, у разі патологічних змін переднього відділу Гт втрачається здатність до регулювання тепловіддачі. Це призводить до того, що організм погано переносить високі температури, але фізіологічно активний в умовах дії холоду. Нейрони ж заднього Гт відповідають за теплопродукцію, за їхнього ушкодження здатність до посилення енергообміну порушується, що не дозволяє організму адекватно реагувати на вплив низьких температур [94].

За постійної температури рецептори мають статичний розряд, якщо ж відбувається її зміна, то рівень випуску заряду рецепторами підвищується: у разі зниження температури тіла підвищується розрядний рівень холодкових рецепторів) [258].

Коли на людину впливає холод (температура тіла досягає 34–35 °С), стимуляція холодкових рецепторів викликає вазоконстрикцію [281, 306].

Вазоконстрикційна відповідь зменшує приплив крові до шкіри, що зі свого боку знижує конвекційну втрату тепла з ядра тіла [168]. Така відповідь захищає температуру ядра тіла, тоді як температура на поверхні шкіри і м'язів знижується [154].

Після індукованої холодом вазоконстрикції, коли температура шкірних покривів падає нижче 12 °C, відбувається вазодилатація, завдяки якій збільшується потік крові до кінцівок, що запобігає появі обморожень. З'являються циклічні зміни в температурі шкіри [255].

Гуморальна регуляція теплообміну здійснюється за участю залоз внутрішньої секреції, головно, щитоподібної й надниркових залоз. На тлі дії низьких температур відбувається підвищена секреція гормонів щитоподібної залози. Вони прискорюють обмін речовин і, як наслідок, продукцію тепла. Наднирники виділяють у кров катехоламіни, які підсилюють окисні процеси в тканинах, збільшують теплопродукцію і звужують шкірні судини, зменшуючи рівень тепловіддачі [94].

Однак, маючи лікувальні властивості, холодові впливи приховують у собі ризик розвитку важких ускладнень, які закінчуються в деяких випадках несприятливим результатом, оскільки теплокровні істоти не можуть витримувати глибокого охолодження, а температура тіла нижче 28 °C є критичною для життя людини.

Під час охолодження розрізняють 2 фази теплової продукції: термогенез без тремтіння й термогенез тремтіння (або нескоротливий і скоротливий термогенез). Завдяки першій фазі теплопродукція збільшується внаслідок підвищення м'язового напруги, заціпеніння й метаболізму. Друга фаза спостерігається після значної втрати тілом тепла і являє собою мимовільне ритмічне стиснення м'язів, яке може починатися відразу або через кілька хвилин після впливу холоду, і поширюється, зазвичай, від м'язів тулуба до кінцівок [159]. Треба зазначити, що чим більше м'язів задіяно в термогенезі тремтіння, тим вище використання кисню всім тілом [154]. Якщо температура навколишнього середовища занадто низька (особливо, якщо це холодна вода, а

не повітря), температура ядра тіла може різко знижуватися. Таке охолодження асоційоване із широким діапазоном фізіологічних і патологічних відповідей, а також дисфункціями [259].

Найважливішим механізмом позитивного впливу охолодження на організм є зміна проникності ГЕБ [8, 55, 92, 137]. З моменту його відкриття Ерліхом, ГЕБ вважається високоспеціалізованим органом, який слугує бар'єром, котрий регулює рух молекул і речовин із системного кровотоку до мозку [254, 284]. Морфологічну основу ГЕБ складають ендотелій судин разом із базальною мембраною й перицитами, а також відростки астроглії, які оточують капіляри [55, 177, 289]. Головною структурою ГЕБ є ендотеліоцити мікрогемодиркуляторної системи, проте дослідження останніх років довели, що астроцити не тільки виконують функцію стабілізації, збереження й підтримання спільно з перицитами [254, 262, 263], а й забезпечують за певних умов вибірккову провідність на синаптичних закінченнях [254]. Автор [254] зазначає, що за тяжких порушеннях ГЕБ, коли ендотеліоцити ще зберігають свою провідну функцію, провідність астроцитів зникає, а за ішемії астроцити стають проникними для молекул.

Водночас відомо, що в процесі старіння ЦНС втрачає пластичність, а проникність ГЕБ для нейромедіаторів знижується [8, 92].

Порушений баланс нейроактивних речовин може спричиняти зміни структурно-функціонального стану, морфофізіологічної рухливості, лабільності ГЕБ [137].

ГЕБ як структурно-функціональна основа повільної керуючої системи мозку, діє на багато адаптаційних і регуляторних процесів у організмі, коли впливи стають надмірними й систематичними [54].

Гіпотермічні впливи, які не призводять до зміни температури тіла понад 1–2 °С, особливо ритмічні (скоординовані з частотою біоритмів організму), здатні модифікувати структурно-функціональний стан складових ГЕБ і стимулювати селективну проникність для нейромедіаторів [137].

У роботі Л. М. Марченко і співавт. [55] встановлено, що ритмічні впливи холоду (5°C) збільшують проникність ГЕБ для норадреналіну, але не для серотоніну. Електронограми показали, що після ритмічного подразнення каудальних терморецепторів щурів крижаною водою синаптичний апарат Гт був у стані напруги, а в ендотеліоцитах мікрогемоциркуляторного русла спостерігалися клатринові везикули, котрі свідчать про активацію процесу рецепторного трансцитозу.

Авторами роботи [137] для структур ГЕБ вираховувалася фрактальна розмірність (D), яка є кількісною характеристикою загального рівня впорядкованості та хаотичності. Так, за безперервних гіпотермічних впливів (10°C), фрактальна розмірність ендотелію капілярів мозку монотонно зростала до $D \sim 1,5$, за ритмічного й хаотичного впливів охолодження D мала виражену ритміку — антиперсистентні періоди розташовувалися між персистентними, що свідчило про підвищення пластичності на тлі збереження стійкості структури.

Коливання температур викликає зміни не тільки проникності ГЕБ, але також діє як стресор для екзистенцефалічної системи — специфічної функціональної системи, яка контролює й задає напрям ритміці адаптаційного процесу в його як специфічному, так і неспецифічному проявах [54].

Понад 10 років тому В. С. Марченко і В. Г. Бабійчук [92] зробили висновок про доцільність інтеграції нейротрансмітерних механізмів функціонування ГЕБ до концепції загального адаптаційного синдрому, оскільки від рівня проникності ГЕБ залежать адаптивні реакції ССС і ЦНС на стресові подразники різної модальності та інтенсивності.

1.3 Загальне екстремальне охолодження організму. Фізіологічні та терапевтичні аспекти застосування кріотерапії

Є різні способи холодівих впливів, котрі відрізняються площею поверхні тіла, на яку діє холодоагент, температурою й режимом охолодження. Можна виділити три різновиди кріогенного впливу на організм людини: кріопротекція,

кріодеструкція і кріотерапія. Перший асоційований із трансплантологією і фармакологією, другий — з кріохірургією, а третій використовується для профілактики й лікування соматичних захворювань [217]. Загальна кріотерапія (ЗКТ) являє собою фізіотерапевтичний метод, котрий базується на застосуванні наднизьких температур (від -80 до -160 °C тривалістю від 30 секунд до 4 хвилин) до всієї поверхні тіла людини [209, 304, 308].

Становлення ЗКТ як методу медичного впливу відбулося порівняно нещодавно й пов'язане з ім'ям японського лікаря Т. Yamauchi [308]. Він у 70-х роках минулого століття використовував першу у світі кріокамеру (-160 °C) для загального охолодження людини з метою лікування захворювань опорно-рухового апарату. У 1982 році дослідження німецького вченого Fricke слугували основою для застосування загальної аерокріотерапії у Європі. Кінець XX століття відзначився розробленням нових кріоносіїв, вивченням впливу холоду на функціональні системи організму й розкриттям деяких механізмів адаптації людини до його дії.

У літературних джерелах останніх років поряд із терміном «кріотерапія» часто вживається термін «кріостимуляція».

Кріотерапія і кріостимуляція зараз широко застосовуються в медицині, спорті і як омолоджуючі процедури, котрі здатні відновлювати й підвищувати резистентність організму здорових людей. Багато авторів не відокремлюють поняття кріотерапії і кріостимуляції і використовують їх як взаємозамінні [146], однак деякі вчені [209] мають іншу думку й розмежовують ці терміни. Так, термін «кріостимуляція» частіше використовується для підкреслення стимулюючого впливу наднизьких температур, тоді як термін «кріотерапія» акцентує увагу на лікувальних ефектах цієї процедури [209].

Вважається, що ЗКТ здорових індивідів є безпечною процедурою й не спричиняє негативних змін в організмі [209, 303], а рідкісні ускладнення можуть траплятися лише за наявності протипоказань щодо заданого впливу [232].

Встановлено позитивну дію ЗКТ на організм як самостійного й допоміжного методу в лікуванні різних гострих і хронічних травм, спадкових порушень, запальних і дегенеративних змін опорно-рухової системи [25, 232, 234, 240, 290, 305]. Експериментально доведено високу ефективність ЗКТ у разі захворювань шкіри, дихальної (бронхіальна астма, емфізема легенів) і нервової (спастичний парез після перенесеного інсульту, розсіяний склероз) систем [217]. Окрім того, сеанси ЗКТ сприятливо впливають на психо-емоційну сферу [19], застосовуються для уривання депресивних станів і вегетативних неврозів [217, 232]. У гінекологічній практиці ЗКТ використовується як лікувальна процедура при дисфункціональних маткових кровотечах [47]. Останнім часом кріотерапія як загальнозміцнююча й адаптивна процедура [215] була рекомендована з метою реабілітації спортсменів і інтенсифікації тренувального процесу [6, 160, 290, 303, 304].

Терапевтичну дію ЗКТ на організм пов'язують із тим, що вона має протизапальний, аналгетичний, антиексудативний, репаративний, релаксуючий ефект [287], стимулює діяльність імунної [25, 287] і ендокринної системи [185]. Однак вплив її на імунну систему залишається дискусійним питанням, деякі автори заперечують імуностимулюючий ефект кріотерапії [210], а інші вважають його тимчасовим [209].

Багато вчених розглядають ЗКТ як стресовий вплив, який сприяє розвитку загальної адаптаційної відповіді й підвищенню загальної стійкості до стресу [2, 8, 146, 233]. Відомо, що малі дози стресових навантажень можуть призводити до незначних пошкоджень в організмі або не створювати їх зовсім, відіграючи водночас важливу сигнальну роль [39]. Одноразове нетривале екстремальне охолодження викликає короткострокову адаптаційну відповідь, а багаторазове супроводжується довгостроковою активацією регуляторних процесів і, як наслідок, призводить до нового рівня функціонування організму в несприятливих умовах довкілля [11, 303].

За літературними даними [47, 145, 292] ЗКТ відрізняється від інших видів холодкових впливів оскільки організм реагує на дію холоду не тільки завдяки

системі терморегуляції, а й усіма можливими адаптаційними механізмам, зокрема через гіпоталамо-гіпофізарно-надниркову, імунну, ендокринну та нейрогуморальну системи [29], суттєво підвищуючи фізіологічні можливості організму [1, 93].

В. Г. Бабійчук у своїй роботі [8] зазначив, що за ритмічних екстремальних холодних впливів (РЕХВ) як різновиду загального екстремального охолодження відбуваються структурні перебудови в усіх ланках ГЕБ гіпоталамуса, які призводять до підвищення його проникності. Автор припускає, що збільшення проникності ГЕБ відбувається через активацію процесу високо специфічного рецептор-індукованого трансцитозу. «Одягнені» або «опушені» везикули виявляли в цитоплазмі ендотеліоцитів після РЕХВ і в 70 % досліджених просвітів капілярів, причому в передньому відділі Гт їх у 2,5 рази більше, ніж у задньому. Розмір таких везикул варіював в одній клітині. Автор зробив висновок, що перераховані фізіологічні зміни мають значення для центральної терморегуляції, а завдяки зміні проникності ГЕБ, можливо, стимулюють адаптаційні можливості організму. У такий спосіб, активуючи специфічні нейротрансмітерні механізми, РЕХВ стають потужним засобом стимуляції фізіологічної активності ГЕБ, що супроводжується довгостроковою активацією синаптичного апарату нейронів Гт і оптимізацією вмісту ретроградних месенджерів.

Однак перспективи використання кріотерапії значно розширили сферу її клінічного застосування без більш детального дослідження фундаментальних механізмів впливу наднизьких температур на живий організм. За останні роки поряд із клінічними набули поширення саме фундаментальні дослідження, які стосуються вивчення механізмів дії ЗКТ на гематологічні параметри, фактори росту [209], про- і антиоксидантну систему [146, 233], структурно-функціональний стан і нейрогуморальну регуляцію ССС [8, 131]. Однак на сьогодні ці нечисленні дослідження не дають можливості обґрунтувати весь спектр фізіологічних змін, які відбуваються в організмі під впливом наднизьких температур [9, 11].

1.4 Застосування кордової крові як джерела стовбурових клітин і біологічно активних речовин у клітинній терапії

Клітинна терапія є сучасною й багатонадійною галуззю медико-біологічних наук. Саме з використанням СК пов'язують майбутнє сучасної медицини й перспективні напрями її розвитку [57].

Сьогодні СК мають широкий діапазон рекомендацій щодо терапевтичного застосування, до складу якого входять близько сотні різноманітних захворювань. СК показані для лікування генетичних, серцево-судинних, хронічних і аутоімунних захворювань, імунодефіцитів, лейкозів, ішемії кінцівок, інсульту, розсіяного склерозу, ДЦП, порушень зору, цирозу печінки, цукрового діабету, панкреонекрозу, м'язової дистрофії, травматичних ушкоджень головного і спинного мозку, теплового удару, хвороб Альцгеймера й Паркінсона [139, 212, 221, 222, 277, 299].

СК — це клітини, здатні до самореплікації й диференціації в один або кілька специфічних клітинних типів і заселення (репопуляції) організму хазяїна [161, 286, 288]. Перші СК виникають відразу ж після злиття яйцеклітини і сперматозоїда [286] і містяться в людському організмі на всіх етапах його життя [139]. Деякі автори [288] виділяють 2 типи СК: ембріональні (ЕСК) і дорослі, інші [286] додають ще один — фетальні (СК із пуповинної крові і плаценти). Перший тип представлений внутрішньої клітинної масою раннього ембріона, другий — соматичними СК, які є тканиноспецифічними [286, 288]. ЕСК характеризуються високою проліферативною активністю, тоті- і плуріпотентністю, завдяки чому можуть утворювати будь-яку з тканин організму. Однак використання ЕСК для дослідницьких цілей і в регенеративній медицині вимагають руйнування ембріона й тому в багатьох країнах заборонено з етичних міркувань [161, 286]. Окрім того, встановлено, що застосування цього типу СК може спричинити неконтрольований розвиток онкологічних новоутворень в організмі реципієнта. Альтернативою

ембріональним СК є соматичні, які виявляються в усіх тканинах. Вони присутні в м'язах, головному й кістковому мозку, пульпі зуба, шкірі, підшлунковій залозі, печінці, крові, роговій і сітчастій оболонці ока [161, 288] і мають унікальну функцію — омолодження старіючих тканин [167].

СК дорослого організму є мультипотентними, тобто, можуть давати початок різним клітинним типам [161, 286]. Гемопоетичні стовбурові клітини (ГСК) дають початок клітинам крові, а мезенхімальні — клітинам кісткової, жирової, хрящової і м'язової тканин [161, 245, 249]. Також у дорослому організмі присутні уніпотентні СК, або ж прогеніторні клітини (клітини-попередники) [161]. Багато наукових робіт розкривають ідею стосовно потенціалу ГСК до трансдиференціації в негемопоетичні типи клітин, зокрема в гепатоцити, волокна скелетних м'язів, кардіоміоцити, нейрональні й епітеліальні клітини, що становить особливий інтерес для регенеративної медицини [167, 200].

Однак кількісний та якісний склад пулу СК на різних етапах життя людини не є однаковим. Чим молодша людина, тим більша кількість таких клітин, а їхня здатність до диференціації сильніша, водночас імовірність мутацій через несприятливий вплив навколишнього середовища нижча [139].

Пуповинна, або ж кордова кров (КК), тобто, кров, яка залишається в пуповині та плаценті після народження дитини, віднедавна стала широко розглядатися як багате, і, що більш важливо, етично прийнятне, джерело фетальних СК з високими регенеративними і проліферативними можливостями [139, 249, 288].

КК необхідна для розвитку майбутньої дитини, забезпечуючи її киснем і поживними речовинами [139]. Однак, окрім поживних речовин, вона має у своєму складі понад 60 видів біологічно активних речовин, фетальних факторів росту, а також високу концентрацію СК різних видів [52, 139, 166, 293, 302].

Історично склалося, що для лікування онкологічних та гематологічних захворювань як джерело «нових» ГСК використовувався кістковий мозок. Пізніше набуло поширення введення таких клітин, мобілізованих із

периферійної крові. Потім було доведено наявність великої кількості попередників гемопоезу в КК, а також здатність клітин, виділених із неї, відновлювати гемопоез і репопулювати кістковий мозок після проведення трансплантації [51].

Перше повідомлення про присутність у КК колонієутворюючих попередників датована 1974 роком. Згодом вчені підтвердили, що концентрація гемопоетичних прогеніторних клітин у КК набагато вище, ніж у крові дорослої людини. У 1989 році в роботі Broxmeyer і співавт. [261], було повідомлено про наявність у кордовій крові ГСК.

Дослідження останніх десятиліть підтверджують концепцію, про те, що КК є альтернативним кістковому мозку й мобілізованим із периферійної крові [70] джерелом ГСК для клінічного застосування й біомедичних досліджень [247, 261], а відсутність юридичних, моральних і етичних застережень для її використання виводить КК на перший місце серед джерел СК для трансплантацій [52].

Згідно з літературними даними [286] КК як джерело СК має низку позитивних властивостей. Одними із головних переваг КК є легкий метод забору цього матеріалу, який відрізняється відсутністю травматизму для матері й дитини [286, 288] і більш низький рівень ризику передачі латентних вірусних інфекцій [76, 139, 197, 230, 278]. СК КК, порівнюючи з клітинами, отриманими з кісткового мозку, мають підвищений проліферативний потенціал і здатність до самовідновлення [149, 158, 161, 164, 165, 194, 197, 230], завдяки чому можуть відновлювати гемопоез [65, 110]. Окрім того, вони відрізняються більш низькою імунологічною реактивністю й доступністю для реципієнтів завдяки розширенню імунотолерантних донорів [139, 278, 295]. Це значно збільшує можливість успішної трансплантації без розвитку хвороби трансплантат проти хазяїна в разі невеликої (1–2 антигена) розбіжності за HLA-комплексом [65, 144, 161, 182, 183, 197, 230]. Детальне вивчення клітинного складу КК виявило, що ефекторні клітини мають функціональну незрілість, дисбаланс цитокінів і знижену чутливість до цитокінової регуляції імунної відповіді. Пригнічення

активності цитотоксичних лімфоцитів вважається чинником, що сприяє формуванню імунотолерантності до гемопоетичних клітин [65, 203]. У популяції лімфоцитів КК, на відміну від джерел ГСК із дорослого організму, переважають неактивні, незрілі лімфоцити і клітини-супресори [65, 102, 204]. Важливо зазначити, що велика частина антигенпрезентуючих клітин моноцитарної фракції КК відрізняється функціональною неповноцінністю і браком активності [65]. Висока імунотолерантність КК особливо актуальна для неспоріднених трансплантацій ГСК. Окрім того, КК, порівнюючи з дорослою периферійною кров'ю, є чудовим джерелом для виділення і збільшення в культурі кількості Т-регуляторних клітин. За даними робіт Godfrey і співавт., $CD4^+CD25^+$ Т-клітини (Т-супресори) КК після культивування і зберігання в банку здатні проявляти потужні пригнічуючі властивості й можуть слугувати доступним джерелом Т-клітин для імунотерапії [175, 216, 241].

У 1988 році у Франції була проведена перша трансплантація КК [211, 249, 261]. Відтоді кількість трансплантацій ГСК КК суттєво зростала з кожним роком. Так, згідно з даними Європейської групи з трансплантацій кісткового мозку (European Group of Blood and Bone Marrow Transplantation — EBMT), у Європі у 2006 році загальна кількість алогенних трансплантацій ГСК склала 9661. Із них у 9154 (94,8 %) випадках джерелом ГСК був дорослий донор (в 59 % — споріднений, а в 41 % — неспоріднений), а в 507 (5,2 %) — КК [50]. За даними WMDA (World Marrow Donor Association — Всесвітня асоціація донорів кісткового мозку) до 2008 року трансплантати КК становили до 22 % від усіх джерел ГСК для алогенних трансплантацій. Цей показник у Сингапурі досягав у 2007 році понад 40 % [101, 102], і, за прогнозами фахівців, у майбутньому буде становити до 60 % від усіх джерел ГСК [102].

У 2010 році в США кількість трансплантацій СК КК особам віком до 18 років перевищило показник для аналогічних операцій із використанням клітинних трансплантатів кісткового мозку [57]. На сьогодні загальна кількість трансплантацій СК КК при гематологічних і негематологічних захворюваннях становить більш ніж 20 000 [195, 286].

Фундаментальні дослідження [273], клінічні випробування й багатий досвід успішного медичного застосування ГСК КК як трансплантата для лікування гематологічних та онкологічних захворювань (спільно з проведенням радіо- і хіміотерапії) підтверджують здатність цієї популяції клітин відновлювати гемопоєз [57, 102, 190].

В Україні відповідно до світових тенденцій відбувається розвиток напрямів застосування КК для лікування неонкогематологічних захворювань і патологічних станів: хронічної ішемії кінцівок, гепатитів, цирозу печінки, цукрового діабету і т. ін. [57].

Так, в умовах експериментально змодельованого цукрового діабету, використання ГСК супроводжується повним гальмуванням розвитку мікроангіопатій [122, 139].

У роботі українських дослідників [52] в експерименті на щурах показано, що СК КК у разі місцевого введення в ішемізовані кінцівки, сприяють постійній структурній стимуляції ангіогенезу й регенеративних процесів. Уже на 3 добу після трансплантації спостерігався початок активних процесів, які компенсують ішемічне пошкодження, а на 7–14 добу з'являлися молоді ендотеліоцити, збільшувалася експресія мезенхімального фактора віментину і фактора Віллебранда, у молодих капілярах з'являвся кровотік. На 22 добу розвивалася й активно функціонувала система новоутворених капілярів.

За останні роки в нашій країні чималих успіхів досягнуто в галузі застосування компонентів КК у неврології й нейрохірургії, а також виробництві імунобіологічних препаратів на основі плазми кордової крові [102].

Основним маркером, який використовується для визначення кількості стовбурових клітин-попередників гемопоєзу в КК, є $CD34^+$ [37, 70, 199]. Облік панлейкоцитарного маркера $CD45^+$, що з'являється на поверхні лімфоїдно-коммітованих клітин-попередників [199], є найбільш коректним способом виділення лейкоцитів із ЯБК КК, оскільки ядровмісні еритроїдні попередники не експресують зазначений маркер [70].

Клінічний досвід показав, що мінімальна лікувальна доза в зразку КК має становити $1,7 \times 10^5$ на кілограм ваги тіла пацієнта для $CD34^+$ і $1,5\text{--}2,0 \times 10^7$ для $CD45^+$ - клітин [179, 219, 256].

Оскільки основним недоліком КК є малий обсяг матеріалу, який забирається [170], важливим аспектом, є наявність у її зразку необхідної для трансплантації кількості $CD34^+$ - клітин [162].

Вчені й далі працюють над розробленням і зараз впроваджують кілька шляхів вирішення цієї проблеми [264]:

- експансія СК поза організмом [51, 157, 164, 191, 271, 272];
- застосування трансплантатів, отриманих від двох і більше різних донорів [205, 220, 235, 248, 273];
- використання внутрішньокісткового введення препаратів КК [220, 273];
- введення спільно з трансплантатом агентів, які потенційно підвищують спрямування СК до кістковомозкової ніші і їхнє приживлення [153, 246, 273, 283].

За допомогою застосування методів культивування, які блокують клітинну диференціацію, концентрацію клітин у зразку КК можна збільшити *ex vivo* більш ніж у 400 разів [241]. Зараз триває пошук оптимальних умов для створення середовища, здатного максимально примножувати кількість ГСК у зразку, отриманому з КК [157, 164, 170].

Наступним способом є одночасне застосування двох [205, 220, 235, 241, 248, 275] і більше [188] зразків КК. Показано [241, 297], що одночасне використання двох препаратів КК (з концентрацією ЯВК $3,6 \times 10^7$ / кг і $CD34^+$ $3,7 \times 10^5$ / кг), отриманих від різних породіль, які мають неповний збіг за генами HLA з реципієнтом, сприяє швидшому приживлення трансплантата, а також не спричиняє перехресного імунологічного відторгнення. Дослідження, проведені британськими вченими [188, 196, 296], свідчать про ефективне застосування 7 різних зразків КК, з яких тільки один збігався за генами HLA, але мав дозу клітин нижче рекомендованої, а решта шість (по одному на кожні

10 кг ваги реципієнта) відігравали роль допоміжних і підвищували рівень приживлення першого.

В останні роки з'явилися роботи, у яких акцентується увага на успіхи, досягнуті в підвищенні приживлюваності ГСК КК завдяки ко-трансфузії цих клітин із високоочищеними мобілізованими ГСК від донорів, необмежених за HLA [176, 192, 193, 264].

Багатьма вченими КК розглядається не тільки як джерело СК різних типів, але й середовища, у якій вони містяться і яке утворюють. Не викликає сумнівів, що СК КК виділяють хімічні месенджери, які мають терапевтичний ефект і можуть підвищувати активність регіональних СК [286]. У плазмі КК містяться компоненти репродуктивних імуномодуляторів, спектр гормонів, ростові фактори, мікроелементи і вітаміни [65, 124, 130].

Цікаво, що перша пропозиція щодо застосування КК, яка була висунута М. С. Малиновським у 1936 році [53], зовсім не була пов'язана з наявністю в її складі СК, а формувала уявлення про КК як гемотрансфузійне середовище. До 1949 року на базі Басманної лікарні та пологового будинку ім. Баумана С. І. Баренбойм із колегами провели 2500 трансфузій [132]. У 1979 році [260] з'явилися дані про те, що фетальну кров, зібрану з пупкової вени, можна безпечно отримувати й застосовувати при ятрогенній крововтраті або шоку в немовлят. Через малий обсяг кордова кров не набула широкого застосування в цій галузі, проте низка медичних університетів Європи і Японії і далі розроблюють підходи щодо застосування аутогенної еритроцитарної маси КК для компенсації крововтрати під час хірургічних втручань у немовлят, а також недоношених дітей при анемічних порушеннях [101, 226, 186].

З кінця 80-х рр. минулого століття в Україні в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Інституті клітинної терапії, Інституті гематології та трансфузіології АМН України, Київському центрі трансплантації кісткового мозку та інших наукових установах і підрозділах проводяться дослідження з вивчення клітинного складу КК. Підтверджено особливість

популяційного складу ефекторних клітин, присутність кровотворних клітин різного ступеня диференціації, зокрема CD34⁺ [49, 65, 109, 113, 130].

Велика кількість робіт, присвячених КК і СК, отриманим з інших джерел, опубліковано співробітниками Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. На базі інституту проводяться фундаментальні і прикладні дослідження в різних напрямках: від вивчення властивостей СК, їх отримання і зберігання до застосування в експериментальних тварин у нормі й при різних патологічних станах. Співробітниками інституту акумульовано унікальний досвід кріоконсервування, низькотемпературного зберігання та клінічного випробування СК. Розроблено методику виділення і кріоконсервування ядровмісних клітин кордової крові (ЯВК КК), зокрема і ГСК КК [128], яка дає змогу досягти високої збережуваності ($89,0 \pm 4,9$ % ЯВК і $95,0 \pm 3,1$ % ГСК) і життєздатності клітин (на рівні 99,0 %).

Останнім часом значна увага до тканинних і клітинних препаратів прикута з погляду їхнього геропротекторного потенціалу [67, 178, 213], оскільки вікові зміни, що відбуваються в пулі СК, є однією з основних причин старіння організму і виникнення асоційованих з віком патологій.

Зменшення з віком чисельності власних СК [139] і їхнього клонального різноманіття [198] знижує регенеративні здатності організму. Водночас, СК похилого організму зберігають свій потенціал, який, у разі створення «омолоджуючого» оточення, може бути спрямований на продукцію нових, молодих СК [257, 276, 310].

На сьогодні із метою ревіталізації організму успішно використовують клітинну терапію, що перевершує за ефективністю багато геріатричних засобів [65], оскільки введення в старіючий організм СК може запобігти або уповільнити розвиток і прогресування вікової патології [141].

Оскільки КК містить у своєму складі біологічно активні речовини, фактори росту, а також має високу концентрацію СК різних популяцій [52, 140, 166, 293, 302], які вирізняються здатністю до проліферації й диференціації, це дає змогу розглядати її в ролі перспективного геропротектора.

З огляду на вище викладене, актуальним є проведення наукових досліджень із вивчення деяких механізмів дії кЯВК КК, РЕХВ та їх поєднаного застосування на організм експериментальних тварин у динаміці їхнього старіння. Особливо варте уваги визначення дії саме поєднаного застосування кЯВК КК та РЕХВ, які є стимулюючими засобами, котрі відрізняються за природою та механізмом дії й, певно, можуть викликати взаємопотенціюючий ефект.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ Й МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Схеми експерименту та кількість досліджуваних тварин

Основну частину досліджень проведено на базі наукових підрозділів Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків), відповідно до загальних принципів роботи на тваринах, схвалених Комітетом з біоетики ІПКіК НАН України та узгодженими з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та законами України.

Згідно з літературними даними відомо, що фізіологія ссавців (зокрема, гризунів) має значну схожість із фізіологією людини, особливо на клітинному рівні. Щури й миші є зручними експериментальними тваринами, котрі широко використовуються для вивчення механізмів дії різних речовин, які мають геропротекторні властивості [3, 218], а результати таких досліджень дозволяють науково обґрунтувати рекомендації щодо їх застосування в людини [3, 217, 301].

Водночас спектр вікових змін у щурів значно ширше, ніж у мишей [3, 270]. Тому для виконання експерименту нами були обрані білі безпородні щури самці, процес старіння яких може виступати адекватною моделлю нормального фізіологічного старіння людини.

Усі тварини містилися в умовах віварію ІПКіК НАН України зі стандартним харчовим раціоном і вільним доступом до їжі і води. Маніпуляції зі щурами виконували в першій половині дня.

Науково-дослідна робота складалася з двох частин (рис. 2.1):

1 — вивчення одноразового впливу РЕХВ, кЯВК КК та їх поєднання на організм старих щурів (24 місяці) (табл. 2.1);

2 — вивчення впливу РЕХВ, кЯВК КК та їх поєднаного застосування в динаміці старіння щурів із повторним використанням кожні півроку, починаючи із 6-місячного віку (6, 12, 18 і 24 місяці) (табл. 2.2).

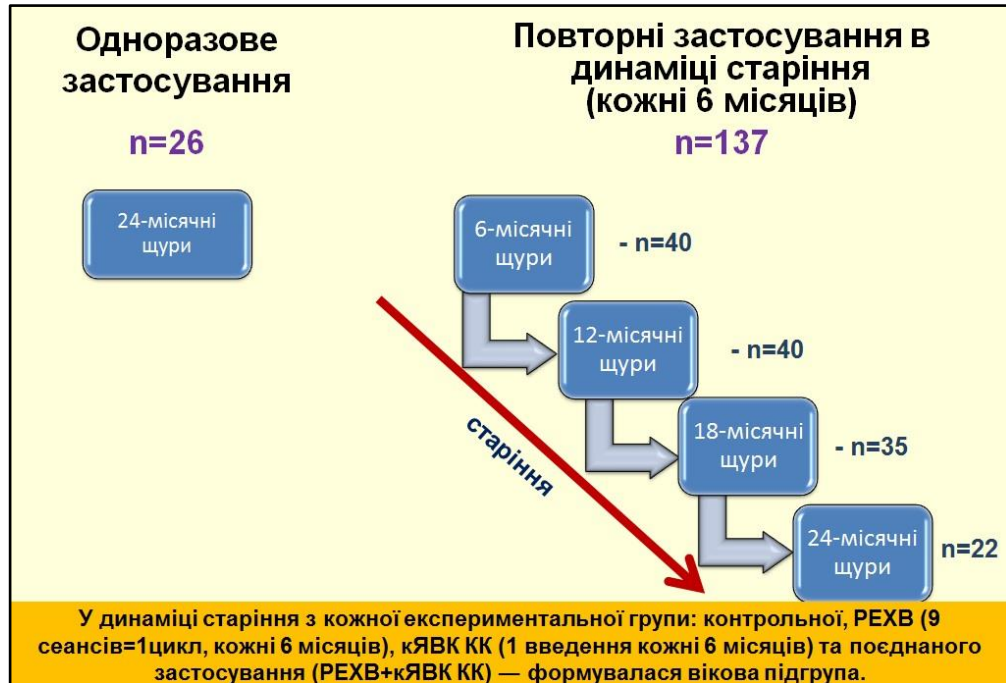


Рис. 2.1. Схема (дизайн) експерименту

Наведені вікові групи тварин відповідають віку людини, починаючи від 25,5 до 102 років [36] (табл. 2.3), та були вибрані з метою отримання динамічної картини розвитку процесу старіння, починаючи з найбільш повного з погляду функціонального стану й адаптаційного потенціалу віку [38]. Усього під час виконання дисертаційної роботи було використано 163 щура: 26 тварин віком 24 місяці (одноразове застосування вищезазначених процедур) й 137 тварин у динаміці старіння, починаючи з 6-місячного віку. Варто зазначити, що кількість щурів, що дожили до 24-місячного віку, у групах поєднаного впливу та кЯВК КК перевищували контрольні показники в 1,8 та 1,6 раза, відповідно.

Таблиця 2.1

Розподіл старих тварин за серіями експерименту в разі одноразового впливу

№ п/п	Частина експерименту	Різновид впливу (група)	Кількість тварин
1.	Оцінювання стану вегетативної регуляції серцевого ритму 24-місячних щурів	РЕХВ	7
		кЯВК КК	7
		Поєднане застосування РЕХВ і кЯКВ КК	7
		Контроль	5
2.	Визначення концентрації тиреоїдних і статевих гормонів сироватки крові 24-місячних щурів	РЕХВ	6
		кЯВК КК	6
		Поєднане застосування РЕХВ і кЯКВ КК	6
		Контроль	5
3.	Аналіз вмісту кінцевих продуктів обміну NO сироватки крові 24-місячних щурів	РЕХВ	6
		кЯВК КК	6
		Поєднане застосування РЕХВ і кЯКВ КК	6
		Контроль	5

Таблиця 2.2

Розподіл тварин за серіями експерименту в динаміці старіння

№ п/п	Частина експерименту	Різновид впливу (група)	Вік, місяців	Кількість тварин
1.	Оцінювання стану	РЕХВ	6	10

Продовж. табл. 2.2

	вегетативної регуляції серцевого ритму в динаміці старіння		12	10
			18	7
		кЯВК КК	6	10
			12	10
			18	10
			24	8
		Поєднане застосування РЕХВ і ЯКВ КК	6	10
			12	10
			18	10
			24	9
		Контроль	6	10
			12	10
			18	8
			24	5
2.	Визначення концентрації тиреоїдних і статевих гормонів сироватки крові в динаміці старіння щурів	РЕХВ	6	6
			12	6
			18	6
		кЯВК КК	6	6
			12	6
			18	6
			24	6
		Поєднане застосування РЕХВ і кЯКВ КК	6	6
			12	6
			18	6
			24	6
		Контроль	6	6
			12	6
			18	6

Продовж. табл. 2.2

			24	5
3.	Аналіз вмісту кінцевих продуктів обміну NO сироватки крові в динаміці старіння щурів	РЕХВ	6	6
			12	6
			18	6
		кЯВК КК	6	6
			12	6
			18	6
			24	6
		Поєднане застосування РЕХВ і кЯВК КК	6	6
			12	6
			18	6
			24	6
		Контроль	6	6
			12	6
			18	6
			24	5
4.	Гістологічне оцінювання структурного стану міокарда в динаміці старіння щурів	РЕХВ	6	7
			12	7
			18	5
		кЯВК КК	6	7
			12	7
			18	7
			24	6
		Поєднане застосування РЕХВ і кЯВК КК	6	7
			12	7
			18	7
			24	6

Продовж. табл. 2.2

5.	Вивчення особливостей ультраструктурних перебудов тканин і судин міокарда в динаміці старіння щурів	Контроль	6	7
			12	7
			18	6
			24	5
		РЕХВ	6	10
			12	10
			18	7
		кЯВК КК	6	10
			12	10
			18	10
			24	8
		Поєднане застосування РЕХВ і кЯВК КК	6	10
			12	10
			18	10
			24	9
		Контроль	6	10
			12	10
			18	8
			24	5

Таблиця 2.3

Співвідношення віку щурів і людини

Вік щурів, місяців	Вік людини, роки
6	25,5
12	51
18	76,5
24	102

2.2 Методика охолодження та введення кріоконсервованих ядромісних клітин кордової крові

РЕХВ ($-120\text{ }^{\circ}\text{C}$) виконували в метрологічно атестованій кріокамері для охолодження експериментальних тварин [66]. Пристрій містить у собі такі вузли (рис. 2.2): термоізований корпус із робочою камерою, у якій розташовані теплообмінник зі заливним клапаном і каналом відводу холодоагенту; робочий відсік із герметичною шторкою, усередині якого розміщено пристрій для фіксації тварини, датчики реєстрації температури й датчики контролю функціонального стану тварини; шлюзовий відсік із герметичною кришкою, наявність якого дозволяє уникнути значного градієнта температур між робочою камерою й робочим відсіком.



Рис. 2.2. Камера для охолодження експериментальних тварин

Температура в кріокамері контролювалася за допомогою платинових метрологічно атестованих термометрів опору виробництва фірми «Гера».

Після виходу пристрою на робочий режим ($-120\text{ }^{\circ}\text{C}$) тварини поміщувалися в кріокамеру через шлюзовий в основний відсік. У кріокамері за

температури -120°C щури містилися протягом 2 хв, де за ними здійснювався постійний візуальний контроль через спеціальне вікно. Потім їх виймали і тримали 5 хв за кімнатної температури ($22-24^{\circ}\text{C}$) поза камерою. Далі процедуру охолодження повторювали, тварин зігрівали 5 хв за кімнатної температури, після чого за аналогічною схемою проводили охолодження. У такий спосіб, тварини отримували три сеанси РЕХВ на добу. Під час відігрівання стежили за поведінкою тварин. На 3-ю і 5-у добу сеанси РЕХВ повторювали. Усього тварини охолоджувались 9 разів по 2 хв за температури -120°C протягом 5 днів [8, 10]. Безпосередньо після охолодження щурам за допомогою цифрового інфрачервоного термометра «microlife 1DE1» вимірювали температуру на поверхні шкіри, яка змінювалася в межах $3-5^{\circ}\text{C}$ від початкової ($36,5 \pm 0,9$) $^{\circ}\text{C}$. Ректальна температура достовірно не змінювалась і була на рівні ($37,4 \pm 0,7$) $^{\circ}\text{C}$.

Експериментальним тваринам вводили готовий препарат кЯВК КК [128, 129], отриманий в ІПКіК НАН України. Розморожений препарат кЯВК КК являв собою суспензію кріоконсервованих ЯВК КК в аутоплазмі КК з концентрацією CD34^{+} -клітин $2-4 \times 10^5$ в 1 мл.

Кріоконсервовані ЯВК КК вводили внутрішньочеревно з розрахунку 1×10^5 життєздатних CD34^{+} -клітин на кілограм маси тіла тварини. Препарат доводили до об'єму 1 мл аутоплазмою КК. Вибір зазначеної концентрації базувався на наявних літературних даних щодо ефективності застосування кордової крові людини за внутрішньочеревного введення в щурів після моделювання інсульту [285], а також попередніх роботах [11, 12], проведених у відділі кріофізіології ІПКіК НАН України. Контрольним тваринам проводили аналогічні маніпуляції з використанням фізіологічного розчину об'ємом 1 мл.

З метою вивчення поєднаного впливу РЕХВ і кЯВК КК препарат вводили щурам після сеансів охолодження. Ґрунтуючись на раніше отриманих співробітниками відділу кріофізіології даних щодо підвищення проникності ГЕБ на тлі РЕХВ [8], щурам 6- і 12-місячного віку введення кЯВК КК

здійснювали після шостої процедури охолодження, а 18- і 24-місячним — після дев'ятої.

Для груп із повторними проведенням циклів охолодження і введення кЯВК КК, процедури РЕХВ і введення кЯВК КК повторювали за аналогічною методикою кожні 6 місяців.

У процесі проведення сеансів РЕХВ і введення кЯВК КК жодна тварина не загинула.

2.3 Електрофізіологічні методи дослідження

Реєстрацію ЕКГ у ненаркотизованих іммобілізованих тварин здійснювали після 3, 6, 9-го сеансу РЕХВ, а також на наступну добу, через 3 доби, тиждень і місяць після останньої процедури охолодження і введення кЯВК КК на електрокардіографі серії «Полі-Спектр» («Нейро-софт», Росія) у 6 стандартних відведеннях. Тривалість запису становила 5 хвилин. Спектральний аналіз ВСР виконували за допомогою програми «Полі-Спектр-Ритм» («Нейро-софт», Росія) у діапазонах частот, рекомендованих для щурів [171, 267]. Для тварин контрольної групи запис і спектральний аналіз виконувалися в аналогічні терміни.

Варіабельність серцевого ритму (ВСР) — це природні тимчасові відмінності між послідовними циклами серцевих скорочень. На стандартній ЕКГ, максимальне відхилення вгору нормального комплексу QRS міститься на піку R-хвилі, а інтервал між двома сусідніми R-хвильовими піками, визначається як RR-інтервал. Результуючий період між сусідніми QRS комплексами, що виникає в результаті деполяризації синусового вузла називається нормальним інтервалом. Аналіз ВСР ґрунтується на вимірюванні мінливості нормальних RR-інтервалів [223, 274].

Спектральний аналіз ВСР є найбільш інформативним і широко поширеним методом оцінки впливу різних рівнів регуляції на ритм серця [13] і

розглядається як неінвазивний маркер функції автономної нервової системи [33, 223] і інтегральний критерій функціонального стану організму [33].

Метод полягає в ідентифікації хвильової структури серцевого ритму, дозволяє розкласти ритмограму (графічне зображення послідовного часового ряду міжсistolічних RR-інтервалів у вигляді відрізків прямої лінії, еквівалентних за довжиною тривалості пауз між послідовними серцевими скороченнями) на складові її хвилі й кількісно оцінити внесок кожної з них у динаміку серцевого ритму. Математично метод виконується перетворенням Фур'є з побудовою спектрограми й підрахунком площі спектра у виділених частотних діапазонах [13, 98].

Спектральний аналіз ВСР дає можливість виділити частоти, які відображають активність складових багаторівневої системи управління серцевим ритмом [98, 223]. Одним із найбільш важливих показників, у частотному аналізі функціональної адаптації ССС у відповідь на дію стресів різного генезу є загальна (сумарна) потужність спектра ВСР (total power — TP). Потужність хвиль в області високих частот спектра ВСР — HF (high frequencies) характеризують активність парасимпатичного (вагусного) кардіоінгібіторного центру довгастого мозку. Зміна активності вазомоторного центру довгастого мозку відображені в коливаннях низькочастотного компонента — LF (low frequencies). Потужність дуже низькочастотного компонента (VLF — very low frequencies) — індикатор управління гуморально-метаболічними процесами. Хвилі в цій області частот тісно пов'язані з психоемоційним напруженням [13, 98].

Керуючись рекомендаціями для проведення спектрального аналізу ВСР у щурів [171, 267] нами були виділені і проаналізовані наведені нижче показники:

TP (мс^2) — загальна потужність спектра коливань кардіоритму (0–3 Гц);

HF (мс^2) — потужність високочастотних коливань у діапазоні (1–3 Гц);

LF (мс^2) — потужність низькочастотних коливань у діапазоні (0,04–1 Гц);

VLF (мс^2) — потужність спектра кардіоритму в області дуже низьких частот (0–0,04 Гц).

2.4 Біохімічні методи дослідження

2.4.1 Методика визначення концентрації тиреоїдних і статевих гормонів у сироватці крові

Щитоподібна залоза складається з безлічі особливих порожнин — фолікулів, заповнених в'язким секретом — колоїдом [16]. До складу колоїду входить особливий йодовмісний глікопротеїн із високою молекулярною масою приблизно 650000 (5000 амінокислотних залишків) — йодтиреоглобулін. Він є запасною формою йодтиронінів: тироксину, або тетраїодтироніну, (T_4) і трийодтироніну (T_3) — основних гормонів, які синтезуються та секретуються фолікулярною частиною щитоподібної залози [16, 105].

Йодтироніни є йодованими похідними тирозину. Вміст T_4 у крові в 50–70 разів більше, ніж T_3 . Однак фізіологічну дію надає переважно T_3 , який у 4–10 разів активніший, ніж T_4 . У клітинах-мішенях T_4 перетворюється на T_3 шляхом дейодування, і з внутрішньоклітинними рецепторами взаємодіє в основному T_3 , а T_4 часто розглядається як прогормон [21]. Йодтироніни циркулюють у крові здебільшого в поєднанні зі спеціальним глікопротеїном — тироксинзв'язуючим білком. Рівновага реакції «гормон + білок = гормон — білок» сильно зміщена в бік комплексу, що призводить до того, що у вільній формі міститься лише 0,03 % T_4 і 0,3 % T_3 [105]. Біосинтез T_3 і T_4 регулюється тиротропіном — гормоном гіпоталамуса [16].

Загальноживаним показником функціонального стану щитоподібної залози вважається вміст T_4 в сироватці крові.

Статеві гормони синтезуються в основному в статевих залозах самок (яєчники) і самців (сім'яники). Деяка їх кількість утворюється в плаценті й кірковій речовині наднирників. Регуляція біосинтезу тестостерону й естрадіолу здійснюється гонадотропними гормонами гіпофіза — лютеїнізуючим і фоллікулостимулюючим. Зі свого боку статеві гормони регулюють секрецію

гонадотропінів за принципом зворотного зв'язку, блокуючи відповідні центри в гіпоталамусі [16].

Тестостерон (Тс) — стероїд із молекулярною масою 288,4 Да. Тс синтезується головно клітинами Лейдіга в сім'яниках, проте невелика його кількість утворюється в надниркових залозах. Біологічна роль тестостерону в чоловічому організмі в основному пов'язана з диференціюванням і функціонуванням репродуктивної системи, проте слід зазначити, що андрогени мають значну анаболічну дію, яка виявляється в стимуляції синтезу білка у всіх тканинах (виняток — виличкова залоза, де андрогени мають катаболічну дію), але здебільшого в м'язах [16]. Секреція тестостерону має певний циркадний ритм. Найвищий рівень гормону в людей відзначається о 6 годині ранку, найменший — о 20 годині.

Естрадіол (Ес) — стероїдний гормон із молекулярною вагою 272,4 Да. Це найбільш активний з естрогенів [16]. Вважається, що в чоловіків незначна кількість естрадіолу синтезується в корі надниркових залоз і в яєчках. Фізіологічна роль Ес полягає у формуванні специфічних функцій жіночого організму.

Дегідроепіандростерон (ДГЕА) — андроген із молекулярною масою 288,4 Да, секретується в пучковій і сітчастій зонах наднирників. В організмі людини та інших ссавців він присутній в основному у вигляді сульфатного похідного — дегідроепіандростерон-сульфату (ДГЕАС). Зниження концентрації ДГЕАС у плазмі крові відбувається з віком у чоловіків і жінок, а також відзначається в разі патологічних станів — гіперліпідемії, психозі, псоріазі, недостатності кори надниркових залоз.

Тварин контрольної й дослідних груп виводили з експерименту шляхом декапітації на 30-у добу після завдання впливів, далі робили забір крові для визначення рівня тиреоїдних і статевих гормонів. Зразки крові центрифугували на центрифугу MPW — 311 (Mechanika Precyzyjna, Poland) зі швидкістю 1500 об/хв за кімнатної температури протягом 15 хв, потім відокремлювали сироватку і зберігали її за -120°C до проведення аналізу.

Вміст T_4 , T_3 , T_c , E_c і ДГЕАС визначали методом твердофазного імуноферментного аналізу [174, 208, 265] за допомогою стандартних комерційних наборів для конкурентного ІФА («ХЕМА Co. Ltd.», Росія): « T_4 -ІФА», « T_3 -ІФА», «ТЕСТОСТЕРОН-ІФА», «ЕСТАРДІОЛ-ІФА» й «ДЕАС-ІФА», відповідно, за методиками виробника.

Вимірювання величини оптичної щільності вмісту лунок планшета здійснювали на фотометрі вертикального сканування — планшетному імуноферментному аналізаторі StatFax 3200 («Awareness Technology Inc.», США) за довжини хвилі 450 нм.

Протягом 5–10 хв вносили до відповідних лунок планшета (у двох повторях) по 25 мкл (для визначення T_3 — 50 мкл) калібрувальної проби й контрольної сироватки, а в інші лунки (у двох повторях) вносили досліджувані зразки сироватки крові в тому ж обсязі. Вносили по 100 мкл кон'югату (для визначення T_3 — 50 мкл), заклеювали планшет папером для заклеювання планшета й інкубували за температури 37 °С. Час інкубації залежав від конкретного гормону й був таким: для визначення T_3 — 30 хв, T_4 і ДГЕАС — 60 хв, T_c і E_c — 120 хв. Після закінчення інкубації видаляли вміст лунок і відмивали лунки 5 разів. Під час кожного відмивання в усі лунки додавали по 250 мкл відмивочного розчину, струшували планшет круговими рухами по горизонтальній поверхні, забирали надосадову рідину пастерівської піпеткою. Частину надосадової рідини зливали (декантували), ретельно видаляючи залишки рідини з лунок постукуванням планшета в перевернутому положенні по фільтрувальному папері.

Потім в усі лунки протягом 2–3 хв вносили по 100 мкл розчину субстрату тетраметилбензидину, після чого інкубували планшет у темряві за кімнатної температури (18–25 °С), час інкубації визначався ступенем розвитку синього забарвлення (10–20 хв).

Після закінчення інкубації в усі лунки з тією ж швидкістю й у тій же послідовності, як і розчин субстрату тетраметилбензидину, вносили по 100 мкл стоп-реагенту — вміст лунок забарвлювалося в яскраво-жовтий колір. У

наступні 15 хв проводили вимір оптичної щільності вмісту лунок планшета (концентрація гормону в зразку обернено пропорційна щільності вмісту лунки).

2.4.2 Методика визначення сумарних метаболітів оксиду азоту в сироватці крові

Визначення сумарних метаболітів оксиду азоту (NO) здійснювали спектрофотометричним методом визначення нітрит-іона [96] з використанням реактивів фірми SIGMA-ALDRICH (США — Німеччина). Вимірювання оптичної щільності зразків здійснювали за допомогою спектрофотометра UV-1800 (SHIMADZU, Японія) за довжини хвилі 540 нм.

Методика визначення рівня метаболітів NO в сироватці крові [96] базується на здатності первинних ароматичних амінів у присутності азотної кислоти, утворювати інтенсивно забарвлені діазосполуки (з максимумом смуги поглинання за $\lambda = 540$ нм), що досягається шляхом реакції нітритів із реактивом Грісса, який є сумішшю рівних обсягів 0,05 % водного розчину N-нафтілетилендіаміну і 1 % розчину сульфаніламід у 30 % оцтовій кислоті.

Обов'язковою умовою визначення сумарних метаболітів NO є трансформація нітратів у нітрити (які і визначаються за допомогою реактиву Грісса) завдяки їхньої взаємодії з хлоридом ванадію (III). Одночасно в реакційному середовищі йде реакція діазотування сульфаніламід нітритом, який утворився, з подальшим розвитком рожевого забарвлення, інтенсивність якого визначається спектрофотометрично.

Для побудови калібрувальної кривої був використаний 1 М водний розчин NaNO_2 , який розводили в 1000 разів, а потім готували серію розведень для побудови градувального графіка. З огляду на те, що лінійність кривої зберігається в діапазоні концентрації нітрит-іона від 5 до 100 мкМ, з 10^{-3} М розчину NaNO_2 отримували розчини з концентраціями 5; 10; 20; 30; 50; 60; 70; 80; 90; 100 мкМ [79]. Готували серію з 10 пробірок, які містили по 0,7 мл розчинів NaNO_2 з відповідними концентраціями. Далі додавали по 0,7 мл свіжоприготованого розчину хлориду ванадію й по 0,7 мл реактиву Грісса.

Дотримуючись зазначених умов, пробірки витримували 30 хв у водяній бані за температури 37 °С. Кожен розчин серії готували в 5 повторях. Вимірювали оптичну щільність. За отриманими оптичним щільностями і відомим концентраціям у калібрувальних пробах будували калібрувальний графік.

2.5 Гістологічні методи дослідження

Після умертвіння тварин на 30-у добу після завданих впливів, їхнє серце розрізали в поперечному напрямку по вінцевої борозні, і виділену каудальную частину (а саме — лівий шлуночок) досліджували гістологічними методами [97]. Матеріал фіксували в 10 % розчині нейтрального формаліну, зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації (від 50° до 100°), просочували сумішшю спирту і ксилолу (1:1), ксиолом, сумішшю ксилолу та парафіну (1:1), парафіном і укладали в парафіновий блок.

За допомогою санного мікротома («Reichert», Австрія) виготовляли гістологічні зрізи (завтовшки 5–7 мкм) у площині, перпендикулярній довгій осі серця. Після депарафінування в ксиолі зрізи забарвлювали гематоксиліном Ганзена й еозином, поміщали в полістирол під покривне скло.

Забарвлення сполучної тканини виконували за методом Ван Гізона із використанням барвника пікрофуксин (насичений розчин пікринової кислоти і 1 % розчин кислого фуксину в співвідношенні 1:10). Забарвлення клітинних ядер проводили залізним гематоксиліном Вейгерта, зрізи поміщали в полістирол під покривне скло.

Для оцінки препаратів і мікрофотографування застосовували світловий мікроскоп AxioStar Plus (Carl Zeiss, Німеччина) та Olympus BX63 (Olympus Corporation, Японія), цифрову фотокамеру Olympus DP73 і комп'ютерну програму CellSens Dimension (Olympus Soft Imaging Solution GmbH, Німеччина), а також цифрову фотокамеру Canon PowerShot SX210 IS. Розподільна здатність отриманих зображень 1600 × 1200 пікселів. Для

підрахунку морфометричних параметрів використовували комп'ютерну програму AxioVision Rel. 4.8 (Carl Zeiss Imaging Solution GmbH, Німеччина).

2.6 Електронно-мікроскопічні методи дослідження

Для оцінювання ультрамікроскопічних перебудов у кардіоміоцитах і ендотеліоцитах кровоносних капілярів міокарда в динаміці старіння щурів на тлі РЕХВ, введення кЯВК КК та за їх поєднаного застосування був використаний метод трансмісійної електронної мікроскопії [22, 99].

Тварин виводили з експерименту шляхом декапітації на 30-у добу після завданих впливів і здійснювали забір шматочків тканин і судин міокарда для електронно-мікроскопічного дослідження.

Забір здійснювали методом висічення й занурення тканини у фіксатор без попередньої загальної васкулярної реперфузії [239]. Серце тварини швидко переносили в первинний фіксатор для відмивання, розрізали в поперечному напрямку по вінцевій борозні і виділену краніальную частину (передсердя) поділяли на шматочки розміром 2–3 мм³.

Попередню фіксацію проводили в глютарового-формальдегідному фіксаторі Карновського [224]. Шматочки тканини опускали у фіксуючий попередньо охолоджений розчин і зберігали в холодильнику за температури 4 °С протягом 5–6 годин [63].

Надалі зразки переносили в 1 % забуферений розчин (рН 7,2–7,4) тетраоксиду осмію (OsO₄) на 3–4 години за температури 4 °С для остаточної фіксації [99]. Після закінчення часу фіксації проводили зневоднення тканини в спиртах зростаючої концентрації й ацетоні, просочували й укладали в блоки епоксидних смол (епон-аралдіт) за стандартними методиками [99, 187, 244]. Полімеризацію блоків проводили в термостаті за 60 °С протягом двох діб.

З отриманих блоків, на ультрамікротомі УМТП–3М («SELMІ», Україна), виготовляли ультратонкі зрізи, монтували їх на електролітичні сіточки і, після

контрастування цитратом свинцю, вивчали під трансмісійним електронним мікроскопом ЕМВ–100 БР («SELMІ», Україна) за напруги 75 кВ.

Ідентифікацію органоїдів і інтерпретацію результатів проводили згідно з посібником [239].

2.7 Статистична обробка отриманих результатів

Перевірку на нормальність розподілу даних здійснювали за допомогою *W*-тесту Шапіро-Уїлка (для вибірок із кількістю менше 30 даних). За нормального розподілу даних для порівняння середніх арифметичних двох вибірок застосовували параметричний *t*-критерій Стюдента, для порівняння чотирьох груп у межах одного віку — дисперсійний параметричний аналіз ANOVA, у разі вільного розподілу — непараметричний *U*-критерій Уїлкоксона (Манна-Уїтні) для порівняння двох вибірок та *H*-критерій Краскла-Уолліса з наступним вирахуванням попарно критерію Манна-Уїтні з внесенням поправки Бонферроні для дисперсійного аналізу чотирьох груп [7, 75]. Статистично значущими вважали відмінності за $p < 0,05$ (для рівня гормонів у сироватці крові щурів $p \leq 0,05$). Розрахунки проводили за допомогою комп'ютерних програм Excel, «НейроСтат», «Past3».

РОЗДІЛ 3

ВПЛИВ РИТМІЧНОГО ЕКСТРЕМАЛЬНОГО ОХОЛОДЖЕННЯ (–120 °C), КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЯДРОВМІСНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ ТА ЇХ ПОЄДНАННЯ НА СТАН ВЕГЕТАТИВНОЇ РЕГУЛЯЦІЇ СЕРЦЕВОГО РИТМУ В ДИНАМІЦІ СТАРІННЯ ЩУРІВ

Вегетативна нервова система (ВНС) забезпечує зв'язок і координацію низки функцій організму, підтримує гомеостаз і відповідає за формування пристосувальних реакцій, спрямованих на підвищення його життєздатності в мінливих умовах існування. Важливою функцією ВНС є контроль вікових змін у ЦНС і ССС, функціональні порушення котрих стають провідним чинником старіння організму. Однак і сама ВНС є нестабільною структурою, яка трансформується в процесі розвитку [69, 108, 114] і старіння організму [282].

Під час старіння слабшають вегетативні впливи на міокард, насамперед парасимпатичні [48, 61], що призводить не тільки до погіршення загальної регуляції серцевого ритму, а й супроводжується зміщенням балансу симпато-парасимпатичних впливів у бік відносного переважання перших. Поряд зі зниженням функціональних можливостей ССС, гіршає кровопостачання серця, розвиваються аритмії [61].

Варіабельність серцевого ритму (ВСР) є надійним маркером оцінювання різних фізіологічних чинників, які модулюють нормальний ритм серця [48, 217, 223, 280]. Сучасні методи аналізу хвильової структури серцевого ритму дають змогу за даними ВСР кількісно оцінити вплив різних ланок нейрогуморальної регуляції на скоротливу здатність міокарда, а також опосередковано робити висновок про адаптаційні резерви організму [38, 48, 72, 98]. Спектральний аналіз ВСР широко застосовується для оцінювання функціонального стану ВНС, дає змогу визначити активність симпатичного й парасимпатичного відділів ВНС, а також гуморальної ланки регуляції [72, 98, 207, 223, 280].

У здоровому молодому організмі синоатріальний вузол, локалізований у задній стінці правого передсердя, ініціює кожне серцеве скорочення. У зв'язку з нестабільним мембранним потенціалом міоцитів, розташованих у цій зоні, потенціали дії генеруються періодично з постійною частотою. Ця порівняно постійна частота, яка виникає ауторитмічно із синусового вузла, модулюється багатьма чинниками, які додають мінливості сигналу серцевого ритму в різних частотних діапазонах: ультранизькочастотному (ULF), дуже низькочастотному (VLF), низькочастотному (LF) і високочастотному (HF). Ультранизькочастотний компонент спектра (довжина циклу для людини >5 годин) відображає вплив циркадного й нейроендокринного ритмів, дуже низькочастотний (довжина циклу для людини >25 сек), імовірно, перебуває під впливом терморегуляторних і гуморальних систем. Низькочастотний компонент (довжина циклу в людини >6 сек), чутливий до змін активності симпатичної й парасимпатичної нервової регуляції серця, високочастотний (довжина циклу в людини від 2,5 до 6 сек) синхронізований з актом дихання і є маркером парасимпатичних впливів на синусовий вузол. Під час короткострокового запису, тривалістю 2–5 хв, визначаються VLF-, LF-, HF-хвилі [32, 71–73], у той час як ULF-компонент можна оцінювати тільки в разі 24-годинного запису [13, 98, 223].

Аналіз щільності спектральної потужності забезпечує основну інформацію про те, як потужність розподіляється залежно від частоти [223]. У такий спосіб, спектральний аналіз ВСР дає змогу виявити періодичні складники в коливаннях серцевого ритму й оцінити їхній кількісний внесок у динаміку ритму. Тобто, отримуючи кількісні дані щодо спектральної потужності в тому чи іншому діапазоні, можна встановити, якої природи впливи переважають і наскільки. Так, значення спектральної потужності хвиль у VLF-діапазоні характеризують активність гуморально-метаболических впливів на міокард, а в LF- і HF-діапазоні відображають тонус симпатичного й парасимпатичного відділу ВНС, відповідно [13]. Сумарним показником активності нейрогуморальної регуляції ССС є загальна спектральна потужність (TP) [13, 98]. Зниження значень

загальної спектральної потужності свідчить про зменшення адаптаційних можливостей і низьку стійкість організму до стресу [13].

Як свідчать літературні дані [36], під час старіння організму істотно змінюється варіабельність кровообігу. Знижуються значення загальної спектральної потужності внаслідок зменшення тону симпатичного й парасимпатичного відділів ВНС. Падіння двох останніх компонентів має майже синхронний характер. Відомо, що в старих щурів основний внесок у структуру ТР роблять хвилі з діапазонів VLF і LF, у той час, як у статевозрілих провідна роль належить HF-хвилям [72]. Гуморально-метаболична система являє собою сукупність циркулюючих у крові і власних, тканинних гормонів [98]. Вона є найбільш повільною системою регуляції серцевого ритму, а це означає, що організм, у якого переважає активність саме цієї регуляторної ланки, не може забезпечувати швидку адаптивну відповідь, на відміну від особин із розвинутою швидкою вегетативною регуляцією. Однак треба зазначити, що надмірний тонус симпатичного відділу ВНС не є сприятливою основою для нормальної життєдіяльності організму. Доказом цього є той факт, що компенсаторна активація симпатoadреналової системи під час перевантаження серця щурів [103] є однією з патогенетичних ланок розвитку хронічної серцевої недостатності.

Раніше співробітниками відділу кріофізіології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України встановлено [8, 10], що РЕХВ (-120°C), як і інші різновиди екстремального охолодження [77], є неінвазивним і порівняно доступним фізіотерапевтичним методом лікування, котрий має стимулюючий вплив на літній організм, викликає кількісні і якісні зміни в структурі нейрогуморальних впливів на міокард.

Окрім того, накопичений на сьогодні досвід успішного застосування КК [230, 241, 300, 302] і її компонентів [261, 293, 299] при лікуванні патологій різного генезу дає змогу зробити припущення про перспективність використання кЯВК КК як ревіталізуючого засобу.

З погляду на вищезазначене, нами були вивчені особливості самостійного й поєднаного впливу ритмічного екстремального охолодження і кЯВК КК на стан вегетативної та гуморальної регуляції серцевого ритму в динаміці старіння щурів (із 6-місячного віку) і після їх одноразового застосування в старих тварин.

3.1 Вплив ритмічного екстремального охолодження на стан вегетативної регуляції серцевого ритму щурів

3.1.1 Вплив одноразового застосування циклу ритмічного екстремального охолодження на стан вегетативної регуляції серцевого ритму старих щурів

Встановлено (рис. 3.1), що в старих щурів на тлі одноразового застосування 9 сеансів РЕХВ значення ТР збільшувалося вже після 6-ї процедури охолодження. Зростає внесок гуморально-метаболических впливів на міокард, що на спектрограмі підтверджувалося збільшенням потужності дуже низькочастотних хвиль (VLF-компонент). Тонус симпатичного й парасимпатичного відділу ВНС у цей термін експериментальних досліджень майже не змінювався, однак невелике, але статистично значуще зниження симпатичної активності виявлялося після 3-го сеансу РЕХВ.

Найвище значення ТР (рис. 3.1) мала місце на наступну добу після 9-ї процедури охолодження (у 2,7 раза вище контрольного). Це було результатом активації вегетативних центрів (HF- і LF-компонент), причому тонус парасимпатичного відділу ВНС зберігався незмінним і через тиждень після останнього сеансу РЕХВ.

Через тиждень і місяць після охолодження (рис. 3.1) показники ТР знижувалися, порівнюючи з попереднім терміном спостережень, водночас значуще перевищуючи контрольні значення (у місячний термін — у 1,5 раза). У її структурі переважали гуморально-метаболическі впливи (порівнюючи з контролем збільшення VLF у 7 разів) на тлі зменшення тонусу ВНС.

Отже, експериментальні дані, отримані за спектрального аналізу ВСР у старих щурів на тлі одноразового застосування РЕХВ, свідчать про те, що пік активності регуляторних систем організму тварин відзначався після 9-ї процедури охолодження. За місяць спостерігалася тенденція до зменшення тону симпатичного й парасимпатичного відділу ВНС на тлі підвищеної активності гуморально-метаболическої ланки, характерною особливістю якого є здатність забезпечувати регуляцію серцевого ритму й адаптивно-компенсаторні реакції організму в старості.

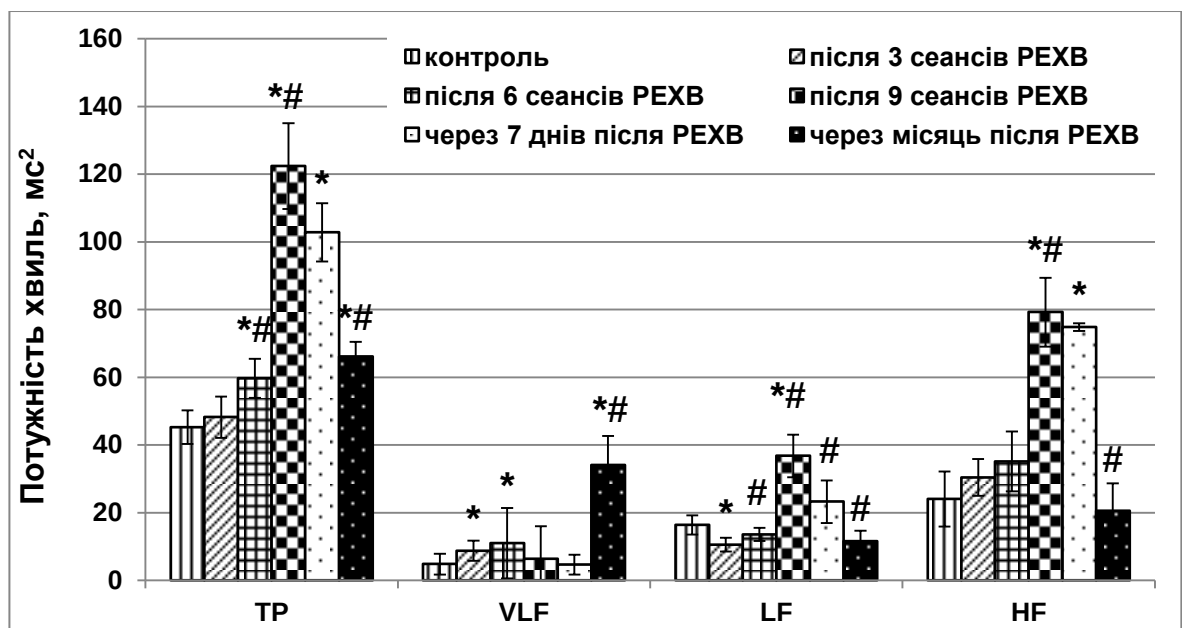


Рис. 3.1. Показники спектрального аналізу ВСР у старих щурів після одноразового застосування 9 сеансів РЕХВ

Примітка: * — статистично значущі відмінності від контрольних показників ($p < 0,05$); # — статистично значущі відмінності від показників попереднього терміну спостереження ($p < 0,05$).

3.1.2 Вплив повторних циклів ритмічного екстремального охолодження на стан вегетативної регуляції серцевого ритму в динаміці старіння щурів

Під час аналізу хвильової структури серцевого ритму у 6-місячних щурів (рис. 3.2) було виявлено значне підвищення показників загальної спектральної

потужності ВСР, проти контрольного, як після 3-го, 6-го, 9-го сеансу РЕХВ, так і у віддалені терміни спостереження (через тиждень і місяць після останньої процедури охолодження).

Найбільше збільшення загальної потужності спектра (у 4,9 раза) спостерігалось через тиждень і місяць після останнього сеансу РЕХВ. Істотно збільшувалась активність симпатичного й парасимпатичного відділу ВНС (у 5,3 і 5,1 раза) і меншою мірою гуморальної ланки регуляції (у 2,6 раза).

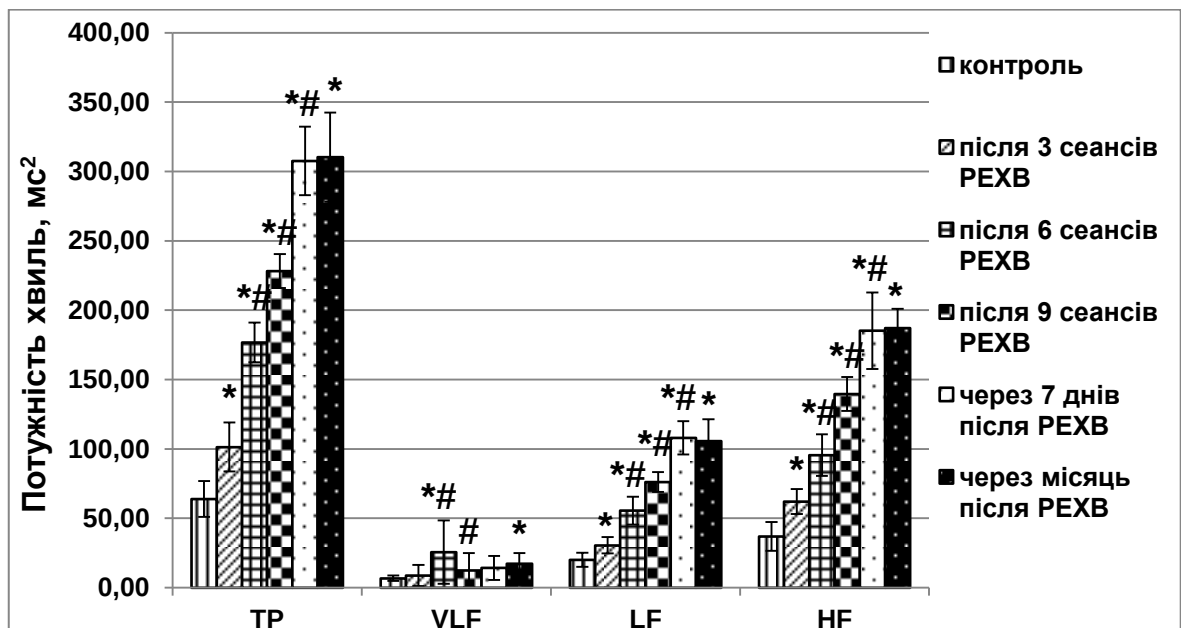


Рис. 3.2. Показники спектрального аналізу ВСР у 6-місячних щурів після 9 сеансів РЕХВ

Примітка: * — статистично значущі відмінності від контрольних показників ($p < 0,05$); # — статистично значущі відмінності від показників попереднього терміну спостереження ($p < 0,05$).

Схожа динаміка зміни основних показників спектрального аналізу ВСР нами була відзначена в групах 12- і 18-місячних тварин на тлі повторних циклів ритмічного екстремального охолодження (рис. 3.3, 3.4).

Найвищі значення TP реєструвалися через тиждень після 9 сеансів РЕХВ (підвищення проти контрольних у 5,7 і 6 разів, відповідно), водночас через місяць (на відміну від 6-місячних щурів) відбувалося статистично значуще

зниження її показників щодо попереднього терміну досліджень унаслідок зменшення тону парасимпатичного відділу ВНС (HF- компонент) у 12-місячних тварин, симпатичного й парасимпатичного (LF і HF- компонент) у 18-місячних. Причому активність гуморально-метаболічної ланки регуляції у 18-місячних щурів статистично значуще зростала тільки через місяць після проведення повного циклу РЕХВ, у той час, коли у 12-місячних тварин — вже після 6-ї процедури охолодження, і залишалася підвищеною у віддалені терміни.

Варто зазначити, що на тлі згаданих змін у місячний термін активність усіх ланок нейрогуморальної регуляції зберігалася підвищеною, порівнюючи з контрольними показниками (для 12-місячних щурів LF — у 5,5, HF — у 4,1 і VLF — у 4,5 раза, TP — 4,5 раза, для 18-місячних тварин — у 5, 4, 3 і 4,2 раза, відповідно).

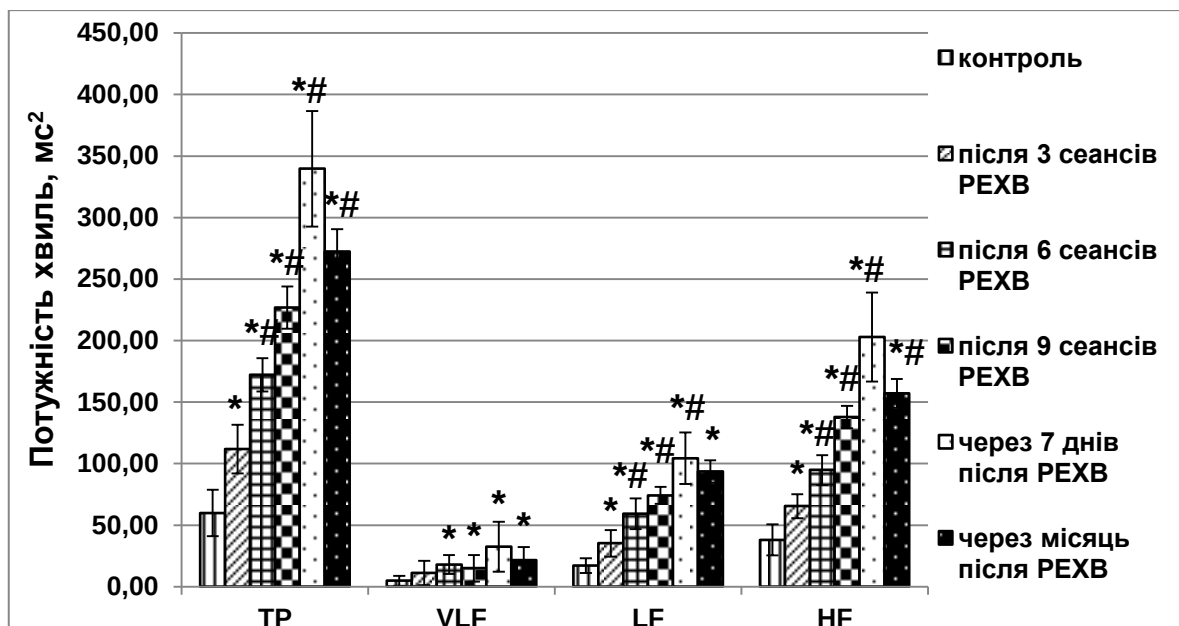


Рис. 3.3. Показники спектрального аналізу ВСР у 12-місячних щурів після 9 сеансів РЕХВ

Примітка: * — статистично значущі відмінності від контрольних показників ($p < 0,05$); # — статистично значущі відмінності від показників попереднього терміну спостереження ($p < 0,05$).

Отже, проведений аналіз експериментальних даних із вивчення впливу повторних сеансів РЕХВ на стан регуляторних систем організму 6-, 12- і 18-місячних тварин показав істотне підвищення загальної спектральної потужності проти контрольних показників. Сприятливим, на нашу думку, є той факт, що підйом ТР був результатом не стільки підвищення активності гуморально-метаболічної ланки регуляції, переважання якої типове для літнього віку, скільки завдяки збільшенню тону вегетативних центрів, причому парасимпатичні впливи на міокард превалювали над симпатичними.

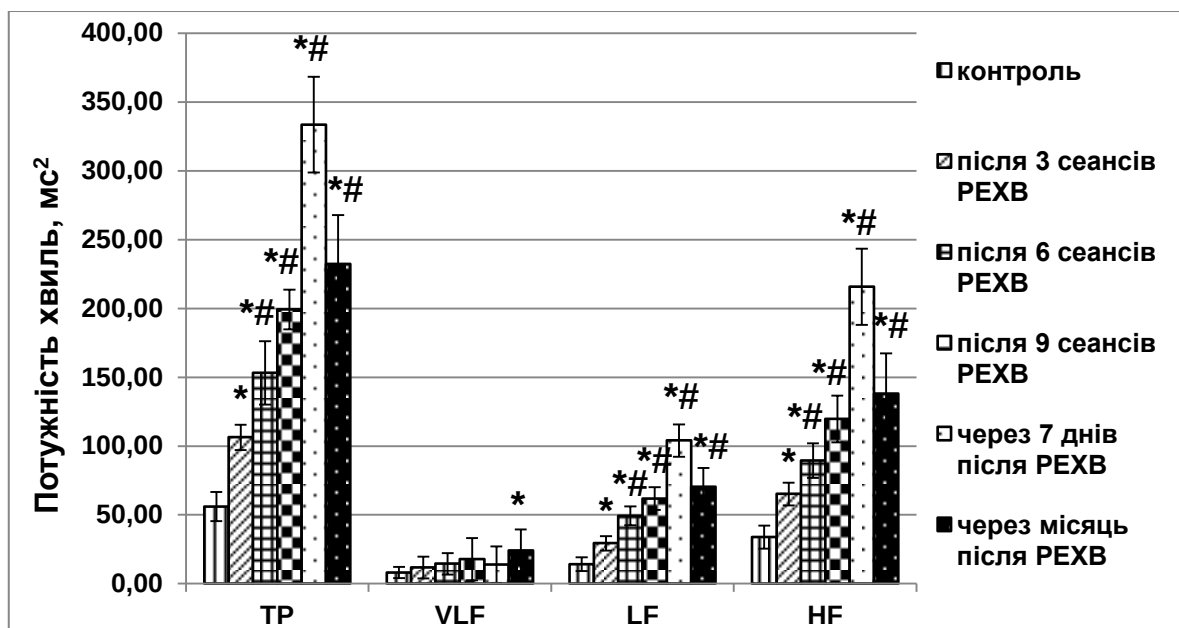


Рис. 3.4. Показники спектрального аналізу ВСР у 18-місячних щурів після 9 сеансів РЕХВ

Примітка: * — статистично значущі відмінності від контрольних показників ($p < 0,05$); # — статистично значущі відмінності від показників попереднього терміну спостереження ($p < 0,05$).

Можна припустити, що повторні цикли РЕХВ ($-120\text{ }^{\circ}\text{C}$) здатні підвищувати адаптаційно-компенсаторні можливості організму експериментальних тварин незалежно від їхнього віку завдяки збільшенню активності всіх регуляторних ланок, причому вказана динаміка зберігається у віддалені терміни спостережень. Після проведення одноразового циклу

екстремального охолодження старим щурам пік активності регуляторних систем спостерігався після 9-ї процедури охолодження, а через місяць на тлі підвищеної активності гуморально-метаболічної ланки регуляції, відбувалося зменшення тону симпатичного й парасимпатичного відділу ВНС, що може свідчити про лімітоване віком підвищення адаптаційного потенціалу.

3.2 Особливості стану вегетативної регуляції серцевого ритму щурів після введення кріоконсервованих ядромісних клітин кордової крові

3.2.1 Особливості стану вегетативної регуляції серцевого ритму старих щурів після одноразового введення кріоконсервованих ядромісних клітин кордової крові

Аналіз хвильової структури серцевого ритму у 24-місячних щурів на наступну добу й через 3 дні після одноразового введення кЯВК КК (рис. 3.5) показав поступове зростання загальної потужності спектра ВСР проти контрольної завдяки активації вегетативних центрів.

У віддалені терміни спостереження (рис. 3.5) зазначено більш істотне збільшення внеску в структуру спектра парасимпатичних і симпатичних впливів на міокард на тлі незмінної активності гуморально-метаболічної ланки регуляції (за місяць HF-компонент підвищувався у 2,7 раза, LF-компонент — у 1,9 раза, TP — у 2,3 раза).

Оскільки вікова інволюція структури і функції вегетативних центрів призводить до погіршення механізмів адаптації, що є однією з причин розвитку різного роду захворювань, відновлення і збільшення деяких параметрів варіабельності кровообігу на тлі одноразового введення кЯВК КК, є, на нашу думку, одним із найважливіших умов індивідуальної стійкості організму до дії несприятливих чинників.

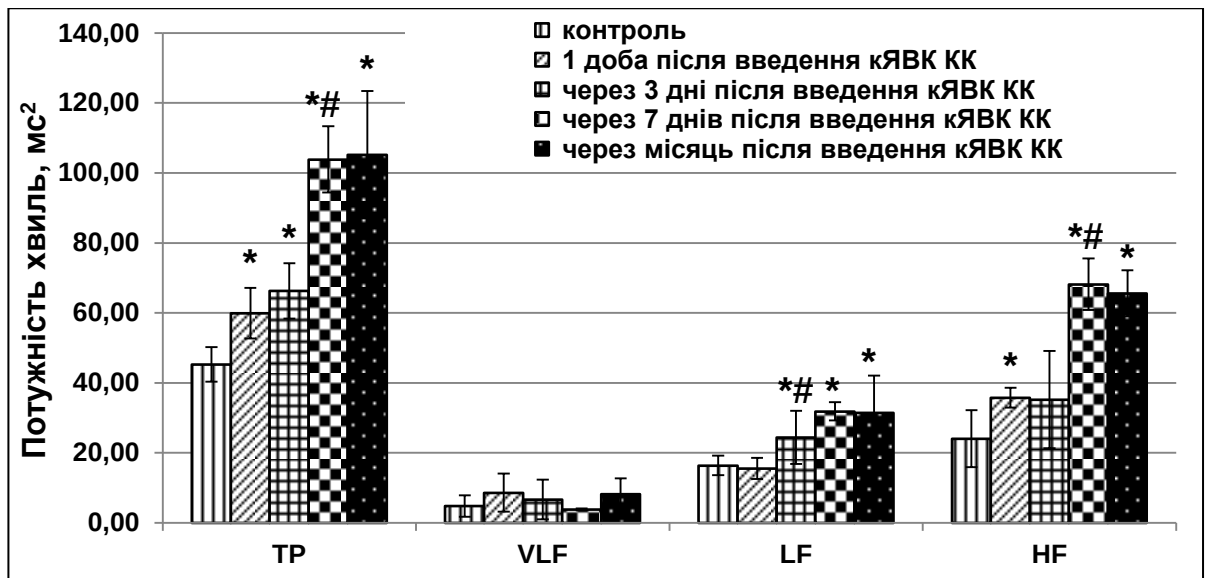


Рис. 3.5. Показники спектрального аналізу ВСР у старих щурів після одноразового введення кЯВК КК

Примітка: * — статистично значущі відмінності від контрольних показників ($p < 0,05$); # — статистично значущі відмінності від показників попереднього терміну спостереження ($p < 0,05$).

3.2.2 Особливості стану вегетативної регуляції серцевого ритму в динаміці старіння щурів після повторних введень кріоконсервованих ядромісних клітин кордової крові

Встановлено (рис. 3.6., 3.7), що в контрольних групах 6- і 12-місячних щурів, відзначався збалансований внесок усіх регуляторних ланок (симпатичної, парасимпатичної й гуморальної) у структуру ТР. Отримані дані узгоджуються з літературними [9, 10], що свідчить про наявність у молодому організмі розвиненої вегетативної регуляції серцевого ритму.

На наступну добу, через 3 дні та тиждень після введення експериментальним тваринам зазначених вікових груп кЯВК КК (рис. 3.6., 3.7) відбувалося поступове збільшення показників ТР проти контрольних, переважно завдяки підвищенню тону симпатичного й парасимпатичного відділу ВНС (LF- і HF-компонент). Активність гуморально-метаболічної ланки регуляції (VLF-компонент) у 6-місячних щурів у ці терміни спостережень

достовірно не змінювалася, у той час як у 12-місячних тварин зазначено збільшення VLF.

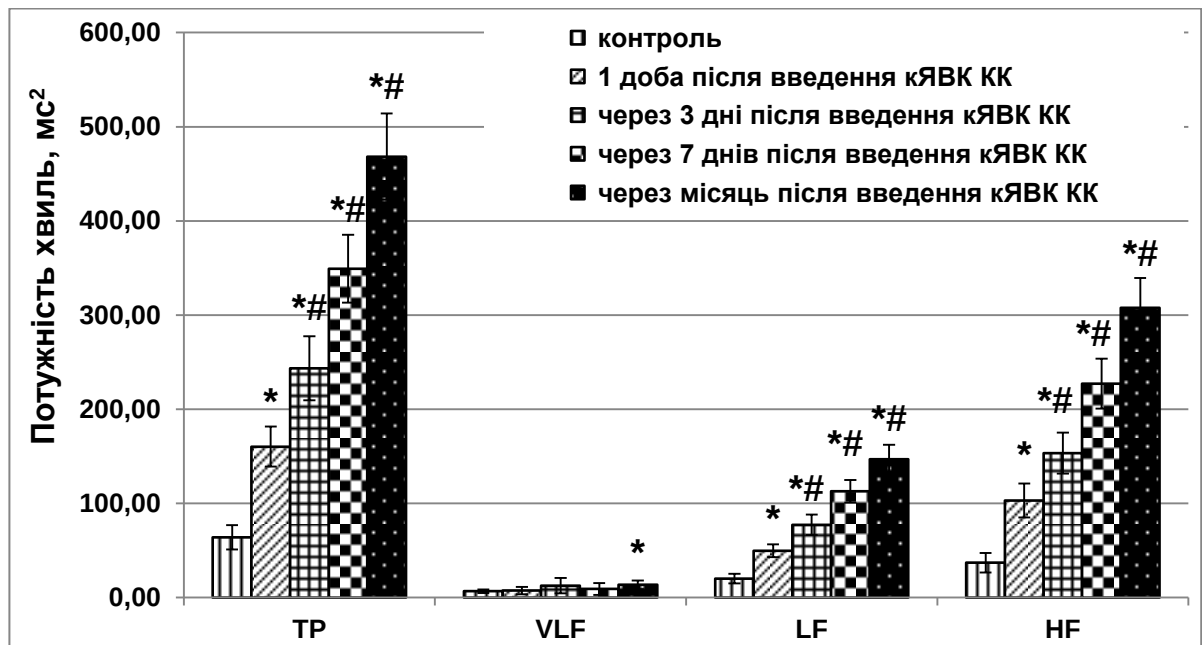


Рис. 3.6. Показники спектрального аналізу ВСР у 6-місячних щурів на тлі введення кЯВК КК

Примітка: * — статистично значущі відмінності від контрольних показників ($p < 0,05$); # — статистично значущі відмінності від показників попереднього терміну спостереження ($p < 0,05$).

Проведений нами спектральний аналіз ВСР, за результатами якого можна опосередковано судити про стан регуляторних систем, у 6- і 12-місячних щурів через місяць після введення кЯВК КК (рис. 3.6, 3.7), показав істотне підвищення значень TP, як проти попередніх етапів експериментальних досліджень, так і проти контрольних показників (у 7,3 і 7,9 раза, відповідно вікових груп). Її зростання було результатом активації ВНС і гуморальної ланки регуляції (збільшення LF у 7,3, HF у 8,3, VLF у 2 рази для 6-місячних і в 9,3; 7,4 і 6,9 раза для 12-місячних щурів).

Представлені результати динамічного дослідження ВСР у молодих тварин (у віці 6 і 12 місяців) дають змогу припустити, що введення їм кЯВК КК не тільки не виснажує адаптаційні резерви організму, а здатне значно підвищувати

їх, завдяки впливу на гомеостатичні регуляторні системи. Ці зміни, на нашу думку, є фізіологічно доцільними, оскільки можливі порушення регуляторних властивостей ВНС знижують стійкість організму до дії несприятливих чинників навколишнього середовища. У разі високої депресії вегетативної регуляції будь-яке значуще навантаження (фізичне, психоемоційне) виводить регуляторні системи в зону нестійкості, тобто за межі адаптаційних можливостей. За різкого зниження варіабельності кровообігу («вегетативній денервації»), гіршає якість регуляторних механізмів і, як наслідок, зростає ризик виникнення різного роду захворювань.

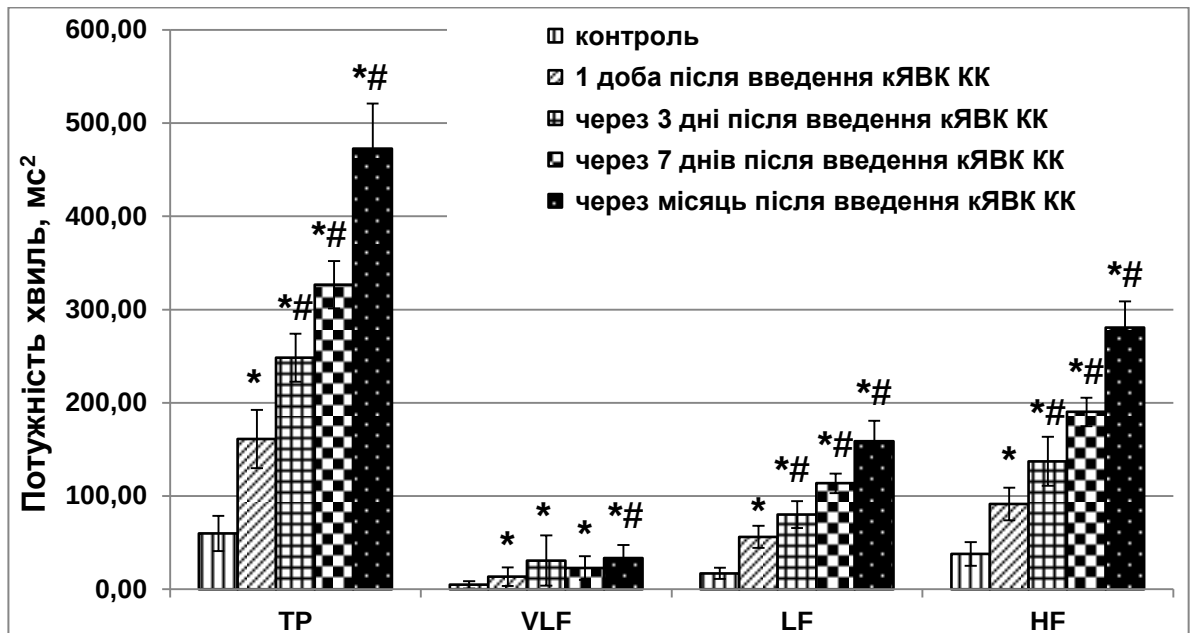


Рис. 3.7. Показники спектрального аналізу ВСР у 12-місячних щурів на тлі введення кЯВК КК

Примітка: * — статистично значущі відмінності від контрольних показників ($p < 0,05$); # — статистично значущі відмінності від показників попереднього терміну спостереження ($p < 0,05$).

У 18- і 24-місячних щурів контрольних груп (порівнюючи із 6- і 12-місячними) спостерігалися значні зміни структури спектра ВСР (рис. 3.8, 3.9, В.1).

Підвищувався рівень гуморально-метаболических впливів на міокард (на спектрограмі збільшувалася питома вага VLF-хвиль) на тлі зниження впливу ВНС. Водночас у 24-місячних тварин, на відміну від 18-місячних, відзначалося також зниження значень TP (рис. 3.9).

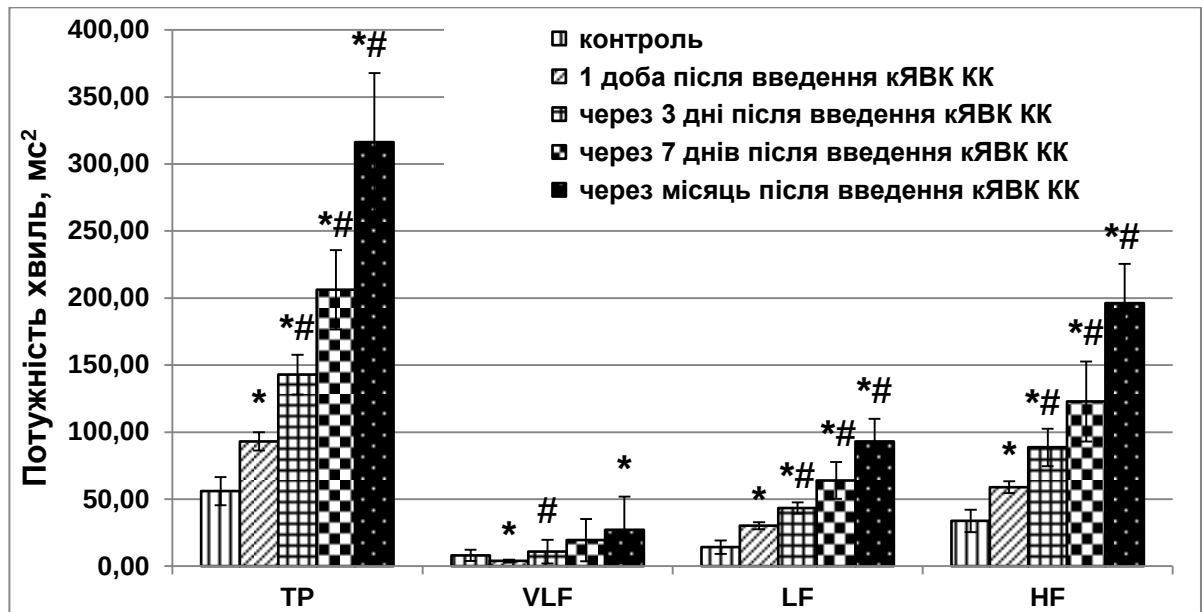


Рис. 3.8. Показники спектрального аналізу ВСР у 18-місячних щурів на тлі введення кЯВК КК

Примітка: * — статистично значущі відмінності від контрольних показників ($p < 0,05$); # — статистично значущі відмінності від показників попереднього терміну спостереження ($p < 0,05$).

Зазначені зрушення, імовірно, обумовлені переходом процесу управління серцевим ритмом зі швидкого вегетативного рівня на більш повільний, виборчий гуморально-метаболический, котрий, як відомо [8, 48, 61], характерний для старіючого організму. Варто також зазначити, що унаслідок ослаблення вегетативних впливів на ССС під час старіння, формується відносно переважання симпатикотонії [36], що, з огляду на вік, призводить до зниження функціональних резервів ССС, створює передумови для погіршення коронарного кровотоку і сприяє розвитку ішемії міокарда.

Введення кЯВК КК 18- та 24-місячним тваринам (рис. 3.8, 3.9) на всіх етапах експериментальних спостережень (на наступну добу, через 3 дні, тиждень і місяць) супроводжувалося поступовим зростанням показників ТР завдяки активації всіх досліджуваних регуляторних ланок організму. Найбільші її значення було зареєстровано у віддалені терміни (через місяць виявлено збільшення ТР у 5,7 раза і в 8,3 раза проти контрольних показників). Збільшення показників VLF-компонента (у 3,3 і 5,4 раза, відповідно) супроводжувалося істотним підвищенням тону симпатичного (у 6,6 і 10 разів, відповідно) і парасимпатичного (у 5,8 і 8,2 раза, відповідно) відділу ВНС, що свідчить про перехід процесу управління серцевого ритму з повільного гуморально-метаболічного рівня регуляції на швидкий вегетативний, який характерний для молодих тварин.

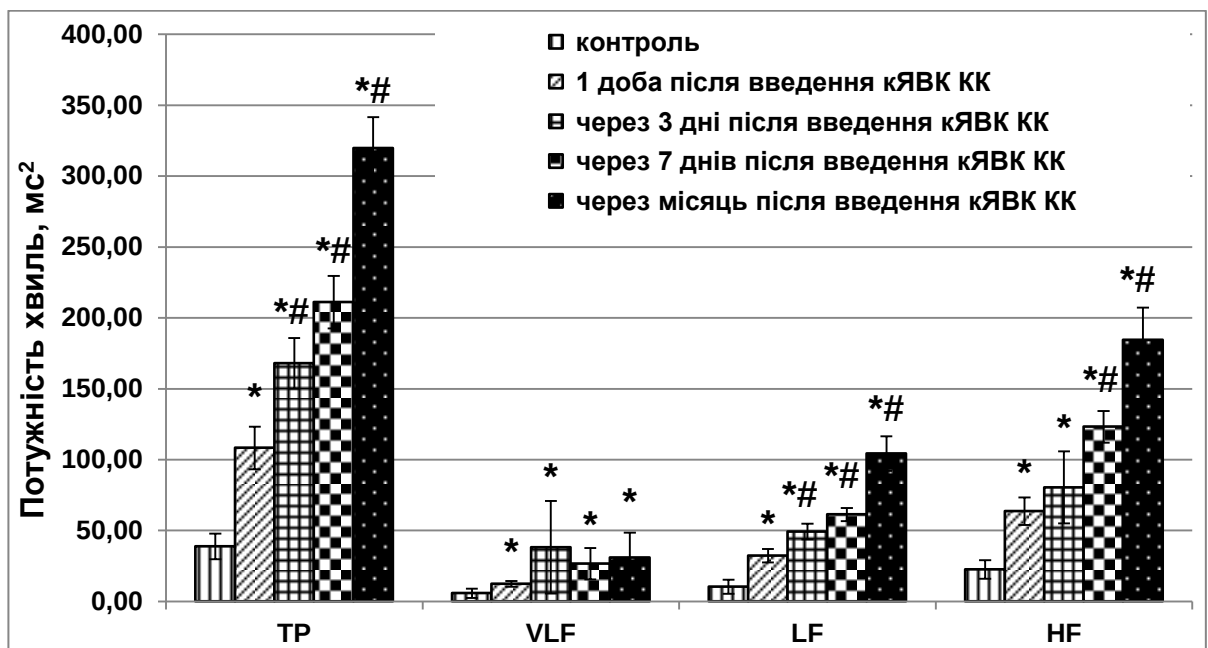


Рис. 3.9. Показники спектрального аналізу ВСР у 24-місячних щурів на тлі введення кЯВК КК

Примітка: * — статистично значущі відмінності від контрольних показників ($p < 0,05$); # — статистично значущі відмінності від показників попереднього терміну спостереження ($p < 0,05$).

Отже, повторне ведення кЯВК КК експериментальним 12-, 18- і 24-місячним тваринам сприяє активації як гуморально-метаболічного ланки регуляції, так і вегетативних центрів, які є найвищим рівнем організації автономної нервової системи, котра є найбільш розвиненим і швидким способом реалізації ефектів нейрогуморальної регуляції.

Відмінною особливістю є той факт, що у 24-місячних тварин, яким вводили кЯВК КК, починаючи з молодого віку, показник ТР перевищував аналогічний контрольний рівень у 8,3 раза, тоді як у старих щурів після одноразового введення зафіксовано його збільшення лише у 2,3 раза. Окрім того, у першому випадку спостерігалася активація не тільки ВНС, а й гуморально-метаболічного ланки регуляції (збільшення LF- компонента в 10, HF — у 8,2 і VLF — у 5,4 раза), у другому — тільки ВНС (збільшення LF- компонента в 1,9, HF — у 2,7 раза).

Оцінюючи експериментальні дані, отримані за спектрального аналізу ВСР, можна зробити висновок, що повторне введення кЯВК КК, навідміну від одноразового введенням старим тваринам, дає змогу досягти збалансованого внеску різних регуляторних ланок у динаміку серцевого ритму на етапах пізнього розвитку організму.

Отже, застосування кЯВК КК протягом життєвого циклу тварин (кожні 6 місяців, починаючи зі статевозрілого віку) дає змогу зберегти функціональний стан ВНС на більш «молодому» фізіологічному рівні, підвищити ефективність адаптаційного-компенсаторних механізмів у старості, збільшити індивідуальну стійкість організму до розвитку захворювань, супутніх старінню.

3.3 Динаміка змін основних показників спектрального аналізу варіабельності серцевого ритму щурів на тлі поєднаного застосування ритмічного екстремального охолодження і кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові

Як було зазначено раніше, попередні дослідження, проведені співробітниками Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, показали [8, 55, 92, 137], що основний механізм дії ритмічного екстремального охолодження на організм експериментальних тварин пов'язаний із підвищенням проникності ГЕБ для біологічно активних речовин (нейромедіаторів, катехоламінів, білків плазми, гормонів). Змінюючи проникність ГЕБ, РЕХВ стимулюють функціональну активність ВНС, а також її головний інтегратор — гіпоталамус. Встановлено [8], що пік проникності ГЕБ у молодих щурів спостерігається після 6-ї процедури охолодження, а в старих — після 9-ї.

Оскільки механізм дії КК пов'язано з наявністю в її складі біологічно активних речовин [52, 65, 124, 130] і їх секрецією стовбуровими клітинами [286] доцільним вважалось вивчити ефекти й механізми поєднаного впливу РЕХВ і кЯВК КК на функціональний стан регуляторних систем організму експериментальних тварин.

3.3.1 Динаміка змін основних показників спектрального аналізу варіабельності серцевого ритму старих щурів на тлі одноразового поєднаного застосування циклу ритмічного екстремального охолодження і кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові

Варто зазначити, що вже після 3 і 6 сеансів РЕХВ (рис. 3.10) у старих щурів відзначався підйом ТР завдяки активації вегетативного ланки регуляції: у першому випадку — парасимпатичного (HF- компонент), у другому — обох відділів ВНС (LF- і HF- компонент).

На наступну добу й через 3 дні після 9 сеансів РЕХВ і введення кЯВК КК, (рис. 3.10) було зареєструвано найвищі показники ТР, які в 5,5 раза перевищували контрольні значення. Це зростання було результатом підвищення тону вегетативних центрів.

У віддалені терміни спостереження (через тиждень і місяць після останньої процедури РЕХВ і введення кЯВК КК) значення загальної потужності спектра

ВСП знижувалися, порівнюючи з попереднім етапом досліджень, однак суттєво перевершували показники контролю (через місяць TP — у 2,6, VLF — у 1,7 ($p>0,05$), LF — у 2,3, HF — у 3 рази).

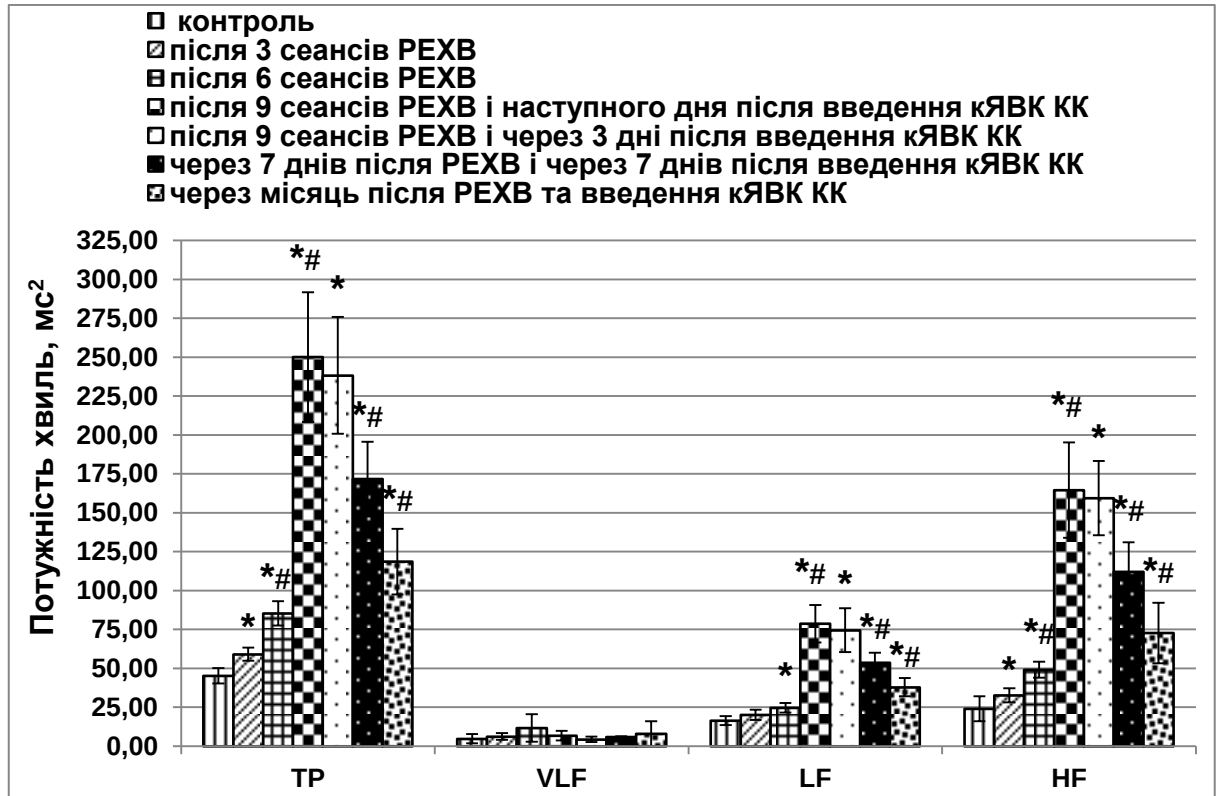


Рис. 3.10. Показники спектрального аналізу ВСП у старих щурів за одноразового поєднаного застосування РЕХВ і кЯВК КК

Примітка: * — статистично значущі відмінності від контрольних показників ($p<0,05$); # — статистично значущі відмінності від показників попереднього терміну спостереження ($p<0,05$).

Порівнюючи баланс регуляторних систем у контрольних і експериментальних тварин, а саме гуморальної, симпатичної й парасимпатичної ланки, можна чітко відстежити тенденцію до підвищення активності ВНС, причому парасимпатичні впливи домінували над симпатичними.

Оскільки переважання парасимпатичної ланки регуляції є характерною особливістю молодого організму й не властиво старіючому, можна припустити,

що одноразове поєднане застосування РЕХВ і кЯВК КК здатне короткочасно підвищувати функціональний стан регуляторних систем організму 24-місячних тварин.

3.3.2 Динаміка змін основних показників спектрального аналізу варіабельності серцевого ритму в процесі старіння щурів на тлі повторних поєднаних застосувань циклу ритмічного екстремального охолодження і кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові

Встановлено (рис. 3.11), що у 6-місячних щурів після поєданого застосування РЕХВ і кЯВК КК в усі терміни експериментальних досліджень показник ТР зростав проти контрольних значень переважно завдяки підвищенню тону симпатичного й парасимпатичного відділів ВНС (на спектрограмі відзначалося збільшення LF- і HF-компонента). У структурі ТР переважали впливи парасимпатичного відділу ВНС. Через місяць, порівнюючи з контрольними показниками, зафіксовано збільшення ТР у 7,5, VLF у 1,9, LF у 7,5, HF у 8,5 рази.

Активність гуморальної ланки значуще збільшувалася у віддалені терміни спостереження, що імовірно можна пояснити гормональними впливами на міокард, впливами ендокринних і гуморальних факторів на синусовий вузол, а також зв'язком хвиль цієї частоти з ритмами терморегуляції.

Позитивним моментом, на нашу думку, є той факт, що підйом спектральної потужності був результатом активації діяльності вегетативних центрів. Високий рівень вагальних, симпатичних впливів у модуляції серцевого ритму, свідчить про наявність у молодих щурів на тлі поєданого застосування РЕХВ і кЯВК КК розвиненої вегетативної регуляції.

У 12-місячних щурів після повторних 9 процедур РЕХВ і введення кЯВК КК уже після 3 сеансів РЕХВ значення ТР збільшувалося, порівнюючи з контрольним, завдяки активації симпатичного й парасимпатичного відділу ВНС (рис. 3.12). У цей термін спостережень активність гуморальної ланки регуляції достовірно не змінювалася. Можна припустити, що РЕХВ, які за своєю природою є «м'яким», нетривалим стресом, підвищують тонус вегетативних

центрів, котрі є найвищим рівень автономної нервової системи, а вона є найбільш розвиненим і швидким способом реалізації ефектів нейрогуморальної регуляції.

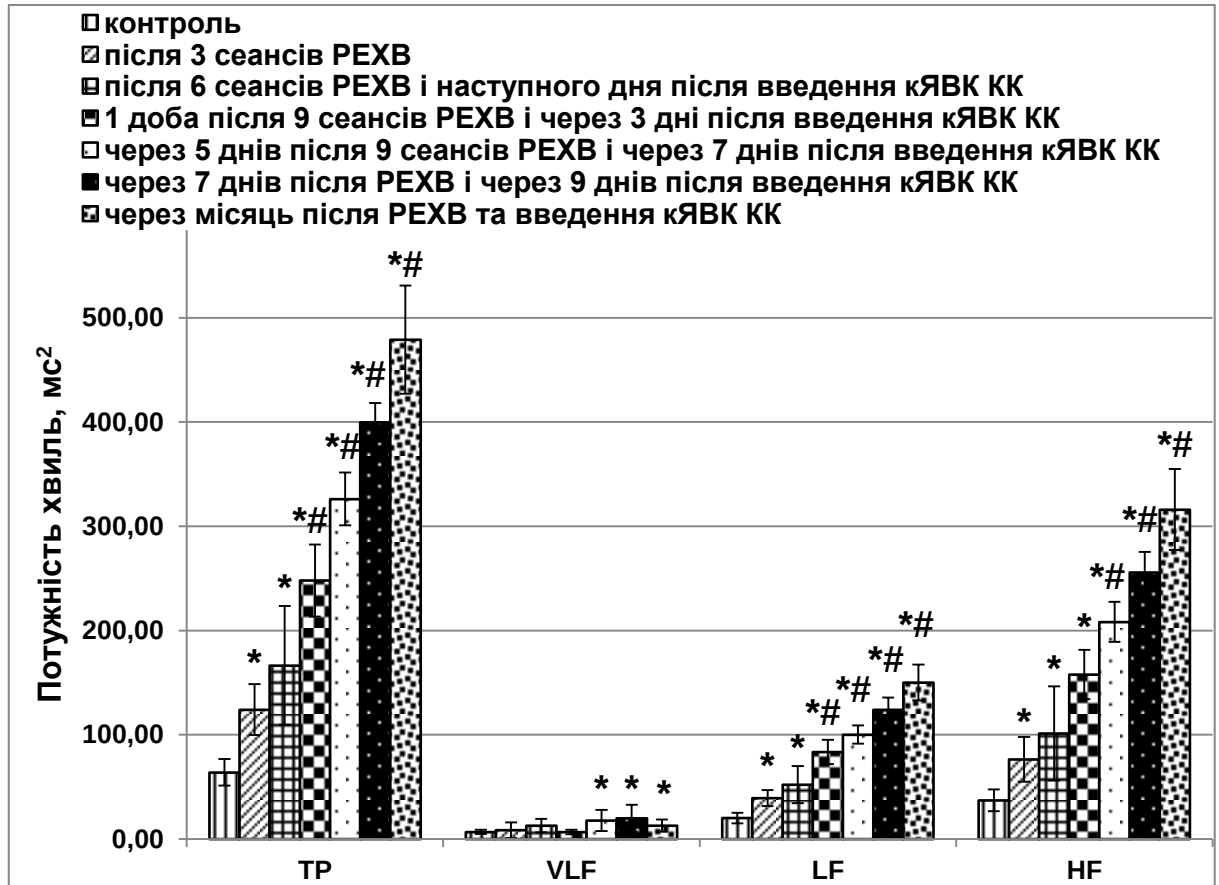


Рис. 3.11. Показники спектрального аналізу ВСР у 6-місячних щурів за поєданого застосування 9 сеансів РЕХВ і кЯВК КК

Примітка: * — статистично значущі відмінності від контрольних показників ($p < 0,05$); # — статистично значущі відмінності від показників попереднього терміну спостереження ($p < 0,05$).

Після 6 і 9 сеансів РЕХВ і відповідно на наступну добу й через 3 дні після введення кЯВК КК (рис. 3.12) поряд із підвищенням активності ВНС, відзначалося значуще збільшення гуморально-метаболических впливів на міокард.

Оскільки препарат кЯВК КК являє собою суспензію кЯВК КК, зокрема і стовбурових $CD34^+$ -клітин в аутоплазмі, яка містить у своєму складі велику

кількість біологічно активних речовин (гормонів, нейропептидів, цитокінів, амінокислот) [65, 124, 130], це пояснює можливий механізм підвищення функціональної активності гуморальної ланки регуляції в експериментальних тварин.

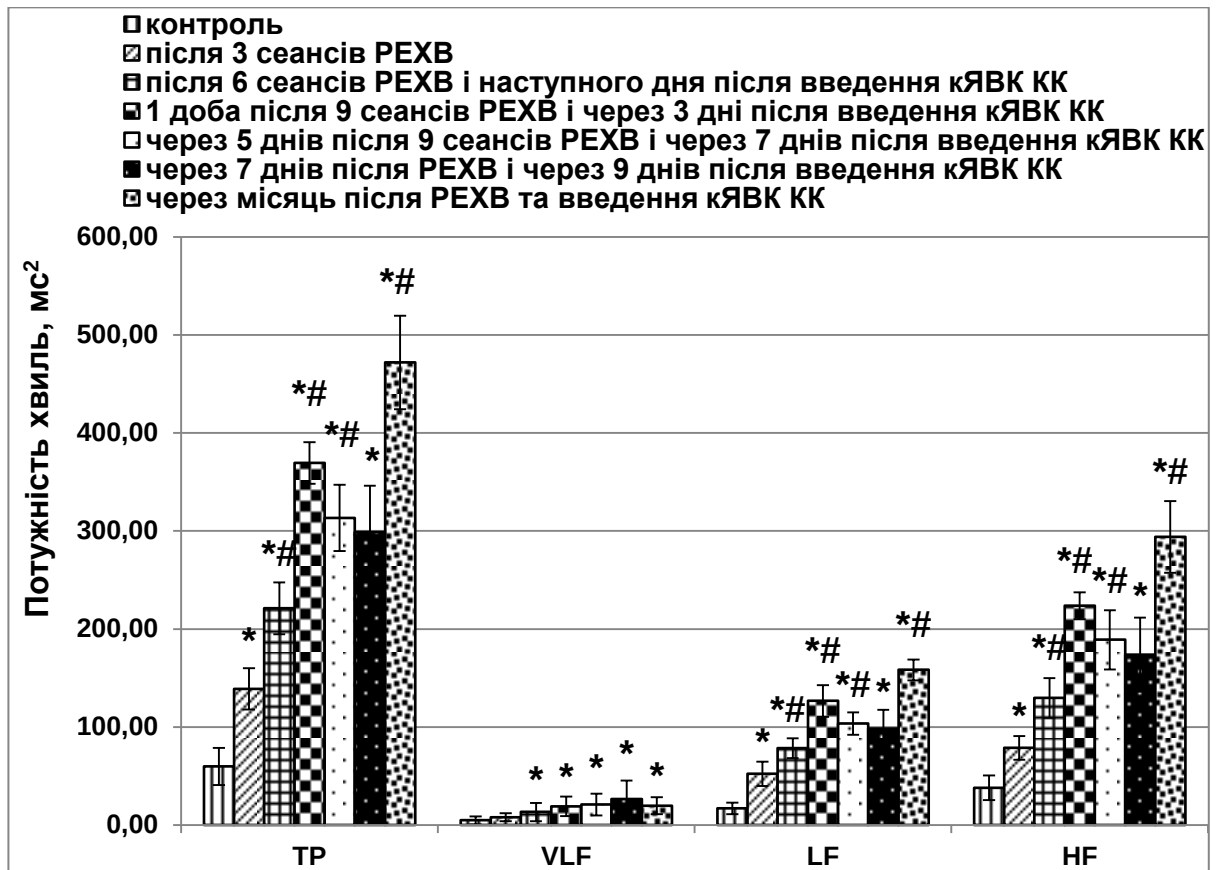


Рис. 3.12. Показники спектрального аналізу ВСР у 12-місячних щурів за поєднаного застосування 9 сеансів РЕХВ і КЯВК КК

Примітка: * — статистично значущі відмінності від контрольних показників ($p < 0,05$); # — статистично значущі відмінності від показників попереднього терміну спостереження ($p < 0,05$).

Через 5 і 7 днів після 9 сеансів РЕХВ (7 і 9 днів після введення КЯВК КК) значення ТР зменшувалися внаслідок зниження тону вегетативних центрів (рис. 3.12).

У віддалені терміни (через місяць після 9 сеансів РЕХВ і введення КЯВК КК) зазначалося статистично значуще збільшення показників ТР як

проти контрольних показників, так і проти показників попередніх етапів досліджень, завдяки збалансованому підвищенню функціональної активності всіх регуляторних ланок організму експериментальних тварин (показник TP збільшувався в 7,9 раза, VLF — у 4,1, LF — у 9,3, HF — у 7,7 раза).

Аналіз хвильової структури серцевого ритму у 18-місячних щурів (рис. 3.13) на тлі 9 процедур РЕХВ і введення кЯВК КК показав значне зростання TP проти контрольної, в усі терміни експерименту, завдяки підвищенню тону симпатичного й парасимпатичного відділу ВНС.

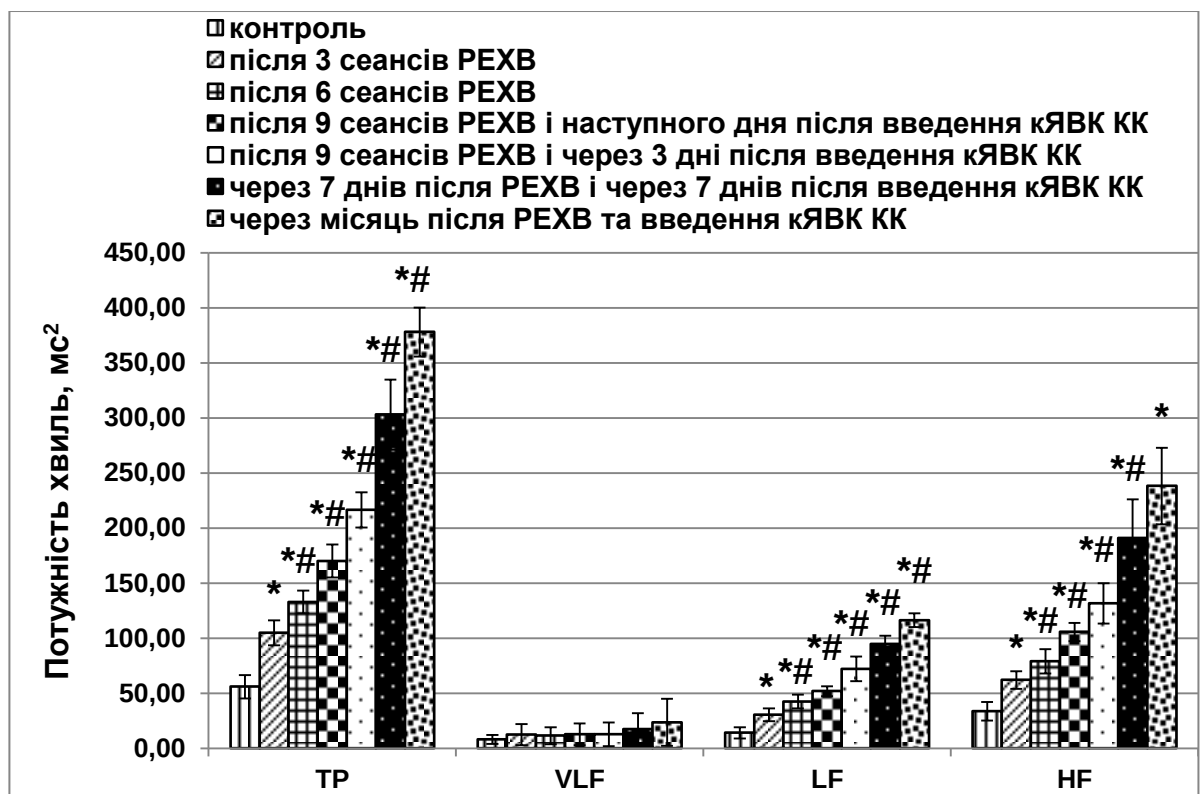


Рис. 3.13. Показники спектрального аналізу ВСР у 18-місячних щурів за поєднаного застосування 9 сеансів РЕХВ і кЯВК КК

Примітка: * — статистично значущі відмінності від контрольних показників ($p < 0,05$); # — статистично значущі відмінності від показників попереднього терміну спостереження ($p < 0,05$).

На спектрограмі реєструвалося збільшення LF- і HF-компонента. Активність гуморальної регуляції, водночас, достовірно не змінювалася. Через

місяць показник ТР підвищувався проти контрольного в 6,8 раза, VLF — у 2,9 ($p>0,05$), LF — у 8,2, HF — у 7,1.

У групі 24-місячних тварин після поєднаного застосування кЯВК КК і РЕХВ (рис. 3.14) спостерігалася аналогічна до попередньої вікової групи динаміка змін основних показників структурних компонентів спектральної потужності. Однак у 24-місячних щурів відзначалося збільшення активності ще й гуморального ланки регуляції. Через місяць ТР підвищувалась у 8,6, VLF — у 2,9, LF — у 10,6, HF — у 9,7 раза.

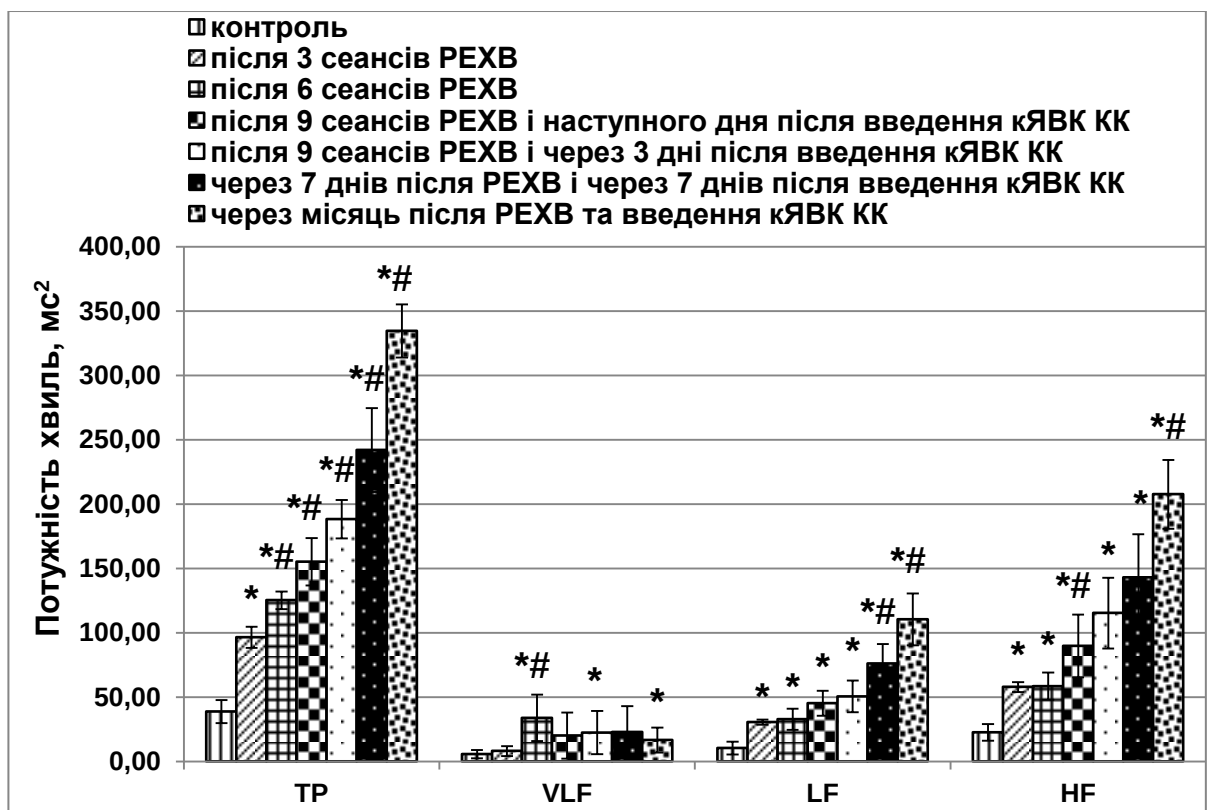


Рис. 3.14. Показники спектрального аналізу ВСР у 24-місячних щурів за поєднаного застосування 9 сеансів РЕХВ і кЯВК КК

Примітка: * — статистично значущі відмінності від контрольних показників ($p<0,05$); # — статистично значущі відмінності від показників попереднього терміну спостереження ($p<0,05$).

Отже, експериментальні дані, отримані під час дослідження ВСР у тварин на тлі поєднаного застосування РЕХВ і кЯВК КК, дають змогу припустити, що

комплексне використання цих впливів є потужним стимулюючим чинником, який здатний значно підвищувати адаптаційні можливості організму незалежно від віку. Підтверджують це дані спектрального аналізу ВСР, які свідчать про підйом загальної спектральної потужності не тільки завдяки активації однієї ланки регуляції, а завдяки збалансованому підвищенню тонуусу всіх регуляторних ланок.

Встановлено, що повторне поєднане застосування екстремального охолодження і кЯВК КК у динаміці старіння щурів має найбільш виражену позитивну дію на стан систем нейрогуморальної регуляції та здатне тривалий час зберігати «молоду» ритміку нейрогуморальних впливів на організм експериментальних тварин.

За матеріалами розділу 3 опубліковані роботи [20, 26, 27, 80, 81, 86, 88, 115–121, 127, 214, 238, 252].

РОЗДІЛ 4

ВПЛИВ РИТМІЧНОГО ЕКСТРЕМАЛЬНОГО ОХОЛОДЖЕННЯ (–120 °C), КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЯДРОВМІСНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ ТА ЇХ ПОЄДНАННЯ НА РІВЕНЬ ТИРЕОЇДНИХ І СТАТЕВИХ ГОРМОНІВ СИРОВАТКИ КРОВІ В ДИНАМІЦІ СТАРІННЯ ЩУРІВ

Нейроендокринна гормональна регуляція гомеостазу посідає важливе місце в складному ланцюгу процесів, котрі призводять до старіння клітин, тканин, органів і організму загалом.

Інволюційні зміни органів і тканин супроводжуються ослабленням їхніх функцій, що на клітинному рівні проявляється порушенням синтезу й секреції сигнальних молекул [104].

Ендокринна система регулює метаболізм, ріст і підтримання гомеостазу, і логічно припустити, що протидія різним механізмам старіння, також має бути підконтрольна гормональним сигнальним системам [152]. Однак і складна мережа гормональних взаємодій зазнає змін у процесі старіння [294].

Відомо, що старіння асоційоване з інволюційними змінами ендокринних залоз, які призводять до порушення гормонального балансу (рис. 4.1) [104, 294]. За останні два десятиліття були виявлені генні мутації, які призводять до затримки старіння і збільшення тривалості життя, багато з порушених генів виявилися компонентами ендокринних сигнальних шляхів [152].

З віком різко знижується синтез багатьох регуляторних пептидів і чутливість до них клітин-мішеней. Посилення під час старіння впливу окисного стресу (утворення вільних радикалів) і накопичення пошкоджених молекул (білків, нуклеїнових кислот і ліпідів) провокує множинну дисфункцію сигнальних шляхів [104].

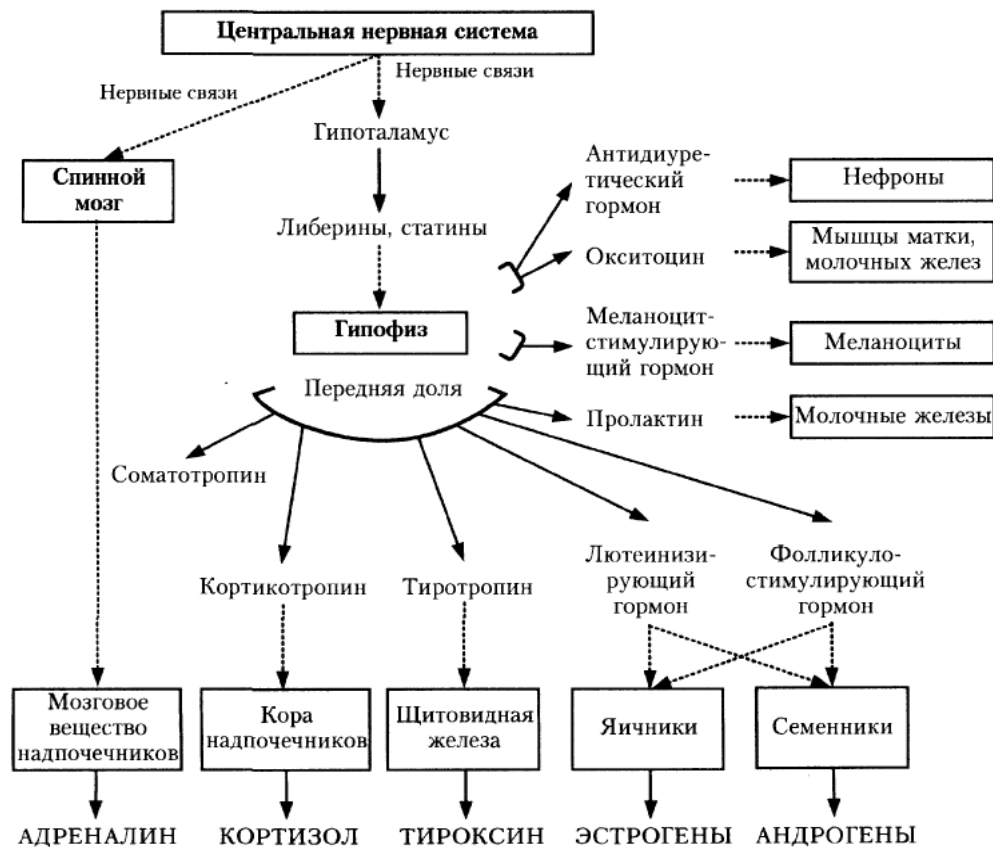


Рис. 4.1 Зв'язки ендокринної та нервової систем. Суцільними стрілками позначено синтез і секрецію гормону, пунктирними — вплив гормону на клітини-мішені [105]

Гормони щитоподібної залози (T_4 і T_3) необхідні для нормальної життєдіяльності організму. Вони надають анаболічну дію на білковий обмін, катаболічну — на жировий, опосередковано регулюють вуглеводний обмін, забезпечують енергетичні процеси, засвоєння кисню клітинами, впливають на водно-сольовий баланс, скоротливу здатність міокарда, частоту серцевих скорочень, тонус судин [21]. Будь-яка дисфункція щитоподібної залози, незалежно від віку, позначається на енергетичному тонусі всіх органів і систем, у тому числі й на діяльності ВНС. Зміна рівня тиреоїдних гормонів у сироватці крові тварин у динаміці їхнього старіння відображає особливості енергетичного та пластичного обміну на різних етапах онтогенезу [100, 126].

Статеві гормони (статеві стероїди) регулюють статеву диференціацію, формування вторинних статевих ознак і статеві моделі поведінки ссавців.

Ефекти статевих гормонів реалізуються як за допомогою повільного геномного механізму (завдяки ядерним рецепторам), так і через швидкий, негеномний механізм (завдяки рецепторам, які асоційовані з мембранами) [279].

Тс є основним чоловічим статевим гормоном і спільно з дигідротестостероном, андростендіолом і їхніми метаболітами визначає функціонування чоловічого організму, створюючи відповідний тонус ЦНС, підкіркових утворень, центрів автономної нервової системи. Він підтримує функціональну активність придаткових статевих залоз і забезпечує копулятивну функцію [21, 58, 104].

Зниження концентрації Тс з віком здебільшого зумовлене одночасним збільшенням вмісту Ес внаслідок підвищення швидкості перетворення Тс в Ес у периферійних органах, що призводить до зміщення андроген-естрогенного балансу в крові [151]. Завдяки тому, що Ес ефективно пригнічує, за механізмом зворотного негативного зв'язку, секрецію фолікулостимулюючого й лютеїнізуючого гормону, рівні гонадотропінів не досягають високих значень [104].

Одним із найбільш відомих і загальноприйнятих маркерів старіння вважається зниження вмісту дегідроепіандростерона (ДГЕА) й, особливо, дегідроепіандростерон-сульфату (ДГЕАС) [31, 59, 243]. В організмі людини ДГЕАС — циркулюючий у крові стероїдний гормон, рівень якого поступово знижується з віком [45, 150, 243, 251]. Його пікова концентрація спостерігається у віковій період від 20 до 30 років [48]. У медичних дослідженнях, проведених у літніх людей [31], відзначена позитивна кореляція між високим рівнем ДГЕАС і клінічними проявами «здорового старіння» (хороший фізичний, психічний стан і под.).

За даними дослідження щодо старіння чоловіків штату Массачусетс (Массачусетської медичної школи й Науково-дослідного інституту Нової Англії) [150] встановлено, що різниця вмісту гормонів ДГЕА, ДГЕАС між хворими та здоровими суб'єктами набагато нижче, ніж вікова різниця в одних і тих же суб'єктів. З огляду на це парадоксальне відкриття, вчені дійшли до

висновку, що в не обтяженому хронічними захворюваннями і шкідливими звичками організмі, відбувається акселерація в зниженні рівня андрогенів.

ДГЕА, котрий є наднирковим стероїдом, не має класичних властивостей гормонів, які притаманні андрогенам, естрогенам та іншим. ДГЕАС і ДГЕА не взаємодіють із рецепторами андрогенів (і будь-якими іншими відомими рецепторами), завдяки чому, на думку дослідників, вони діють через конверсію в естрогени або андрогени [59, 148]. У печінці й жировій тканині з ДГЕАС утворюється естрон. За інтракринної регуляції в клітинах тканин-мішеней на периферії ДГЕА трансформується в біологічно активні стероїди — тестостерон, дигідротестостерон і/або естрадіол, які виконують властиву їм функцію, не виходячи клітини й не потрапляючи в загальний кровотік [59].

Крім того, відомо [25, 59, 181, 266], що ДГЕА надає нейропротективний і стресспротективний вплив завдяки своїм антиглюкокортикоїдним властивостями — регуляції негативного впливу кортизолу на мозок.

У роботах останніх років [250], *in vitro* показано, що ДГЕАС на молекулярному рівні впливає на біосинтез стероїдних гормонів, підвищуючи синтез прегненолону, який є попередником мінералокортикоїдів, глюकोкортикоїдів, а також ДГЕА і його похідних — статевих гормонів.

Зважаючи на все вищезазначене, та те, що гормони щитоподібної залози, зокрема, беруть участь у регуляції додаткового, індукованого холодом термогенезу [100] та запуску механізмів адаптації [28, 184], особливий інтерес викликає з'ясування відображених у вмісті тиреоїдних та статевих гормонів у сироватці крові щурів гормональних перебудов, які відбуваються в організмі експериментальних тварин у динаміці їхнього старіння під впливом РЕХВ та кЯВК КК, оскільки застосування препаратів КК розглядають [23, 112] як перспективний фактор впливу на перебіг і наслідки ендокринних порушень організму загалом.

4.1 Динаміка змін вмісту тиреоїдних гормонів у сироватці крові щурів після самостійного та поєднаного застосування циклу ритмічного екстремального охолодження і кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові

Під час дослідження вмісту тиреоїдних гормонів у сироватці крові щурів контрольної групи в динаміці їхнього старіння було виявлено значуще зниження рівня T_4 у тварин 24-місячного віку в 1,5 раза проти 6-місячних щурів і 2 рази проти 12-і 18-місячних щурів (табл. 4.1). Така концентрація T_4 в старих щурів, на нашу думку, зумовлена зменшенням функціональної активності щитоподібної залози, що узгоджуються з літературними даними [21, 150] щодо зниження тиреоїдної функції з віком.

На тлі одноразового застосування 9 сеансів РЕХВ у старих тварин зазначено значуще підвищення (у 1,3 раза) рівня тиреоїдних гормонів (табл. 4.1). Таке збільшення вмісту T_4 і T_3 свідчить про підвищення і відновлення функціональної активності щитоподібної залози, нормальне функціонування монодейодинази — ферменту, який здійснює трансформацію неактивного T_4 в активний T_3 . Оскільки гормони щитоподібної залози підвищують споживання тканинами кисню [21], збільшення вмісту T_4 і T_3 має сприяти інтенсифікації обмінних процесів в організмі, активації основного обміну, поліпшенню фізичної активності і психічного стану.

У 6-і 12-місячних тварин після повторних процедур РЕХВ (табл. 4.1) концентрація тиреоїдних гормонів у сироватці крові значуще не змінювалася проти контрольних значень.

Для 18-місячних щурів (табл. 4.1) було характерним значуще зменшення рівня T_4 проти контрольного (в 1,4 раза) за майже ідентичного вмісту T_3 . Такі зміни свідчать про те, що в старіючому організмі РЕХВ впливають не на функціональний стан щитоподібної залози, а на збільшення концентрації активної форми тиреоїдного гормону (T_3). Ймовірно, підвищення активності

монодейодинази спрямовано на підтримання нормального рівня T_3 за зниженої концентрації T_4 в крові.

Таблиця 4.1

Вміст тиреоїдних гормонів у сироватці крові щурів на тлі ритмічного екстремального охолодження, введення кЯВК КК і за їх поєднаного застосування, $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$, нмоль/л

Показник	Вік тварин, кількість			
	6 місяців, n=24			
	Контроль	РЕХВ	кЯВК КК	РЕХВ+кЯВК КК
T_3	2,88±0,06	3,35±0,33	2,90±0,43	2,33±0,07*
T_4	62,40±3,90	54,70±4,97	67,42±4,20	81,78±7,08
	12 місяців, n=24			
T_3	2,43±0,51	3,20±0,40	3,45±0,17	3,20±0,23
T_4	81,53±3,61	85,28±6,29	82,33±4,69	79,28±5,70
	18 місяців, n=24			
T_3	3,05±0,28	3,05±0,54	3,78±0,22	2,88±0,14
T_4	82,85±0,90	60,32±2,46*	77,98±6,66	79,83±5,05
	24 місяці, n=17			
T_3	3,26±0,19	-	3,33±0,28	3,88±0,13*
T_4	41,10±2,73	-	52,23±4,00*	95,90±6,17*
	Старі (24 місяці, одноразове застосування), n=23			
T_3	3,34±0,27	4,40±0,32*	4,83±0,18*	3,17±0,18
T_4	53,30±0,84	66,73±2,88*	57,37±1,50*	72,17±1,96*

Примітка: * – статистично значущі відмінності від контрольної групи відповідного віку ($p \leq 0,05$).

Деякі автори [78] також пов'язують можливий механізм дії загальної кріотерапії зі збільшенням перетворення T_4 в T_3 , потреба в якому підвищується в екстремальних умовах.

Отже, можна припустити, що РЕХВ є перспективним фізіотерапевтичним методом, який здатний збільшувати концентрацію активної форми тиреоїдних гормонів (T_3) у старіючих і старих щурів, а також підвищувати функціональну активність щитоподібної залози в старих тварин (збільшення вмісту T_4).

Введення кЯВК КК сприяло підвищенню рівня сироваткового T_4 у старих тварин як після одноразового (в 1,07 раза), так і після повторного застосування (в 1,3 раза) (табл. 4.1). Вміст T_3 збільшувався лише в групі старих щурів після одноразового використання кЯВК КК (в 1,4 раза). Таку відмінність у зміні рівня T_3 можна пояснити сезонними коливаннями, що підтверджується літературними даними [100].

Повторне введення кЯВК КК 6-, 12- і 18-місячним тваринам статистично значуще не впливало на рівень тиреоїдних гормонів у сироватці крові.

Відсутність будь-яких змін у концентрації тиреоїдних гормонів свідчить про те, що використання кЯВК КК не спричиняє функціональних порушень щитоподібної залози в молодих щурів, проте покращує її функціональний стан у старих тварин, завдяки відновленню гормонсинтезуючої здатності.

Показано, що після поєднаного застосування РЕХВ і кЯВК КК рівень T_3 , порівнюючи з контрольним, змінювався у двох вікових групах: знижувався (в 1,2 раза) у 6-місячних тварин після першого циклу охолодження і введення кЯВК КК і підвищувався (в 1,2 раза) у 24-місячних щурів після повторного їх використання (табл. 4.1).

У групах експериментальних тварин 12- і 18-місячного віку істотних змін у вмісті тиреоїдних гормонів у сироватці крові на тлі проведення вищезазначених процедур не спостерігалось.

Окрім того, нами встановлено значне збільшення від контрольних показників концентрації T_4 у 24-місячних щурів як після одноразового, так і після повторних сеансів РЕХВ і введення кЯВК КК.

Варто зазначити, що збільшення (проти контрольної) концентрації T_4 було більш виражено кількісно у 24-місячних щурів на тлі повторного поєднаного застосування РЕХВ і кЯВК КК (у 2,3 раза), порівнюючи з тваринами аналогічного віку після одноразового використання охолодження і кЯВК КК (в 1,4 раза).

З погляду на те, що рівень тиреоїдних гормонів знижується під час старіння [126], зазначене підвищення вмісту T_4 , ймовірно, може бути одним із можливих механізмів позитивного впливу РЕХВ і кЯВК КК на старіючий організм.

Отже, можна зробити висновок, що самостійне й поєднане, одноразове й повторне застосування РЕХВ і кЯВК КК підвищує функціональну активність щитоподібної залози в старих тварин завдяки відновленню її гормонсинтезуючої здатності. Це підтверджується збільшенням проти контрольної концентрації T_4 в сироватці крові. Варто зауважити, що повторне поєднане використання зазначених процедур упродовж життєвого циклу тварин супроводжується у 24-місячних щурів більш істотним підвищенням рівня T_4 (у 2,3 раза), а також підвищенням (у 1,2 раза) і рівня T_3 (проти контрольних).

4.2 Динаміка змін вмісту статевих гормонів у сироватці крові щурів після самостійного та поєднаного застосування циклу ритмічного екстремального охолодження і кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові

Встановлено, що вміст T_c у сироватці крові контрольних 18-і 24-місячних щурів значуще зменшувався проти показників 6- (у 2 і 1,6 раза) й 12-місячних (у 2,2 і 1,7 раза, відповідно) щурів (табл. 4.2). На тлі зазначених вище змін знижувалося співвідношення тестостерон/естрадіол (T_c/E_c) в 1,9–2,4 рази (табл. 4.3).

Таблиця 4.2

Вміст статевих гормонів у сироватці крові щурів на тлі ритмічного екстремального охолодження, введення кЯВК КК та за їх поєднаного застосування, $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$, нмоль/л

Показник	Вік тварин, кількість			
	6 місяців, n=24			
	Контроль	РЕХВ	кЯВК КК	РЕХВ+кЯВК КК
Тс	13,90±0,84	7,80±0,50*	12,72±0,48	24,25±1,73*
Ес	0,20±0,00	0,30±0,00*	0,20±0,00	0,20±0,00
ДГЕАС	2,70±0,04	2,53±0,12	2,23±0,15	2,18±0,22
	12 місяців, n=24			
Тс	15,50±1,40	8,05±0,69*	13,63±0,87	11,10±0,43*
Ес	0,23±0,02	0,38±0,09	0,25±0,02	0,20±0,00
ДГЕАС	2,80±0,32	2,48±0,28	2,80±0,26	2,48±0,10
	18 місяців, n=24			
Тс	7,10±0,30	11,33±1,58*	23,93±1,17*	13,18±1,12*
Ес	0,25±0,02	0,20±0,00	0,25±0,02	0,20±0,00
ДГЕАС	2,60±0,10	2,45±0,10	4,28±0,52*	2,88±0,08
	24 місяці, n=17			
Тс	8,96±1,14	-	7,37±0,27	17,38±0,37*
Ес	0,26±0,02	-	0,37±0,11	0,23±0,02
ДГЕАС	3,10±0,07	-	2,60±0,24	3,18±0,39
	Старі (24 місяці, одноразове застосування), n=23			
Тс	2,34±0,20	2,23±0,20	6,03±1,17*	7,33±0,76*
Ес	0,30±0,00	0,30±0,04	0,43±0,15	0,90±0,04*
ДГЕАС	3,04±0,02	2,87±0,13	4,30±0,30*	3,40±0,21

Примітка: * — статистично значущі відмінності від контрольної групи відповідного віку ($p \leq 0,05$).

Таблиця 4.3

Співвідношення тестостерон/естрадіол у сироватці крові щурів на тлі ритмічного екстремального охолодження, введення кЯВК КК та за їх поєднаного застосування, $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$

Показник	Вік тварин, кількість			
	6 місяців, n=24			
	Контроль	РЕХВ	кЯВК КК	РЕХВ+кЯВК КК
Тс/Ес	69,50±4,18	26,00±1,68*	63,58±2,41	121,25±8,63*
	12 місяців, n=24			
Тс/Ес	71,14±10,79	26,19±5,23*	55,89±4,01	55,50±2,15
	18 місяців, n=24			
Тс/Ес	29,81±3,38	56,67±7,89*	99,44±9,56*	65,92±5,59*
	24 місяці, n=17			
Тс/Ес	35,73±5,42	-	27,25±5,04	76,78±5,15*
	Старі (24 місяці, одноразове застосування), n=23			
Тс/Ес	7,80±0,66	7,81±0,79	25,11±8,11	8,16±0,82

Примітка: * — статистично значущі відмінності від контрольної групи відповідного віку ($p \leq 0,05$).

Після 9 сеансів РЕХВ у 6- і 12-місячних тварин визначено зниження рівня Тс (у 1,8 і 1,9 раза, відповідно) і співвідношення Тс/Ес (у 2,7 раза в обох вікових групах) проти контрольними показників (табл. 4.2, 4.3), що, на нашу думку, пов'язано з помірним стресовим впливом низьких температур на систему гіпоталамус-гіпофіз-гонади. У 18-місячних щурів відбувалося підвищення як рівня Тс в 1,6 раза, так і співвідношення Тс/Ес у 1,9 раза. У групі старих тварин на тлі РЕХВ значущих змін концентрації Тс та співвідношення Тс/Ес не виявлено.

У разі одноразового введення кЯВК КК 24-місячним тваринам рівень Тс значуще підвищувався в 2,6 раза (а співвідношення Тс/Ес у 3,2 раза, $p > 0,05$).

Введення кЯВК КК молодим 6- і 12-місячним, а також старим 24-місячним щурам (в процесі старіння) не супроводжувалося значущими змінами вмісту статевих гормонів, а також їх співвідношення, у той час, як у 18-місячних тварин нами визначено збільшення рівня Тс в 3,4 рази, а співвідношення Тс/Ес у 3,3 раза.

Таке збільшення концентрації тестостерону і співвідношення Тс/Ес у 18-місячних щурів, як на тлі РЕХВ, так і після введення кЯВК КК, може бути зумовлено тим, що саме цей вік асоціюється з періодом перших старечих змін і функціональних перебудов систем регуляції. Тому підвищення адаптаційного потенціалу організму 18-місячних експериментальних тварин після РЕХВ і введення кЯВК КК, на нашу думку, не впливає на природне старіння організму, проте здатне запобігати розвитку вік-залежних патологій, у такий спосіб покращуючи якість життя. Водночас самостійне застосування цих процедур, не дає змогу досягти позитивного ефекту в старечому віці.

За одноразового поєднаного застосування старим тваринам РЕХВ і кЯВК КК, співвідношення Тс/Ес залишалося незмінним завдяки підвищенню в 3 рази рівня Тс й Ес.

Після поєднаного використання РЕХВ і кЯВК КК у динаміці старіння щурів збільшення вмісту Тс (у 1,4–3,1 раза) і співвідношення Тс/Ес (в 1,7–2,2 раза) спостерігалось у всіх вікових групах, за винятком 12-місячних тварин, у яких рівень Тс знижувався в 1,4 раза, а співвідношення Тс/Ес значуще не змінювалося. У 24-місячних щурів на тлі поєднаного застосування РЕХВ і кЯВК КК (на відміну від самостійного) концентрація Тс у сироватці крові підвищувалася в 1,9 раза, а співвідношення Тс/Ес у 2,1 раза.

Оскільки статеві гормони необхідні для нормального розвитку і функціонування організму [279], беруть участь у модуляції стресової реакції [201], а брак андрогенів супроводжується порушенням метаболізму ліпідів, розвитком атеросклерозу й підвищенням ризику розвитку серцево-судинних

захворювань, інсулінорезистентності та цукрового діабету 2-го типу [58, 279], збільшення вмісту Тс і співвідношення Тс/Ес у 18- і, особливо, 24-місячних щурів на тлі поєднаного використання РЕХВ і кЯВК КК упродовж життєвого циклу тварин підтверджує ефективність і доцільність поєднаного застосування зазначених процедур, починаючи з молодого віку.

Нами встановлено, що рівень ДГЕАС у сироватці крові 24-місячних щурів контрольної групи був вищим, ніж у 6- і 18-місячних тварин. Самостійне й поєднане застосування РЕХВ і кЯВК КК 6-, 12- і 24-місячним експериментальним тваринам у динаміці їхнього старіння не супроводжувалося зміною концентрації цього гормону. У 18-місячних щурів після повторного введення кЯВК КК відзначалося збільшення вмісту ДГЕАС в 1,6 раза проти контрольного. Аналогічна динаміка спостерігалася в групі старих щурів після одноразового застосування кЯВК КК — рівень ДГЕАС підвищувався в 1,4 раза. Треба зазначити, що в ці терміни рівень Тс був суттєво підвищеним, з погляду на це, збільшення концентрації ДГЕАС на тлі використання кЯВК КК може бути тісно пов'язане і викликати підвищення рівня Тс, оскільки ДГЕАС впливає на біосинтез або конверсію статевих гормонів.

Отримані експериментальні дані свідчать, про те, що вміст ДГЕАС у сироватці крові 6-, 12- і 24-місячних тварин не тільки не змінювався за ритмічного екстремальноого охолодження, введення кЯВК КК і їх поєднаного застосування, а й не знижувався в щурів контрольної групи в динаміці їхнього старіння.

Оцінюючи результати досліджень, необхідно згадати, що шляхи синтезу стероїдних гормонів у людини і гризунів істотно відрізняються [251]. У той час як ДГЕАС в організмі людини є найбільш чисельно вираженим циркулюючим стероїдним гормоном [59, 231, 243], рівень циркулюючого ДГЕА і ДГЕАС на периферії в щурів і мишей низький [147, 148, 172, 194]. Окрім того, відомо, що концентрація ДГЕАС і прегненолон-сульфату в мозку гризунів і людини висока [253, 268], однак ДГЕА, який міститься в мозку щурів, є продуктом тільки

локального синтезу, у той час як у людини це продукт локального й периферичного синтезу [251].

Також згідно з літературними даними [147], у щурів у гонадах немає ферменту, необхідного для синтезу С-19 стероїдів, відповідно статеві залози не можуть впливати на рівень ДГЕА (і андростендіолу).

Виходячи з отриманих нами даних та усього вищезазначеного, можна зробити висновок, що вміст ДГЕАС у сироватці крові щурів, на відміну від людини, не може слугувати адекватним маркером старіння організму, що доповнює дані [148] інших авторів щодо суттєвих відмінностей у динаміці секреції наднирковими залозами стероїдів з андрогенною активністю під час статевого дозрівання (у процесі адренархе) у різних ссавців.

Отже, проведений нами аналіз вмісту тиреоїдних гормонів у сироватці крові щурів показав, що в щурів контрольної групи найвищий рівень T_4 — у 12- і 18-місячному віці, водночас у 6-місячних щурів цей показник вище, ніж у 24-місячних. Встановлено зниження рівня T_c і співвідношення T_c/E_c у процесі старіння тварин у період між 12- і 18-місячним віком.

За одноразового використання 9 процедур РЕХВ у сироватці крові старих щурів відбувається збільшення вмісту тиреоїдних гормонів (в 1,3 раза проти контрольних показників). Повторне застосування РЕХВ у динаміці старіння супроводжувалося зниженням рівня T_c і співвідношення T_c/E_c у 6- і 12-місячних тварин і підвищенням цих показників у 18-місячних щурів. У 18-місячних тварин відбувалося зменшення вмісту T_4 (в 1,4 раза).

Одноразове введення кЯВК КК старим щурам призводило до підвищення рівня T_4 в 1,07 раза і T_3 у 1,4 раза, у той час як їх повторне застосування в динаміці старіння у 24-місячних тварин сприяло зростанню тільки рівня T_4 (у 1,3 раза). Окрім того, введення кЯВК КК супроводжувалося збільшенням концентрації T_c у старих 24-місячних тварин за одноразового застосування (у 2,6 раза) і у 18-місячних (у 3,4 раза) — за повторного, у останній групі значуще збільшувалося і співвідношення T_c/E_c (у 3,3 раза).

На тлі поєданого використання РЕХВ і кЯВК КК у динаміці старіння збільшення вмісту T_4 і T_c у 24-місячних щурів було більш виражено кількісно, порівнюючи з тваринами аналогічного віку всіх інших груп. Окрім цього, лише поєдане застосування цих впливів, починаючи із 6-місячного віку, сприяло значному підвищенню (у 2,1 раза) співвідношення T_c/E_c у 24-місячних щурів — відновленню цього показника до рівня 6- та 12-місячних тварин контрольної групи.

Наведені експериментальні дані щодо вмісту тиреоїдних і статевих гормонів у сироватці крові щурів узгоджуються й доповнюють результати, отримані за спектрального аналізу ВСР.

Отже, самостійне й поєдане з РЕХВ застосування кЯВК КК протягом життєвого циклу тварин не спричиняє гормональних порушень у молодому організмі, водночас більш ефективне, порівнюючи з одноразовим, у старечому віці. Ймовірно, поєдане використання зазначених процедур здатне значно підвищувати адаптаційно-регуляторний потенціал організму, сприяти реалізації гормонального ланки вітаукту.

За матеріалами розділу 4 опубліковано роботи [81, 89, 91, 214, 252].

РОЗДІЛ 5

ВМІСТ КІНЦЕВИХ ПРОДУКТІВ МЕТАБОЛІЗМУ ОКСИДУ АЗОТУ СИРОВАТКИ КРОВІ В ПРОЦЕСІ СТАРІННЯ ЩУРІВ ПІСЛЯ РИТМІЧНИХ ЕКСТРЕМАЛЬНИХ ХОЛОДОВИХ ВПЛИВІВ (–120 °C), ВВЕДЕННЯ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЯДРОВМІСНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ ТА ЇХ ПОЄДНАНОГО ЗАСТОСУВАННЯ

Оксид азоту (NO) є одним із найбільш важливих біологічних медіаторів і залучений у безліч фізіологічних і патофізіологічних процесів.

NO — дрібна ліпофільна молекула з високою реактивною здатністю, яка легко дифундує. В організмі NO синтезується клітинами з амінокислоти L-аргініну. Процес являє собою комплексну окисну реакцію, яка каталізується ферментом NO-синтазою (NOS) [95, 134, 227].

На сьогодні ідентифіковано три ізоформи NOS, які названі згідно з тим типом клітин, де вони були вперше виявлені: NOS-I — нейрональна (nNOS); NOS-II — індукбельна (iNOS), уперше ідентифікована в макрофагах і гепатоцитах під час індукування цитокінами; NOS-III — ендотеліальна (eNOS). eNOS синтезує NO у відповідь на ацетилхолін, nNOS — на глутамат, iNOS — у відповідь на цитокінову стимуляцію. Хоча всі ізоформи NOS каталізують утворення NO, кожна з них має свої особливості як у механізмах дії й локалізації, так і в біологічному значенні для організму [227].

NO характеризують як основну фізіологічно активну речовину ендотеліального походження [232], яка бере участь у реалізації важливих фізіологічних функцій, таких як вазодилатація, нейротрансмісія, зниження агрегації тромбоцитів, реакції імунної системи. Крім цього, NO має антиатеросклеротичну дію, пригнічує адгезію лейкоцитів, регулює тонус гладкої мускулатури [163].

Маючи широкий спектр біологічної дії, NO може проявляти як позитивний регуляторний вплив, так і негативний, який призводить до патологічних станів.

Стимулюючи апоптоз (проапоптоз) в одних клітинах, він є інгібітором цього процесу (антиапоптоз) в інших. Низькі або фізіологічні концентрації NO захищають клітини від апоптозу, а тривала надпродукція є проапоптичним модулятором. У цьому разі оксид азоту активує протеази сімейства каспаз через виділення мітохондріального цитохрому C у цитозоль, регулює експресію гена p53, а також змінює експресію апоптоз-асоційованих білків, зокрема сімейства Bcl-2 [95, 134].

Незважаючи на те, що радикал NO має прооксидантні властивості завдяки створенню пероксинітриту внаслідок реакції NO із супероксиданіоном, він також діє як антиоксидант і завершує ланцюгову реакцію перекисного окиснення ліпідів [242].

Така біфункціональність NO зумовлена різноманітною його взаємодією з іншими молекулами: металами, тіолами, тирозином і активними формами кисню [95, 134].

Вміст сумарних метаболітів NO в сироватці крові з віком знижується, що є ознакою розвитку ендотеліальної дисфункції. Змінюється експресія та/або активність ендотеліальної NO-синтази, підвищується активність індукцибельної NO-синтази, що, поряд зі збільшенням утворення активних форм кисню, спричиняє ослаблення ендотелій-залежних реакцій розширення судин [163, 229, 282].

Окрім того, під час старіння ендотеліальна дисфункція є одним із ключових ланок патогенезу хронічної серцевої недостатності [34].

Функціональна активність NO і характер його впливу виявляється в онтогенезі вже на ранніх стадіях розвитку щурів [135].

Зважаючи на вищевикладене, доцільним вважалось визначити рівень кінцевих метаболітів NO в процесі природного старіння щурів, після PEXB, введення кЯВК КК і їх поєднаного застосування.

Під час дослідження встановлено, що вміст сумарних метаболітів NO в сироватці крові щурів контрольної групи в динаміці їхнього старіння істотно знижувався з віком (рис. 5.1). У 24-місячному віці рівень нітритів зменшувався

в 3,1 раза проти показнику 6-місячних щурів, водночас статистично значущі відмінності спостерігалися і від 12- і 18-місячних щурів.

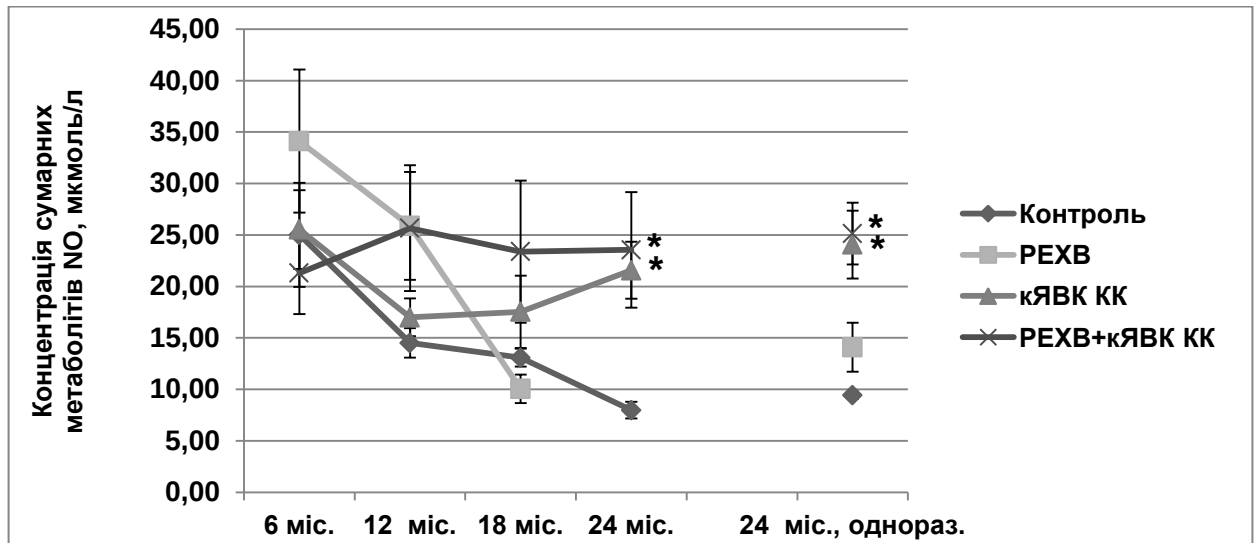


Рис. 5.1. Концентрація сумарних метаболітів NO у сироватці крові щурів на тлі РЕХВ, введення кЯВК КК та за їх поєднання

Примітка: * — статистично значущі відмінності від контрольної групи відповідного віку ($p < 0,05$).

Після одноразового й повторних застосувань циклу РЕХВ у динаміці старіння значущих змін у вмісті кінцевих продуктів обміну NO проти контрольних показників відповідного віку не було, однак відзначалася динаміка збільшення ($p > 0,05$) концентрації NO у 6-, 12- і 24-місячних тварин.

У старих щурів як після одноразового, так і повторного застосування кЯВК КК і їх поєднання з РЕХВ вміст кінцевих метаболітів NO у 2,5–3 рази перевищував контрольні показники аналогічного віку, що, можливо, пов'язано з активацією NO-синтаз і експресією їх генів. Після поєднаного використання РЕХВ і кЯВК КК у процесі старіння щурів рівень NO значуще не змінювався у 12-, 18- і 24-місячних тварин проти 6-місячних, хоча, порівнюючи з контролем відповідного віку, він значно підвищувався.

Тобто, у щурів на тлі поєднаного застосування РЕХВ і кЯВК КК, упродовж усього постпубертатного періоду життя зберігався високий рівень сумарних

метаболітів NO, який у 24-місячному віці був на рівні показників 6-місячних молодих тварин.

Отже, введення кЯВК КК, а також поєднане використання РЕХВ і кЯВК КК сприяє відновленню концентрації NO, стимулюючи впливає на його синтез тільки в разі дефіциту й не супроводжується надлишком цієї біфункціональної молекули, що дає змогу майже уникнути коливань концентрації NO з віком. Такі зміни, на нашу думку, є фізіологічно значущими, оскільки надлишкова продукція NO часто зумовлює розвиток деструктивних процесів в організмі [125].

За результатами розділу 5 опубліковано роботи [81, 236].

РОЗДІЛ 6

ОСОБЛИВОСТІ ГІСТОЛОГІЧНОГО СТАНУ МІОКАРДА В ДИНАМІЦІ СТАРІННЯ ЩУРІВ ПІСЛЯ РИТМІЧНИХ ЕКСТРЕМАЛЬНИХ ХОЛОДОВИХ ВПЛИВІВ (–120 °С), ВВЕДЕННЯ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЯДРОВІСНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ ТА ЗА ЇХ ПОЄДНАННЯ

Старіння асоційоване зі структурно-функціональними перебудовами всіх органів і систем. Оскільки захворювання ССС зберігають першість серед причин смерті людей похилого віку [169, 206], морфо-функціональну інволюцію серця можна розглядати як один із головних маркерів, що відображає процес старіння.

Вікове ремоделювання серця добре описано в літературі [123, 163, 282] і характеризується зміною як клітинного, так і стромального компонента міокарда під впливом різних ендогенних і екзогенних чинників, які призводять до структурно-функціональних перебудов серцевого м'яза. Цей процес охоплює всі відділи серця. Упродовж життєвого циклу зменшується кількість кардіоміоцитів, що компенсується їхньою гіпертрофією. Зниження сумарного обсягу кардіоміоцитів супроводжується зростанням обсягу сполучної тканини [123]. Вікове ремоделювання судинної стінки охоплює розширення люмінальної, потовщення медіальної оболонки й інтими, що проявляється збільшенням товщини й жорсткості судинної стінки, розширенням просвіту судини [163, 229, 282]. Характерною ознакою старіння міокарда є спустошення судин, накопичення колагену в інтерстиціальному просторі [123].

6.1 Структурна організація міокарда в динаміці старіння щурів

Під час гістологічного дослідження міокарда 6-місячних щурів контрольної групи нами було показало, що м'язові волокна мали порівняно

рівномірну товщину, розгалужувались і утворювали між собою анастомози, формуючи щільну мережу, характерну для серцевого м'яза (рис. 6.1, А).

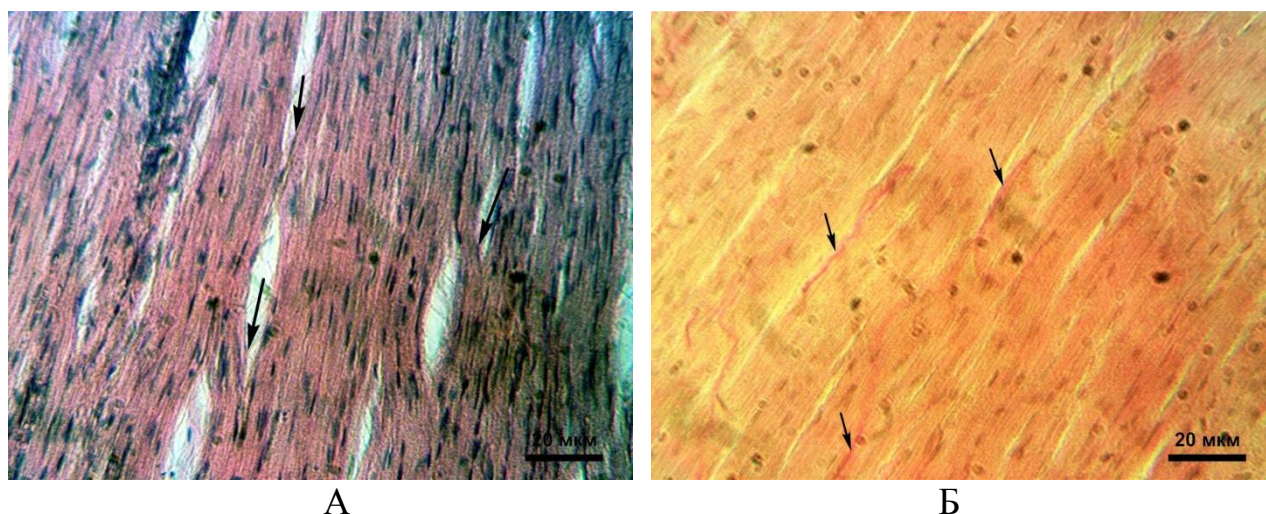


Рис. 6.1. Ділянки міокарда лівого шлуночка щурів контрольної групи 6-місячного віку: А — м'язові волокна рівномірної товщини з анастомозами (стрілки). Забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 300$; Б — м'язові волокна, оточені тонким шаром інтерстиціальної сполучної тканини (стрілки). Забарвлення пікрофуксином за методом Ван Гізона, $\times 300$

Простори між кардіоміоцитами були заповнені пухкою волокнистою сполучною тканиною (інтерстиціальна сполучна тканина), у якій вирізнялися дифузно розташовані фібробласти із щільним базофільним ядром веретеноподібної форми, а також численні капіляри. Вкрай рідко виявлялися інтерстиціальні набряки. Кардіоміоцити мали овальні або видовжені базофільні ядра, еозинофільна цитоплазма кардіоміоцитів фарбувалася рівномірно. На поздовжньо орієнтованих м'язових волокнах чітко розрізнялася поперечна смугастість кардіоміоцитів і вставні диски. Ендотелій судин був представлений сплюсненими ендотеліоцитами з витягнутими ядрами. Завдяки забарвленню пікрофуксином за методом Ван Гізона, в інтерстиціальній сполучній тканині міокарда були виявлені тонкі колагенові волокна рожевого кольору, розташовані уздовж м'язових волокон (рис. 6.1, Б). Навколо судин розташовувалися пучки колагенових волокон, орієнтовані концентрично.

Дослідивши морфометричні показники, ми встановили, що кількість капілярів становила (740 ± 90) на мм^2 , площа ядер кардіоміоцитів — $(16,2 \pm 5,8)$ мкм^2 , а їх кількість — (6900 ± 720) на мм^2 (табл. 6.1).

Під час гістологічного дослідження міокарда 12-місячних щурів контрольної групи виявили кардіоміоцити нерівномірної товщини з анастомозами. Їхні ядра були переважно великі, подовженої форми. Привертала увагу низька, порівнюючи з виявленою у 6-місячних щурів, щільність фібробластів у сполучній тканині. Вени й капіляри були здебільшого розширені й повнокровні. Крім того, траплялися помірно виражені перикапілярні й інтерстиціальні набряки (рис. 6.2).

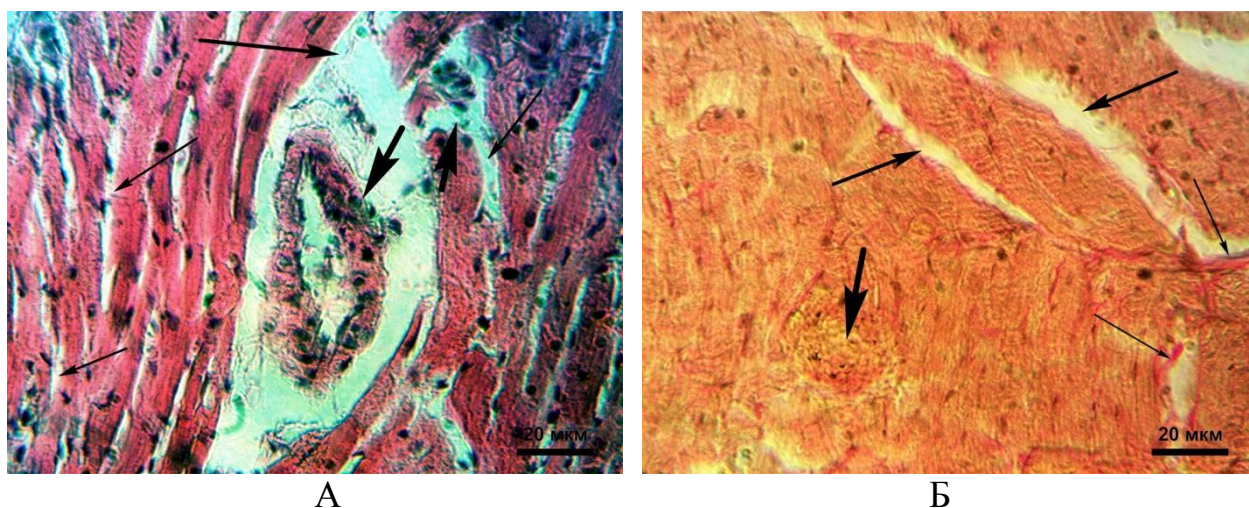


Рис. 6.2. Ділянки міокарда лівого шлуночка щурів контрольної групи 12-місячного віку: А — вени й капіляри розширені (товста стрілка), помірно виражені перикапілярні, периваскулярні (середня стрілка) та інтерстиціальні набряки (тонка стрілка). Забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 300$; Б — розширена й повнокровна судина (товста стрілка), інтерстиціальний набряк (середня стрілка), периваскулярний склероз (тонка стрілка). Забарвлення пікрофуксином за методом Ван Гісона, $\times 300$

Завдяки забарвленню за методом Ван Гісона у сполучній тканині міокарда на ділянках біля судин були виявлені великі пучки колагенових волокон, що свідчило про розвиток периваскулярного склерозу (рис. 6.2, Б).

Таблиця 6.1.

Морфометричні показники міокарда в динаміці старіння щурів, після РЕХВ, введення кЯВК КК та за їх поєднаного застосування

№ п/п	Група	Вік, місяців	Кількість ядер кардіоміоцитів на мм ² , $\bar{X} \pm SD$	Площа ядер кардіоміоцитів, мкм ² , $\bar{X} \pm SD$	Кількість капілярів на мм ² , $\bar{X} \pm SD$
1.	Контроль	6	6900±720	16,2±5,8	740±90
		12	7100±680	15,5±5,4	620±68 ¹
		18	7100±720	15,7±1,2	650±72
		24	6600±560	13,5±1,2 ¹	680±74
2.	РЕХВ	6	7100±770	15,8±1,1	720±68
		12	7200±820 ¹	15,5±1,4	900±88 ^{1 2 3}
		18	6300±780 ^{2 3}	12,4±1,8 ^{1 2 3}	800±78 ³
3.	кЯВК КК	6	8400±1200 ¹	20,2±4,2 ¹³	720±86
		12	8600±872 ¹	26,1±5,1 ¹²³	920±123 ¹²³
		18	7800±886	17,5±5 ²	810±83 ²³
		24	7200±863 ¹³	16,7±4,2 ³	760±70 ¹
4.	РЕХВ+ кЯВК КК	6	8100±720 ¹³	24,5±5 ¹³	860±120 ¹²³
		12	7400±710 ¹	18,5±2 ¹²³	670±108 ¹²
		18	6920±820	16,5±2 ²	750±102 ²
		24	7200±480 ¹³	15,5±5 ³	720±66

Примітка: ¹ – статистично значущі відмінності від контрольної групи щурів 6-місячного віку (p<0,05); ² – статистично значущі відмінності від попереднього терміну спостережень (p<0,05); ³ – статистично значущі відмінності від контрольної групи щурів відповідного віку (p<0,05).

Виявлені нами структурні порушення міокарда контрольних 12-місячних щурів були пов'язані з віковими змінами судинного русла: розширення й повнокров'я судин, потовщення стінки великих судин, помірний інтерстиціальний і більш виражений периваскулярний набряк. Окрім того, у

тварин цієї вікової групи (на відміну від 6-місячних щурів) скоротливі м'язові волокна міокарда характеризувалися більш вираженою гіпертрофією, розростанням інтерстиціальної й периваскулярної сполучної тканини, низькою щільністю клітин фібробластичного ряду, присутніх у ній.

За результатами морфометричних досліджень показано, що кількість капілярів знижувалася до (620 ± 68) на мм^2 , площа ядер кардіоміоцитів незначуще зменшувалася до $(15,5 \pm 1,4)$ мкм^2 , а їх кількість збільшувалася до (7100 ± 680) (табл. 6.1).

У міокарді 18-місячних тварин контрольної групи під час гістологічного дослідження були виявлені ділянки з тонкими м'язовими волокнами, які мали звивисту форму (рис. 6.3, А).

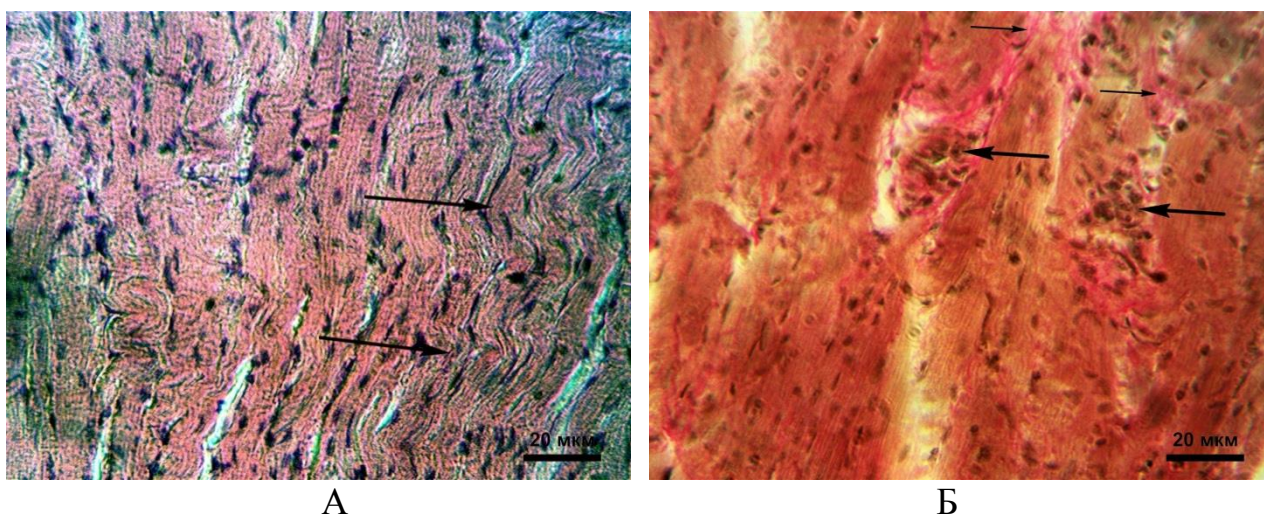


Рис. 6.3. Ділянки міокарда лівого шлуночка щурів контрольної групи 18-місячного віку: А — стоншені м'язові волокна звивистої форми (стрілки), поліморфізм кардіоміоцитів і їхніх ядер. Забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 300$; Б — інтерстиціальний і периваскулярний кардіосклероз (тонка стрілка), гістіоцитарно-макрофагальна реакція (середня стрілка). Забарвлення пікрофуксином за методом Ван Гізона, $\times 300$

Подекуди поперечна смугастість м'язових волокон не виявлялась. Спостерігався поліморфізм кардіоміоцитів і їхніх ядер. У міокарді було

виявлено інтерстиціальний і периваскулярний кардіосклероз, а також гістіоцитарно-макрофагальну реакцію (рис. 6.3, Б).

Проаналізувавши морфометричні дані, ми виявили, що кількість і площа ядер кардіоміоцитів, порівнюючи з 12-місячними тваринами, не змінювалася. Кількість капілярів також істотно не відрізнялася від аналогічного показника попередньої вікової групи і становила (650 ± 72) на мм^2 (табл. 6.1).

За гістологічного дослідження міокарда 24-місячних щурів контрольної групи було виявлено більш вираженні, порівнюючи з попереднім терміном, вікові перебудови (рис. 6.4). Капіляри були розширені й переповнені еритроцитами. Виявлялися вогнища периваскулярного та інтерстиціального набряку, поодинокі лімфо- гістіоцитарні інфільтрати. Навколо деяких судин, на невеликих ділянках міокарда в інтерстиції спостерігалася підвищена щільність фіброblastів із великим еухромним ядром (рис. 6.4, А).

Усі великі судини були повнокровні, мали змінену форму просвіту, нерівномірно потовщені стінки, звивисті контури внутрішньої еластичної мембрани. Навколо судин виявлялися периваскулярний набряк і кардіосклероз (рис. 6.4, Б).

Проаналізувавши морфометричні показники, ми встановили, що кількість капілярів у міокарді 24-місячних щурів майже не відрізнялася від 12- і 18-місячних тварин, проте була дещо нижчою від показника 6-місячних ($p > 0,05$) і становила (680 ± 74) на мм^2 . Нами зазначено значуще зменшення площі ядер кардіоміоцитів проти тварин 6-місячного віку до $(13,5 \pm 1,2)$ мкм^2 . Зниження їх кількості до (6600 ± 560) на мм^2 не було статистично значущим (табл. 6.1).

Отже, з огляду на отримані дані, можна узагальнити, що вікові зміни структури міокарда щурів пов'язані зі збільшенням відносного обсягу сполучної тканини, порушенням кровообігу, зменшенням кількості й розмірів ядер кардіоміоцитів, кількості капілярів, дифузними склеротичними процесами. Перші морфологічні ознаки, які свідчать про вікові зміни судинного русла, виявляються у 12-місячних тварин. Зменшення кількості та розмірів ядер кардіоміоцитів у динаміці старіння зумовлене адаптаційно-компенсаторною

перебудовою міокарда, спрямованою на підтримання і збереження його функції у відповідь на кардіосклеротичні процеси й погіршення трофіки міокарда. Зазначені зміни відповідають описаним у літературі [163, 229, 282]. Зрив компенсаторних можливостей міокарда в щурів відбувався до 24-місячного віку.

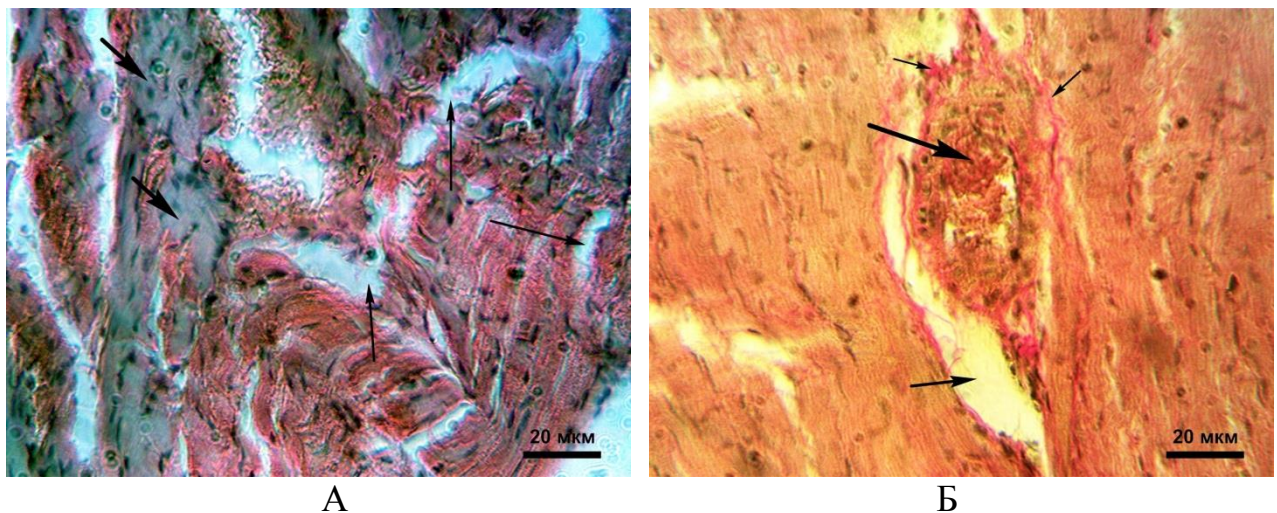


Рис. 6.4. Ділянки міокарда лівого шлуночка щурів контрольної групи 24-місячного віку: А — інтерстиціальний набряк (тонкі стрілки), підвищена щільність фіброblastів (фіброз) в інтерстиції (товсті стрілки). Забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 300$; Б — периваскулярний набряк (стрілка середньої товщини), повнокров'я судин (товста стрілка), кардіосклероз (тонка стрілка). Забарвлення пікрофуксином за методом Ван Гізона, $\times 300$

6.2 Структурна організація міокарда щурів після ритмічного екстремального охолодження

Через місяць після 9 сеансів РЕХВ кардіоміоцити 6-місячних щурів являли собою витягнуті клітини з типовою поперечною смугастістю і великими базофільними ядрами округлої форми. Між ними розташовувалися фіброblastи з ядрами веретеноподібної форми, а також капіляри, у просвіті яких було видно еритроцити. Між пучками кардіоміоцитів траплялися розриви (набряк), заповнені міжтканинною рідиною (рис. 6.5, А). Виконавши забарвлення

гістологічних препаратів за методом Ван Гізона, ми виявили ділянки зі слабовираженим кардіосклерозом (рис. 6.5, Б).

Морфометричні показники (кількість капілярів, кількість і площа ядер кардіоміоцитів) тварин цієї експериментальної групи відповідали значенням контрольної групи 6-місячних щурів (табл. 6.1).

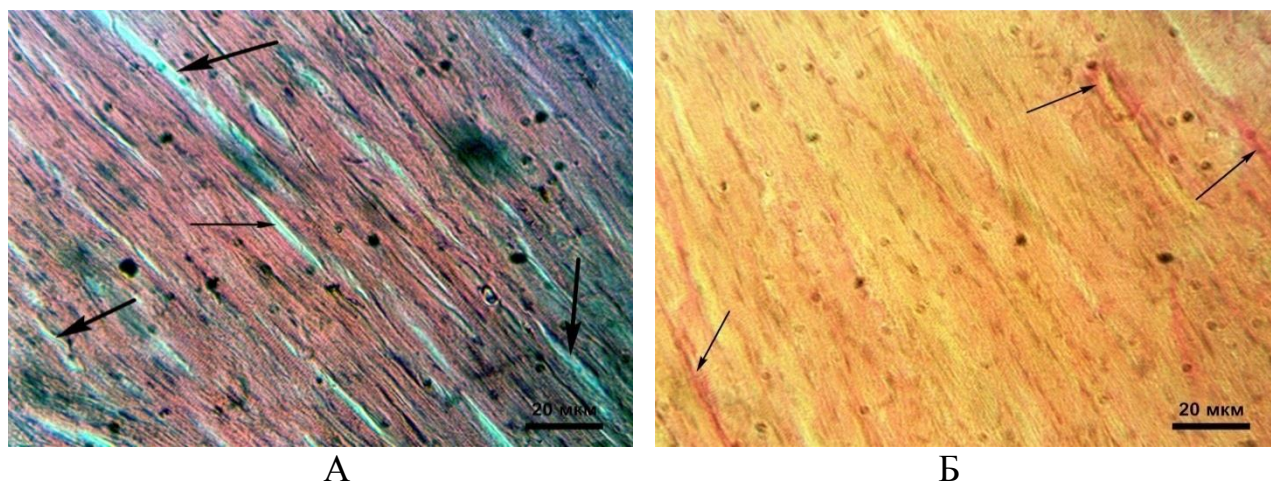


Рис. 6.5. Ділянки міокарда лівого шлуночка щурів 6-місячного віку через місяць після 9 сеансів РЕХВ: А — типові кардіоміоцити з базофільними ядрами, слабкий інтерстиціальний набряк (тонка стрілка), капіляри заповнені еритроцитами (середня стрілка). Забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 300$; Б — слабовиражений кардіосклероз (стрілки). Забарвлення пікрофуксином за методом Ван Гізона, $\times 300$

У 12-місячних щурів через місяць після повторного циклу РЕХВ навколо великих судин міокарда був виражений набряк і кардіосклероз (рис. 6.6, Б). У периваскулярній зоні біля пошкоджених м'язових волокон виявлялися макрофаги (гістіоцити), розташовані дифузно або невеликими групами (рис. 6.6, А). Було зареєстровано підвищену кількість фібробластів із великими ядрами.

Проаналізувавши морфометричні показники, ми виявили, що кількість капілярів у 12-місячних щурів була вищою в 1,5 раза від контрольної для цього віку, а також істотно перевищувала показники 6-місячних щурів (як

контрольної групи, так і після РЕХВ). Кількість і площа ядер кардіоміоцитів майже не відрізнялися від контрольних значень (табл. 6.1).

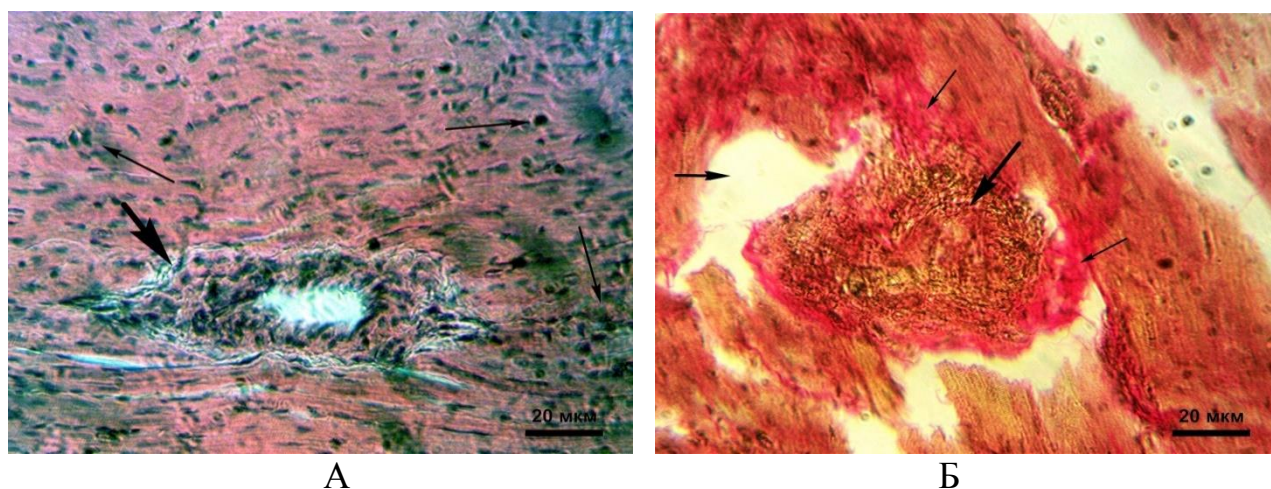


Рис. 6.6. Ділянки міокарда лівого шлуночка щурів 12-місячного віку через місяць після 9 сеансів РЕХВ: А — периваскулярна проліферація фібробластів (товста стрілка), дифузно розташовані макрофаги (тонкі стрілки). Забарвлення гематоксилином і еозином, $\times 300$; Б — розширена венозна судина, заповнена кров'ю (товста стрілка), периваскулярний набряк (стрілка середньої товщини), кардіосклероз (тонка стрілка). Забарвлення пікрофуксином за методом Ван Гізона, $\times 300$

У групі 18-місячних експериментальних тварин через місяць після повторних циклів РЕХВ, у міокарді було виявлено набряк і ознаки порушеного кровообігу. Капіляри суцільно були заповнені еритроцитами (рис. 6.7, Б). У кардіоміоцитах подекуди не виявлялася поперечна смугастість. Спостерігалися вогнища периваскулярного набряку, поодинокі лімфо-гістіоцитарні інфільтрати (рис. 6.7, А), а також дифузний кардіосклероз (рис. 6.7, Б).

Унаслідок аналізу морфометричних даних, було виявлено статистично значуще, порівнюючи з контрольною групою щурів цього віку, зниження кількості (на 11 %) і площі (на 20 %) ядер кардіоміоцитів на тлі збільшення кількості капілярів (на 23 %) (табл. 6.1).

Отже, застосування повторних сеансів РЕХВ істотно впливає на морфологічну структуру міокарда в процесі природного старіння щурів. Починаючи з 12-місячного віку, поліпшується трофіка серцевого м'яза завдяки збільшенню кількості капілярів на одиницю площі тканини. У 18-місячних щурів ці зміни, імовірно, є компенсаторними у відповідь на зменшення кількості і площі ядер кардіоміоцитів.

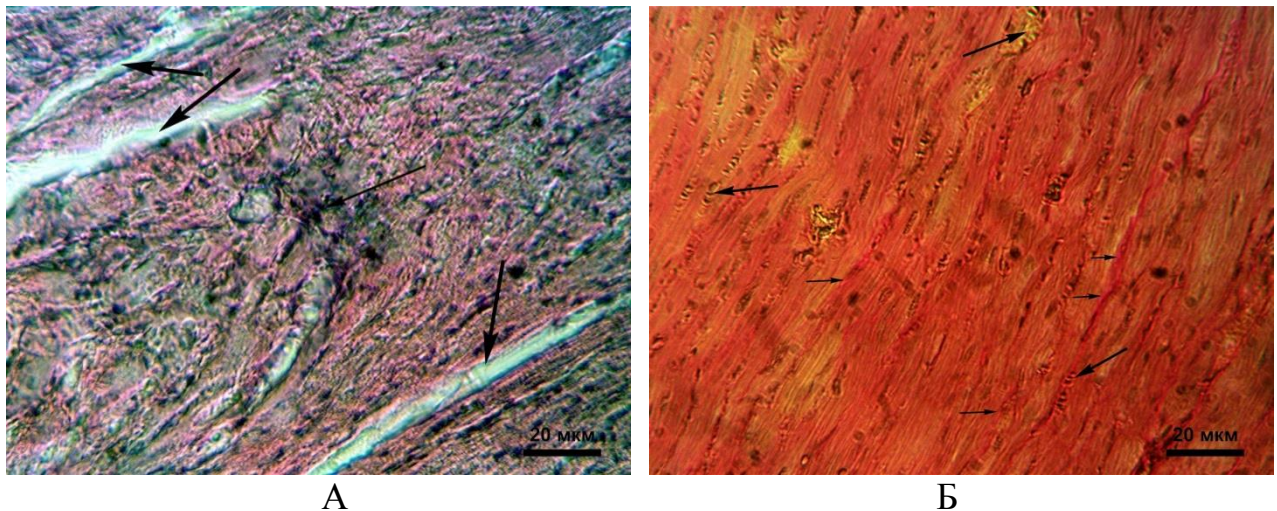


Рис. 6.7. Ділянки міокарда лівого шлуночка щурів 18-місячного віку через місяць після 9 сеансів РЕХВ: А — інтерстиціальний набряк (середня стрілка), лімфо-гістіоцитарний інфільтрат (тонка стрілка). Забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 300$; Б — усі капіляри заповнені еритроцитами (середні стрілки), виражений дифузний кардіосклероз (тонкі стрілки). Забарвлення пікрофуксином за методом Ван Гісона, $\times 300$

6.3 Морфологічний стан міокарда щурів після введення кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові

Морфологічний стан міокарда 6-місячних щурів через місяць після введення кЯВК КК майже не відрізнявся від контрольної групи. Кардіоміоцити мали чітку поперечну смугастість, порівняно рівномірну товщину, розлапувались і утворювали між собою анастомози (рис. 6.8, А). Між

м'язовими волокнами виявлялися тонкі прошарки інтерстиціальної сполучної тканини, у якій розташовувалися численні капіляри.

Спостерігався поліморфізм ядер кардіоміоцитів (округлі, паличкоподібні, значно витягнуті). Виявлялася помірна гіпертрофія кардіоміоцитів. На гістологічних препаратах, забарвлених за методом Ван Гізона, нами були виявлені ніжні колагенові волокна рожевого кольору, які розташовувалися уздовж м'язових волокон (рис. 6.8, Б).

Завдяки аналізу морфометричних даних встановлено, що кількість капілярів ((720 ± 86) на мм^2) у тварин цієї експериментальної групи майже не відрізнялася від контрольної. Площа й кількість ядер кардіоміоцитів значуще збільшувалися на 25 % і 22 %, відповідно (табл. 6.1).

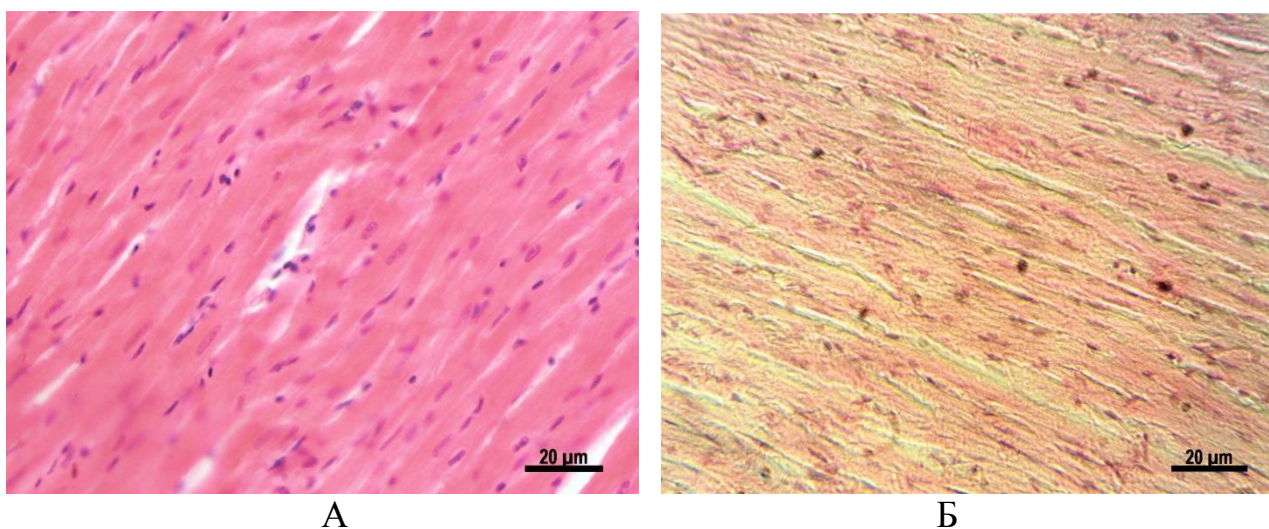


Рис. 6.8. Ділянки міокарда лівого шлуночка щурів 6-місячного віку через місяць після введення кЯВК КК: А — щільна структура тканини з помірною гіпертрофією кардіоміоцитів. Забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 300$; Б — ніжні колагенові волокна рожевого кольору в інтерстиціальній сполучній тканині міокарда. Забарвлення пікрофуксином за методом Ван Гізона, $\times 300$

У міокарді 12-місячних щурів через місяць після повторного введення кЯВК КК виявлялися щільно розташовані м'язові волокна й тонкі прошарки інтерстиціальної сполучної тканини. Морфологічні ознаки інтерстиціального набряку й кардіосклерозу на цих ділянках були виражені слабо (рис. 6.9, А).

Водночас траплялися зони з більш вираженим інтерстиціальним набряком (рис. 6.9, Б). Ділянки, на яких містилися фрагментовані м'язові волокна, а також волокна із підвищеною еозинофілією, траплялися набагато рідше, ніж у контрольній групі тварин цього віку. Окрім того, на таких ділянках, як в інтерстиціальній сполучній тканині, так і навколо кровоносних судин, щільність фіброblastів була підвищеною. Оскільки фіброblastи продукують проангіогенні фактори, то це, можливо, є морфологічною ознакою неоангіогенезу.

Аналіз морфометричних показників виявив значуще збільшення кількості ядер кардіоміоцитів (на 21 %), їхньої площі (у 1,7 раза) і кількості капілярів (у 1,5 раза) проти контролю. Обидва останні показники були в 1,3 раза вище від групи 6-місячних щурів, яким вводили кЯВК КК (табл. 6.1).

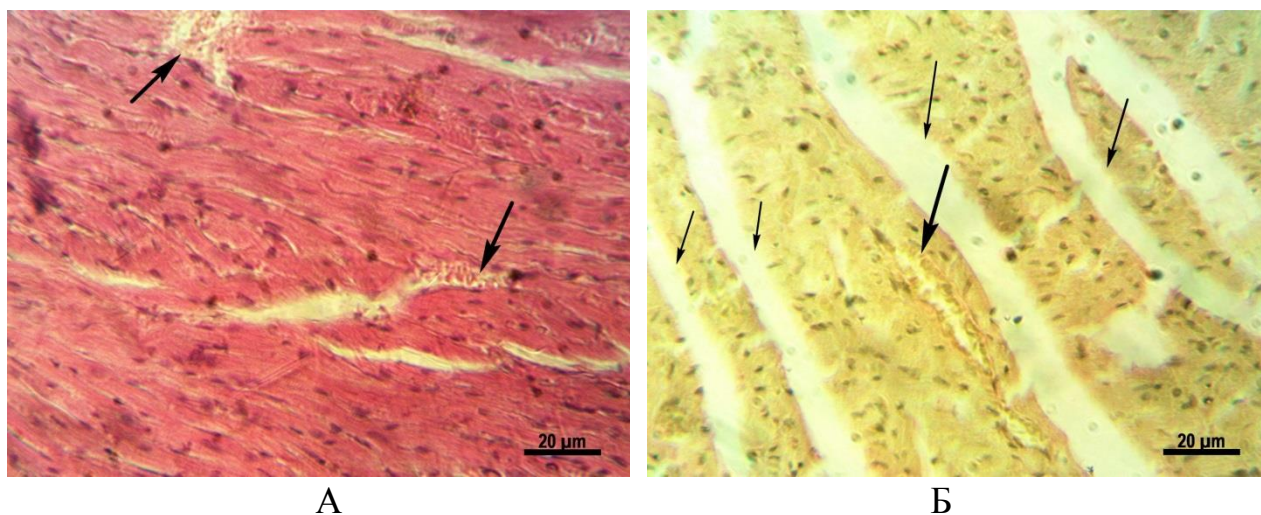


Рис. 6.9. Ділянки міокарда лівого шлуночка щурів 12-місячного віку через місяць після повторного введення кЯВК КК: А — набряк і підвищена щільність клітин в інтерстиції (стрілки). Забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 300$; Б — виражений інтерстиціальний набряк (тонкі стрілки), заповнений еритроцитами капіляр (середня стрілка). Забарвлення пікрофуксином за методом Ван Гізона, $\times 300$

У 18-місячних щурів через місяць після повторних введень кЯВК КК, у міокарді все ж виявлялися ознаки порушення кровообігу. Капіляри й більші судини були заповнені еритроцитами (рис. 6.10, А).

У кардіоміоцитах нами зареєстровано гіпертрофію м'язових волокон та відсутність на деяких ділянках поперечної смугастості. Окрім того, виявлялися вогнища периваскулярного набряку та кардіосклерозу (рис. 6.10, Б). Однак, варто звернути увагу, що зазначені структурні зміни міокарда були менш виражені, порівнюючи з контрольною групою цього віку.

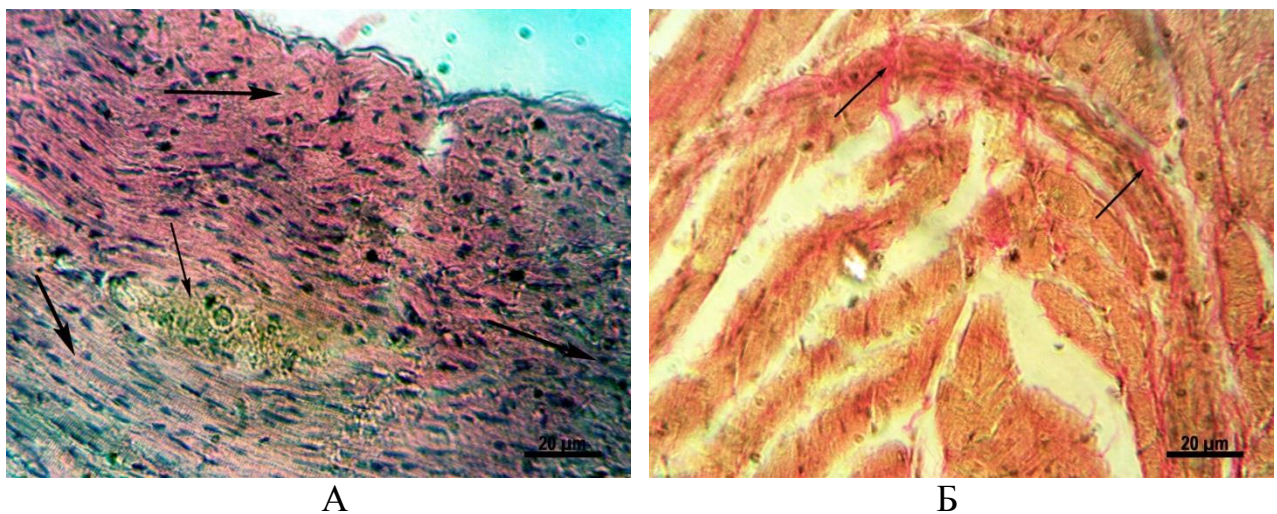


Рис. 6.10. Ділянки міокарда лівого шлуночка щурів 18-місячного віку через місяць після повторного введення кЯВК КК: А — гіпертрофовані м'язові волокна з нерівномірно забарвленою цитоплазмою кардіоміоцитів (середні стрілки), розширені кровоносні судини, заповнені еритроцитами (тонка стрілка). Забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 300$; Б — пучки колагенових волокон навколо розширеної судини (стрілка). Забарвлення пікрофуксином за методом Ван Гізона, $\times 300$

Завдяки дослідженню морфометричних показників (табл. 6.1) виявлено, що проти попередньої вікової групи, у 18-місячних щурів на тлі введення кЯВК КК усе ж таки відбувалося пов'язане з віком значуще зменшення площі ядер кардіоміоцитів і кількості капілярів (на 33 % і 12 %, відповідно), водночас останній показник залишався на 25 % значуще вищим від контрольного.

Кількість ядер кардіоміоцитів, хоча статистично незначуще, проте також знижувалася проти попередньої вікової групи (з (8600 ± 872) до (7800 ± 886) на мм^2 , $p > 0,05$; за контрольної (7100 ± 720) на мм^2).

Під час гістологічного дослідження серцевого м'яза 24-місячних щурів після повторних введень кЯВК КК були виявлені менш виражені, порівнюючи з контрольними тваринами, вікові структурні зміни міокарда (рис. 6.11).

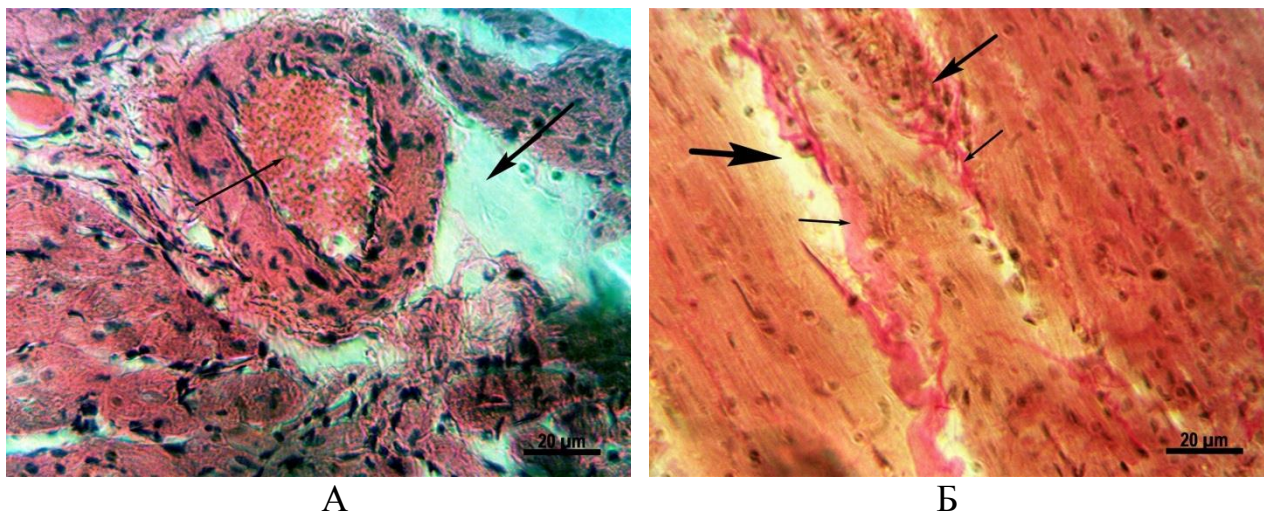


Рис. 6.11. Ділянки міокарда лівого шлуночка щурів 24-місячного віку через місяць після повторного введення кЯВК КК: А — периваскулярний набряк (середня стрілка), розширена й заповнена кров'ю судина (тонка стрілка). Забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 300$; Б — помірний інтерстиціальний набряк (товста стрілка), венозна гіперемія (середня стрілка), склероз (тонкі стрілки). Забарвлення пікрофуксином за методом Ван Гізона, $\times 300$

Лише на деяких ділянках траплялися капіляри, відмінні від типових, молодих: дещо розширені й заповнені еритроцитами. Осередки периваскулярного набряку все ж траплялись, однак лімфо-гістіоцитарних інфільтратів у тканинах міокарда зареєстровано не було. Усі великі судини характеризувалися повнокров'ям, нормальною формою просвіту, рівномірно потовщеними стінками (рис. 6.11, А). Навколо судин виявлявся помірний периваскулярний набряк і кардіосклероз (рис. 6.11, Б). Уцілому, морфологічний стан майже відповідав 12-місячним щурам контрольної групи.

Проаналізувавши морфометричні показники, ми зазначили підвищення кількості капілярів ($p > 0,05$), а також значуще збільшення кількості та площі ядер кардіоміоцитів (на 9 % і 24 %, відповідно) проти контрольних для цього віку.

Отже, можна узагальнити, що на тлі введення кЯВК КК експериментальним тваринам різних вікових груп, структура серцевого м'яза істотно покращувалася, порівнюючи з тією, яка спостерігалася в процесі природного старіння щурів. Ознаки порушення кровообігу, набряк і кардіосклероз у 24-місячних тварин після застосування кЯВК КК були виражені помірно, лімфо-гістіоцитарні інфільтрати відсутні. Відзначалася тенденція до збільшення кількості ядер кардіоміоцитів в усіх вікових групах, у 24-місячних щурів збільшення було статистично значущим, значно зростала їхня площа (у 24-місячних тварин вона відповідала показникам 6-місячних щурів контрольної групи). Кількість капілярів у 12- і 18-місячних тварин істотно збільшувалася, а у 24-місячних щурів підвищення цього показника не досягало статистичної значущості.

6.4 Морфологічний стан міокарда щурів на тлі поєднаного застосування ритмічних екстремальних холодкових впливів та ядровмісних клітин кордової крові

Структурна організація серцевого м'яза 6-місячних щурів на тлі поєднаного застосування РЕХВ і кЯВК КК майже не відрізнялася від тієї, яка була встановлена в контрольних тварин цього віку. Зрідка виявлялися незначні пошкодження міокарда, вираженість і поширеність яких були менше, ніж у контрольних щурів. Звертала на себе увагу проліферація фібробластів інтерстицію, що свідчило, певно, про неоангіогенез, а також дифузне поширення гістіоцитів (рис. 6.12, А). Завдяки забарвленню препаратів за методом Ван Гізона, в інтерстиціальній тканині було виявлено тонкі колагенові волокна (рис. 6.12, Б).

Нами зазначено статистично значуще збільшення, проти контрольних, усіх досліджуваних морфометричних показників. Кількість ядер кардіоміоцитів збільшувалася на 17 %, їхня площа на 51 %, а кількість капілярів на 16 % (табл. 6.1). Крім того, наведені параметри були значуще вищими від тих, які вираховані для 6-місячних тварин, котрим застосовували РЕХВ, проте істотно не відрізнялися від показників групи щурів цього віку, яким вводили кЯВК КК.

Під час гістологічного дослідження препаратів міокарда 12-місячних щурів через місяць після повторного поєднаного застосування РЕХВ і кЯВК КК виявлено проліферацію фібробластів (рис. 6.13, А), незначний інтерстиціальний набряк, помірно виражений кардіосклероз (рис. 6.13, Б) і макрофагально-гістіоцитарну реакцію (рис. 6.13).

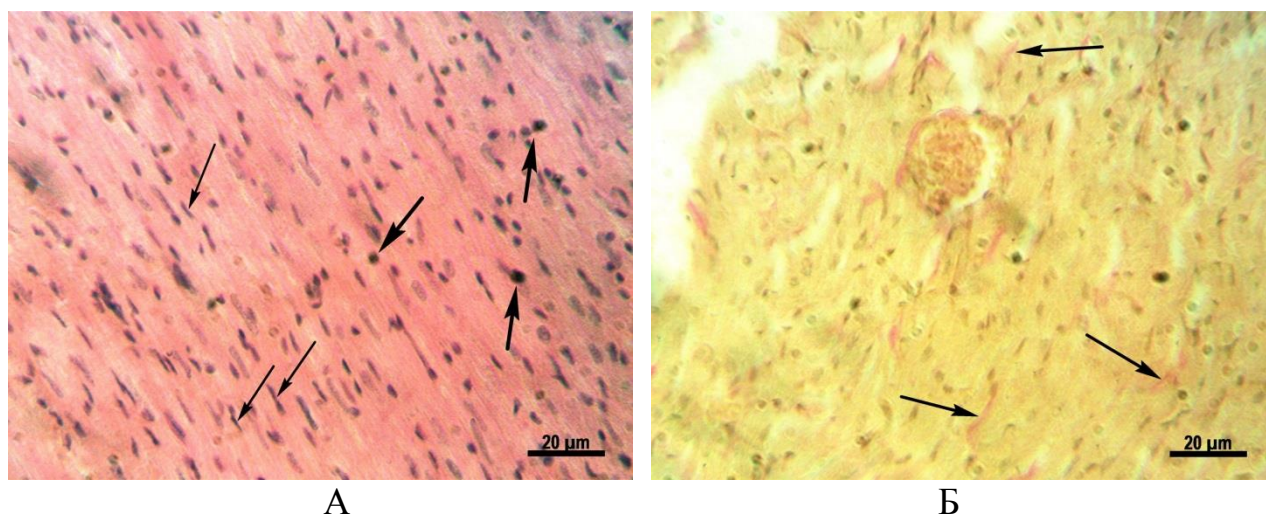


Рис. 6.12. Ділянки міокарда лівого шлуночка щурів 6-місячного віку через місяць після повторного поєднаного застосування РЕХВ і кЯВК КК: А — проліферація фібробластів (тонка стрілка), дифузно розташовані гістіоцити (середня стрілка). Забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 300$; Б — тонкі колагенові волокна в інтерстиціальній тканини (стрілки). Забарвлення пікрофуксином за методом Ван Гісона, $\times 300$

Проаналізувавши морфометричні параметри, ми встановили значуще збільшення площі ядер кардіоміоцитів проти контрольної (на 19 %) і її зменшення (на 24 %) проти вирахованої у попередній віковій групі. Кількість

капілярів не змінювалася проти контрольної, проте статистично значуще знижувалася проти попередньої вікової групи (на 22 %). Кількість ядер кардіоміоцитів дещо перевищувала контрольні показники (табл. 6.1).

Під час гістологічного дослідження міокарда 18-місячних щурів після повторного поєднаного застосування РЕХВ і кЯВК КК було виявлено ознаки порушення кровообігу, інтерстиціальний і периваскулярний набряки. Капіляри були заповнені еритроцитами (рис. 6.14, А). У кардіоміоцитах подекуди бракувало поперечної смугастості, спостерігався каріопікноз. Нами зазначено вогнища кардіосклерозу (рис. 6.14, Б).

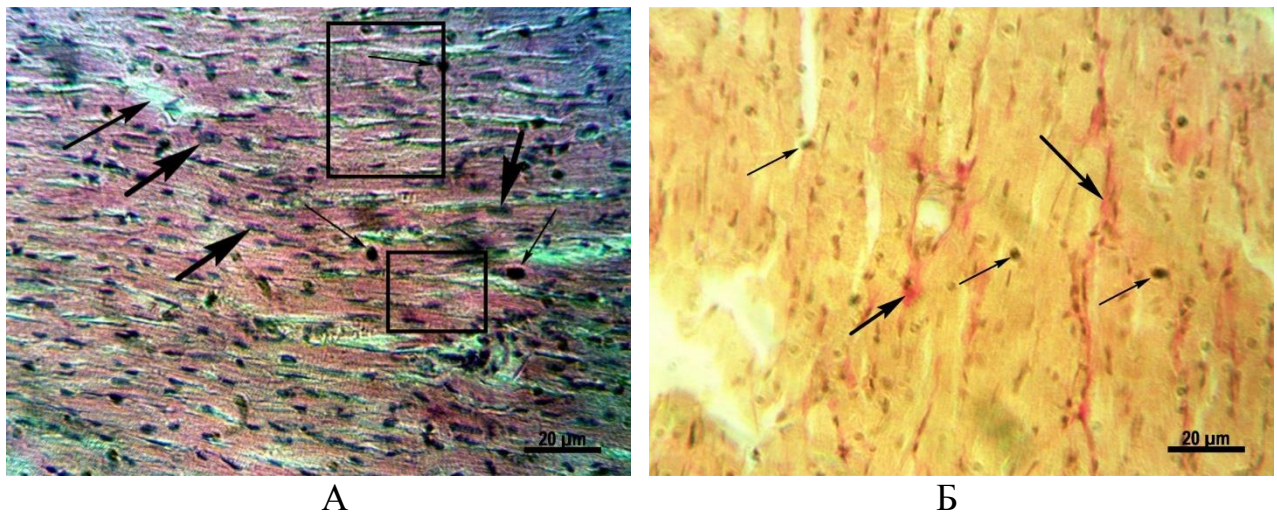


Рис. 6.13. Ділянки міокарда лівого шлуночка щурів 12-місячного віку через місяць після повторного поєднаного застосування РЕХВ і кЯВК КК: А — збільшення кількості та розмірів ядер кардіоміоцитів (товста стрілка), незначний інтерстиціальний набряк (середня стрілка), проліферація фібробластів (рамка), дифузне поширення гістіоцитів (тонка стрілка). Забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 300$; Б — помірно виражений кардіосклероз (середня стрілка), дифузне поширення гістіоцитів (тонка стрілка). Забарвлення пікрофуксином за методом Ван Гізона, $\times 300$

Проаналізувавши морфометричні показники, ми встановили, що кількість і площа ядер кардіоміоцитів знижувалися проти 12-місячних щурів (від (7400 ± 710) до (6920 ± 820) на мм^2 , $p > 0,05$, і від $(18,5 \pm 2)$ до $(16,5 \pm 2)$ мкм^2 , $p < 0,05$,

відповідно), проте перевищували контрольні значення (табл. 6.1). Кількість капілярів, натомість, значуще збільшувалася, як проти 12-місячних щурів (на 12 %), так і проти контрольної групи 18-місячного віку (на 15 %).

Гістологічне дослідження серцевого м'яза 24-місячних щурів після повторного поєднаного застосування РЕХВ і кЯВК КК показало, що ступінь вираженості морфологічних змін міокарда (ознаки порушення кровообігу, інтерстиціальний набряк, дистрофія й кардіосклероз) майже не відрізнялася від попередньої вікової групи (рис. 6.15).

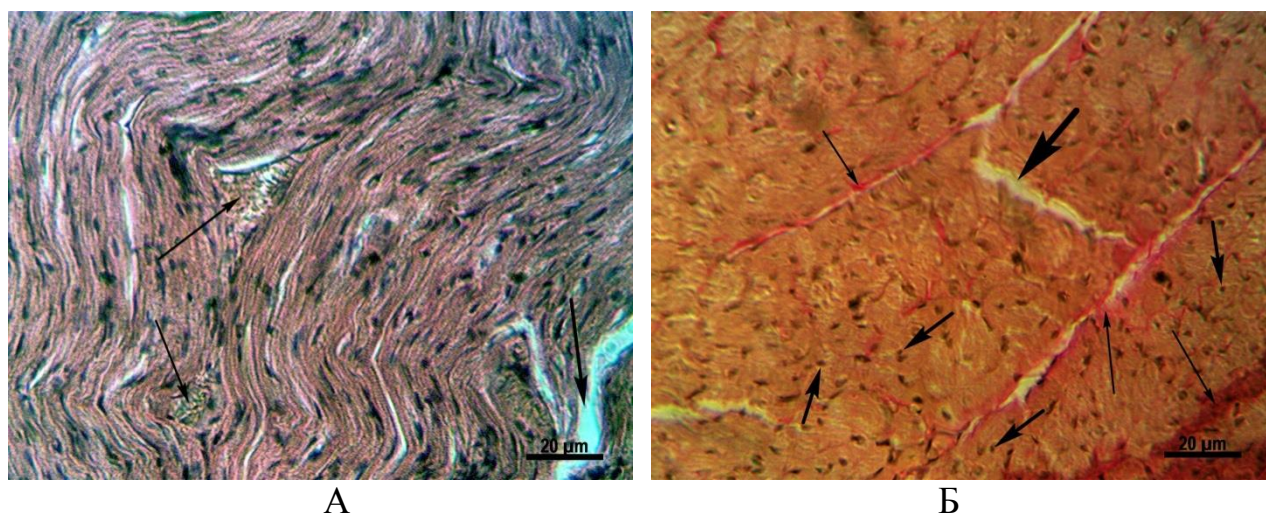


Рис. 6.14. Ділянки міокарда лівого шлуночка щурів 18-місячного віку через місяць після повторного поєднаного застосування РЕХВ і кЯВК КК: А — помірний набряк (середня стрілка), заповнені еритроцитами капіляри (тонка стрілка). Забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 300$; Б — помірний набряк (товсті стрілки), осередки кардіосклерозу (тонкі стрілки), каріопікноз у кардіоміоцитах (середні стрілки). Забарвлення пікрофуксином за методом Ван Гізона, $\times 300$

Аналіз морфометричних параметрів виявив, що проти контрольних показників кількість (на 9 %) і площа (на 15 %) ядер кардіоміоцитів значуще зростали, а кількість капілярів підвищувалася статистично незначуще. Хоча відмінності морфометричних параметрів від попередньої вікової групи не

досягали статистичної значущості, проте варто зазначити, що дещо зростала кількість ядер кардіоміоцитів, на тлі зменшення їхньої площі (табл. 6.1).

Отже, під час гістологічного дослідження серцевого м'яза і внаслідок аналізу його морфометричних показників встановлено, що поєднане застосування РЕХВ і кЯВК КК упродовж життєвого циклу тварин супроводжувалося покращенням мікроскопічної будови міокарда, вірогідно, завдяки розвитку репаративних процесів. Підвищувалися компенсаторні можливості серцевого м'яза завдяки збільшенню як кількості, так і площі ядер кардіоміоцитів, поліпшувалася трофіка внаслідок утворення нових капілярів. Це підтверджувалося проліферацією в інтерстиціальній тканині фібробластів, які, як відомо, продукують проангіогенні фактори. Описані зміни перешкоджають розвитку ішемії міокарда, кардіосклерозу й некрозу — синильно-інволюційних змін міокарда.

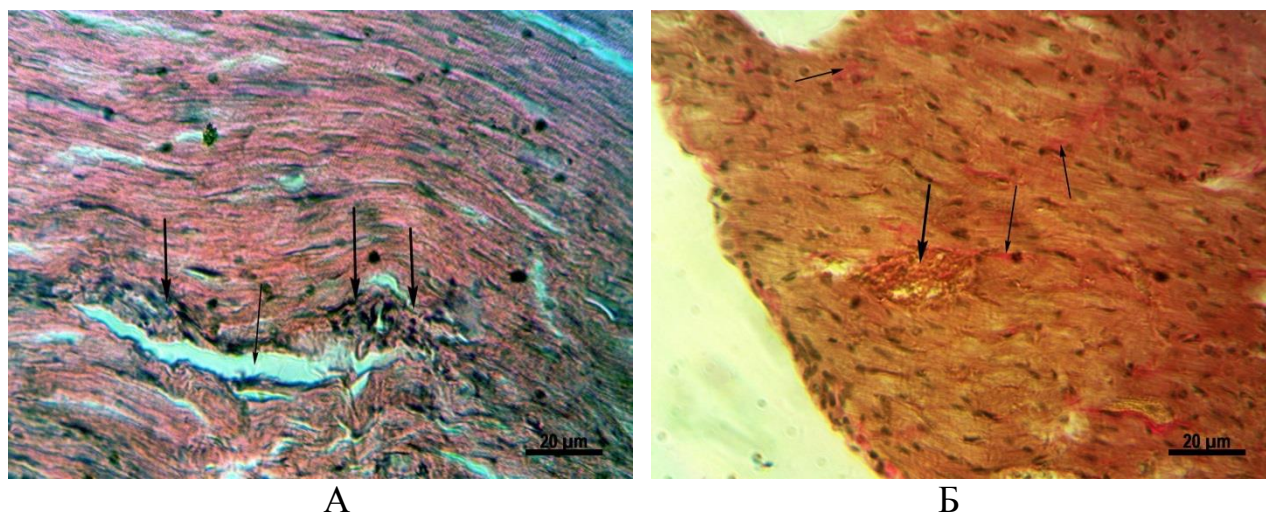


Рис. 6.15. Ділянки міокарда лівого шлуночка щурів 24-місячного віку через місяць після повторного поєднаного застосування РЕХВ і кЯВК КК: А — помірний набряк (тонка стрілка) та порушення кровообігу (стрілка середньої товщини). Забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 300$; Б — венозна гіперемія (середня стрілка) та помірний кардіосклероз (тонка стрілка). Забарвлення пікрофуксином за методом Ван Гізона, $\times 300$

Окрім того, треба зазначити, що введення кЯВК КК, а також поєднане використання РЕХВ і кЯВК КК у динаміці старіння щурів має більш виражену позитивну дію на структурну організацію міокарда, порівнюючи із самостійним застосуванням РЕХВ.

За матеріалами розділу 6 опубліковано роботи [85, 87, 238].

РОЗДІЛ 7

СУБМІКРОСКОПІЧНІ ПЕРЕБУДОВИ ТКАНИН І СУДИН МІОКАРДА ЩУРІВ У ДИНАМІЦІ ЇХНЬОГО СТАРІННЯ ПІСЛЯ РИТМІЧНИХ ЕКСТРЕМАЛЬНИХ ХОЛОДОВИХ ВПЛИВІВ (–120 °С), ВВЕДЕННЯ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЯДРОВМІСНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ ТА ЇХ ПОЄДНАНОГО ВИКОРИСТАННЯ

Як уже було зазначено, захворювання ССС зберігають першість серед причин смерті населення України [35] і планети загалом [206, 225, 269].

Під час старіння організму спостерігається зменшення функціональних можливостей різних систем, зокрема ССС [225], патології якої пов'язані з ультраструктурними змінами її компонентів [12, 47]. Загальновизнаними описовими характеристиками старіючого організму є мітохондріальна [180] і ендотеліальна дисфункція [163].

Відомо [309], що позитивний (підготовчий) окисний стрес призводить до молекулярних перебудов у клітинах організму, а побічні продукти перекисного окиснення ліпідів і аддукти окиснення білків мають вагомий профілактичний вплив проти розвитку асоційованих зі старінням захворювань.

Встановлено [8], що РЕХВ, які є «м'яким» нетривалим стресом для організму тварин, викликають субмікроскопічні адаптивні перебудови в тканинах і судинах серця молодих (6-місячних) і старих (24–30-місячних) щурів.

Нечисленні літературні дані свідчать про зміну ультраструктурної організації кардіоміоцитів і ендотеліоцитів кровоносних капілярів міокарда молодих [24] і старих [12, 45] щурів після введення кЯВК КК, які містять зокрема і ГСК, при патології ССС. Водночас особливості субмікроскопічних перебудов тканин і судин міокарда на тлі як самостійного, так і поєднаного застосування РЕХВ і кЯВК КК у динаміці старіння тварин, залишалися не дослідженими.

7.1 Ультрамiкроскопiчна органiзацiя тканин i судин мiокарда щурiв контрольної групи

Кардіоміоцити 6-місячних щурів контрольної групи мали типову організацію. Ядра кардіоміоцитів були витягнутої форми й мали гладку ядерну мембрану. Ядерний хроматин перебував переважно в деконденсованому стані, його гранули рівномірно розподілялися по площі зрізу ядра. Досить часто траплялися ядра, мембрана яких утворювала глибокі інвагінації. Вогнищ розпушення й лізису нами виявлено не було. Перинуклеарний простір мав постійну ширину й низьку електронну щільність.

У перинуклеарній зоні містилися цистерни ендоплазматичного ретикулума (ЕПР), заповнені тонковолокнистою субстанцією, яка мала середню електронну щільність. Скорочувальний апарат кардіоміоцитів являв собою паралельно орієнтовані пучки міофібрил із чітко вираженою поперечною смугастістю, між якими розташовувалися мітохондрії (Мт). Мт містили велику кількість крист (рис. 7.1, А). Було зареєстровано поліморфізм форм і розмірів Мт: деякі з них містили електронно-щільний матрикс, інші — електронно-прозорий.

Зрідка в кардіоміоцитах молодих тварин виявлялися дрібні включення ліпідів. У перинуклеарній зоні саркоплазми розташовувався комплекс Гольджі. Саркоплазматична мембрана мала типову для елементарної мембрани структуру.

Ендотеліальні клітини кровоносних капілярів 6-місячних щурів контрольної групи мали типову для таких клітин організацію. У цитоплазмі ендотеліоцитів містилися численні рибосоми й полісоми. Вторинних лізосом і включень ліпідів не було. У цитоплазмі розташовувалася невелика кількість Мт із дрібногранулярним матриксом середньої електронної щільності та вкороченими кристами. Цистерни шорсткого ЕПР були сплюснені, а на мембранах виявлялася невелика кількість рибосом. Біля комплексу Гольджі містилися дрібні везикули, заповнені речовиною, електронна щільність якої

варіювала. Не було виявлено деструктивних порушень мембранних внутрішньоклітинних структур. Ядерна мембрана мала численні дрібні деформації. Хроматин здебільшого перебував у конденсованому стані.

У цитоплазмі відростків ендотеліоцитів було виявлено велику кількість мікропіноцитозних пухирців (рис. 7.1, Б). Цитоплазматична мембрана, звернена до току крові, мала структуру, властиву елементарній мембрані.

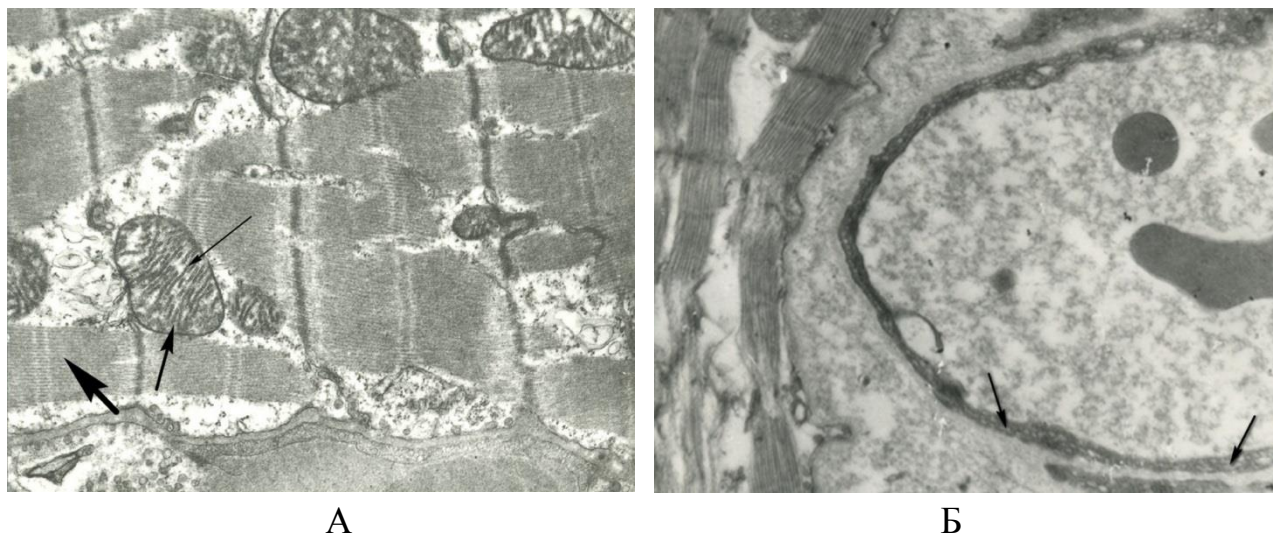


Рис. 7.1. Ультраструктура кардіоміоцитів (А) та ендотеліоцитів (Б) кровоносних капілярів міокарда 6-місячних щурів контрольної групи: А — чітка поперечна смугастість (товста стрілка), мітохондрії з дрібнозернистим матриксом (стрілка середнього розміру), велика кількість крист (тонка стрілка). Контрастовано цитратом свинцю, $\times 36\,000$; Б — численні мікропіноцитозні пухирці в цитоплазмі (стрілки). Контрастовано цитратом свинцю, $\times 47\,000$

Подібною до описаної вище була субмікроскопічна організація кардіоміоцитів і ендотеліоцитів кровоносних капілярів міокарда 12-місячних щурів контрольної групи (рис. 7.2).

Ядра кардіоміоцитів мали неправильну форму й були оточені чітко контурованою ядерною мембраною без вогнищ розпушення й лізису. Ядерна мембрана деяких кардіоміоцитів утворювала глибокі інвагінації. Гранули деконденсованого ядерного хроматину були розподілені більш-менш

рівномірно по площі зрізу ядра. Ширина перинуклеарного простору залишалася рівномірною.



Рис. 7.2. Ультраструктура кардіоміоцитів (А) та ендотеліоцитів (Б) кровоносних капілярів міокарда 12-місячних щурів контрольної групи: А — ущільнення матриксу (товста стрілка), численні кристи (середня стрілка), осміофільні зовнішні мембрани мітохондрій (тонка стрілка). Контрастовано цитратом свинцю, $\times 38\,000$; Б — численні мікропіноцитозні пухирці в цитоплазмі (стрілки). Контрастовано цитратом свинцю, $\times 42\,000$

У саркоплазмі кардіоміоцитів містилися сплюснені цистерни ЕПР, заповнені тонковолокнистою субстанцією, яка мала середню електронну щільність. Пучки міофібрил були орієнтовані паралельно, а між ними рядами локалізувалися Мт. Матрикс Мт мав високу електронну щільність і дрібнодисперсну структуру. Мт містили безліч щільно упакованих крист (рис. 7.2, А). Зовнішні мітохондріальні мембрани були чіткими, осміофільними, без вогнищ розпушення й лізису.

Комплекс Гольджі мав типову структуру: паралельно орієнтовані гладенькі мембрани, оточені дрібними електронно-прозорими везикулами.

Кровоносні капіляри розташовувалися дуже близько до кардіоміоцитів. Ендотеліальні клітини і їхня цитоплазматична мембрана мали типову будову.

Привертала увагу велика кількість мікропіноцитозних пухирців у цитоплазмі відростків ендотеліоцитів (рис. 7.2, Б). Ядерна мембрана ендотеліоцитів містила численні інвагінації різної глибини. Хроматин перебував переважно в деконденсованому стані. У перинуклеарній зоні містилися цистерни гранулярного ЕПР, комплекс Гольджі, численні рибосоми й полісоми. Деструктивних порушень цих органел нами не виявлено.

Кардіоміоцити 18-місячних тварин контрольної групи, загалом, зберігали типову субмікроскопічну будову. Деякі з них мали зміни, характерні для розвитку помірно вираженого дистрофічного процесу.

Матрикс ядер набував низької електронної щільності. Грудочки конденсованого хроматину були зосереджені переважно в зоні, прилеглій до ядерної мембрани, а гранули деконденсованого хроматину містилися в центральній ділянці матриксу ядра. Ядерна мембрана утворювала невелику кількість глибоких і дрібних інвагінацій. Нами виявлені дрібні ділянки її розпушення. Вогнищ деструкції ядерної мембрани майже не було. Перинуклеарний простір мав ділянки локального розширення.

Кількість органел, рибосом і гранул глікогену в перинуклеарній зоні кардіоміоцитів була зниженою проти контрольної групи 6-місячних щурів. Саркоплазма мала більш низьку електронну щільність.

Зміни Мт мали поліморфний характер. Мт мали здебільшого типову структуру з безліччю паралельно орієнтованих крист і чітко контурованою зовнішньою мембраною. Траплялися Мт з електронно-прозорим матриксом і лізованими кристами. У деяких мітохондріях зовнішні мембрани містили дрібні вогнища розпушення й лізису, виявлялася дезорганізація крист (рис. 7.3, А).

Саркоплазма кардіоміоцитів також зазнавала просвітлення, часто мала електронно-прозорий вигляд. У ній іноді траплялися включення ліпідів і ліпофусцину. Пучки міофібрил зберігали паралельну орієнтацію й поперечну смугастість, проте спостерігалось їхнє локальне витончення.

Цистерни ЕПР і Т-системи були розширені й заповнені електронно-прозорою субстанцією.

Ядра ендотеліоцитів кровоносних капілярів міокарда 18-місячних щурів контрольної групи були неправильної форми. Хроматин ядра був зосереджений переважно вздовж ядерної мембрани. У центральній зоні ядерного матриксу утворювалася електронно-прозора ділянка, заповнена невеликою кількістю гранул деконденсованого хроматину. Ядерна мембрана мала глибокі інвагінації, великі вогнища розпушення, проте ділянки її руйнування виявлялися вкрай рідко. Перинуклеарний простір подекуди був розширеним.

У цитоплазмі відростків ендотеліоцитів кількість мікропіноцитозних пухирців була істотно знижена проти молодших вікових груп. Мт ендотеліоцитів були сильно набряклі, мали просвітлений матрикс і поодинокі кристи (рис. 7.3, Б).

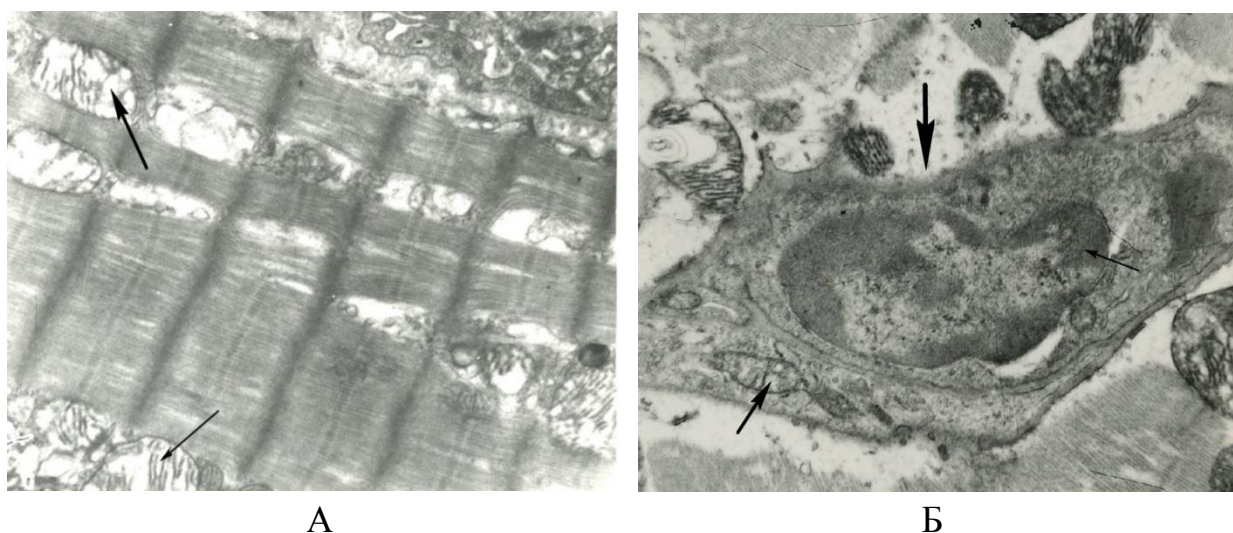


Рис. 7.3. Ультраструктура кардіоміоцитів (А) та ендотеліоцитів (Б) кровоносних капілярів міокарда 18-місячних щурів контрольної групи: А — просвітлення матриксу (тонка стрілка) і вогнищевий лізис крист мітохондрій (товста стрілка). Контрастовано цитратом свинцю, $\times 39\,000$; Б — конденсація хроматину ядра (тонка стрілка), просвітлення матриксу мітохондрій (середня стрілка), розпушення цитоплазматичної мембрани (товста стрілка). Контрастовано цитратом свинцю, $\times 40\,000$

Цистерни гранулярного ЕПР були розширені, на його мембранах визначалася невелика кількість рибосом.

Цитоплазматична мембрана, звернена до просвіту капіляра, була розпушеною, містила невелику кількість вогнищ деструкції. Комплекс Гольджі був помірно редукованим, його гладенькі мембрани часто були дезорганізовані. Деякі ендотеліоцити містили вторинні лізосоми і включення ліпідів, які розташовувалися поблизу комплексу Гольджі.

У 24-місячних щурів контрольної групи ядра кардіоміоцитів мали округлу, дещо витягнуту форму. Ядерний хроматин перебував здебільшого в конденсованому стані, його грудочки більш-менш рівномірно розподілялися по площі зрізу ядра. Розпушена ядерна мембрана мала дрібні вогнища деструкції.

У перинуклеарній зоні саркоплазми виявлявся редукований комплекс Гольджі, який мав вигляд невеликої кількості дезорієнтованих гладеньких мембран, оточених поодинокими, електронно-прозорими великими вакуолями.

Між пучками міофібрил були локалізовані розширені цистерни ЕПР, заповнені електронно-прозорою субстанцією.

Найбільшим різноманіттям вирізнялися Мт. У тому самому кардіоміоциті виявлялися досить різні за своїм станом Мт. Траплялися Мт із просвітленим, майже електронно-прозорим матриксом, у якому містилися численні кристи. Матрикс Мт часто був контрастованим нерівномірно: реєструвалися невеликі електронно-прозорі ділянки й зони, заповнені аморфною осміофільною речовиною. У матриксі деяких Мт містилися мієліноподібні структури.

Майже всі Мт мали ознаки локальних процесів дегенерації (рис. 7.4, А). У їхньому матриксі утворювалися електронно-прозорі порожнини, оточені елементарною мембраною.

У саркоплазмі кардіоміоцитів часто виявлялися вторинні лізосоми, включення електронно-щільного ліпофусцину. Міофібрили кардіоміоцитів були розташовані паралельними пучками. Саркоплазма була істотно просвітлена й містила невелику кількість рибосом і гранул глікогену.

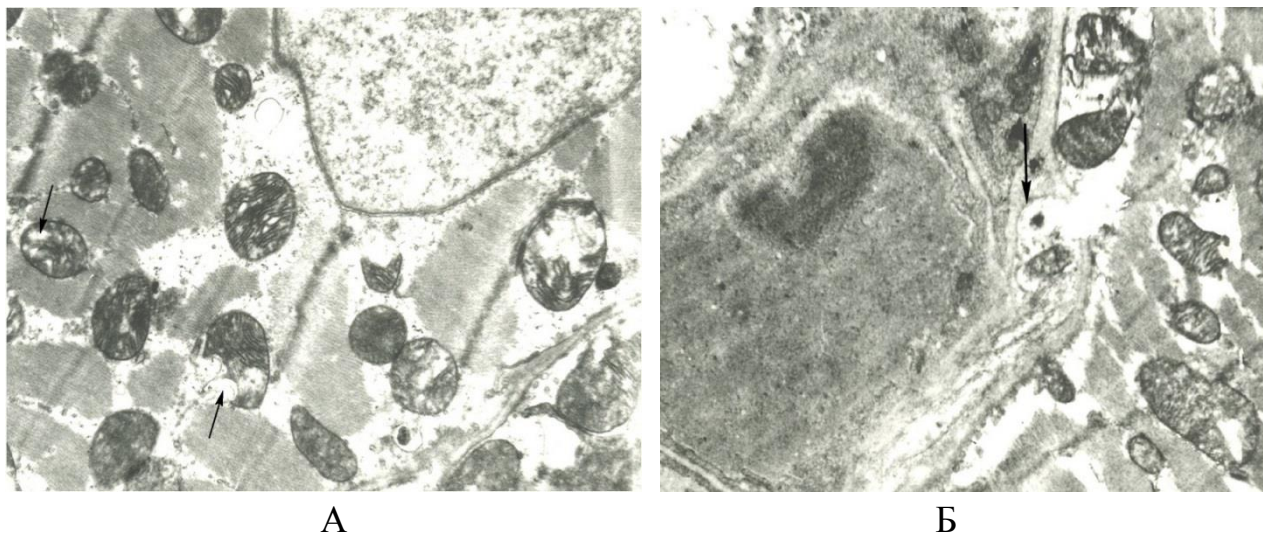


Рис. 7.4. Ультраструктура кардіоміоцитів (А) та ендотеліоцитів (Б) кровоносних капілярів міокарда 24-місячних щурів контрольної групи: А — дегенеративні зміни мітохондрій — наявність порожнин, оточених елементарною мембраною (стрілки). Контрастовано цитратом свинцю, $\times 35\ 000$; Б — вторинні лізосоми в цитоплазмі (стрілка). Контрастовано цитратом свинцю, $\times 37\ 000$

Ультраструктурна організація ендотеліоцитів кровоносних капілярів міокарда 24-місячних щурів контрольної групи мала риси виражених дистрофічних і деструктивних змін. Реєструвалося значне зменшення проти попередніх вікових груп кількості мікропіноцитозних пухирців у цитоплазмі відростків ендотеліоцитів.

Ядра ендотеліальних клітин містили переважно конденсований хроматин, мали гладку, розпушену ядерну мембрану з вогнищами лізису. Невелика кількість набряклих Мт із поодинокими кристами й електронно-прозорим матриксом розташовувалася в перинуклеарній зоні цитоплазми.

Гранулярний ЕПР був розвинений слабо, його цистерни мали різну форму й електронно-прозорий вміст, на поверхні майже не було рибосом, а в деяких ендотеліоцитах спостерігалася фрагментація мембран.

Комплекс Гольджі був редукованим. Його гладкі мембрани були дезорганізовані, а везикулярна частина представлена поодинокими великими електронно-прозорими вакуолями. У цитоплазмі всіх ендотеліоцитів виявлялися вторинні лізосоми і дрібні включення ліпідів (рис. 7.4, Б).

Цитоплазматична мембрана, звернена до просвіту капіляра, була осміофільна, потовщена й подекуди зруйнована.

Отже, проведені електронно-мікроскопічні дослідження динаміки субмікроскопічних перебудов органел кардіоміоцитів і ендотеліоцитів кровоносних капілярів міокарда щурів у динаміці їхнього старіння, показали, що характерною особливістю ультраструктурної організації кардіоміоцитів 6-місячних щурів є наявність великої кількості дрібних Мт і крист у них, а також присутність гантелеподібних форм Мт — форм Мт, які діляться. Вторинні лізосоми і включення ліпідів у цьому віці не виявлялися.

Ознаки високого рівня метаболічної, репаративної та синтетичної активності зберігалися в клітинах і судинах міокарда 12-місячних щурів.

Прояви розвитку дистрофічних процесів на субклітинному рівні, вочевидь, починають з'являтися в щурів до 18-місячного віку, оскільки у тварин цієї вікової групи нами виявлено набрякання Мт, вогнищеве просвітлення їхнього матриксу, деструкцію деяких крист. Наведені зміни типові для розвитку мітохондріальної дисфункції.

У 24-місячних щурів Мт кардіоміоцитів перебували в різному стані: деякі були сильно набряклі, мали просвітлений матрикс і розширені простори між кристами, інші перебували на різних стадіях дегенерації, яка супроводжувалася лізисом крист і зовнішніх мембран. Траплялися також тотально зруйновані Мт. Дегенеративно-деструктивні зміни Мт свідчили про істотне порушення внутрішньоклітинної біоенергетики і зниження скорочувальної здатності кардіоміоцитів.

У кардіоміоцитах і ендотеліоцитах реєструвалися морфологічні ознаки досить високої активності катаболічних процесів: наявність у саркоплазмі

включень ліпідів і ліпофусцину, зменшена кількість рибосом, полісом і гранул глікогену.

7.2 Ультраструктурні зміни кардіоміоцитів і ендотеліоцитів кровоносних капілярів міокарда щурів після ритмічних екстремальних холодкових впливів

У групі 6-місячних експериментальних тварин через місяць після 9 сеансів РЕХВ ультраструктурна організація кардіоміоцитів відповідала описаній у контрольній групі, за винятком стану Мт і комплексу Гольджі.

Мт розташовувалися рядами між пучками міофібрил, їхній матрикс містив дрібногранулярну субстанцію низької електронної щільності й багато коротких крист (рис. 7.5, А). Деякі Мт мали перетяжки, що свідчило про їхній поділ.

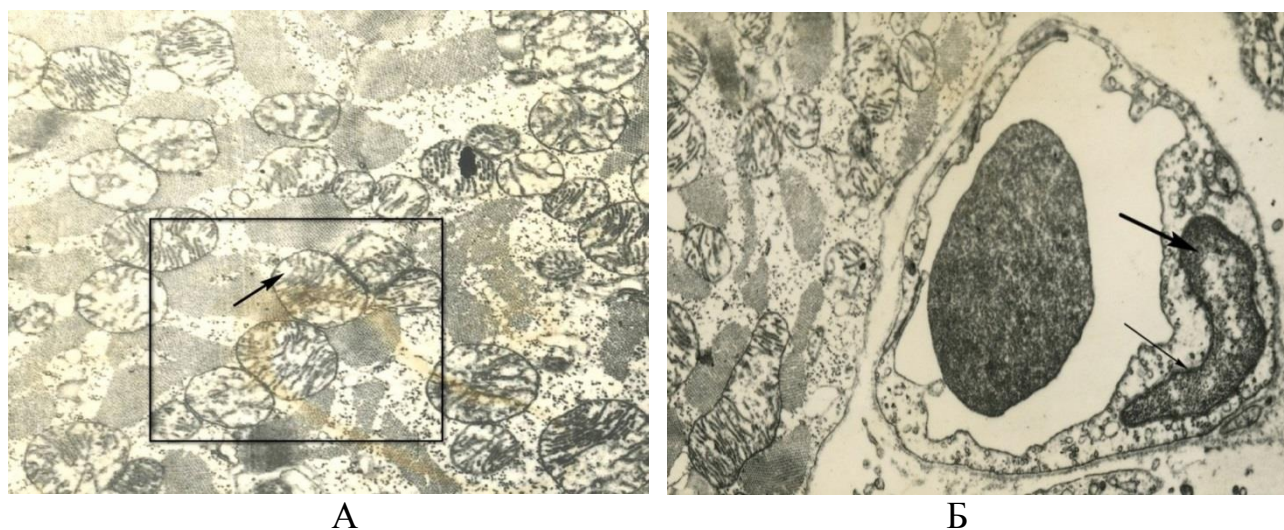


Рис. 7.5. Ультраструктура кардіоміоцитів (А) та ендотеліоцитів (Б) кровоносних капілярів міокарда 6-місячних щурів через місяць після 9 сеансів РЕХВ: А — скупчення Мт з укороченими кристами (виділено рамкою), помірне просвітлення матриксу (стрілка). Контрастовано цитратом свинцю, $\times 34\,000$; Б — ядра неправильної форми (товста стрілка), чітка ядерна мембрана (тонка стрілка). Контрастовано цитратом свинцю, $\times 49\,000$

Комплекс Гольджі був помірно гіпертрофований, його гладкі мембрани були паралельно орієнтовані й зібрані в стопки. Поблизу них виявлялося багато дрібних електронно-прозорих везикул. Включення ліпідів і ліпофусцину не виявлялися. Саркоплазматична мембрана мала звичайну структуру.

Ультраструктурна організація ендотеліоцитів більше, ніж у кардіоміоцитів, відрізнялася від контрольної групи. Ці відмінності стосувалися Мт, комплексу Гольджі та стану хроматину. Ядра ендотеліальних клітин капілярів міокарда 6-місячних щурів через місяць після 9 процедур охолодження мали неправильну форму й містили приблизно однаковий обсяг, як конденсованого, так і деконденсованого хроматину. Ядерна мембрана була гладенькою, без вогнищ деструкції та розпушення (рис. 7.5, Б).

Траплялися помірно набряклі Мт із дещо просвітленим матриксом. У деяких ендотеліоцитах виявлялися Мт гантелеподібної форми. Ознак деструкції зовнішніх мембран і крист не було. Комплекс Гольджі був помірно гіпертрофований. Вторинні лізосоми і включення ліпідів виявлялися вкрай рідко. У цитоплазмі відростків ендотеліоцитів реєструвалися численні електронно-прозорі мікропіноцитозні пухирці, заповнені речовиною з різним ступенем осміофілії. На мембранах гранулярного ЕПР містилося багато рибосом. У цитоплазмі також виявлялися численні рибосоми й полісоми.

У 12-місячних експериментальних щурів через місяць після повторного циклу РЕХВ стан ядер (мембран і матриксу), хроматину, мембран Мт кардіоміоцитів відповідав контрольній групі. У перинуклеарній зоні саркоплазми була збільшеною, проти контрольної групи цього віку, кількість саркоплазматичних органел.

Ступінь просвітлення саркоплазми, кількість електронно-прозорих зон, які поділяли пучки міофібрил, були істотно знижені. У кардіоміоцитах була збільшена кількість Мт і крист у них. Матрикс Мт набував дрібногранулярної структури й середньої електронної щільності. Значна кількість кардіоміоцитів містили Мт з перетяжками. Вогнищ деструкції зовнішньої мембрани Мт виявлено не було (рис. 7.6, А).

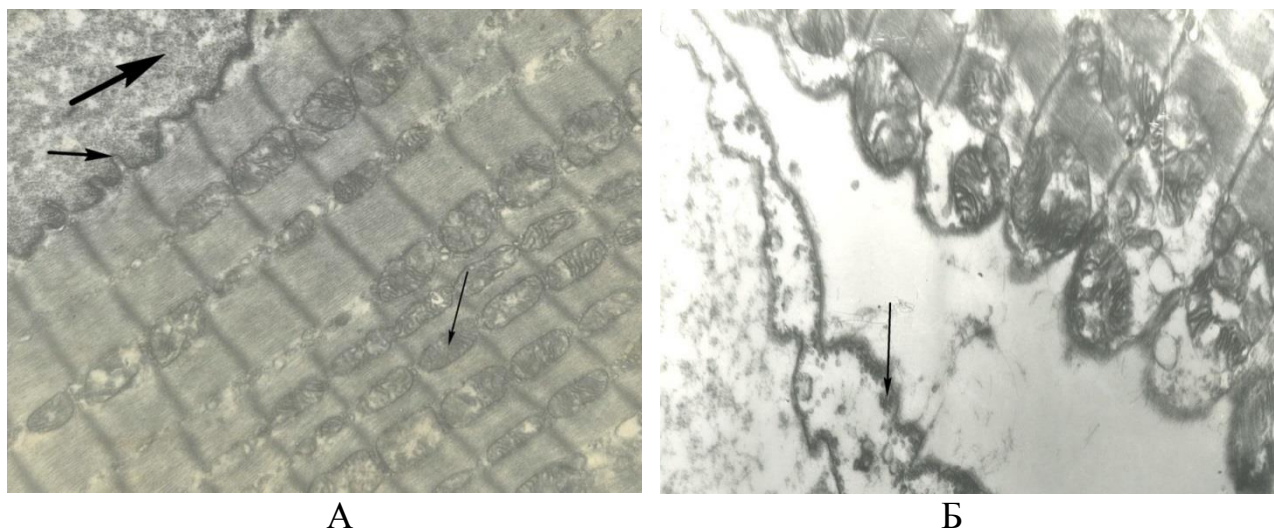


Рис. 7.6. Ультраструктура кардіоміоцитів (А) та ендотеліоцитів (Б) кровоносних капілярів міокарда 12-місячних щурів через місяць після 9 сеансів РЕХВ: А — деконденсація хроматину (товста стрілка), інвагінації ядерної мембрани (стрілка середньої товщини), Мт із дрібно гранулярним матриксом (тонка стрілка). Контрастовано цитратом свинцю, $\times 35\,000$; Б — скупчення мікропіноцитозних пухирців у цитоплазмі (стрілка). Контрастовано цитратом свинцю, $\times 60\,000$

У саркоплазмі була збільшеною кількість вільних рибосом, полісом, гранул глікогену. У перинуклеарній зоні саркоплазми розташовувався гіпертрофований комплекс Гольджі, стопки гладеньких мембран якого були оточені численними дрібними везикулами. Цистерни ЕПР і Т-системи містили електронно-прозору субстанцію. У саркоплазмі кардіоміоцитів вкрай рідко виявлялися вторинні лізосоми і включення ліпідів.

Ультраструктурна організація ендотеліоцитів кровоносних капілярів міокарда 12-місячних щурів через місяць після повторного циклу РЕХВ не зазнавала суттєвих перебудов. Дистрофічних і деструктивних змін виявлено не було.

Мт мали чітко контуровані кристи й зовнішню мембрану. Гранулярний ЕПР був добре розвинений: на його мембранах виявлялися численні рибосоми, а цистерни були помірно розширеними.

Комплекс Гольджі був гіпертрофований. Паралельна орієнтація його гладких мембран порушена не була, поблизу них виявлялося багато дрібних везикул, які мали різну електронну щільність. Вкрай рідко в цитоплазмі ендотеліальних клітин траплялися дрібні включення ліпідів і вторинні лізосоми. Цитоплазматична мембрана була гладкою й чітко контурованою, не мала вогнищ деструкції та розпушення. У цитоплазмі відростків ендотеліоцитів містилися численні мікропіноцитозні пухирці (рис. 7.6, Б).

У групі експериментальних тварин 18-місячного віку через місяць після повторних циклів РЕХВ, порівнююючи з щурами контрольної групи, спостерігалися зміни, характерні для активації внутрішньоклітинних метаболічних процесів.

Ядра кардіоміоцитів містили переважно деконденсований хроматин, гранули якого рівномірно розподілялися по площі зрізу. Ядерна мембрана мала чітко контуровану структуру, властиву елементарній мембрані. Перинуклеарна зона не була розширеною і зберігала постійну ширину на всьому зрізі. Матрикс ядра був помірно просвітлений, мав середню електронну щільність.

Мт містили багато крист. Матрикс Мт мав високу електронну щільність і дрібнозернисту структуру (рис. 7.7, А). Зовнішні мембрани Мт були чіткі, без вогнищ деструкції.

Значна кількість Мт мали завихорені кристи й розташовувалися не поодинокі, а як скупчення. ЕПР був добре розвинений. Цистерни ЕПР і Т-системи мали вигляд вакуолей різної форми й розмірів. Пучки міофібрил у кардіоміоцитах розташовувалися паралельними рядами. У саркоплазмі виявлялися гранули глікогену, рибосоми й полісоми. Комплекс Гольджі був гіпертрофований, його паралельно орієнтовані гладенькі мембрани були оточені дрібними електронно-прозорими везикулами, поряд іноді виявлялися дрібні включення ліпідів.

Ядра ендотеліоцитів капілярів міокарда тварин цієї експериментальної групи через місяць після повторних 9 сеансів РЕХВ мали типову форму. Ядерна мембрана була чіткою, без вогнищ деструкції. Перинуклеарні простори були однакової ширини, без розширення. У центральній зоні ядра спостерігалися ділянки, які мали низьку електронну щільність. У каріоплазмі були дифузно розміщені гранули деконденсованого хроматину. У ядрах виявлялися осміофільні ядерця. У цитоплазмі ендотеліальних клітин містилися поодинокі Мт, матрикс яких мав дрібногранулярну структуру й середню електронну щільність. Зовнішні мембрани не містили вогнищ деструкції. Іноді в цитоплазмі траплялися Мт із перетяжками.

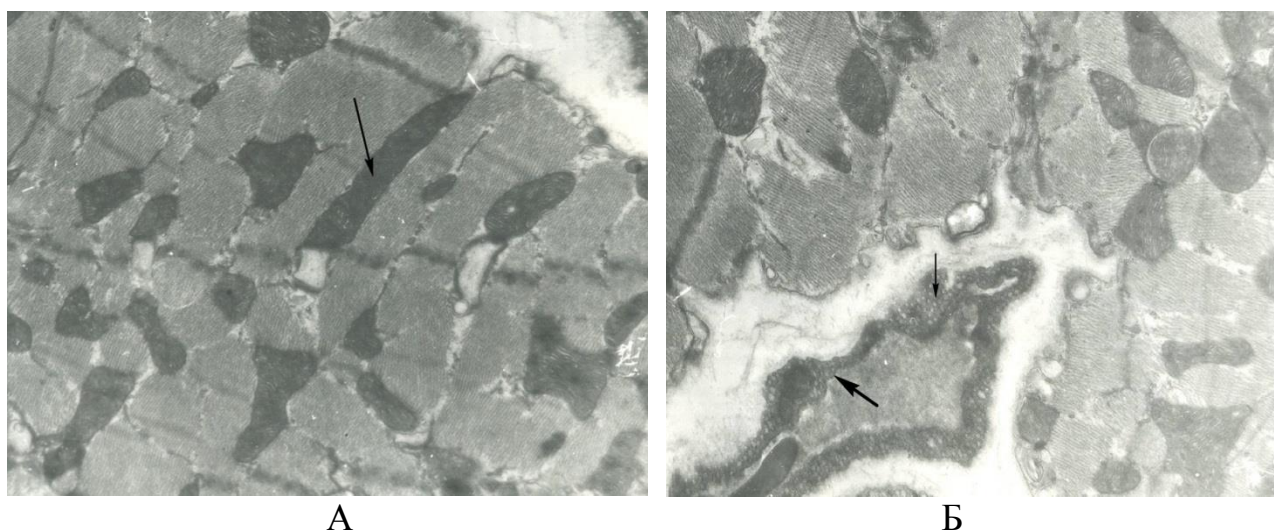


Рис. 7.7. Ультраструктура кардіоміоцитів (А) та ендотеліоцитів (Б) кровоносних капілярів міокарда 18-місячних щурів через місяць після 9 сеансів РЕХВ: А — ущільнення матриксу Мт (стрілка). Контрастовано цитратом свинцю, $\times 38\,000$; Б — осміофільна цитоплазматична мембрана (товста стрілка), мікропіноцитозні пухирці (тонка стрілка). Контрастовано цитратом свинцю, $\times 55\,000$

Цистерни гранулярного ЕПР мали вигляд вакуолей (невеликої кількості), на мембранах яких розташовувалися рибосоми.

Застосування повторних циклів РЕХВ супроводжувалося істотним збільшенням (проти контрольної групи цього віку) кількості вільних рибосом і полісом у цитоплазмі ендотеліоцитів.

Комплекс Гольджі був гіпертрофований, його гладкі мембрани були орієнтовані паралельно й зібрані в стопки. Навколо них було виявлено багато дрібних везикул різної електронної щільності. Вторинних лізосом і включень ліпідів зареєстровано не було.

Вузька смужка відростків ендотеліоцитів кровоносних капілярів була заповнена безліччю мікропіноцитозних пухирців. Цитоплазматична мембрана не містила вогнищ деструкції, однак мала високий ступінь осміофілії (рис. 7.7, Б).

Отже, аналіз змін субмікроскопічної організації кардіоміоцитів і ендотеліоцитів кровоносних капілярів міокарда 6-місячних щурів через місяць після проведення 9 процедур РЕХВ показав, що в клітинах міокарда істотних змін не спостерігалось. Ультраструктура кардіоміоцитів і ендотеліоцитів кровоносних капілярів була майже такою, як у щурів контрольної групи цього віку, за винятком просвітлення матриксу мітохондрій та укорочення крист.

Майже незмінними залишалися органели тканин і судин міокарда у 12-місячних щурів після повторного циклу РЕХВ. Водночас кількість мікропіноцитозних пухирців у цитоплазмі відростків ендотеліоцитів і кількість крист у мітохондріях кардіоміоцитів були суттєво збільшені. Зважаючи на це, а також на брак у ядрах хроматину в конденсованому стані та збільшену кількість гранул глікогену, рибосом і полісом у кардіоміоцитах, можна узагальнити, що РЕХВ сприяли активації внутрішньоклітинних метаболічних процесів у щурів 12-місячного віку. Варто зазначити, що в цитоплазмі ендотеліоцитів виявлялися численні мікропіноцитозні пухирці, а це свідчить про активацію трансцелюлярного транспорту речовин, води й електролітів.

Під час дослідження ультраструктури кардіоміоцитів і ендотеліоцитів кровоносних капілярів міокарда 18-місячних щурів після повторних циклів РЕХВ морфологічних ознак дистрофічних та деструктивних процесів,

характерних для тварин контрольних групи цього віку, виявлено не було. У цитоплазмі кардіоміоцитів не було вогнищ деструкції мембран Мт, ЕПР і гіпертрофованого комплексу Гольджі. Визначалася збільшена кількість гранул глікогену, рибосом і полісом і зменшена кількість включень ліпідів і вторинних лізосом, порівнюючи з контрольною групою. В ендотеліальних клітинах спостерігалася деконденсація ядерного хроматину, зменшення ступеня набухання Мт, поява в цитоплазмі форм Мт, які діляться, а також гіперплазія мембран гранулярного ЕПР.

Можна припустити, що застосування повторних сеансів РЕХВ (-120°C) у динаміці старіння тварин здатне збільшувати скоротливу здатність міокарда завдяки нормалізації внутрішньоклітинної біоенергетики, пов'язаної зі структурно-функціональним станом Мт, покращувати процеси мікротранспорту, у такий спосіб підвищуючи функціональний стан ендотеліоцитів. Проте, варто зазначити, що просвітлення матриксу мітохондрій та укорочення крист після першого застосування у 6-місячних щурів екстремального охолодження, вказує на помірну стресову дію РЕХВ.

7.3 Ультраструктура кардіоміоцитів і ендотеліоцитів кровоносних капілярів міокарда щурів на тлі введення кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові

Показано, що через місяць після введення 6-місячним тваринам кЯВК КК, ультраструктурна організація кардіоміоцитів відповідала контрольній групі, за винятком стану Мт і ЕПР.

ЕПР був добре розвинений, його цистерни були заповнені субстанцією, яка мала низьку електронної щільності. Пучки міофібрил розташовувалися паралельними рядами й мали чітко виражену смугастість (рис. 7.8, А).

Між міофібрилами були локалізовані поліморфні електронно-щільні Мт, форма й розміри яких варіювали в широких межах. Деякі Мт мали дрібнозернистий, електронно-щільний матрикс. В інших матрикс мав низьку

електронну щільність. Мт містили паралельно орієнтовані кристи (рис. 7.8, Б), нерідко виявлялися Мт гантелеподібної форми з перетяжками.

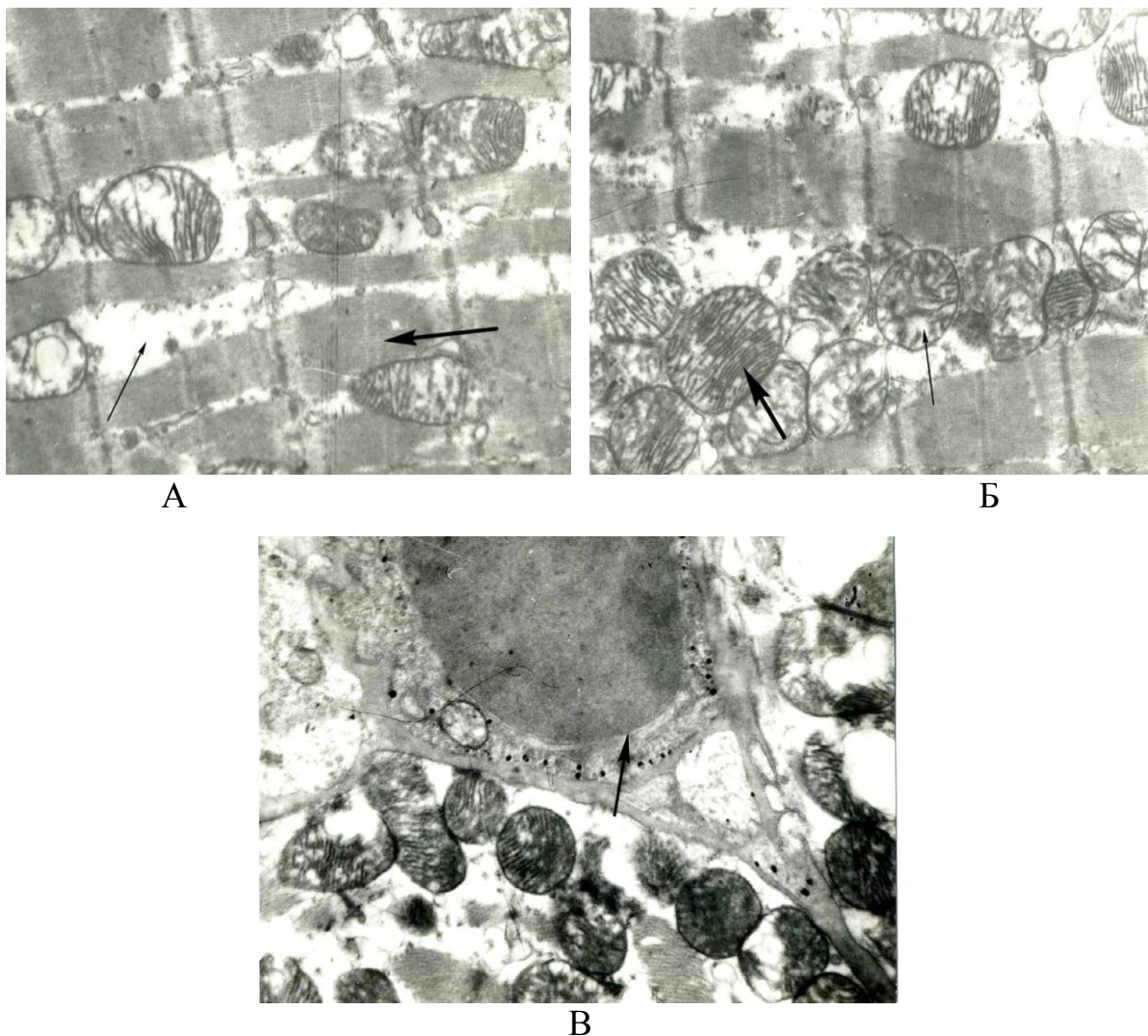


Рис. 7.8. Ультраструктура кардіоміоцитів (А, Б) й ендотеліоцитів (В) кровоносних капілярів міокарда 6-місячних щурів через місяць після введення кЯВК КК: А — електронно-прозорі цистерни ЕПР (тонка стрілка), виражена поперечна смугастість (товста стрілка). Контрастовано цитратом свинцю, $\times 37\ 000$; Б — просвітлення матриксу Мт (тонка стрілка), паралельна орієнтація крист (товста стрілка). Контрастовано цитратом свинцю, $\times 36\ 000$; В — незмінена цитоплазматична мембрана (стрілка). Контрастовано цитратом свинцю, $\times 39\ 000$

Саркоплазма кардіоміоцитів містила велику кількість вільних рибосом, полісом і гранул глікогену. Вторинні лізосоми виявлені не були. Саркоплазматична мембрана була чітко контурована, вогнищ лізису й розпушення не мала.

Ендотеліальні клітини кровоносних капілярів міокарда 6-місячних щурів через місяць після введення кЯВК КК мали типову ультраструктурну організацію. Ядерна мембрана утворювала множинні глибокі і дрібні инвагінації. Хроматин ядра перебував здебільшого в конденсованому стані. У перинуклеарній зоні розташовувалися дрібні Мт, сплюснені цистерни гранулярного ЕПР, комплекс Гольджі, а також численні полісоми й рибосоми. Деструктивних порушень цих органел виявлено не було. У цитоплазмі відростків ендотеліоцитів реєструвалося багато мікропіноцитозних пухирців. Цитоплазматична мембрана, звернена до току крові, мала типову структуру (рис. 7.8, В).

Через місяць після повторного введення 12-місячним щурам кЯВК КК ядра кардіоміоцитів мали подовжену форму й типову локалізацію в саркоплазмі. Ядерний хроматин перебував переважно в деконденсованому стані, його гранули були дифузно розсіяні по матриксу ядра. Ядерна мембрана була чітко контурованою, без вогнищ розпушення й деструкції. Каріоплазма мала дрібногранулярну структуру й середню електронну щільність. Перинуклеарні простори були помірної, рівномірної ширини.

Міофібрили розташовувалися паралельними рядами, мали типову для кардіоміоцитів будову й чітку поперечну смугастість. Між пучками міофібрил розташовувалися великі і дрібні Мт, переважно подовженої форми. Матрикс Мт мав дрібногранулярну структуру й середню електронну щільність. Частина Мт містила просвітлений у деяких осередках матрикс. Зовнішні мембрани були чітко контуровані, без вогнищ лізису. Численні кристи були орієнтовані паралельно (рис. 7.9, А).

Саркоплазматична мембрана істотно не відрізнялася від контрольної групи цього віку. ЕПР і Т-система являли собою дрібні електронно-прозорі вакуолі.

Саркоплазма кардіоміоцитів мала середню електронну щільність. У ній розташовувалися численні рибосоми, полісоми і гранули глікогену. Вторинні лізосоми і включення ліпідів не виявлялися.

Ендотеліальні клітини кровоносних капілярів 12-місячних щурів після повторного введення кЯВК КК мали цитоплазму дрібногранулярної структури й середньої електронної щільності. Ядра містили як конденсований, так і деконденсований хроматин. Ядерна мембрана утворювала глибокі і дрібні інвагінації (рис. 7.9, Б). Вогнищ лізису виявлено не було. Нечисленні Мт мали осміофільний матрикс. Цитоплазматична мембрана була чітко контурованою, без вогнищ руйнування. Гранулярний ЕПР і комплекс Гольджі мали типову будову. У цитоплазмі відростків ендотеліоцитів було виявлено велику кількість мікропіноцитозних пухирців.

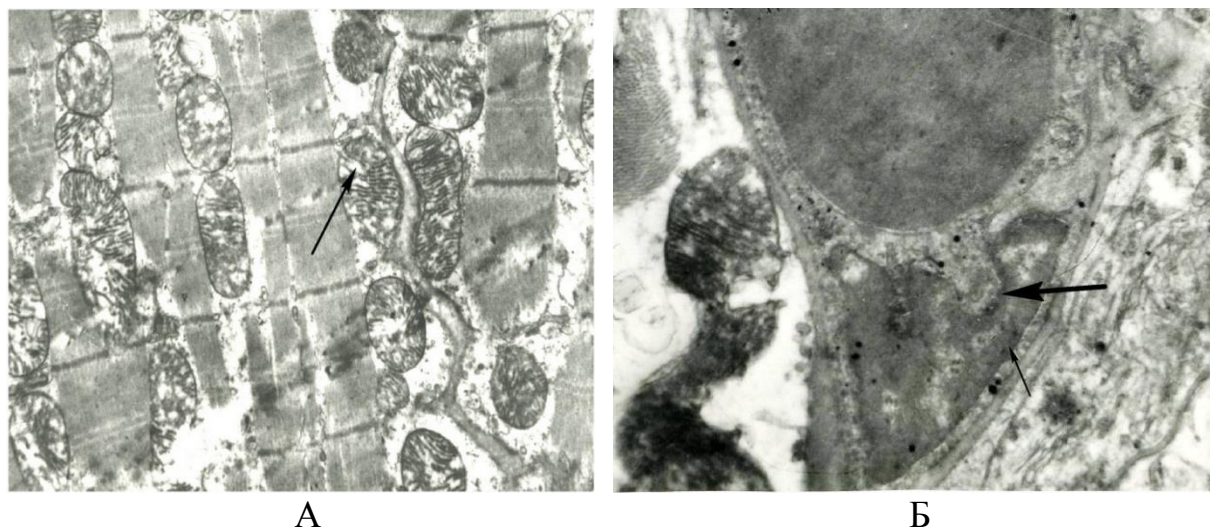


Рис. 7.9. Ультраструктура кардіоміоцитів (А) й ендотеліоцитів (Б) кровоносних капілярів міокарда 12-місячних щурів через місяць після введення кЯВК КК: А — осередкове просвітлення матриксу Мт (стрілка). Контрастовано цитратом свинцю, $\times 38\,000$; Б — інвагінація ядерної мембрани (товста стрілка), конденсація хроматину (тонка стрілка). Контрастовано цитратом свинцю, $\times 43\,000$

Ядра кардіоміоцитів міокарда 18-місячних щурів після повторних введень кЯВК КК мали витягнуту форму й типове розташування в саркоплазмі. Ядерний хроматин, у деяких кардіоміоцитах, перебував у деконденсованому стані в центральній ділянці зрізу ядра, і, як конденсовані грудочки, переважно вздовж ядерної мембрани. Ядерна мембрана подекуди була істотно розпушена, виявлялися осередки її лізису. Перинуклеарні простори були помірно й нерівномірно розширені.

Міофібрили були розміщені паралельними рядами, мали типову будову й чітку поперечну смугастість. Між пучками міофібрил виявлялися Мт, які мали сферичну форму. Їхній матрикс мав знижену електронну щільність і гомогенну структуру. Зовнішні мембрани і кристи деяких Мт були розпушені.

Саркоплазма кардіоміоцитів мала низьку електронну щільність, у ній була істотно знижена, порівнюючи з групою контрольних щурів цього віку, кількість рибосом, полісом і гранул глікогену. Цистерни ЕПР і Т-системи містили дрібногранулярну субстанцію з низькою електронною щільністю. Структура саркоплазматичної мембрани відповідала елементарній мембрані (рис. 7.10, А).

Ендотеліальні клітини кровоносних капілярів мали цитоплазму середньої електронної щільності. Ядра містили деконденсований хроматин, гранули якого були рівномірно розсіяні по центральній ділянці каріоплазми (рис. 7.10, Б). Ядерна мембрана утворювала велику кількість глибоких і дрібних інвагінацій. Вогнищ розпушення й лізису не було. У цитоплазмі реєструвалися дрібні Мт з осміофільним матриксом і великою кількістю крист, траплялися Мт гантелеподібної форми. Цистерни гранулярного ЕПР були потовщені, заповнені тонковолокнистою субстанцією. На мембранах виявлялися численні рибосоми. Вторинних лізосом і включень ліпідів не було, натомість виявлялося досить багато рибосом і полісом. Цитоплазматична мембрана була чітко контурована, без вогнищ руйнування. У цитоплазмі відростків ендотеліоцитів нами було визначено велику кількість мікропіноцитозних пухирців.

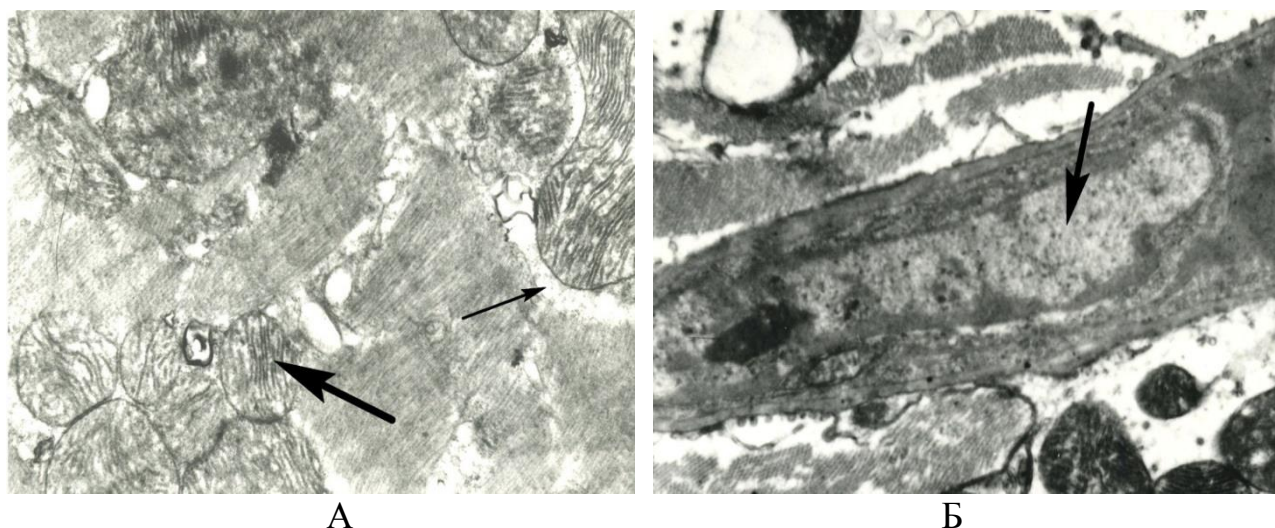


Рис. 7.10. Ультраструктура кардіоміоцитів (А) й ендотеліоцитів (Б) кровоносних капілярів міокарда 18-місячних щурів через місяць після введення кЯВК КК: А — розширення цистерн ЕПР і Т-системи (тонка стрілка), паралельна орієнтація крист Мт (товста стрілка). Контрастовано цитратом свинцю, $\times 37\,000$; Б — деконденсований хроматин у центральній ділянці матриксу ядра (стрілка). Контрастовано цитратом свинцю, $\times 48\,000$

Аналіз ультраструктурної організації кардіоміоцитів 24-місячних щурів після повторних введень кЯВК КК виявив прояви активації, порівняно до контрольної групи цього віку, репаративних і синтетичних процесів. Ядра кардіоміоцитів містили велику кількість деконденсованого хроматину. Його гранули рівномірно розташовувалися як на периферії ядра, так і в центральній зоні каріоплазми. Кількість конденсованого хроматину була істотно зменшена проти контрольної групи. Вогнища лізису й розпушення ядерної мембрани також траплялися рідше, ніж у контрольній групі, хоча чітко контурованою ядерна мембрана все ж не була.

Ступінь набухання Мт і їхній об'єм також були нижчі від контрольної групи, значно збільшувалася кількість крист у Мт. Ознак розвитку вогнищового лізису зовнішніх мембран і крист Мт не було, проте все ж виявлялось осередкове просвітлення матриксу (рис. 7.11, А). У саркоплазмі кардіоміоцитів траплялися Мт з перетяжками.

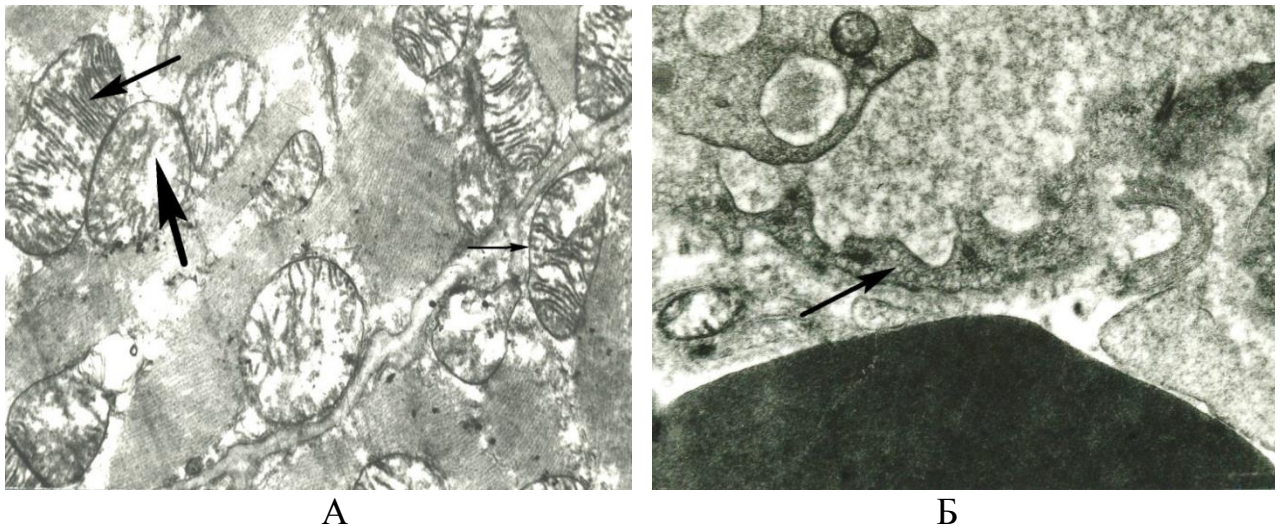


Рис. 7.11. Ультраструктура кардіоміоцитів (А) й ендотеліоцитів (Б) кровоносних капілярів міокарда 24-місячних щурів через місяць після введення кЯВК КК: А — чітко контуровані зовнішні мембрани (тонка стрілка), паралельно орієнтовані кристи Мт (стрілка середньої товщини), осередки просвітлення матриксу (товста стрілка). Контрастовано цитратом свинцю, $\times 40\,000$; Б — численні мікропіноцитозні пухирці в цитоплазмі відростків (стрілка). Контрастовано цитратом свинцю, $\times 56\,000$

Пучки міофібрил, на відміну від контрольної групи, мали паралельну орієнтацію. Саркоплазма була електронно-прозора, містила невелику кількість гранул глікогену, рибосом і полісом. Цистерни ЕПР, як і цистерни Т-системи, були розширені.

Помірно редукований комплекс Гольджі був розташований у перинуклеарній зоні. Його гладенькі мембрани мали дезорганізований вигляд. У ділянці локалізації комплексу виявлялися великі і дрібні електронно-прозорі вакуолі. У саркоплазмі кардіоміоцитів рідше від контрольної групи траплялися вторинні лізосоми і включення ліпідів. Саркоплазматична мембрана мала помірно розпушений вигляд, але осередків руйнування не було.

Прояви активації, порівняно до контрольної групи цього віку, репаративних і синтетичних процесів були зареєстровані і в ендотеліоцитах

кровоносних капілярів міокарда 24-місячних щурів після повторних введень кЯВК КК. У ядрах ендотеліоцитів спостерігалася деконденсація хроматину, гранули якого були рівномірно розподілені по площі зрізу ядра. Ядерна мембрана мала численні інвагінації, рідше виявлялися вогнища розпушення й лізису. Перинуклеарна зона була рівномірної ширини. Виявлялися форми Мт, характерні для їхнього поділу. Цитоплазматична мембрана була розпушена й мала осередки руйнування. На її поверхні виявлялися скупчення осміофільної субстанції. Кількість мікропіноцитозних пухирців у цитоплазмі відростків ендотеліальних клітин була суттєво збільшена проти контрольної групи (рис. 7.11, Б).

Аналіз отриманих експериментальних даних дає змогу зробити висновок, що суттєвих відмінностей від контрольних груп в ультраструктурній організації органел кардіоміоцитів і ендотеліоцитів кровоносних капілярів міокарда щурів 6- і 12-місячного віку, на тлі введення кЯВК КК не спостерігалось.

У деяких кардіоміоцитах виявлялося набухання і зниження електронної щільності Мт, просвітлення матриксу ядра й саркоплазми. Описані ультраструктурні перебудови свідчили про розвиток помірної мітохондріальної дисфункції, яка істотно не впливає на скоротливу здатність кардіоміоцитів.

Водночас у кардіоміоцитах зростала активність репаративних процесів, на що вказувало збільшення кількості рибосом, полісом і гранул глікогену в саркоплазмі. Зазначені субмікроскопічні перебудови є компенсаторно-адаптаційні й не перевищують межі фізіологічної компенсації.

В ендотеліоцитах кровоносних капілярів міокарда істотно зростала активність трансцелюлярного транспорту речовин. Це підтверджувалося збільшенням кількості мікропіноцитозних пухирців, рибосом і полісом.

У 18- і 24-місячних експериментальних тварин після повторних введень кЯВК КК спостерігалися більш виражені зміни субмікроскопічної організації тканин і судин міокарда. У саркоплазмі кардіоміоцитів 18-місячних щурів вторинних лізосом і включень ліпідів не було, а в групі 24-місячних тварин вони виявлялися лише в деяких кардіоміоцитах. У саркоплазмі кардіоміоцитів

істотно зростала кількість гранул глікогену, полісом і рибосом проти тварин контрольної групи цього віку.

Ендотеліоцити кровоносних капілярів міокарда набували типової ультраструктурної організації.

Отже, повторні введення кЯВК КК у динаміці старіння тварин супроводжувалися підвищенням та відновленням активності метаболічних і синтетичних процесів у тканинах і судинах міокарда. Найбільш вираженими ці зміни були в старих тварин.

7.4 Перебудови органел кардіоміоцитів і ендотеліоцитів міокарда щурів після поєднаного застосування екстремального охолодження і кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові

Встановлено, що у 6-місячних щурів через місяць після поєднаного застосування 9 сеансів РЕХВ і кЯВК КК ультраструктурна організація кардіоміоцитів загалом залишалася такою ж, як і у тварин контрольної групи цього віку.

Нами виявлено різні форми Мт кардіоміоцитів. Здебільшого Мт мали дрібногранулярний матрикс і велику кількість укорочених крист. Кількість крист була дещо збільшена, порівнюючи з контролем. Матрикс Мт мав середню електронну щільність. Водночас, траплялися Мт із перетяжками. Невелика частина Мт містила електронно-прозорий матрикс і дезорганізовані кристи (рис. 7.12, А), що було подібним до виявлених змін на тлі самостійного застосування циклу РЕХВ щурам 6-місячного віку.

Цистерни ЕПР і Т-системи містили дрібногранулярну субстанцію. Комплекс Гольджі був гіпертрофований. У саркоплазмі було виявлено невелику кількість гранул глікогену, рибосом і полісом. Гіалоплазма мала середню електронну щільність.

Ендотеліоцити кровоносних капілярів мали ядра неправильної форми з чітко контурованою ядерною мембраною і дрібнозернистим матриксом. Значна

частина хроматину перебувала в деконденсованому стані. Деструкції ядерної мембрани не було. Мт ендотеліальних клітин містили поодинокі кристи та електронно-щільний матриксом. У препаратах виявлялися Мт гантелеподібної форми.

Гранулярний ЕПР був розвинений помірно, на його мембранах виявлялася велика кількість рибосом. Комплекс Гольджі був гіпертрофований, його гладкі мембрани були орієнтовані паралельно й зібрані в стопки.

У цитоплазмі ендотеліоцитів зареєстровано велику кількість мікропіноцитозних пухирців, численні полісоми й рибосоми. Включення ліпідів і вторинні лізосоми не виявлялися.

Цитоплазматична мембрана, звернена до просвіту капіляра, мала множинні інвагінації (рис. 7.12, Б).

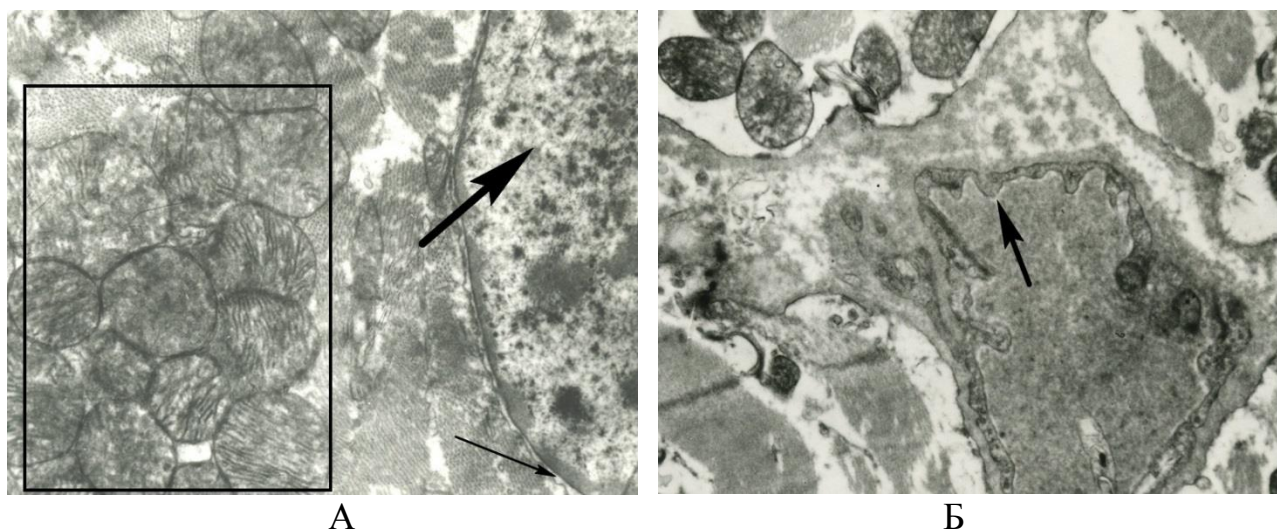


Рис. 7.12. Ультраструктура кардіоміоцитів (А) й ендотеліоцитів (Б) кровоносних капілярів міокарда 6-місячних щурів через місяць після поєднаного застосування РЕХВ та кЯВК КК: А — деконденсація хроматину (товста стрілка), рівномірне розширення перинуклеарного простору (тонка стрілка), скупчення Мт у перинуклеарному просторі (рамка). Контрастовано цитратом свинцю, $\times 40\,000$; Б — інвагінації цитоплазматичної мембрани, зверненої до току крові (стрілка). Контрастовано цитратом свинцю, $\times 42\,000$

У 12-місячних щурів через місяць після повторного поєданого застосування 9 процедур РЕХВ і кЯВК КК субмікроскопічна будова кардіоміоцитів і ендотеліоцитів кровоносних капілярів свідчила про активацію метаболічних і синтетичних процесів.

Ядра кардіоміоцитів містили деконденсований хроматин. У каріоплазмі розташовувалися осміофільні ядерця. Ядерна мембрана була гладкою, перинуклеарна зона не розширеною.

Мт у кардіоміоцитах розташовувалися рівномірними рядами уздовж міофібрил. Зовнішні мембрани і кристи не мали вогнищ деструкції. Матрикс Мт мав різну електронну щільність. Істотно збільшувалася кількість крист у Мт проти кардіоміоцитів щурів 12-місячного віку контрольної групи.

Цистерни ЕПР і Т-системи були розширені. У саркоплазмі виявлялися численні рибосоми, полісоми і гранули глікогену (рис. 7.13, А).

Саркоплазма залишалася помірно просвітленою, а саркоплазматична мембрана не зазнала суттєвих змін. Міофібрили, зібрані в пучки, мали паралельну орієнтацію й чітку поперечну смугастість.

Ультраструктурні перебудови ендотеліоцитів кровоносних капілярів міокарда свідчили про активацію внутрішньоклітинного метаболізму. Саркоплазма набувала дрібнозернистої структури й середньої електронної щільності. Ядра ендотеліальних клітин містили переважно деконденсований хроматин, гранули якого дифузно розподілялися по матриксу ядра. Чітко контурована ядерна мембрана утворювала дрібні і глибокі інвагінації, проте не мала вогнищ розпушення й лізису (рис. 7.13, Б).

Мт мали помірно просвітлений, дрібнозернистий матрикс і незмінені кристи. Були виявлені Мт гантелеподібної форми. Цистерни гранулярного ЕПР були сплюснені.

Число рибосом, як пов'язаних із мембранами ЕПР, так і вільних, було істотно збільшене, порівнянно до контрольної групи цього віку. Комплекс Гольджі був гіпертрофований. Включення ліпідів і вторинні лізосоми не виявлялися. Кількість мікропіноцитозних пухирців, які були локалізовані

уздовж цитоплазматичної мембрани, була суттєво збільшеною проти контрольної групи цього віку.

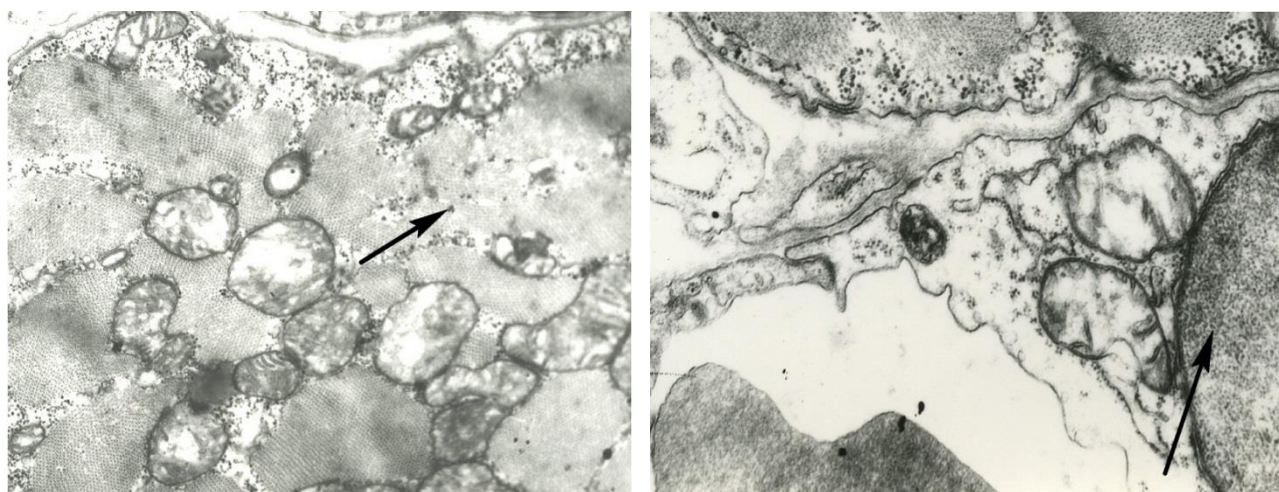


Рис. 7.13. Ультраструктура кардіоміоцитів (А) й ендотеліоцитів (Б) кровоносних капілярів міокарда 12-місячних щурів через місяць після поєднаного застосування РЕХВ та кЯВК КК: А — численні гранули глікогену в саркоплазмі (стрілка). Контрастовано цитратом свинцю, $\times 40\,000$; Б — деконденсація хроматину (стрілка). Контрастовано цитратом свинцю, $\times 42\,000$

Через місяць після повторного поєднаного застосування 9 сеансів РЕХВ і кЯВК КК у 18-місячних щурів виявлялися морфологічні ознаки розвитку репаративних процесів та активації метаболізму, порівнюючи з тваринами контрольної групи цього віку.

Ядра кардіоміоцитів мали типову форму й розміри. Ядерна мембрана утворювала численні глибокі і дрібні інвагінації. Нами виявлено зниження кількості конденсованого ядерного хроматину. У перинуклеарній зоні саркоплазми містилася велика кількість органел і мембран ЕПР.

Мт мали дрібногранулярний матрикс середньої електронної щільності та досить велику кількість крист. Особливо привертала увагу поява в цій групі тварин Мт гантелеподібної форми. Поліморфізм форм і розмірів Мт поєднувався з різним ступенем осміофілії їхнього матриксу, який мав ділянки з

дуже низькою електронною щільністю (рис. 7.14, А). Кристи Мт були паралельно орієнтовані, а зовнішні мембрани чітко контуровані.

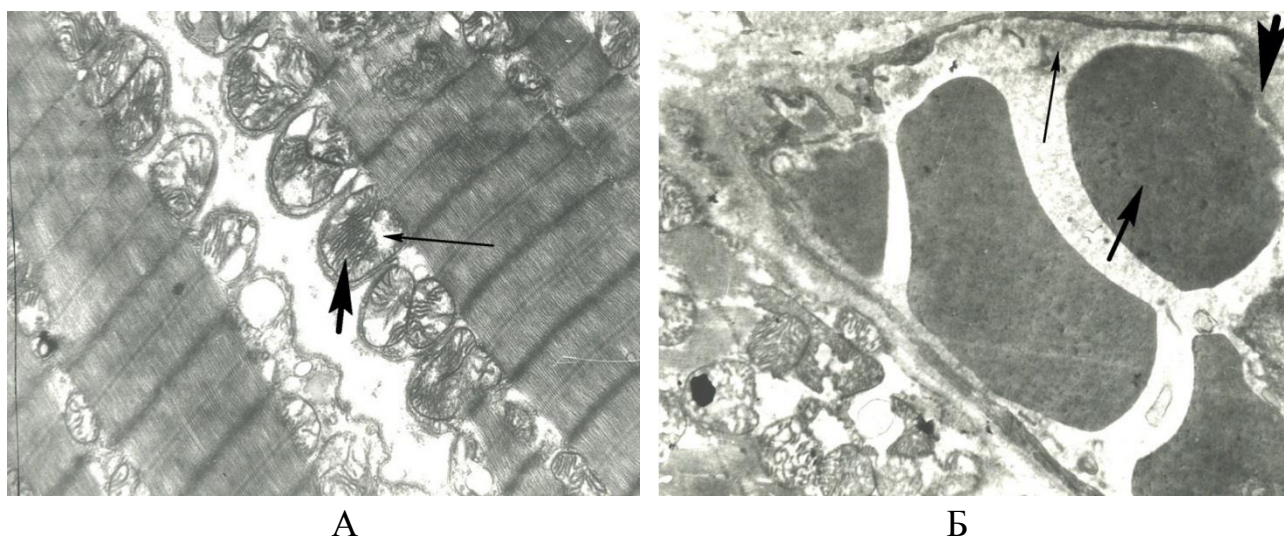


Рис. 7.14. Ультраструктура кардіоміоцитів (А) й ендотеліоцитів (Б) кровоносних капілярів міокарда 18-місячних щурів через місяць після поєданого застосування РЕХВ та кЯВК КК: А — ділянки просвітлення матриксу мітохондрій (тонка стрілка), паралельна орієнтація крист (товста стрілка). Контрастовано цитратом свинцю, $\times 38\ 000$; Б — розпушення цитоплазматичної мембрани (товста стрілка), еритроцити (стрілка середньої товщини), детрит осміофільної субстанції (тонка стрілка). Контрастовано цитратом свинцю, $\times 65\ 000$

Цистерни ЕПР і вакуолі Т-системи були сплюснені, їхній вміст мав тонковолокнисту структуру й різну електронну щільність.

У саркоплазмі кардіоміоцитів виявлялася збільшена, проти контрольної групи цього віку, кількість рибосом, полісом і гранул глікогену. Водночас вторинні лізосоми, включення ліпідів і ліпофусцину не виявлялися. Комплекс Гольджі був гіпертрофований, поруч із паралельно орієнтованими гладкими мембранами виявлялося безліч дрібних везикул, заповнених речовиною з різною електронною щільністю. Скоротливі елементи кардіоміоцитів були орієнтовані паралельно, визначалася їхня чітка поперечна смугастість.

Саркоплазматична мембрана мала типову будову, властиву елементарній мембрані.

Спостерігалися морфологічні ознаки активації внутрішньоклітинних процесів і в ендотеліальних клітинах кровоносних капілярів міокарда. Кількість мікропіноцитозних пухирців у відростках ендотеліоцитів, а також крист у мітохондріях, рибосом і полісом у цитоплазмі була збільшеною, комплекс Гольджі був гіпертрофованим, відбувалася деконденсація хроматину.

Цитоплазматична мембрана була помірно розпушеною й набувала типової будови. У просвіті капілярів виявлялися еритроцити й неструктурний детрит із різною електронною щільністю (рис. 7.14, Б).

У групі 24-місячних щурів на тлі повторного поєднаного застосування РЕХВ і кЯВК КК в ультраструктурній організації кардіоміоцитів міокарда виявлялися ознаки як дистрофічних, так і репаративних змін органел.

Ядерна мембрана була сильно розпушеною, однак не містила вогнищ лізису, на відміну від контрольної групи цього віку. Перинуклеарні зони були нерівномірно розширені. Ступінь конденсації ядерного хроматину був нижчим від контрольного. Осміофільні грудочки конденсованого хроматину розташовувалися як поблизу ядерної мембрани, так і в інших відділах матриксу ядра. Центральна ділянка ядра мала низьку електронну щільність і була заповнена гранулами деконденсованого хроматину.

Саркоплазма кардіоміоцитів зберігала низьку електронну щільність, у ній була істотно збільшеною проти контрольної групи цього віку кількість вільних рибосом, полісом і гранул глікогену.

Найбільш виражені трансформації як дистрофічного, так і репаративно-синтетичного характеру спостерігалися в мітохондріях. Частина Мт містила дрібногранулярний матрикс, численні кристи й чітко контуровані зовнішні мембрани (рис. 7.15, А).

Цистерни ЕПР були сплюснені, проте, як і в контрольній групі цього віку, спостерігалася їхня низька електронна щільність. Нами виявлено гіпертрофію комплексу Гольджі, що виражалось в збільшенні навколо стопок гладких

мембран кількості дрібних везикул. Кількість включень ліпідів і ліпофусцину в саркоплазмі була істотно зменшена, порівнюючи з контрольною групою цього віку.

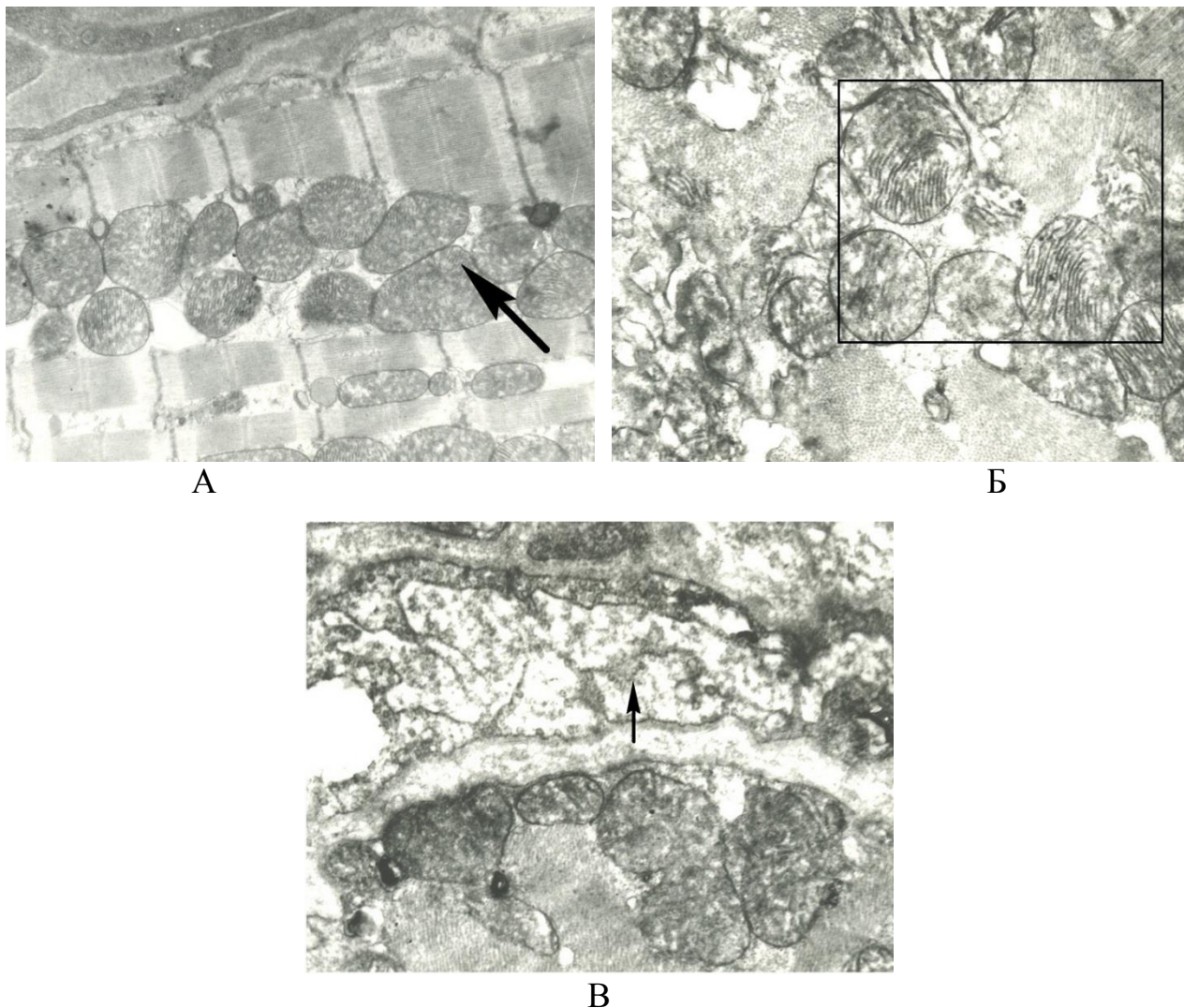


Рис. 7.15. Ультраструктура кардіоміоцитів (А, Б) та ендотеліоцитів (В) кровоносних капілярів міокарда 24-місячних щурів через місяць після поєднаного застосування РЕХВ та кЯВК КК: А — велика кількість крист у мітохондріях (стрілка). Контрастовано цитратом свинцю, $\times 36\,000$; Б — скупчення Мт із вигнутими кристами (виділено рамкою). Контрастовано цитратом свинцю, $\times 52\,000$; В — велика кількість мікропіноцитозних пухирців у цитоплазмі (стрілка). Контрастовано цитратом свинцю, $\times 68\,000$

В інших кардіоміоцитах було зареєстровано прояви активації системи репарації, зокрема наявність гантелеподібних форм Мт. У деяких кардіоміоцитах виявлялися скупчення Мт, кристи в них були вигнуті й орієнтовані паралельно (рис. 7.15, Б).

Ендотеліоцити кровоносних капілярів міокарда містили ознаки виражених репаративних змін. Ядра мали неправильну форму і звичайні розміри. Ядерна мембрана утворювала велику кількість неглибоких інвагінацій. Перинуклеарні зони мали невеликі ділянки розширення. Кількість конденсованого хроматину була істотно знижена проти контрольної групи тварин 24-місячного віку. Мт були набряклі, матрикс усе ж мав низьку електронну щільність. Зовнішні мембрани Мт майже не містили вогнищ лізису. Нами виявлено велику кількість Мт гантелеподібної форми. Гранулярний ЕПР у ендотеліоцитах був здебільшого гіпертрофований, на його мембранах виявлялися численні рибосоми. Комплекс Гольджі також був гіпертрофований. Дуже рідко виявлялися включення ліпідів і вторинні лізосоми. У цитоплазмі відростків ендотеліальних клітин, на відміну від контрольної групи цього віку, виявлялася велика кількість мікропіноцитозних пухирців (рис. 7.15, В). У просвіті капіляра було зареєстровано скупчення речовини різної електронної щільності.

Узагальнюючи отримані експериментальні дані щодо ультрамікроскопічної організації кардіоміоцитів та ендотеліоцитів кровоносних судин капілярів на тлі поєднаного застосування РЕХВ і кЯВК КК, можна зробити висновок, що в групі 6- і 12-місячних щурів дистрофічних змін зареєстровано не було. Водночас, на препаратах виявлялися форми мітохондрій, які діляться, а в мітохондріях кардіоміоцитів збільшувалася кількість крист, що дає змогу говорити про зростання біоенергетичного забезпечення внутрішньоклітинних метаболічних процесів. Збільшення кількості рибосом, полісом і гранул глікогену в саркоплазмі свідчило про високий рівень скорочувальної здатності кардіоміоцитів.

Через місяць після повторних 9 сеансів РЕХВ і введення кЯВК КК в ультраструктурі кардіоміоцитів і ендотеліальних клітин міокарда 18-місячних

щурів, на відміну від контрольних тварин аналогічного віку, у цитоплазмі не було вторинних лізосом і включень ліпідів. Зменшувалася ступінь набухання Мт, майже не було вогнищ деструкції зовнішніх мембран і крист. Цитоплазматична мембрана, звернена до току крові, набувала типової будови.

У 24-місячних щурів повторне поєднане застосування РЕХВ і кЯВК КК супроводжувалось істотним зниженням ступеня вираженості дистрофічних і деструктивних порушень кардіоміоцитів і ендотеліоцитів кровоносних капілярів. Ці зміни здебільшого стосувалися Мт, які відрізнялися меншим ступенем набухання, порівнюючи з групою контрольних тварин цього віку. Крім того, набагато рідше траплялися вторинні лізосоми і включення ліпідів. Зростала кількість рибосом, полісом і гранул глікогену, що є показником збільшення резервних скорочувальних механізмів міокарда.

Отже, нами було проаналізовано субмікроскопічні зміни, котрі відбуваються в тканинах і судинах міокарда, як у процесі природного старіння тварин, так і після самостійного й поєданого застосування РЕХВ і кЯВК КК. Встановлено, що поєднане застосування РЕХВ і введення кЯВК КК надає більш виражений позитивний вплив на субмікроскопічну організацію досліджуваних клітин. Це підтверджується змінами їхньої структурної організації вже в молодому віці (6 місяців). На препаратах реєструвалися гантелеподібні форми Мт, збільшувалася кількість крист у них. У 18-місячних щурів майже не було ознак розвитку дистрофічного процесу, властивого тваринам контрольної групи. Найбільш виражені зміни репаративного характеру на тлі поєданого застосування РЕХВ і кЯВК КК виявлялися в кардіоміоцитах і ендотеліоцитах 24-місячних щурів. У той час, коли в контрольній групі органи здебільшого зазнавали деструктивних змін, у групі поєданого впливу спостерігалось лише розпушення їхньої структури, без вогнищ лізису.

За матеріалами розділу 7 опубліковані роботи [83, 84, 90, 106, 107, 133, 237].

УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Геронтологічні програми набули широкого розповсюдження. Пошук нових методів, спрямованих на збереження і поліпшення якості життя літніх людей, є одним з провідних завдань біомедичних досліджень [4, 5, 67, 155, 189].

Оскільки старіння не є патологічним станом, а являє собою послідовний природний фізіологічний процес, який супроводжується виснаженням захисних і регуляторних механізмів [18, 38, 169], зменшенням пластичності адаптаційних процесів [30, 44, 60], зниженням загальної життєздатності організму [68], і, як наслідок, розвитком гострих і хронічних захворювань різних органів і систем, надзвичайно важливим для медико-біологічних цілей є пошук нових способів впливу на організм, здатних надавати генералізовану, стимулюючу дію на гомеостатичні регуляторні системи та особливо таких, які запобігають зниженню власних адаптаційно-регуляторних можливостей літнього організму.

Відомо, що ритмічне екстремальне охолодження, яке є модулятором активності власних ендогенних ритмів, підвищує лабільність регуляторних процесів у ЦНС і ССС, стимулює їхні прямі та зворотні зв'язки, нормалізує симпато-парасимпатичний баланс ВНС з подальшою оптимізацією механізмів гомеостазу [8].

КК містить СК [40, 248, 286], у тому числі гемопоетичні клітини-попередники [40, 41, 56, 113, 161, 288], які відрізняються більш вираженою здатністю до проліферації й диференціації, порівнюючи зі СК, виділеними із кісткового мозку дорослого організму [42, 139, 219], а також велику кількість біологічно активних речовин, в тому числі і ростових факторів. Така особливість КК надає змогу розглядати її як перспективний геропротектор, котрий може запобігти або уповільнити розвиток і прогресування вікової патології.

Нами вивчено дію РЕХВ (-120°C), введення кЯВК КК та їх поєднаного застосування на структурно-функціональні показники регуляторних систем

організму щурів у динаміці їхнього природного старіння, починаючи з 6-місячного віку.

Встановлено, що в процесі старіння щурів, спостерігається зниження всіх досліджуваних параметрів варіабельності кровообігу.

Показано, що у старих щурів на тлі одноразового застосування сеансів PEXB пік активності регуляторних систем організму відзначався після 9 процедури охолодження. Зростання загальної спектральної потужності ВСР (у 2,7 раза) було результатом активації вегетативних центрів (HF і LF-компонент). Через місяць після охолодження зменшувався тонус симпатичного і парасимпатичного відділу ВНС на тлі підвищеної активності гуморально-метаболічного ланки (VLF-компонент перевищував контрольний у 7 разів), характерною особливістю якого є здатність забезпечувати регуляцію серцевого ритму і адаптивно-компенсаторні реакції організму в старості.

За повторного використання PEXB у динаміці старіння тварин (починаючи з 6-місячного віку), встановлено, що значення загальної спектральної потужності у 6-місячних щурів значно збільшувалося проти контрольного, як після 3-го, 6-го та 9-го сеансу PEXB, і у віддалені терміни спостереження (через тиждень і місяць після останньої процедури охолодження). У віддалені терміни спостереження показники ТР зростали в 4,9 раза. Істотно підвищувалася активність симпатичного і парасимпатичного відділу ВНС (у 5,3 і 5,1 раза, відповідно) і меншою мірою гуморальної ланки регуляції (у 2,6 раза).

Схожа динаміка зміни основних показників спектрального аналізу ВСР нами була відзначена в групах 12- і 18-місячних тварин на тлі повторних циклів ритмічного екстремального охолодження. Найвищі значення ТР реєструвалися через тиждень після 9 сеансів PEXB (збільшення проти контрольного показника в 5,7 і 6 разів, відповідно), водночас через місяць (на відміну від 6-місячних щурів) відбувалося статистично значуще зниження її показників проти попереднього терміну спостережень. Активність усіх ланок нейрогуморальної регуляції зберігалася підвищеною, порівнюючи з контрольними показниками

(для 12-місячних щурів LF — у 5,5, HF — у 4,1 і VLF — у 4,5 рази, для 18-місячних тварин — у 5, 4 і 3 рази, відповідно).

Сприятливим є той факт, що підйом TP був результатом не стільки підвищення активності гуморальної-метаболічної ланки регуляції, переважання якої типове для літнього віку, скільки завдяки збільшенню тону вегетативних центрів, причому парасимпатичні впливи на міокард превалювали над симпатичними.

Аналіз хвильової структури серцевого ритму у 24-місячних щурів на наступну добу і через 3 дні після одноразового введення кЯВК КК показав поступове зростання загальної потужності спектра ВСР проти контрольної завдяки активації вегетативних центрів. У віддалені терміни спостереження зазначено більш істотне збільшення внеску в структуру спектра парасимпатичних і симпатичних впливів на міокард на тлі незмінної активності гуморально-метаболічної ланки регуляції (за місяць HF-компонент підвищувався у 2,7 рази, LF-компонент — у 1,9 рази, TP — у 2,3 рази).

На наступну добу, через 3 дні та тиждень після введення 6- і 12-місячним щурам кЯВК КК відбувалося поступове збільшення показників TP проти контрольних, переважно завдяки підвищенню тону симпатичного й парасимпатичного відділу ВНС (LF- і HF-компонент). Проведений спектральний аналіз ВСР у тварин зазначених вікових груп через місяць після введення кЯВК КК показав істотне підвищення значень TP, як проти попередніх етапів експериментальних досліджень, так і проти контрольних показників (у 7,3 і 7,9 рази, проти відповідного контрольного показника). Її зростання було результатом активації ВНС і гуморальної ланки регуляції (збільшення LF у 7,3, HF у 8,3, VLF у 2 рази для 6-місячних і в 9,3; 7,4 і 6,9 рази для 12-місячних щурів).

Повторне застосування кЯВК КК експериментальним 18- і 24-місячним тваринам на всіх етапах спостережень сприяло активації як гуморально-метаболічної ланки регуляції, так і вегетативних центрів, які є найвищим

рівнем організації автономної нервової системи, котра є найбільш розвиненим і швидким шляхом реалізації ефектів нейрогуморальної регуляції.

Відмінною особливістю є той факт, що у 24-місячних тварин, яким вводили кЯВК КК, починаючи з молодого віку, показник ТР перевищував аналогічний контрольний рівень у 8,3 раза, тоді як у старих щурів після одноразового введення зафіксовано його збільшення лише у 2,3 раза. Крім того, у першому випадку спостерігалася активація не тільки ВНС, а й гуморально-метаболічного ланки регуляції (збільшення LF-компонента в 10, HF — у 8,2 і VLF — у 5,4 раза), у другому — тільки ВНС (збільшення LF-компонента в 1,9, HF — у 2,7 раза).

Отже, застосування кЯВК КК протягом життєвого циклу тварин (кожні 6 місяців) дає змогу зберегти функціональний стан ВНС на більш «молодому» фізіологічному рівні, підвищити ефективність адаптаційного-компенсаторних механізмів у старості, збільшити індивідуальну стійкість організму до розвитку захворювань, супутніх старінню.

У 24-місячних щурів на тлі одноразового поєднаного застосування РЕХВ і кЯВК КК найвищі показники ТР (які в 5,5 раза перевищували контрольні значення) були зареєстровані на наступну добу і через 3 дні після 9 сеансів РЕХВ і введення кЯВК КК. Її зростання було результатом підвищення тону вегетативних центрів. У віддалені терміни спостереження (через тиждень і місяць після останньої процедури РЕХВ і введення кЯВК КК) значення загальної потужності спектра ВСР знижувалися, порівнюючи з попереднім етапом досліджень, однак суттєво перевершували показники контролю (ТР — у 2,6, VLF — у 1,7 ($p > 0,05$), LF — у 2,3, HF — у 3 рази).

Встановлено, що у 6-місячних щурів після поєднаного застосування РЕХВ і кЯВК КК в усі терміни експериментальних досліджень загальна потужність спектра ВСР зростала проти контрольних значень переважно завдяки підвищенню тону симпатичного й парасимпатичного відділів ВНС. Активність гуморальної ланки значуще збільшувалася у віддалені терміни

спостереження. Через місяць зафіксовано збільшення ТР у 7,5, VLF у 1,9, LF у 7,5, HF у 8,5 рази.

У 12-місячних щурів після повторних 9 процедур РЕХВ і введення кЯВК КК уже після 3 сеансів РЕХВ значення ТР збільшувалося, порівнюючи з контрольним, завдяки активації симпатичного й парасимпатичного відділу ВНС. У цей термін спостережень внесок впливів гуморальної регуляції на серцевий ритм достовірно не змінювався.

Після 6 і 9 сеансів РЕХВ і відповідно на наступну добу й через 3 дні після введення кЯВК КК поряд із підвищенням активності ВНС, відзначалося достовірне збільшення гуморально-метаболических впливів на міокард.

Через 5 і 7 днів після 9 сеансів РЕХВ (7 і 9 днів після введення кЯВК КК) значення загальної спектральної потужності ВСР зменшувалися внаслідок зниження тону вегетативних центрів.

У віддалені терміни (через місяць після 9 сеансів РЕХВ і введення кЯВК КК) зазначалося статистично значуще збільшення показників ТР як проти контрольних показників, так і проти показників попередніх етапів досліджень, завдяки збалансованому підвищенню функціональної активності всіх регуляторних ланок організму експериментальних тварин (показник ТР збільшувався в 7,9 рази, VLF — у 4,1, LF — у 9,3, HF — у 7,7 рази).

Аналіз хвильової структури серцевого ритму у 18-місячних щурів на тлі 9 процедур РЕХВ і введення кЯВК КК показав значне зростання загальної потужності спектра ВСР проти контрольної, в усі терміни експерименту, завдяки підвищенню тону симпатичного й парасимпатичного відділу ВНС. Активність гуморальної регуляції, водночас, достовірно не змінювалася. Через місяць показник ТР підвищувався проти контрольного в 6,8 рази, VLF — у 2,9 ($p > 0,05$), LF — у 8,2, HF — у 7,1.

У групі 24-місячних тварин після поєднаного застосування РЕХВ і кЯВК КК спостерігалася аналогічна до попередньої вікової групи динаміка змін основних показників спектрального аналізу ВСР. Однак у 24-місячних щурів

відзначалося збільшення активності ще й гуморальної ланки регуляції. Через місяць ТР підвищувалась у 8,6, VLF — у 2,9, LF — у 10,6, HF — у 9,7 раз.

Отже, повторне поєднане застосування екстремального охолодження і кЯВК КК у динаміці старіння щурів має найбільш виражену позитивну дію на стан систем нейрогуморальної регуляції та здатне тривалий час зберігати «молоду» ритміку нейрогуморальних впливів на організм експериментальних тварин.

Оскільки нейроендокринна гормональна регуляція гомеостазу посідає важливе місце в складному ланцюгу процесів, котрі призводять до старіння клітин, тканин, органів і організму загалом, а інволюційні зміни ендокринних залоз супроводжуються порушенням гормонального балансу [104, 294], нами була визначена концентрація гормонів сироватки крові щурів у процесі природного старіння, після РЕХВ, введення кЯВК КК та за їх поєданого застосування.

При дослідженні вмісту тиреоїдних гормонів сироватки крові в динаміці старіння щурів було виявлено зниження рівня T_4 у тварин 24-місячного віку в 1,5 рази проти 6-місячних щурів і 2 рази проти 12-і 18-місячних щурів. Така концентрація T_4 в старих щурів, на нашу думку, зумовлена зменшенням функціональної активності щитоподібної залози. Вміст Тс у сироватці крові контрольних 18-і 24-місячних щурів значуще зменшувався проти показників 6- (у 2 і 1,6 рази, відповідно) й 12-місячних (у 2,2 і 1,7 рази, відповідно) тварин. На тлі вищезазначених змін знижувалося співвідношення Тс/Ес в 1,9–2,4 рази.

На тлі одноразового застосування 9 сеансів РЕХВ у старих тварин зазначено значуще підвищення (у 1,3 рази) рівня тиреоїдних гормонів. У 6- і 12-місячних тварин після повторних процедур РЕХВ концентрація тиреоїдних гормонів у сироватці крові значуще не змінювалася проти контрольних значень, рівень Тс знижувався в 1,8 і 1,9 рази, відповідно, а співвідношення Тс/Ес у 2,7 рази в обох вікових групах. Для 18-місячних щурів було характерним значуще зменшення рівня T_4 проти контрольного (в 1,4 рази) за майже ідентичного вмісту T_3 та підвищення як рівня Тс в 1,6 рази, так і

співвідношення Тс/Ес у 1,9 раза. Зазначені зміни свідчать про те, що РЕХВ стимулюють синтетичну активність щитоподібної та статевих залоз у старіючих тварин, проте як стресовий вплив помірної інтенсивності, вони все ж сприяють зниженню рівня тестостерону в молодих щурів.

Введення кЯВК КК сприяло підвищенню рівня сироваткового Т₄ у старих тварин як після одноразового (в 1,07 раза), так і після повторного застосування (в 1,3 раза). Вміст Т₃ збільшувався лише в групі старих щурів після одноразового використання кЯВК КК (в 1,4 раза). Повторне введення кЯВК КК 6-, 12- і 18-місячним тваринам статистично значуще не впливало на рівень тиреоїдних гормонів у сироватці крові. У разі одноразового введення кЯВК КК старим 24-місячним тваринам рівень Тс підвищувався в 2,6 раза, а за повторного у 18-місячних — у 3,4 раза (а співвідношення Тс/Ес у 3,3 раза).

Відсутність будь-яких змін у концентрації тиреоїдних і статевих гормонів у молодих щурів свідчить про те, що використання кЯВК КК не спричиняє функціональних порушень щитоподібної та статевих залоз, проте покращує їхній функціональний стан у старих тварин завдяки відновленню гормонсинтезуючої здатності.

Після поєднаного застосування РЕХВ і кЯВК КК рівень Т₃, порівнюючи з контрольним, змінювався у двох вікових групах: знижувався (у 1,2 раза) у 6-місячних тварин після першого циклу охолодження і введення кЯВК КК та підвищувався (у 1,2 раза) у 24-місячних щурів після повторного їх використання. У групах експериментальних тварин 12- і 18-місячного віку істотних змін у вмісті тиреоїдних гормонів у сироватці крові на тлі проведення вище зазначених процедур не спостерігалось. Крім того, нами встановлено значне збільшення від контрольних показників концентрації Т₄ у 24-місячних щурів як після одноразового (у 1,4 раза), так і після повторних сеансів РЕХВ і введення кЯВК КК (у 2,3 раза).

За одноразового поєднаного застосування старим тваринам РЕХВ і кЯВК КК, співвідношення Тс/Ес залишалося незмінним завдяки підвищенню втричі рівня Тс й Ес. Після їх поєднаного використання у динаміці старіння

щурів збільшення вмісту Тс (у 1,4–3,1 раза) і співвідношення Тс/Ес (в 1,7–2,2 раза) спостерігалось у всіх вікових групах, за винятком 12-місячних тварин, у яких рівень Тс знижувався в 1,4 раза, а співвідношення Тс/Ес достовірно не змінювалося. У 24-місячних щурів цієї експериментальної групи, на відміну від самотійного (одноразового і повторного у динаміці старіння) та поєднаного одноразового застосування РЕХВ і кЯВК КК, підвищувалася не тільки концентрація Тс (у 1,9 раза), а співвідношення Тс/Ес у 2,1 раза. Оскільки рівень тиреоїдних гормонів знижується під час старіння [126], а брак андрогенів супроводжується порушенням метаболізму ліпідів, розвитком атеросклерозу й підвищенням ризику розвитку серцево-судинних захворювань [58, 279], збільшення вмісту тиреоїдних і статевих гормонів у сироватці крові 18- та 24-місячних щурів на тлі поєднаного використання РЕХВ і кЯВК КК підтверджує ефективність і доцільність поєднаного застосування даних процедур, починаючи з молодого віку.

Таким чином, самотійне й поєднане з РЕХВ застосування кЯВК КК протягом життєвого циклу тварин не спричиняє гормональних порушень у молодому організмі, водночас більш ефективне, порівнюючи з одноразовим, у старечому віці. Ймовірно, поєднане використання зазначених процедур здатне значно підвищувати адаптаційно-регуляторний потенціал організму, сприяти реалізації гормонального ланки вітаукту.

Виходячи з того, що NO є одним з найбільш важливих біологічних медіаторів і залучений у безліч фізіологічних і патофізіологічних процесів [95, 134, 163], нами вивчено вплив РЕХВ, кЯВК КК та їх поєднання на вміст кінцевих продуктів метаболізму NO в сироватці крові щурів у динаміці старіння.

Під час дослідження встановлено, що вміст сумарних метаболітів NO в сироватці крові щурів контрольної групи в динаміці їхнього старіння знижувався з віком у 3,1 раза проти показнику 6-місячних щурів. Після одноразового й повторних застосувань циклу РЕХВ у динаміці старіння значущих змін у вмісті кінцевих продуктів обміну NO проти контрольних

показників відповідного віку не було. У старих щурів як після одноразового, так і повторного застосування кЯВК КК і їх поєднання з РЕХВ вміст кінцевих метаболітів NO у 2,5–3 рази перевищував контрольні показники аналогічного віку, що, можливо, пов'язано з активацією NO-синтаз і експресією їх генів. Після поєднаного використання РЕХВ і кЯВК КК у процесі старіння щурів рівень NO значуще не змінювався у 12-, 18- і 24-місячних тварин проти 6-місячних, хоча, порівнюючи з контролем відповідного віку, він значно підвищувався. Можна припустити, що введення кЯВК КК, а також поєднане використання РЕХВ і кЯВК КК сприяє відновленню концентрації NO, стимулюючи впливає на його синтез тільки в разі дефіциту й не супроводжується надлишком цієї біфункціональної молекули, що дає змогу майже уникнути коливань концентрації NO з віком. Такі зміни, на нашу думку, є фізіологічно значущими, оскільки старіння асоційоване з розвитком ендотеліальної дисфункції, яка виражається в зниженні синтезу і вивільнення NO [163, 229, 282], водночас деструктивні процеси, які розвиваються в організмі, часто обумовлені його надмірною продукцією [125].

З огляду на той факт, що функціональний стан ССС є одним із головних маркерів, які відображають хід старіння, доцільним уявлялося оцінити мікроскопічну і ультрамікроскопічну структуру тканин і судин міокарда, як в процесі старіння тварин, так і після самостійного і поєднаного застосування РЕХВ і кЯВК КК.

Під час гістологічного дослідження серцевого м'яза в динаміці природного старіння щурів встановлено, що вікові зміни його структури пов'язані зі збільшенням відносного обсягу сполучної тканини, порушенням кровообігу, зменшенням кількості й розмірів ядер кардіоміоцитів, кількості капілярів, дифузними склеротичними процесами. Перші морфологічні ознаки, які свідчать про вікові зміни судинного русла, виявлялися у 12-місячних тварин. Виявлені нами структурні порушення міокарда контрольних 12-місячних щурів були пов'язані з віковими змінами судинного русла: розширенням й повнокров'ям судин, потовщенням стінки великих судин, помірним інтерстиціальним і більш

вираженим периваскулярним набряком. Зрив компенсаторних можливостей міокарда у щурів відбувався до 24-місячного віку.

Застосування повторних сеансів РЕХВ істотно впливало на морфологічну структуру міокарда в процесі природного старіння щурів. Починаючи з 12-місячного віку, поліпшувалася трофіка серцевого м'яза завдяки збільшенню кількості капілярів на одиницю площі тканини. У 18-місячних щурів ці зміни, імовірно, були компенсаторними у відповідь на зменшення кількості і площі ядер кардіоміоцитів.

На тлі введення кЯВК КК тваринам різних вікових груп, структура міокарда істотно покращувалася, порівнюючи з тією, яка спостерігалася в процесі природного старіння щурів. У 24-місячних тварин ознаки порушення кровообігу, набряк і кардіосклероз були виражені помірно, лімфо-гістіоцитарні інфільтрати відсутні, значно зростала площа (відповідала показникам 6-місячних щурів контрольної групи) та кількість ядер кардіоміоцитів. Кількість капілярів у 12- і 18-місячних тварин істотно збільшувалася, а у 24-місячних щурів підвищення цього показника не досягало статистичної значущості. Відзначалася тенденція до збільшення кількості ядер кардіоміоцитів в усіх вікових групах.

Поєднане застосування РЕХВ і кЯВК КК упродовж життєвого циклу тварин супроводжувалося покращенням мікроскопічної будови міокарда. Підвищувалися компенсаторні можливості серцевого м'яза завдяки збільшенню як кількості, так і площі ядер кардіоміоцитів, поліпшувалася трофіка внаслідок утворення нових капілярів. Це підтверджувалося проліферацією в інтерстиціальній тканині фібробластів, які, як відомо, продукують проангіогенні фактори. Описані зміни перешкоджають розвитку ішемії міокарда, кардіосклерозу й некрозу — синильно-інволюційних змін міокарда.

Отже, введення кЯВК КК, а також поєднане використання РЕХВ і кЯВК КК у динаміці старіння щурів має більш виражену позитивну дію на структурну організацію міокарда, порівнюючи із самотійним застосуванням РЕХВ.

Електронно-мікроскопічні дослідження динаміки субмікроскопічних перебудов органел кардіоміоцитів і ендотеліоцитів кровоносних капілярів міокарда щурів контрольної групи у динаміці їхнього старіння, показали, що прояви розвитку дистрофічних процесів на субклітинному рівні починають виявлятися у 18-місячному віці. У тварин цієї вікової групи нами зареєстровано набрякання Мт, вогнищеве просвітлення їхнього матриксу, деструкцію деяких крист. Наведені зміни типові для розвитку мітохондріальної дисфункції. У 24-місячних щурів траплялися також тотально зруйновані Мт. Дегенеративно-деструктивні зміни Мт свідчили про істотне порушення внутрішньоклітинної біоенергетики і зниження скорочувальної здатності кардіоміоцитів. У кардіоміоцитах і ендотеліоцитах реєструвалися морфологічні ознаки досить високої активності катаболічних процесів: наявність у саркоплазмі включень ліпідів і ліпофусцину, зменшена кількість рибосом, полісом і гранул глікогену.

Застосування повторних сеансів РЕХВ (-120°C) у динаміці старіння тварин здатне збільшувати скоротливу здатність міокарда завдяки нормалізації внутрішньоклітинної біоенергетики, пов'язаної зі структурно-функціональним станом Мт, покращувати процеси мікротранспорту, у такий спосіб підвищуючи функціональний стан ендотеліоцитів. Починаючи з 12-місячного віку, відзначалося істотне зменшення ступеня просвітління саркоплазми, кількості електронно-прозорих зон, які розділяють пучки міофібрил, зростала кількість Мт і крист у них. Значна кількість кардіоміоцитів і ендотеліоцитів містили Мт з перетяжками. У групі 18-місячних щурів спостерігалися зміни, характерні для активації внутрішньоклітинних метаболічних процесів: Мт мали велику кількість крист, їхній матрикс мав високу електронну щільність і дрібнозернисту структуру, а зовнішні мембрани були чіткі. Проте, варто зазначити, що просвітлення матриксу мітохондрій та укорочення крист після першого застосування екстремального охолодження у 6-місячних щурів, вказує на помірну стресову дію РЕХВ.

Введення кЯВК КК майже не впливало на ультрамікроскопічну будову кардіоміоцитів і ендотеліоцитів кровоносних капілярів міокарда 6- та 12-

місячних тварин. У 18- і 24- місячних щурів повторні введення кЯВК КК супроводжувалися появою ознак підвищення та відновлення активності метаболічних і синтетичних процесів у тканинах і судинах міокарда. Найбільш вираженими ці зміни були в старих тварин. У саркоплазмі кардіоміоцитів 18-місячних щурів вторинних лізосом і включень ліпідів не було, а в групі 24-місячних тварин вони виявлялися лише в деяких кардіоміоцитах. У саркоплазмі кардіоміоцитів істотно зростала кількість гранул глікогену, полісом і рибосом проти тварин контрольної групи цього віку. Ендотеліоцити кровоносних капілярів міокарда набували типової ультраструктурної організації.

Поєднане застосування РЕХВ і введення кЯВК КК надає більш виражений позитивний вплив на субмікроскопічну організацію досліджуваних клітин. Це підтверджується змінами їхньої структурної організації вже в молодому віці (6 місяців). На препаратах реєструвалися гантелеподібні форми Мт, збільшувалася кількість крист у них. У 18-місячних щурів майже не було ознак розвитку дистрофічного процесу, властивого тваринам контрольної групи. Найбільш виражені зміни репаративного характеру на тлі поєданого застосування РЕХВ і кЯВК КК виявлялися в кардіоміоцитах і ендотеліоцитах 24-місячних щурів. У той час, коли в контрольній групі органи здебільшого зазнавали деструктивних змін, у групі поєданого впливу спостерігалось лише розпушення їхньої структури, без вогнищ лізису.

Отже, отримані експериментальні дані обґрунтовують перспективність самостійного й поєданого застосування РЕХВ і кЯВК КК в геронтологічній практиці для підвищення власних адаптаційно-регуляторних можливостей організму, які істотно знижуються з віком, з метою профілактики розвитку захворювань часто супутніх старінню. Застосування кЯВК КК, поєднаних з РЕХВ, протягом життєвого циклу тварин здатне тривалий час зберігати «молоду» ритміку нейрогуморальних впливів на організм, сприяти реалізації гормональної ланки вітаукту, стимулювати синтез NO у разі його дефіциту, активувати метаболічні та синтетичні процеси на мікроскопічному й субмікроскопічному рівні.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено теоретичне узагальнення й нове вирішення наукового завдання, що розкриває спрямованість і рівень активності адаптаційних і компенсаторних процесів, які відбуваються в регуляторних системах організму тварин у динаміці їхнього старіння, на тлі РЕХВ (-120°C), введення кЯВК КК, а також за їх поєднаного застосування. Отримані експериментальні дані обґрунтовують перспективність їх самотійного й поєднаного застосування в геронтологічній практиці для підвищення власних адаптаційно-регуляторних можливостей організму, які істотно знижуються з віком, з метою профілактики розвитку захворювань часто супутніх старінню.

1. Одноразове використання РЕХВ, кЯВК КК та їх поєднання в старих тварин супроводжується збільшенням загальної спектральної потужності варіабельності серцевого ритму (в 1,5 раза, 2,3 раза та 2,6 раза, відповідно), проте не призводить до збалансованої активації всіх регуляторних ланок, що свідчить про виснаження адаптаційно-компенсаторних можливостей організму.

2. Повторні процедури РЕХВ, введення кЯВК КК і їх поєднання протягом життєвого циклу, здатні підвищувати адаптаційно-компенсаторні можливості організму експериментальних тварин, оцінені за даними спектрального аналізу варіабельності серцевого ритму, незалежно від їхнього віку завдяки збільшенню активності всіх регуляторних ланок, причому зазначена динаміка зберігається у віддалені терміни спостережень. Водночас поєднане застосування екстремального охолодження і кЯВК КК у динаміці старіння щурів має більш виражений позитивний вплив на стан систем нейрогуморальної регуляції експериментальних тварин: у 24-місячних тварин відносно контрольних показників ТР підвищується у 8,6 раза, LF — у 10,6 раза, HF — у 9,7 раза, VLF — у 2,9 раза.

3. Самостійне й поєднане з РЕХВ застосування кЯВК КК супроводжується збільшенням концентрації тироксину в сироватці крові старих щурів за

одноразового (в 1,07 та 1,4 рази) і повторних застосувань (в 1,3 та 2,3 рази), що свідчить про підвищення функціональної активності щитоподібної залози завдяки відновленню її гормонсинтезуючої здатності. У старих тварин на тлі повторного поєданого застосування РЕХВ і кЯВК КК, на відміну від самотійного, підвищувалися не тільки концентрація Тс (у 1,9 рази), а і співвідношення Тс/Ес (у 2,1 рази), що підтверджує доцільність такого застосування, починаючи з молодого віку.

4. Введення кЯВК КК, а також поєднане використання РЕХВ і кЯВК КК у динаміці старіння сприяє відновленню вмісту оксиду азоту, має стимулюючий вплив на синтез NO у разі його дефіциту (у 2,5–3 рази проти контрольних показників) й не призводить до надлишку цієї молекули.

5. Застосування РЕХВ призводить до збільшення кількості капілярів у міокарді старіючих тварин на тлі зменшення кількості та площі ядер кардіоміоцитів. Введення кЯВК КК, а також поєднане використання РЕХВ і кЯВК КК супроводжується поліпшенням трофіки завдяки утворенню нових капілярів і підвищенню компенсаторних можливостей серцевого м'яза, унаслідок збільшення як кількості, так і площі ядер кардіоміоцитів.

6. Застосування повторних сеансів РЕХВ і введення кЯВК КК у динаміці старіння тварин супроводжується підвищенням активності метаболічних і синтетичних процесів у тканинах і судинах міокарда завдяки нормалізації внутрішньоклітинної біоенергетики, пов'язаної зі структурно-функціональним станом мітохондрій. Поєднане використання РЕХВ і кЯВК КК має найбільш виражений позитивний вплив на ультраструктурну організацію кардіоміоцитів та ендотеліоцитів кровоносних капілярів міокарда. Істотно знижується ступінь дистрофічних і деструктивних порушень кардіоміоцитів і ендотеліоцитів кровоносних капілярів, рідше трапляються вторинні лізосоми та включення ліпідів. Збільшується кількість рибосом, полісом і гранул глікогену, що є ознакою підвищення скорочувальної здатності міокарда.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Агаджанян Н. А., Медалиева Р. Х. Теоретические основы и практическое применение общей воздушной криотерапии в восстановительной медицине // Вестник восстановительной медицины. 2008. № 4. С. 4—7.
2. Альтман Д. Ш., Давыдова Е. В. Мукозальные эффекты общей аэрокриотерапии при ранних формах хронической ишемии мозга у ветеранов современных военных конфликтов // Вестник уральской медицинской академической науки. 2012. № 2. С. 78—79.
3. Анисимов В. Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения : в 2 т. СПб : Наука, 2008. Т. 1. 481 с.
4. Анисимов В. Н. Приоритетные направления фундаментальных исследований в геронтологии: вклад России // Успехи геронтологии. 2003. Вып. 12. С. 9—27.
5. Анисимов В. Н., Забежинский М. А., Попович И. Г. Модели и методы изучения геропротекторной активности фармакологических препаратов // Успехи геронтологии. 2009. Т. 22, № 2. С. 237—252.
6. Апрелева А. В., Баранов А. Ю. Общая криотерапия как новый метод интенсификации тренировочного процесса // Ученые записки. 2007. №8 (30). С. 8—14.
7. Атраментова Л. А., Утевская О. М. Статистические методы в биологии. Горловка : «Видавництво ліхтар», 2008. 248 с.
8. Бабийчук В. Г. Механизмы действия экстремально низких температур на структурно-функциональное состояние центральной нервной и сердечно-сосудистой систем у животных различных возрастных групп : дис. ... доктора мед. наук : 14.01.35 «Криомедицина» / Институт проблем кпριοбиологии и криомедицины. Харьков, 2010. 335с.
9. Бабийчук В. Г., Марченко В. С., Бабийчук Г. А. Холодовой стресс как фактор коррекции функциональной архитектоники

- гематоэнцефалического барьера старых крыс. Часть 1. Фрактальный анализ // Проблемы криобиологии. 2012. Т. 22, № 2. С. 107—117.
10. Бабийчук Г. А., Бабийчук В. Г., Мамонтов В. В. Влияние ритмических экстремальных холодовых воздействий на показатели вегетативной регуляции сердечного ритма и содержание цитокинов в сыворотке крови у людей пожилого возраста // Буковинський медичний вісник. 2009. Т. 13, №4. С. 17—20.
 11. Бабийчук Л. В., Бабийчук В. Г., Мамонтов В. В. Влияние гемопоэтических стволовых клеток кордовой крови на состояние вегетативной регуляции сердечного ритма у крыс разного возраста // Проблемы старения и долголетия. 2012. Т. 21, № 1. С. 14—23.
 12. Бабийчук Л. В., Коваль С. Н., Бабийчук В. Г. Ультраструктурные изменения кардиомиоцитов старых крыс с экспериментальной неврогенной артериальной гипертензией до и после введения криоконсервированных ядродержащих клеток кордовой крови // Вестник неотложной и восстановительной медицины. 2012. Т. 13, № 1. С. 23—26.
 13. Бабунц И. В., Мириджанян Э. М., Машаех Ю. А. Азбука анализа вариабельности сердечного ритма. Ставрополь : Принтмастер, 2002. 111с.
 14. Баранов А. Ю. Криогенная физиотерапия // Физиотерапия, бальнеология и реабилитация. 2005. № 3. С. 25—31.
 15. Баранов А. Ю., Кидалов В. Н. Лечение холодом. Криомедицина. СПб. : Изд-во Атон, 1999. 272 с.
 16. Березов Т. Т., Коровкин Б. Ф. Биологическая химия : учебник / 3-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 1998. 704 с.
 17. Беридзе Л. Р., Кацитадзе А. Г., Кацитадзе Т. Г. Криотерапия в лечении демодекоза кожи // Georgian medical news. 2009. №5 (170). Р. 43—45.
 18. Биологические ритмы и возраст / Е. Д. Голованова, Г. Н. Федоров, В. Н. Григорьева и др. // Клиническая геронтология. 2011. Т. 17, № 11–12. С. 16—20.

- 19.Быков А. Т., Медалиева Р. Х., Денисенко В. А. Психоэмоциональное состояние и церебральный гомеостаз на фоне кратковременных общих воздействий сверхнизких температур // Современные проблемы науки и образования: электрон. версия журн. 2013. № 3. 9 с. URL : <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=9307> (дата обращения: 14.12.2015).
- 20.Вариабельность сердечного ритма в динамике старения крыс на фоне повторных сеансов ритмических экстремальных криовоздействий / Ю. В. Руднева, В. Г. Бабийчук, Е. А. Чернявская, В. В. Кулик // Холод в биологии и медицине. Актуальные проблемы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии: тезисы 38-ой ежегодн. конф. молодых ученых (г. Харьков, 21–22 мая 2014 г.). Проблемы криобиологии и криомедицины. 2014. Т. 22, № 2. С. 169.
- 21.Верин В. К., Иванов В. В. Гормоны и их эффекты : справочник. СПб. : Фолиант, 2012. 136 с.
- 22.Власов А. И., Есуков К. А., Косолапов И. А. Электронная микроскопия : учеб. пособие. М.: Изд-во МГТУ им. Н. Э. Баумана, 2011. 168 с.
- 23.Влияние клеточных препаратов кордовой крови на морфологию кожи крыс / В. Ю. Пурышева, В. В. Волина, О. В. Кудokoцева, Л. А. Бабийчук // Світ медицини та біології. 2009. № 3. С. 131—136.
- 24.Влияние криоконсервированных гемопоэтических стволовых клеток кордовой крови на ультраструктурную архитектуру миокарда молодых крыс с неврогенной стресс-индуцированной артериальной гипертензией / Л. В. Бабийчук, В. П. Невзоров, О. Ф. Невзорова, В. Г. Бабийчук // Харківська хірургічна школа. 2012. № 6 (57). С. 50—55.
- 25.Влияние локальной криотерапии на иммунологические процессы у детей первого года жизни при коррекции врожденной косолапости / Е. В. Чугуй, В. Н. Воропаев, Ю. К. Илюшенко и др. // Український морфологічний альманах. 2010. Т. 8, № 2. С. 228—232.

26. Влияние ритмических экстремальных холодовых воздействий (-120°C) и кордовой крови на состояние вегетативной регуляции сердечного ритма в динамике старения крыс / Е. А. Чернявская, В. Г. Бабийчук, Ю. В. Руднева и др. // Теоретические и практические аспекты современной криобиологии : материалы междунар. заочн. науч.-практ. конф. (Россия – Украина, 24 марта 2014 г.). Сыктывкар, 2014. С. 392—398.
27. Влияние ритмических экстремальных холодовых воздействий и кордовой крови на состояние вегетативной регуляции сердечным ритмом у животных различных возрастных групп в норме и при алиментарном ожирении / Ю. В. Руднева, В. Г. Бабийчук, Е. А. Чернявская и др. // Криоконсервация генетических ресурсов. Современное состояние, проблемы и перспективы: материалы науч.-практ. конф. с междунар. участ. (г. Пущино, 28–30 окт. 2014 г.). Биофизика живой клетки. 2014. Т.10. С. 171—173.
28. Влияние холодовых воздействий на тиреоидную активность и спектр полипептидов средней массы у крыс / А. В. Шило, Е. А. Венцковская, А. Ю. Семенченко, Г. А. Бабийчук // Проблемы криобиологии. 2012. Т. 22, № 1. С. 3—13.
29. Воздушная криотерапия / В. В. Портнов, В. Д. Григорьева, Т. А. Дашина и др. / Новые технологии в медицине: сборник докл. первой междунар. дистанцион. науч.-практ. конф. (г. Санкт-Петербург, 15–30 марта 2004 г.). СПб., 2004. С. 44—45.
30. Возрастные особенности влияния иммобилизационного стресса на состояние системы монооксида азота у крыс / О. К. Кульчицкий, Р. И. Потапенко, С. Н. Новикова и др. // Пробл. старения и долголетия. 2009. Т. 18, № 1. С. 51—59.
31. Волошин П. В. Концепция роли нейроиммуноэндокринного звена в этиопатогенезе современных форм нервной и психической патологии /

- П. В. Волошин, Т. М. Воробьева, В. В. Гейко // Український вісник психоневрології. 2006. Т. 14, Вип. 3 (48). С. 5—9.
32. Воробьев К. П. Методическая проблема частотных диапазонов при анализе вариабельности ритма сердца в клинике и эксперименте // Український медичний альманах. 2008. Т. 11, № 1 (додаток). С. 242—245.
33. Воробьев К. П., Паламарчук Е. А. Результаты независимого тестирования трех программ вычисления показателей вариабельности сердечного ритма // Укр. мед. часопис. 2007. Т. 3 (59). С. 45—51.
34. Воронков Л. Г. Хроническая сердечная недостаточность у пациентов пожилого возраста // Кровообіг та гемостаз. 2013. Т. 3—4. С. 107—111.
35. Всемирная организация здравоохранения – Обзорная сводка о состоянии здоровья в Украине, 2005: электрон. ресурс. 2006. URL : <http://www.euro.who.int/ru/countries/ukraine/publications3/highlights-on-health-in-ukraine> (дата обращения: 12.04.2017).
36. Гелашвили О. А. Вариант периодизации биологически сходных стадий онтогенеза человека и крыс // Саратовский научно-медицинский журнал. 2008. Т. 4, № 22. С. 125—126.
37. Гемопозитические стволовые клетки кордовой крови: новые методы выделения и криоконсервирования / Л. А. Бабийчук, В. В. Рязанцев, П. М. Зубов, О. Л. Зубова // Трансплантологія. 2007. Т. 9, № 1 С. 13—15.
38. Герасимов И. Г. Возрастная динамика качества функционирования организма человека (анатомо-морфологические показатели) // Проблемы старения и долголетия. 2012. Т. 21, № 1. С. 3—13.
39. Геронтология in silico: становление новой дисциплины / А. И. Яшин, А. А. Романюха, А. И. Михальский и др. // Успехи геронтологии. 2007. Т. 20, № 1. С. 7—19.
40. Гольцев А. Н., Калиниченко Т. А. Пуповинная кровь человека как источник гемопозитических клеток для клинического применения. Часть I. Характеристика гемопозитического потенциала // Проблемы криобиологии. 1998. № 1. С. 3—23.

41. Гольцев А. Н., Калиниченко Т. А. Пуповинная кровь человека как источник гемопоэтических клеток для клинического применения. Часть II. Характеристика гемопоэтического потенциала // Проблемы криобиологии. 1998. № 1. С. 3—23.
42. Грищенко В. И. Достижения криобиологии и криомедицины во имя здоровья нации // Проблемы криобиологии. 2008. Т. 18, № 3. С. 269—274.
43. Гусеница С. Г. Обоснование использования контрастных температурных воздействий для коррекции стрессогенных соматоформных расстройств у специалистов опасных профессий : автореф. дис. на соиск. науч. степени канд. мед. наук : 05.26.02 «Безопасность в чрезвычайных ситуациях» / ГБОУ ВПО «Северный государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития Российской Федерации. Архангельск, 2012. 21 с.
44. Деев А. И., Бухарова Е. В. Проблемы определения темпа старения человека // Пробл. старения и долголетия. 2009. Т. 18, № 1. С. 8—19.
45. Динамика ультраструктурных перестроек кардиомиоцитов миокарда старых крыс с неврогенной артериальной гипертензией после введения криоконсервированных гемопоэтических стволовых клеток кордовой крови / Л. В. Бабийчук, В. Г. Бабийчук, В. П. Невзоров, О. Ф. Невзорова // Харківська хірургічна школа. 2012. № 4 (55). С. 47—52.
46. Динамика ультраструктурных перестроек органелл кардиомиоцитов миокарда молодых крыс в процессе развития и прогрессирования неврогенной артериальной гипертензии / Л. В. Бабийчук, В. П. Невзоров, О. Ф. Невзорова, В. Г. Бабийчук // Харківська хірургічна школа. 2012. № 5 (56). С. 24—29.
47. Дисфункциональные маточные кровотечения: новые подходы к терапии / Л. А. Артемова, В. В. Лазуренко, О. В. Мерцалова, М. И. Антонян // Международный медицинский журнал. 2009. №1. С. 39—45.
48. Дисфункция вегетативной нервной системы при преждевременном старении организма / В. С. Никитин, А. Л. Азин, А. Л. Азьев, А. В. Смирнов // Успехи геронтологии. 2007. Т. 20, № 2. С. 66—69.

49. Заготівля, кріоконсервування та клінічне застосування гемопоетичних клітин кордової крові людини : методичні рекомендації / А. О. Цуцаєва, В. І. Грищенко, О. В. Кудокочева та ін. Київ, 2000. 16 с.
50. Иоффе Ю. Г. Современное состояние неродственного донорства гемопоэтических стволовых клеток в Российской Федерации (по материалам отчета Всемирной ассоциации доноров костного мозга за 2008 г.) // Клиническая онкогематология. Т. 2, № 3. С. 257—259.
51. Исаев А. А. Банки пуповинной крови – деятельность, её регулирование, перспективы / А. А. Исаев, Н. В. Квашнина, А. В. Приходько // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2006. Т. 1, № 1. С. 88—91.
52. Імуногістохімічна характеристика диференціації клітин кордової крові за різних умов трансплантації в експерименті / Д. Б. Домбровський, В. В. Савін, Ю. В. Оліник та ін. // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2013. Т. 12, № 4. С. 32—37.
53. К вопросу о применении плацентарной крови для переливания / М. С. Малиновский, Л. Г. Смирнова, М. С. Моярщинова, В. Г. Тарзанова // Акуш. и гинекол. 1936. № 5. С. 495—499.
54. К концепции экзистэнцефалической системы охлажденного мозга. Часть 2. Биоритмы холодового стресса / Г. А. Бабийчук, В. С. Марченко, Л. Н. Марченко, Л. В. Полищук // Проблемы криобиологии. 2000. №3. С. 21—27.
55. К механизмам регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера охлажденного мозга. Сообщение 4. Ультраструктурные особенности и функциональная активность гематоэнцефалического барьера при ритмических холодовых воздействиях / Л. Н. Марченко, Г. А. Бабийчук, В. С. Марченко и др. // Проблемы криобиологии. 1995. № 4. С. 10—19.
56. Калиниченко Т. А., Гольцев А. Н. Пуповинная кровь человека как источник гемопоэтических клеток для клинического применения. Часть III. Кріоконсервирование // Проблемы криобиологии. 1999. № 1. С. 45—56.

57. Клітинна трансплантація: нормативно-правові аспекти, перспективи та напрямки клінічного використання / Ю. В. Поляченко, О. С. Ніконенко, Р. В. Салютін та ін. // Клітинна та органна трансплантологія. 2013. Т. 1, № 1. С. 40—43.
58. Князькова И. И. Факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний у мужчин: фокус на дефицит андрогенов // Медицинские аспекты здоровья мужчины. 2012. № 4. С. 18—25.
59. Колов С. А., Шейченко Е. Ю. Значение дисфункции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы в психопатологии у ветеранов боевых действий // Социальная и клиническая психиатрия. 2009. Т. 19, № 3. С. 74—79.
60. Коркушко О. В., Шатило В. Б. Ускоренное старение и пути его профилактики // Буковинський медичний вісник. 2009. Т. 13, № 4. С. 153—158.
61. Коркушко О. В., Писарук А. В., Лишневская В. Ю. Возрастные и патологические изменения суточной вариабельности сердечного ритма // Вестник аритмологии. 1999. № 14. С. 30—33.
62. Коркушко О. В., Чеботарев Д. Ф., Калиновская Е. Г. Гериатрия в терапевтической практике. К. : Здоров'я, 1993. 840 с.
63. Кравченко С. А. Фиксирующие растворы в электронно-микроскопическом исследовании тканей легких // Український журнал клінічної та лабораторної медицини. 2011. Т. 6, № 2. С. 139—143.
64. Криотерапия: учеб.-метод. пособие / А. В. Волотовская, Г. К. Колтович, Л. Е. Козловская, А. Н. Мумин. Минск : БелМАПО, 2010. 26 с.
65. Критерії повноцінності та безпечності трансплантата стовбурових клітин пуповинної крові людини / Р. В. Салютін, Г. С. Лобинцева, Г. А. Зубкова та ін. // Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія. 2011. Т. 36, № 3. С. 15—19.

- 66.Кріокамера для екстремального охолодження лабораторних тварин: пат. 40168 Україна, МПК А61В 18/00. № u200812930 ; заявл. 06.11.2008 ; опубл. 25.03.2009. – Бюл. №6. 4 с.
- 67.Крутько В. Н. Профилактика старения как системная технология // Вестник РАН. 2006. Т. 76, № 9. С.790—797.
- 68.Крутько В. Н., Донцов В. И., Захарьяшева О. В. Системная теория старения: методологические основы, главные положения и приложения // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2009. Т. 43, № 1. С.12—19.
- 69.Кузнецов С. В., Дмитриева Л. Е., Стонов В. А. Сердечная, дыхательная и моторная деятельность в норме и после активации катехоламинергических систем у новорожденных крысят // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2012. Т.48, №4. С. 367—379.
- 70.Куртова А. В., Зуева Е. Е. Количественный учет CD34+ гемопоэтических стволовых клеток в цельной пуповинной крови // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2006. Т. 1, № 1 (3). С.66—71.
- 71.Курьянова Е. В. Изменение сердечного ритма белых крыс при различных режимах введения бета-блокатора: роль исходного состояния регуляторных систем // Вариабельность сердечного ритма: Теоретические аспекты и практическое применение : тезисы докл IV всероссийск. симпоз. с междунар. участ. (г. Ижевск, 19–21 ноября 2008 г.). Ижевск, 2008. С. 170—173.
- 72.Курьянова Е. В. К вопросу о методах анализа сердечного ритма типах его регуляции на ранних этапах онтогенеза белых крыс // Естественные науки: журнал фундаментальных и прикладных исследований. 2008. № 4. С.77—84.
- 73.Курьянова Е. В. Спектральные характеристики сердечного ритма наркотизированных крыс при рефлексорной стимуляции симпатoadреналовых и парасимпатических влияний // Вариабельность сердечного ритма: Теоретические аспекты и практическое применение:

- тезисы докл IV всероссийск. симпоз. с междунар. участ. (г. Ижевск, 19–21 ноября 2008 г.). Ижевск, 2008. С. 174—177.
74. Кухарчук О. Л., Радченко В. В., Сирман В. М. Стволовые клетки: эксперимент, теория, клиника. Черновцы : Золоті литаври, 2004. 505 с.
75. Лакин Г.Ф. Биометрия. М. : Высш.школа, 1990. 350 с.
76. Лобынцева Г. С., Ворожка И. В., Ситникова А. В. Инфицированность пуповинной крови и эмбрионов ранних сроков гестации и гемопоэз в эмбриональной печени // Проблемы криобиологии. 2008. Т. 18, № 3. С. 355—360.
77. Ломакин И. И. Обоснование методов лечебного охлаждения в терапии хронического алкоголизма // Проблемы криобиологии. 2008. Т. 18, № 3. С. 383—385.
78. Ломакин И. И., Кудокоцева О. В., Пурышева В. Ю. Терапевтический эффект препаратов кордовой крови на примере структурных изменений дермы при экспериментальном гипотиреозе и его потенцирование аэрокриотерапией // Криотерапия: безопасные технологии применения : сборн. науч. работ науч.-практ. конф. с междунар. участ. / Под общ. ред. проф. О.А. Панченко. Киев : КВИЦ, 2012. С. 49—57.
79. Мажитова М. В. Спектрофотометрическое определение уровня метаболитов монооксида азота в плазме крови и ткани мозга белых крыс// Современные проблемы науки и образования. 2011. № 3. С. 45—48.
80. Мартинова Ю. В. Гематоенцефалічний бар'єр та його зміни в умовах ритмічних холодових впливів // Біологічні дослідження – 2015 : зб.наук. праць наук.-практ. конф. для молодих учених і студентів (м. Житомир, 11–12 березня 2015 р.). Житомир, 2015. С. 390—394
81. Мартинова Ю. В., Бабійчук В. Г. Вплив екстремального охолодження (–120 °С) на функціональний стан організму молодих та старих щурів // VIII МАК 2017: тези VIII Міжнар. Антарктичн. Конф., присвяч. 25-ій річниці приєднання України до Договору про Антарктику (17 вересня 1992 р.) (м. Київ, 16–18 травня 2017 р.). Київ, 2017. С. 71—73.

- 82.Мартінова Ю. В., Бабійчук В. Г., Логінова О. О. Вплив ритмічного екстремального охолодження (-120°C) на функціональний стан організму щурів у динаміці їх старіння // Холод в біології та медицині — 2017: Актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології : матеріали 41-ої щорічн. конф. молодих учених (м. Харків, 24–25 травня 2017 р.). Проблеми кріобіології та кріомедицини. 2017. Т. 27, № 2. С. 159.
- 83.Мартінова Ю. В., Невзоров В. П., Бабійчук В. Г. Изменение ультраструктурной организации кардиомиоцитов после применения кордовой крови в динамике старения крыс // Микро- и макроанатомия: материалы II межкафедр. науч.-практ. конф. с междунар.участ. студентов и молодых ученых, посвящен. памяти Лойко Ромуальда Михайловича (г. Гомель, 13 марта 2015 г.). Гомель, 2015. С. 64—69.
- 84.Мартынова Ю. В. Влияние ядросодержащих клеток пуповинной крови на морфометрические показатели миокарда крыс в динамике их старения // Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье: тезисы XX междунар. мед.-биолог. конф. молодых исследователей (г. Санкт-Петербург, 22 апреля 2017 г.). Санкт-Петербург: Изд-во СПбГУ, 2017. С. 348—349.
- 85.Мартынова Ю. В., Бабійчук В. Г. Влияние повторных циклов ритмических криовоздействий (-120°C) на ультраструктурную организацию эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда в динамике старения крыс // Холод в биологии и медицине — 2015: Актуальные вопросы кріобіології, трансплантології та біотехнології : матеріали 39-ої щорічн. конф. молодих учених, посвящ. 70-летию ЮНЕСКО (г. Харьков, 20–21 мая 2015 г.). Проблеми кріобіології та кріомедицини. 2015. Т. 25, № 2. С. 166.
- 86.Мартынова Ю. В., Бабійчук В. Г. Влияние повторных циклов ритмических экстремальных холодовых воздействий (-120°C) на структурное состояние миокарда в динамике старения крыс // Холод в

- биологии и медицине. — 2016: Актуальные вопросы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии : материалы 40-ой ежегодн. конф. молодых ученых (г. Харьков, 23–24 мая 2016 г.). Проблемы криобиологии и криомедицины. 2016. Т. 26, № 2. С. 159.
87. Мартынова Ю. В., Бабийчук В. Г. Влияние ритмических экстремальных холодовых воздействий на состояние вегетативной и гуморально-метаболической регуляции сердечного ритма старых крыс // Біологічні дослідження — 2016 : збірник наук. праць VII всеукраїнськ. наук.-практ. конф. для молодих учених і студентів (м. Житомир, 10-11 березня 2016 р.). Житомир: ПП «Рута», 2016. С. 278—280.
88. Мартынова Ю. В., Бабийчук В. Г. Содержание тиреоидных гормонов в сыворотке крови крыс в динамике старения на фоне сочетанного применения экстремального охлаждения и ядродержащих клеток кордовой крови // Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології : матеріали IV міжнар. наук. конф. студентів, аспірантів і молодих вчених (м. Вінниця, 12–14 квітня 2016 р.). Вінниця: ДРУК, 2016. С. 360—361.
89. Мартынова Ю. В., Бабийчук В. Г. Ультраструктурные перестройки эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда в динамике старения крыс на фоне сочетанного применения экстремального охлаждения (-120°C) и клеток кордовой крови // Ендотеліальна дисфункція при вік-залежній патології – діагностика, профілактика, лікування : матеріали конф. (м. Київ, 12–13 листопада 2015 р.). Кровообіг та гемостаз. 2015. № 1–2 (47–48). С. 120—121.
90. Мартынова Ю. В., Бабийчук В. Г., Сиротенко Л. А. Содержание тиреоидных гормонов в сыворотке крови крыс на фоне ритмического экстремального охлаждения (-120°C) // Advances in Science and Technology : материалы II междунар. науч.-практ. телеконф. (г. Пенза, 25 декабря 2015 г.). Actualscience. 2015. Т. 1, № 5 (5). С. 10—11.

91. Мартынова Ю. В., Бабийчук Л. В. Оценка нейрогуморальной регуляции сердечного ритма в динамике старения крыс на фоне повторного введения ядросодержащих клеток кордовой крови // Вісник Луганського національного університету імені Тараса Шевченка. 2014. Частина I: Біологічні науки. № 12 (295). С. 14—22.
92. Марченко В. С., Бабийчук В. Г. Кардиорегуляторная функция гематоэнцефалического барьера при резонансной гипотермии // Проблемы криобиологии. 2001. № 4. С. 17—29.
93. Медалиева Р. Х. Особенности реакций организма с различной криогенной болевой чувствительностью на курс ритмических общих холодových воздействий // Современные проблемы науки и образования: электронный ресурс. 2014. № 4. 7 с. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=14179> (дата обращения: 30.05.2016)
94. Мельников Д. С. Физиологические основы терморегуляции при мышечной работе : уч.-метод. пособ. СПб. : СПбГУФК им. П.Ф. Лесгафта, 2006. 27 с.
95. Метаболиты оксида азота в тканях, сыворотке крови, мононуклеарных и мезенхимальных стволовых клетках / А. А. Чеботарёва, И. А. Комаревцева, Р. М. С. Юсуф и др. // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». 2016. № 2. С. 90—95.
96. Метельская В. А., Гуманова Н. Г. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке // Клиническая лабораторная диагностика. 2005. № 6. С. 15—18.
97. Микроскопическая техника : руководство / под ред. Саркисова Д. С., Перова Ю. Л. М. : Медицина, 1996. 544 с.
98. Михайлов В. М. Вариабельность ритма сердца: опыт практического применения метода / 2-е изд. Иваново: Иван. гос. мед. академия, 2002. 290 с.
99. Морозова К. Н. Электронная микроскопия в цитологических исследованиях : методическое пособие. Новосибирск, 2013. 85 с.

100. Нарыжнева Е. В. Сезонная и возрастная динамика содержания тиреоидных гормонов в сыворотке крови бычков // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2014. №. 3. С. 90—92.
101. Насаднюк Х. М. Заготовка и применение пуповинной крови в Украине // Сучасні медичні технології. 2010. № 4. С. 105—106.
102. Насаднюк К. М. Состояние и перспективы криохранения и клинического применения пуповинной крови в Украине // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2011. Т. 6, № 1. С. 98—104.
103. Нейрогуморальные механизмы адаптации сердца крыс к перегрузке / В. Н. Федоров, М. М. Фатеев, Е. В. Сальников, А. В. Сидоров // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2009. Т. 45, № 4. С. 484—489.
104. Нейроиммуноэндокринные механизмы старения / М. А. Пальцев, И. М. Кветной, В. О. Полякова и др. // Успехи геронтологии. 2009. Т. 22, № 1. С. 24—36.
105. Николаев А. Я. Биологическая химия. М : Мед. информ. агентство, 2004. 559 [427—430] с.
106. Особенности изменений ультраструктурной организации кардиомиоцитов и эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда крыс в динамике старения / Ю. В. Руднева, В. П. Невзоров, В. Г. Бабийчук и др. // Вісник проблем біології і медицини. 2014. Вып. 4, Т. 2 (114). С.253—258.
107. Особенности изменений ультраструктурной организации кардиомиоцитов и эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда крыс в динамике старения после сочетанного применения кордовой крови и экстремального охлаждения (-120°C) / Ю. В. Мартынова, В. П. Невзоров, В. Г. Бабийчук и др. // Вісник проблем біології і медицини. 2015. Вип. 2, Т. 1 (118). С. 244—250.
108. Особенности регуляции высокочастотных колебаний сердечного ритма в онтогенезе крыс / О. П. Тимофеева, Л. В. Бурсиан, В. Л. Сизонов,

- Н. Д. Вдовиченко // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2008. Т.44, №2. С. 221—229.
109. Особливості популяційного складу гемопоетичних клітин пуповинної (кордової) крові в аспекті клінічного застосування / П. М. Перехрестенко, Г. Т. Глухенька, Т. О. Калиниченко, М. К. Алгазінова // Укр. журн. гематол. та трансфуз. 2001. № 2. С. 38—41.
 110. Оцінка проліферативного потенціалу кровотворних стовбурових клітин, отриманих з онтогенетично різних джерел / Н. М. Білько, О. Я. Ярошенко, С. В. Василевська та ін. // Трансплантологія. 2003. Т. 4, № 1. С. 58—59.
 111. Панченко О. А., Оніщенко В. О., Лях Ю. Є. Реакція поверхневої та внутрішньої температури тіла людини під впливом екстремального охолодження // Фізіол. журн. 2011. Т. 57, № 6. С. 85—92.
 112. Преждевременное старение кожи, вызванное гипотиреозом, и способы его коррекции / В. Ю. Пурышева, О. В. Кудкоцева, В. В. Волина и др. // Буковинський медичний вісник. 2009. Т. 13, № 4. С. 236—239.
 113. Розвиток досліджень з проблем кріобіології та кріомедицини в Національній академії наук України / А. М. Гольцев, О. Ф. Дембновецький, В. І. Бойко та ін. // Вісн. НАН України. 2012. № 8. С. 54—61.
 114. Роль симпатических и парасимпатических механизмов в формировании вторичных ритмов сердца в онтогенезе крыс / А. В. Бурсиан, В.А. Сизонов, Ю. О. Семенова и др. // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2005. Т. 41, № 1. С. 87—95.
 115. Руднева Ю. В., Бабийчук В. Г. Влияние кордовой крови и ритмического экстремального охлаждения (-120°C) на состояние основных показателей спектрального анализа вариабельности сердечного ритма в динамике старения крыс // Вариабельность сердечного ритма : теоретические и прикладные аспекты : материалы Ввероссийская заочн.

- науч.-практ. конф. (г. Чебоксары, 1 ноября 2014 г.). Чебоксары, 2014. С. 138—142.
116. Руднева Ю. В. Состояние нейрогуморальной регуляции сердечным ритмом в динамике старения крыс при повторных сеансах ритмического общего экстремального (-120°C) охлаждения // Адаптация биологических систем к естественным и экстремальным факторам среды : материалы V междунар. науч.-практ. конф. (г. Челябинск, 2–3 окт. 2014 г.). Челябинск, 2014. С. 219—224.
117. Руднева Ю. В., Бабийчук В. Г., Чернявская Е. А. Влияние ядросодержащих клеток кордовой крови на показатели спектрального анализа вариабельности сердечного ритма у молодых и старых крыс // «Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі»: Серия биологических наук; серия медицинских наук. 2014. Ч. 4., прил. С.131—135.
118. Руднева Ю. В., Бабийчук В. Г., Чернявская Е. А. Состояние вегетативной регуляции сердечного ритма у старых крыс при сочетанном применении ритмических экстремальных холодовых воздействий (-120°C) и криоконсервированного препарата кордовой крови // Актуальные проблемы геронтологии и гериатрии: от теории к практике : материалы научно-практ. конф. и школы, посвящен. памяти академика В. В. Фролькиса (г. Киев, 16–17 мая 2013 г.). Проблемы старения и долголетия. 2013. Том 22, прил. С. 56.
119. Руднева Ю. В., Бабийчук В. Г., Чернявская Е. А. Влияние ритмического экстремального охлаждения (-120°C) и ядросодержащих клеток кордовой крови на функциональное состояние систем нейрогуморальной регуляции у молодых и старых крыс // Холод в биологии и медицине — 2013: Актуальные проблемы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии: материалы 37-ой ежегодн. конф. молодых ученых (г. Харьков, 20–21 мая 2013 г.). Проблемы криобиологии и криомедицины. 2013. Т. 23, № 2. С. 16.

120. Руднева Ю. В., Бабийчук В. Г., Чернявская Е. А. Влияние ядродержащих клеток кордовой крови на показатели спектрального анализа вариабельности сердечного ритма у молодых и старых крыс // Молодежь в науке – 2013: материалы междунар. науч.-практ. конф. (г. Минск, 19–22 ноября 2013 г.). Минск, 2013. С. 270—273.
121. Руднева Ю. В., Бабийчук В. Г., Чернявская Е. А. Особенности состояния вегетативной регуляции сердечного ритма у молодых крыс при сочетанном применении ритмических экстремальных холодовых воздействий (-120°C) и ядродержащих клеток кордовой крови // матеріали XIX з'їзду Українського фізіологічного товариства ім. П. Г. Костюка з міжнар. участю, (м. Львів, 26–29 травня 2014 р.). Фізіологічний журнал. 2014. Т. 60, № 3, дод. С. 92.
122. Селезньова О. В. Вплив трансплантації культур клітин підшлункової залози і стовбурових клітин на патогенез експериментального цукрового діабету: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : 14.03.04 «Патологічна фізіологія» / Луганський державний медичний університет. К., 2008. 20 с.
123. Сікора В. З., Ярмоленко О. С. Вікові особливості морфофункціональних перетворень міокарда в нормі та в умовах впливу ушкоджувальних чинників (огляд літератури) // Журнал клінічних та експериментальних медичних досліджень. 2013. Т. 1, № 3. С. 263—274.
124. Современные подходы к количественному и качественному учету криоконсервированных стволовых клеток кордовой крови в аутобанке Харькова / Л. А. Бабийчук, О. В. Кудогоцева, В. В. Рязанцев и др. // Трансплантологія. 2008. Т. 10, № 1 С. 119—121.
125. Содержание конечного продукта оксида азота в хряще и сыворотке крови крыс при низкотемпературном моделировании деструктивно-дистрофического процесса в коленном суставе / Б. П. Введенский, Л. Н. Тыныныка, Г. А. Ковалев, Б. П. Сандомирский // Проблемы криобиологии. 2011. Т. 21, № 4. С. 421—428.

126. Соловьёв Р. М., Козловский В. Ю., Леонтьев А. А. Возрастная динамика тиреоидных гормонов в крови ремонтных тёлочек голштинской породы // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2011. Т. 4. №. 32–1. С. 301—303.
127. Состояние вегетативной и гуморальной регуляции сердечного ритма молодых и старых крыс на фоне ритмического экстремального охлаждения в сочетании с введением ядродержащих клеток кордовой крови / Ю. В. Руднева, В. Г. Бабийчук, Е. А. Чернявская, В. В. Кулик // Проблемы криобиологии и криомедицины. 2013. Т. 23, № 4. С.318—325.
128. Спосіб виділення ядровмісних клітин пуповинної крові: пат. 23499 Україна: МПК С12N5/00. № u200700585 ; заявл. 22.01.2007 ; опубл. 25.05.2007, Бюл. № 7. 4 с.
129. Спосіб кріоконсервування ядровмісних клітин кордової крові, у тому числі стовбурових гемопоетичних клітин: пат. 92227 Україна, МПК А01N1/02. № a200814009 ; заявл. 05.12.2008 ; опубл. 11.10.2010, Бюл. № 19. 8 с.
130. Стволовые эмбриональные гемопоэтические клетки человека: Часть 1 / Г. С. Лобынцева, Ю. В. Гладких, Д. В. Лобынцев, В. Ю. Гладких. К.: Наукова думка, 2004. 186 с.
131. Тетюра С. М., Антонова В. О. Влияние экстремальной криотерапии на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы человека // Питання експериментальної та клінічної медицини : зб. статей. Донецьк: ДонНМУ, 2009. Вип. 13, Т. 2. С. 72—80.
132. Титков К. В. Оптимизация интенсивной терапии новорожденных детей с пороками развития в послеоперационном периоде путем трансфузии аутологичной эритроцитной массы из пуповинной крови : дис. ... канд. мед. наук : 14.01.20 «Анестезиология и реаниматология» / Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова. Москва, 2015. 120 с.

133. Ультраструктурная организация эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда в динамике старения крыс на фоне применения криоконсервированного препарата кордовой крови / Ю. В. Мартынова, В. П. Невзоров, В. Г. Бабийчук и др. // Світ медицини та біології. 2015. №2(49). С. 104—107.
134. Уровень оксида азота в тканях, сыворотке крови, мононуклеарных и мезенхимальных стволовых клетках / И. А. Комаревцева, Е. А. Орлова, М. В. Тарасова и др. // Український журнал клінічної та лабораторної медицини. 2009. Т. 4, №4. С. 133—137.
135. Участие нейрональной NO-синтазы в регуляции вазопрессинергических нейронов гипоталамуса крысят на ранних стадиях постнатального онтогенеза / Е. В. Черниговская, А. Г. Таранухин, Л. А. Ямова и др. // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2006. Т. 42, № 1. С. 98—108.
136. Файн М. К., Хабибуллин Р. М. Динамика функционального состояния и работоспособности специалистов с напряженным характером труда в процессе профессиональной деятельности // Современное техническое образование и транспортный комплекс России: состояние, проблемы и перспективы развития : материалы всерос. молодежн. науч. конф., посвящен. 55-летию Уфимского института путей сообщения (Самара-Уфа, 21 марта 2013 г.). Самара-Уфа: СамГУПС, 2013. С.92—94.
137. Фрактальная ультраструктура гематоэнцефалического барьера при непрерывной, ритмической и хаотической гипотермии / В. С. Марченко, Л. Н. Марченко, Т. П. Говоруха и др. // Таврический медико-биологический вестник. 2012. Т. 15, № 3. С. 216—219.
138. Фролькис В. В. Старение и увеличение продолжительности жизни Ленинград: Наука, 1988. 239 с.
139. Характеристика та шляхи використання стовбурових клітин кордової крові (огляд літератури) / Д. Б. Домбровський, Ю. Р. Пшиборовська, К. І.

- Яковець та ін. // Буковинський медичний вісник. 2014. Т. 18, №1. С. 151—155.
140. Чернилевский В. Е. Общебиологический подход к изучению природы старения. Биологические проблемы старения и увеличения продолжительности жизни. М.: Наука, 1988. С. 21—32.
 141. Чернилевский В. Е. Роль стволовых клеток в самообновлении организмов и возможности продления жизни // Доклады МОИП. Секция геронтологии. 2008. № 41. С. 82—95.
 142. Чичинадзе К. Н., Ткемадзе Дж. В. Центросомная гипотеза клеточного старения и дифференциации // Успехи геронтологии. 2008. Т. 21, № 3. С. 367—371.
 143. Шило А. В., Венцовская Е. А., Бабийчук Г. А. Сон в структуре адаптивного ответа организма на холодовые воздействия // Проблемы криобиологии. 2012. Т. 22, № 3. С. 296.
 144. A meta-analysis of unrelated donor umbilical cord blood transplantation versus unrelated donor bone marrow transplantation in adult and pediatric patients / W. Y. K. Hwang, M. Samuel, D. Tan et al. // Biol. Blood Marrow Transplant: Electronic source. 2007. Vol. 13. P. 444—453. DOI: 10.1016/j.bbmt.2006.11.005.
 145. Acute and long-term effects of winter swimming and whole-body cryotherapy on plasma antioxidative capacity in healthy women / B. Dugué, J. Smolander, T. Westerlund et al. // Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. 2005. Vol. 65 (5). P. 395—402.
 146. Acute effect of a single whole-body cryostimulation on prooxidant–antioxidant balance in blood of healthy, young men / A. Lubkowska, M. Chudecka, A. Klimek et al. // Journal of Thermal Biology. 2008. Vol. 33. P. 464—467.
 147. Adrenal glands of mouse and rat do not synthesize androgens / W. M. van Weerden, H. G. Bierings, G. J. van Steenbrugge et al. // LifeSci: Electronic source. 1992. Vol. 50. P. 857—861. DOI: 10.1016/0024-3205(92)90204-3.

148. Adrenarche: a survey of rodents, domestic animals, and primates / G. B. Cutler Jr., M. Glenn, M. Bush et al. // *Endocrinology: Electronic source*. 1978. Vol. 103. P. 2112—2118. DOI: 10.1210/endo-103-6-2112.
149. Adult umbilical cord blood transplantation: a comprehensive review / H. Schoemans, K. Theunissen, J. Maertens et al. // *Bone Marrow Transplant: Electronic source*. 2006. Vol. 38. P.83—93. DOI: 10.1038/sj.bmt.1705403.
150. Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: longitudinal results from the Massachusetts male aging study / H. A. Feldman, C. Longcope, C. A. Derby et al. // *J Clin Endocrinol Metab*. 2002. Vol. 87. P.589—598.
151. Ahima R. S., Osei S. Y. Adipokines in obesity // *Front.Horm. Res*. 2008. Vol. 36. P. 182—197.
152. Allard J. B., C. Duan. Comparative endocrinology of aging and longevity regulation // *Frontiers in Endocrinology: Electronic source*. 2011. Vol. 2. 23 p. DOI: 10.3389/fendo.2011.00075.
153. AMD3100 and CD26 modulate mobilization, engraftment, and survival of hematopoietic stem and progenitor cells mediated by the SDF-1/CXCL12-CXCR4 axis / H. E. Broxmeyer, G. Hangoc, S. Cooper et al. // *Ann NY Acad Sci*. 2007. Vol. 1106. P. 1—19.
154. American College of Sports Medicine position stand: Prevention of cold injuries during exercise / J. W. Castellani, A. J. Young, M. B. Ducharme et al. // *Med Sci in Sports & Exercise*. 2006. 38 (11). P. 2012—2029.
155. Anisimov V. N. Experimental research on ageing in Russia // *Experimental Gerontology*. 2001. Vol. 36. P. 935—945.
156. Anisimov V. N. Life span extension and cancer risk: myths and reality // *Exp. Gerontol*. 2001. Vol. 36. P. 1101—1136.
157. Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with ex vivo-expanded UCB cells: results of a phase 1 trial using the AastromReplicell System / J. Jaroscak, K. Goltry, A. Smith et al. // *Blood*. 2003. Vol. 101 (12). P. 5061—5067.

158. Ballen K. K. New trends in umbilical cord blood transplantation // *Blood*. 2005. Vol. 105. P. 3786—3792. DOI: 10.1182/blood-2004-10-4125.
159. Bell D. G., Tikuisis P., Jacobs I. Relative intensity of muscular contraction during shivering // *J Appl Physiol*. 1992. Vol. 72. P. 2336—2342.
160. Bell G. W. Aquatic sports massage therapy // *Clin Sports Med*. 1999. 18. P. 427—435.
161. Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues / H. Abdulrazzak, D. Moschidou, G. Jones, P. V. Guillot // *J. R. Soc. Interface: Electronic source*. 2010. Vol. 7. P. 689—706. DOI: 10.1098/rsif.2010.0347.focus.
162. Bradley M. B., Cairo M. S. Cord blood immunology and stem cell transplantation // *Human Immunol*. 2005. Vol. 6. P. 431—446.
163. Brandes R. P., Fleming I., Busse R. Endothelial aging // *Cardiovascular Research*. 2005. Vol. 66. P. 286—294. DOI: 10.1016/j.cardiores.2004.12.027.
164. Broxmeyer H. Umbilical cord transplantation: epilogue // *Semin. Hematol*. 2010. Vol. 47. P. 97—103. DOI: 10.1053/j.seminhematol.2009.10.002.
165. Brunstein C. G., Setubal D. C., Wagner J. E. Expanding the role of umbilical cord blood transplantation // *Br. J. Haematol*. 2007. Vol. 137. P. 20—35.
166. Burger S. R. Umbilical cord blood stem cells // *Handbook of Transfusion*. London: Medicine Academic Press. 2001. P. 17—21.
167. Butenko G. M. Stem cell technologies in gerontological research // *Stem cells and their potential for clinical application: the meeting of the NATO-Advanced Study Institute (ASI) : the works of the meeting (Kiev and Simeiz, Ukraine, 23 – 31 August, 2006) / edited by. N. M. Bilko, B. Fehse, W. Ostertag, A. R. Zander*. The Netherlands, Dordrecht: Springer, 2008. P. 77—82.
168. Bykov A. T., Rybkina V. A., Kovalenko V. V. Hemodynamics state at different modes of systemic air cryogenic exposure // *European Researcher*. 2012. Vol. 34, № 11–2. P. 1929—1934.

169. Carro A., Kaski J. C. Myocardial infarction in the elderly // *Aging and Disease*. 2011. Vol. 2, № 1. P. 116—137.
170. Chotinantakul K., Prasajak P., Leeanansaksiri W. Wnt1 accelerates an ex vivo expansion of human cord blood CD34+CD38– cells // *Stem Cells International: Electronic source*. 2013. Vol. 2013. 12 p. DOI: 10.1155/2013/909812.
171. Cold-impaired cardiac performance in rats is only partially overcome by cold acclimation / D. Hauton, S. May, R. Sabharwal et al. // *The Journal of Experimental Biology*. 2011. Vol. 214. P. 3021—3031.
172. Conley A. J., Bird I. M. The role of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and 3 betahydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the delta 5 and delta 4 pathways of steroidogenesis in mammals // *Biol. Reprod.* 1997. Vol. 56. P. 789—799. DOI: 10.1095/biolreprod56.4.789.
173. Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brain / J. M. Weimann, C. A. Charlton, T. R. Brazelton et al. // *PNAS*. 2003. Vol. 100. P. 2088—2093.
174. Cooper D.S. Subclinical thyroid disease a clinicians perspective. // *Ann Intern Med*. 1998. Vol. 129. P. 135—138.
175. Cord blood CD4(+)CD25(+)-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function / W. R. Godfrey, D. J. Spoden, Y. G. Ge et al. // *Blood*. 2005. Vol. 105 (2). P.750—758. DOI: 10.1182/blood-2004-06-2467.
176. Cord blood transplants supported by co-infusion of mobilized hematopoietic stem cells from a third-party donor / G. Bautista, J. R. Cabrera, C. Regidor et al. // *Bone Marrow Transplantation*. 2009. Vol. 43, № 5. P. 365—373. DOI: 10.1038/bmt.2008.329.
177. Correale J., Villa A. Cellular elements of the blood-brain barrier // *Neurochem Res*. 2009. Vol.34. P.2067—2077.

178. Cryopreserved Placental Explants Increase Lifespan of Male Mice and Change Survival Features of Female Mice / V. Y. Prokopyuk, O. V. Chub, N. A. Shevchenko et al. // Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2017. Vol. 27, №. 2. P. 143—150.
179. Current status of cord blood banking and transplantation in the United States and Europe / K. Ballen, H. E. Broxmeyer, J. McCullough et al. // Biol. Blood and Marrow Transplant. 2001. Vol. 7. P. 635—645.
180. Dai D.-F., Rabinovitch P. S., Ungvari Z. Mitochondria and Cardiovascular Aging // Circulation Research. 2012. Vol. 110. P. 1109—1124. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.246140.
181. Dehydroepiandrosterone antagonizes the neurotoxic effects of corticosterone and translocation of stress-activated protein kinase 3 in hippocampal primary cultures / V. G. Kimonides, M. G. Spillantini, M. V. Sofroniew et al. // Neuroscience. 1999. № 2. P. 429—436.
182. Effect of graft source on unrelated donor haemopoietic stem-cell transplantation in adults with acute leukaemia: a retrospective analysis / M. Eapen, V. Rocha, G. Sanz et al. // Lancet Oncol. 2010. Vol. 11 (7). P. 653—660.
183. Effect of stem cell source on transplant outcomes in adults with acute leukaemia: a comparison of unrelated marrow (BM), peripheral blood (PB) and cord blood (CB) / M. Eapen, V. Rocha, A. Scaradavou et al. // Blood. 2008. Vol. 112. P. 62—63.
184. Effects of heat stress on endocrine functions & behaviour in the pre-pubertal rat / F. Mete, E. Kilic, A. Somay, B. Yilmaz // The Indian Journal of Medical Research: Electronic source. 2012. Vol. 135 (2). P. 233—239. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3336856> (Last accessed: 12.05.2017).
185. Effects of repeated whole-body cold exposures on serum concentrations of growth hormone, thyrotropin, prolactin and thyroid hormones in healthy

- women / J. Smolander, J. Leppäluoto, T. Westerlund et al. // *Cryobiology*. 2009. Vol. 58 (3). P. 275—278.
186. Efficacy, recovery, and safety of RBCs from autologous placental blood: clinical experience in 52 newborns / T. Brune, H. Garritsen, R. Hentschel et al. // *Transfusion*. 2003. Vol. 43 (9). P. 1210—1216.
 187. *Electron microscopy: methods and protocols*: 2nd ed. / ed. by John Kuo. Totowa, New Jersey, 2007. 625 p.
 188. Enhanced engraftment of a very low-dose cord blood unit in an adult haemopoietic transplant by addition of six mismatched viable cord units / S. J. Proctor, C. E. Chapman, R. Sharples et al. // *Stem Cells International: Electronic source*. 2010. Vol. 2010. 4p. DOI: 10.4061/2010/431909.
 189. Ershler W. B., Artz A. S., Keller E. T. Issues of aging and geriatric medicine: relevance to cancer treatment and hematopoietic reconstitution // *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2006. Vol. 12, Is. 1. P. 100—106.
 190. Escalón M. P., Komanduri K. V. Cord blood transplantation: evolving strategies to improve engraftment and immune reconstitution // *Curr. Opin. Oncol.* 2010. Vol. 22(2). P. 122—129.
 191. Ex vivo expansion of umbilical cord blood stem cells for transplantation: growing knowledge from the hematopoietic niche / C. C. Hofmeister, J. Zhang, K. L. Knight et al. // *Bone Marrow Transplant*. 2007. Vol. 39. P. 11—23.
 192. Fernandez M. N. Improving the outcome of cord blood transplantation: use of mobilized HSC and other cells from third party donors // *British Journal of Haematology*. 2009. Vol. 147, № 2. P. 161—176. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2009.07766.x.
 193. Fernández M. N., Regidor C., Cabrera R. Unrelated umbilical cord blood transplants in adults: early recovery of neutrophils by supportive co-transplantation of a low number of highly purified peripheral blood CD34+ cells from an HLA-haploidentical donor // *Experimental Hematology*. 2003. Vol. 31, № 6. P. 535—544. DOI: 10.1016/S0301-472X(03)00067-5.

194. Fluck C. E., Miller W. L., Auchus R. J. The 17, 20-lyase activity of cytochrome p450c17 from human fetal testis favors the delta5 steroidogenic pathway // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003. Vol. 88. P. 3762—3766. DOI: 10.1210/jc.2003-030143.
195. Fricke R. Ganzkurperkaltetherapie in einer Kaltekammer mit Temperaturen um -110 °C // *Z. Phys. Med. Baln. Med. Klim.* 1989. Vol.18. P. 1—10.
196. Gluckman E., Rocha V. Cord blood transplantation for children with acute leukaemia: a Eurocord registry analysis // *Blood Cells, Molecules, and Diseases.* 2004. Vol. 33, № 3. P. 271—273.
197. Gluckman E., Rocha V. Cord blood transplantation: state of the art // *Haematologica.* 2009. № 94 (4). P. 451—454.
198. Goodell M. A., Rando Th. A. Stem cells and healthy aging // *Science.* 2015. Vol. 350, Iss. 6265. P. 1199 —1204. DOI: 10.1126/science.aab3388.
199. Grischenko V .I., Babiychuk L. A., Petrenko A. Yu. Cryopreservation of stem cells // *Stem cells and their potential for clinical application: the meeting of the NATO-Advanced Study Institute (ASI) : the works of the meeting (Kiev and Simeiz, Ukraine, 23 – 31 August, 2006) / edited by. N. M. Bilko, B. Fehse, W. Ostertag, A. R. Zander. The Netherlands, Dordrecht: Springer, 2008. P. 223—231.*
200. Grove J. E., Bruscia E., Krause D. S. Plasticity of bone marrow-derived stem cells // *Stem Cells.* 2004. Vol. 22. P. 487—500.
201. Handa R. J., Weiser M. J. Gonadal steroid hormones and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis // *Frontiers in Neuroendocrinology.* 2014. Vol. 35, Iss. 2. P. 197—220. DOI: 10.1016/j.yfrne.2013.11.001.
202. Hariharan N., Sussman M. A. Cardiac aging — Getting to the stem of the problem // *Journal of molecular and cellular cardiology.* 2015. Vol. 83. P. 32—36. DOI: 10.1016/j.bbadis.2013.09.016.
203. Harris D. T. Experience in autologous and allogeneic cord blood banking // *J. Heamatother.* 1996. Vol. 5, № 2. P. 123—128.

204. Harris D. T., Schumacher J. M., Locascio J. Phenotypic and functional immaturity of human umbilical cord blood T-lymphocytes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992. Vol. 89, №21. P. 10006—10010.
205. Haspel R. L., Ballen K. K. Double cord blood transplants: filling a niche? // *Stem Cell Rev*. 2006. Vol. 2. P. 81—86.
206. Health in 2015: from MDGs, Millennium Development Goals to SDGs, Sustainable Development Goal: World Health Organization report [Electronic source] / World Health Organization // *Noncommunicable diseases*. France, 2015. Chapter 6. 133—152. URL: <http://www.who.int/gho/publications/mdgs-sdgs/en/> (Last accessed: 05.12.2017)
207. Heart rate variability during nNOS inhibition in spontaneously hypertensive rats /P. Markova, B. Iliev, D. Popov, R. Girchev // *Trakia Journal of Sciences*. 2010. Vol. 8, Suppl. 2. P. 114—118.
208. Helfand M., Redfern C. C. Screening for thyroid disease an update // *Ann Intern Med*. 1998. № 129. C. 140—143.
209. Hematological Parameters, and Hematopoietic Growth Factors: Epo and IL-3 in Response to Whole-Body Cryostimulation (WBC) in Military Academy Students / Z. Szygula, A. Lubkowska, C. Giemza et al. // *PLoS ONE: Electronic source*. 2014. Vol. 9 (4). 7 p.: e93096. DOI: 10.1371/journal.pone.0093096.
210. Hematological profile and martial status in rugby players during whole body cryostimulation / G. Lombardi, P. Lanteri, S. Porcelli et al. // *PLoS ONE: Electronic source*. 2013. Vol. 8 (2). 6 p.: e55803. : DOI: 10.1371/journal.pone.0055803.
211. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling / E. Gluckman, H. A. Broxmeyer, A. D. Auerbach et al. // *N Engl J Med*. 1989. Vol. 321. P. 1174—1178.
212. Human umbilical cord blood stem cells infusion in spinal cord injury: engraftment and beneficial influence on behavior / S. Saporta, J.-J. Kim,

- A. E. Willing et al. // *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research*. 2003. Vol. 12, №. 3. P. 271—278.
213. Human umbilical cord plasma proteins revitalize hippocampal function in aged mice / J. M. Castellano, K. I. Mosher, R. J. Abbey et al. // *Nature*. 2017. Vol. 544, №. 7651. P. 488—492. DOI: 10.1038/nature22067.
214. Impact of Frozen-Thawed Cord Blood Nucleated Cells Combined with Extreme Whole Body Cooling on Rat's Neurohumoral Regulation in Dynamics of Aging / Yu. V. Martynova, L. V. Babiychuk, V. G. Babiychuk et al. // *Cold Applications in Life Sciences: proceedings of the IIR Workshop (Dresden, 08–09 September 2016)*. P. 40—44. DOI: 10.18462/iir.cals.2016.0010.
215. Improved antioxidative protection in winter swimmers / W. Siems, R. Brenke, O. Sommerburg, T. Grune // *Q J Med*. 1999. Vol. 99. P. 193—198.
216. In vitro-expanded human CD4(+)CD25(+) T-regulatory cells can markedly inhibit allogeneic dendritic cell-stimulated MLR cultures / W. R. Godfrey, Y. G. Ge, D. J. Spoden et al. // *Blood*. 2004. Vol. 104 (2). P. 453—461. DOI: 10.1182/blood-2004-01-0151.
217. Influence of whole body cryotherapy on depressive symptoms—preliminary report / J. Rymaszewska, A. Tulczynski, Z. Zagrobelny et al. // *Acta Neuropsychiatrica*. 2003. Vol.15. P.122–128.
218. Ingram D. K., Jucker M. Developing mouse models of aging: a consideration of strain differences in age-related behavioral and neural parameters // *Neurobiol. Aging*. 1999. Vol. 20. P. 137—145.
219. Insights and hopes in umbilical cord blood stem cell transplantations / S. Shahrokhi, F. Menaa, K. Alimoghaddam et al. // *Journal of Biomedicine and Biotechnology: Electronic source*. 2012. Vol. 2012. 11 p. DOI: 10.1155/2012/572821.
220. Intra-BM injection to enhance engraftment after myeloablative umbilical cord blood transplantation with two partially HLA-matched units / C. G.

- Brunstein, J. N. Barker, D. J. Weisdorf et al. // *Bone Marrow Transplant*. 2009. Vol. 43. P. 935—940.
221. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats / J. Chen, P. R. Sanberg, Y. Li et al. // *Stroke*. 2001. Vol. 32, №. 11. P. 2682—2688.
222. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces neurological deficit in the rat after traumatic brain injury / D. Lu, P. R. Sanberg, A. Mahmood et al. // *Cell Transplantation*. 2002. Vol. 11, №. 3. P. 275—281.
223. Karim N., Hasan J. A., Ali S. S. Heart rate variability – a review // *Journal of Basic and Applied Sciences*. 2011. Vol. 7, No. 1. P. 71—77.
224. Karnovsky M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy // *J. Cell. Biol.* 1965. Vol. 27. P. 137—138.
225. Kendall K. L., Fairman C. M. Women and exercise in aging // *Journal of Sport and Health Science*. 2014. Vol. 3. P.170—178.
226. Khodabux C. M., Brand A. The use of cord blood for transfusion purposes: current status // *Vox Sang*. 2009. Vol. 97(4). P. 281—293.
227. Knowles R. G., Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals // *Biochemical Journal*. 1994. Vol. 298 (Pt 2). 249—258.
228. Kolling Th., Knopf M. Late life human development: boosting or buffering universal biological aging // *GeroPsych*. 2014. Vol. 27 (3). P. 103—108.
229. Levy B. I. Artery changes with aging: Degeneration or adaptation? // *Dialog. Cardiovas. Med*. 2001. V.6 (2). P. 104—111.
230. Lewis I. D. Clinical and experimental uses of umbilical cord blood // *Internal Medicine Journal*. 2002. Vol. 32, №. 12. P. 601—609.
231. Longcope C. Dehydroepiandrosterone metabolism // *J. Endocrinol*. 1996. Vol. 150, Iss.3 (Suppl.). P. 125—127. – DOI: 10.1677/joe.0.150S125.
232. Lubkowska A. Cryotherapy: Physiological Considerations and Applications to Physical Therapy / Edited by Dr. Josette Bettany-Saltikov // *Physical*

- Therapy Perspectives in the 21st Century—Challenges and Possibilities. InTech, 2012. Chapt.7. P. 155—176. DOI: 10.5772/35055.
233. Lubkowska A., Dołęgowska B., Szyguła Z. Whole-Body Cryostimulation—Potential Beneficial Treatment for Improving Antioxidant Capacity in Healthy Men—Significance of the Number of Sessions / A. Lubkowska // PLoS ONE: Electronic source. 2012. Vol. 7 (10). 10 p.: e46352. DOI: 10.1371/journal.pone.0046352.
 234. Macauley D. C. Ice therapy: how good is the evidence? // Int J Sports Med. 2001. Vol. 22. P. 379—384.
 235. Majhail N. S., Brunstein C. G., Wagner J. E. Double umbilical cord blood transplantation // Curr Opin Immunol. 2006. Vol. 18. P. 571—575.
 236. Martynova Yu. V., Babiichuk V. G., Nevzorov V. P. Influence of repeated sessions of rhythmic extreme whole-body cooling (-120°C) on features of cardiomyocyte's ultrastructure in dynamics of rats' aging // The 52nd Annual Meeting of the Society for Cryobiology : conference proceedings (Ostrava, 26–29 July, 2015). Cryobiology. 2015. Vol. 71, Is. 3. P. 561.
 237. Martynova Yu. V., Babiychuk V. G. Effects of repeated cycles of rhythmic extreme whole body cooling on indices of neurohumoral regulation in rat's aging // SLTB Symposium 2016 : Book of abstracts annual meeting of the Society of Low Temperature biology (Dresden, 7 September, 2016). Dresden, 2016. P. 13.
 238. Martynova Yu., Babiichuk V. Vegetative regulation of heart rhythm and myocardium structure after whole-body cryostimulation in dynamics of aging in rats: remote effect // LIMSC 2017 : Book of abstracts Leiden International (bio-)Medical Student Conference (Leiden, 16–19 March, 2017). Leiden, 2017. P. 184.
 239. Maunsbach A. B., Afzelius B. A. Biomedical electron microscopy. Academic press, 1999. 552 p.
 240. McDowell J. H., McFarlamd E. G., Nalli B. J. Use of cryotherapy for orthopaedic patients // Orthopaedic Nursing. 1994. Vol. 13. P. 21—30.

241. McKenna D., Sheth J. Umbilical cord blood: Current status & promise for the future // *Indian J Med Res.*: Electronic source. 2011. Vol. 134 (3). P. 261—269. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3193706/?report=classic> (Last accessed: 12.05.2017).
242. Mechanisms of the pro- and anti-oxidant actions of nitric oxide in atherosclerosis / R. P. Patel A. Levonen, J. H. Crawford, V. M. Darley-Usmar // *Cardiovasc Res.* 2000. Vol. 47. P. 465—474.
243. Metabolomic markers reveal novel pathways of ageing and early development in human populations / Cr. Menni, G. Kastenmüller, A. Kr.Petersen et al. // *International Journal of Epidemiology*: Electronic source. 2013. P. 1—9. DOI: 10.1093/ije/dyt094.
244. Methods of Preparation for Electron Microscopy: An Introduction for the Biomedical Sciences / D. G. Robinson . U. Ehlers . R. Herken et al. Springer-Verlag, 1987. 203 p.
245. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller et al. // *Cytotherapy*. 2006. Vol. 8, №. 4. P. 315—317.
246. Modulation of the SDF-1-CXCR4 axis by the third complement component (C3)-implications for trafficking of CXCR4+ stem cells / M. Z. Ratajczak, R. Reca, M. Wysoczynski et al. // *Exp Hematol*. 2006. Vol. 34. P. 986—995.
247. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! / M. Secco, E. Zucconi, N. M. Vieira et al. // *Stem Cells*. Vol. 26. P. 146—150. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0381.
248. Nabelschnurblut-Stammzellspende: Wie ist der heutige Stand? / A. M. Wagner, D. Surbek, G. Nicoloso u.a. // *Schweiz Med Forum*. 2011. B. 11 (39). S. 676—680.
249. Nagamura-Inoue T., He H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility // *World J Stem Cells*: Electronic source. 2014. Vol. 6, Is. 2. P. 195—202. DOI: 10.4252/wjsc.v6.i2.195.

250. Neunzig J., Bernhardt R. Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) stimulates the first step in the biosynthesis of steroid hormones // PLoS ONE: Electronic source. 2014. Vol. 9 (2). 7 p.: e89727. DOI: 10.1371/journal.pone.
251. Neurobiology of DHEA and effects on sexuality, mood and cognition / N. Pluchino, P. Drakopoulos, F. Bianchi-Demicheli et al. // Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology. 2015. Vol. 145. P. 273—280. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2014.04.012.
252. Neurohumoral changes in rats of different age groups on the background of injection of cryopreserved cord blood nucleated cells / Yu. V. Martynova, V. G. Babiychuk, L. A. Sirotenko et al. // Advances in Gerontology. 2016. Vol. 6, No. 4. P. 304—310.
253. Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients / S. Weill-Engerer, J. P. David, V. Sazdovitch et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2002. Vol. 87. P. 5138—5143. DOI: 10.1210/jc.2002-020878.
254. Nuriya M., Shinotsuka T., Yasui M. Diffusion Properties of Molecules at the Blood-Brain Interface: Potential Contributions of Astrocyte Endfeet to Diffusion Barrier Functions // Cereb. Cortex. 2013. Vol. 23. P. 2118—2126.
255. O'Brien C. Reproducibility of the cold-induced vasodilatation response in the human finger // J Appl Physiol. 2005. Vol. 98 (4). P. 254—259. DOI: 10.1152/jappphysiol.00859.2004.
256. Optimizing umbilical cord blood collection: impact of obstetric factors versus quality of cord blood units / F. Mancinelli, A. Tamburini, A. Spagnoli et al. // Transplantation Proceedings. 2006. Vol. 38, №. 4. P. 1174—1176. DOI: 10.1016/j.transproceed.2006.03.052.
257. Oxytocin is an age-specific circulating hormone that is necessary for muscle maintenance and regeneration / Ch. Elabd, W. Cousin, P. Upadhyayula et al. // Nat. Commun.: Electronic source. 2014. Vol. 5. Art. 4082, 11 p. DOI: 10.1038/ncomms5082.

258. Papenfuß W. Power from the Cold: Whole body cryotherapy at -110°C / 1st ed. Regensburg: Friedrich Kehrler, 2006. 143p.
259. Parsons K. C. Human thermal environments: the effects of hot, moderate, and cold environments on human health, comfort and performance / 2nd ed. London and New York: Taylor and Francis, 2003. 560 p.
260. Paxson C. L. Jr. Collection and use of autologous fetal blood / Charles L. Jr. Paxson // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1979. Vol. 134(6). P. 708—710.
261. Pelosi E., Castelli G., Testa U. Human umbilical cord is a unique and safe source of various types of stem cells suitable for treatment of hematological diseases and for regenerative medicine // *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2012. Vol. 49. P. 20—28.
262. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis / R. Daneman, L. Zhou, A. A. Kebede, B. A. Barres // *Nature*. 2010. Vol. 468. P.562—566.
263. Pericytes regulate the blood-brain barrier / A. Armulik, G. Genove, M. Mae et al. // *Nature*. 2010. Vol. 468. P.557—561.
264. Petropoulou A. D., Rocha V. Risk factors and options to improve engraftment in unrelated cord blood transplantation // *Stem Cells International: Electronic source*. 2011. Vol. 2011. 8 p. DOI: 10.4061/2011/610514.
265. Physiology of thyroid hormones // *Drug Evaluations Annual 1995* / Division of Drugs and Toxicology, American Medical Association. Chicago, 1995. Ch. 47. P. 1039—1040.
266. Possible role of cortisol and dehydroepiandrosterone in human development and psychopathology / I. M. Goodyer, R. J. Park, C. M. Netherton, J. Herbert // *Br. J. Psychiatry*. 2001. Vol. 179. P. 243—249.
267. Power spectral analysis of heart rate variability as a new method for assessing autonomic activity in the rat / M. Kuwahara, K. Yayou, K. Ishii et al. // *J. Electrocardiol.* 1994. Vol. 27, № 4. P. 333—337.

268. Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain / C. Corpechot, M. Synguelakis, S. Talha et al. // *Brain Res.* 1983. Vol. 270. P. 119—125. DOI: 10.1016/0006-8993(83)90797-7.
269. Primary prevention of coronary heart disease in women through diet and lifestyle / M. J. Stampfer, F. B. Hu, J. E. Manson et al. // *N Engl J Med.* 2000. Vol. 343. P. 16—22.
270. Program for testing biological interventions to promote health aging / H. R. Warner, D. Ingram, R. A. Miller et al. // *Mech. Aging Dev.* 2000. Vol. 155. P. 199—208.
271. Prompt and durable engraftment in two older adult patients with high risk chronic myelogenous leukemia (CML) using ex vivo expanded and unmanipulated unrelated umbilical cord blood / A. L. Pecora, P. Stiff, A. Jennis et al. // *Bone Marrow Transplant.* 2000. Vol. 25. P. 797—799.
272. Protocols for hematopoietic stem cell expansion from umbilical cord blood / S. Koestenbauer, A. Zisch, G. Dohr, N. H. Zech // *Cell Transplant.* 2009. Vol. 18. P. 1059—1068.
273. Ramirez P. A., Wagner J. E., Brunstein C. G. Going straight to the point: intra-BM injection of hematopoietic progenitors // *Bone Marrow Transplantation: Electronic source.* 2010. 7 p. DOI: 10.1038/bmt.2010.39.
274. Reed M. J., Robertson C. E., Addison P. S. Heart rate variability measurements and the prediction of ventricular arrhythmias // *Q J Med.* 2005. Vol. 98. P. 87—95.
275. Relapse risk after umbilical cord blood transplantation: enhanced graft-versus-leukemia effect in recipients of 2 units / M. R. Verneris, C. G. Brunstein, J. Barker et al. // *Blood.* 2009. Vol. 114. P. 4293—4299.
276. Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle / M. Sinha, Y. C. Jang, J. Oh et al. // *Science.* 2014. Vol. 344, № 6184. P. 649—652. DOI:10.1126/science.1251152.

277. Resuscitation from experimental heatstroke by transplantation of human umbilical cord blood cells / S.-H.Chen, F.-M.Chang, Y.-C. Tsai et al. // *Critical Care Medicine*. 2005. Vol. 33, № 6. P. 1377—1383.
278. Rocha V., Gluckman E. Clinical use of umbilical cord blood hematopoietic stem cells // *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2006. Vol. 12, Is. 1. P. 34—41.
279. Ruiz-Cortés Z. T. Gonadal Sex Steroids: Production, Action and Interactions in Mammals // *From Physiology to Clinical Medicine: Chapter 1* / ed. by Sergej M. Ostojic. 2012. P. 3 – 44. DOI: 10.5772/52994.
280. Saul J. P. Beat-to-beat variations of heart rate reflect modulation of cardiac autonomic outflow // *News Physiol. Sci.* 1990. Vol. 5. P. 32—37.
281. Savage M. V., Brengelmann G. L. Control of skin blood flow in the neutral zone of human body temperature regulation // *J Appl Physiol*. 1996. Vol. 80(4). P. 1249—1257.
282. Shiogai Y., Stefanovska A., McClintock P. V. E. Nonlinear dynamics of cardiovascular ageing // *Physics Reports*. Vol. 488. 2010. P. 51—110.
283. Shirvaikar N., Marquez-Curtis L. A., Janowska-Wieczorek A. Hematopoietic stem cell mobilization and homing after transplantation: the role of MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP // *Biochemistry Research International: Electronic source*. 2012. Vol. 2012. 11 p. DOI: 10.1155/2012/685267.
284. Silver Nanoparticle Induced Blood-Brain Barrier Inflammation and Increased Permeability in Primary Rat Brain Microvessel Endothelial Cells / W. J. Trickler, S. M. Lantz, R. C. Murdock et al. // *Toxicol. Sci.* 2010. Vol. 118. P. 160—170.
285. Spastic Paresis After Perinatal Brain Damage in Rats Is Reduced by Human Cord Blood Mononuclear Cells / C. Meier, J. Middelans, B. Wasielewski et al. // *Pediatric research*. 2006. Vol. 59, No. 2. P. 244—249.
286. Stammzellen aus Nabelschnurblut—ein besonderes Gut / T. W. Goecke, S. M. Jud, V. Weisbach u.a. // *Geburtsh Frauenheilk*. 2010. B. 70. S. 3—16.

287. Stanek A., Sieron A., Sliwinski Z. Application of cryotherapy in medicine // Криотерапия как инновационный метод в клинической практике : сборн. науч. работ науч.-практ. конф. с междунар. участ. / Под общ. ред. проф. О. А. Панченко. Киев: КВИЦ, 2013. С. 22—33.
288. Stem and progenitor cells in human umbilical cord blood / M. W. Lee, I. K. Jang, K. H. Yoo et al. // *Int J Hematol.* 2010. Vol. 92. P. 45—51.
289. Structure and function of the blood-brain barrier / N. J. Abbott, A. A. Patabendige, D. E. Dolman et al. // *Neurobiol Dis.* 2010. Vol. 37. P.13—25.
290. Swenson C., Sward L., Karlsson J. Cryotherapy in sports medicine // *Scand J Med Sci Spor.* 1996. Vol. 6. P. 193—200.
291. Terman A., Brunk U. T. Oxidative stress, accumulation of biological “garbage”, and aging // *Antioxid. Redox Signal.* 2006. Vol. 8. P. 197—204.
292. The effect of whole-body cryostimulation on the prooxidant–antioxidant balance in blood of elite kayakers after training / A. Wozniak, B. Wozniak, G. Drewa, C. Mila-Kierzenkowska // *Eur.J.Appl.Physiol.* 2007. Vol. 101 (5). P. 533—537.
293. The potential of cord blood stem cells for use in regenerative medicine / D. T. Harris, M. Badowski, N. Ahmad, M. A. Gaballa // *Expert Opinion on Biological Therapy.* 2007. Vol. 7, № 9. P. 1311—1322.
294. Thorner M. O. Endocrinology of aging: the convergence of reductionist science with systems biology and integrative medicine // *Frontiers in Endocrinology: Electronic source.* 2010. Vol. 1. 1p. – DOI: 10.3389/fendo.2010.00002.
295. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy / J. N. Barker, D. J. Weisdorf, T. E. DeFor et al. // *Blood.* 2005. Vol. 105, № 3. P. 1343—1347.
296. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD 34 cell dose and HLA

- disparity on treatment-related mortality and survival / J. E. Wagner, J. N. Barker, T. E. DeFor et al. // *Blood*. 2002. Vol. 100, № 5. P. 1611—1618.
297. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood utilizing double-unit grafts for five teenagers with transfusion-dependent thalassemia / T. H. Jaing, C. P. Yang, I. J. Hung et al. // *Bone Marrow Transplant*. 2007. Vol. 40 (4). P. 307—311. DOI: 10.1038/sj.bmt.1705737.
298. Turnheim K. Drug therapy in the elderly // *Exp. Geront*. 2004. Vol. 39. P. 1731—1738.
299. Umbilical cord blood-derived stem cells improve heat tolerance and hypothalamic damage in heat stressed mice / L.-Sh. Tseng, Sh.-H. Chen, M.-T. Lin, Y.-Ch. Lin // *BioMed Research International: Electronic source*. 2014. Vol. 2014. 8 p.. Article ID 685683. DOI: 10.1155/2014/685683.
300. Wagner J. E., Gluckman E. Umbilical cord blood transplantation: the first 20 years // *Semin. Hematol*. 2010. Vol. 47 (1). P. 3—12.
301. Ward J. M. Background data and variations in tumor rates of control rats and mice // *Progr. Exp. Tumor Res*. 1983. Vol. 26. P. 241—258.
302. Watt S., Contreras M. Stem cell medicine: Umbilical cord blood and its stem cell potential // *Semin. Fetal Neonat. Med*. 2005. Vol. 209, № 10. P. 201—207.
303. Westerlund T. Thermal, circulatory, and neuromuscular responses to wholebody cryotherapy: Academic dissertation D. Medica / University of Oulu. Oulu, 2009. 76 p. URL: <http://herkules.oulu.fi/isbn9789514290435/isbn9789514290435.pdf> (Last accessed: 07.05.2017).
304. White G. E., Wells G. D. Cold-water immersion and other forms of cryotherapy: physiological changes potentially affecting recovery from high-intensity exercise // *Extreme Physiology & Medicine: Electronic source*. 2013. Vol. 2, No. 26. 11 p. DOI: 10.1186/2046-7648-2-26.

305. Whole-body cryotherapy in rehabilitation of patients with rheumatoid diseases—pilot study / D. Metzger, C. Zwingmann, W. Protz, Wh. Jackel // Rehabilitation. 2000. Vol. 39. P. 93—100.
306. Whole-body cryotherapy: empirical evidence and theoretical perspectives / C. M. Bleakley, F. Bieuzen, G. W. Davison, J. T. Costello // Open Access Journal of Sports Medicine. 2014. Vol. 5. P. 25—36. DOI: 10.2147/OAJSM.S41655.
307. World Health Organization—Noncommunicable Diseases (NCD) Country Profiles, 2014: Electronic source. URL: http://www.who.int/nmh/countries/ukr_en.pdf. (Last accessed 07.05.2017)
308. Yamauchi T. Whole body cryotherapy is method of extreme cold -175°C treatment, initially used for reumathoid arthritis // Z Phys Medical Baln Klim. 1986. Vol. 19. P. 311.
309. Yan Liang-Jun. Positive oxidative stress in aging and aging-related disease tolerance // Redox. Biology. 2014. Vol. 2. P. 165—169.
310. Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice / S. A Villeda, K. E. Plambeck, J. Middeldorp et al. // Nat. Med. 2014. Vol. 20 (6). P. 659–663. DOI: 10.1038/nm.3569.

Додаток А

Список публікацій здобувача за темою дисертації

Статті у фахових журналах України

1. Состояние вегетативной и гуморальной регуляции сердечного ритма молодых и старых крыс на фоне ритмического экстремального охлаждения в сочетании с введением ядросодержащих клеток кордовой крови / **Ю. В. Руднева**, В. Г. Бабийчук, Е. А. Чернявская, В. В. Кулик // Проблемы криобиологии и криомедицины. 2013. Т. 23, № 4. С. 318–325. (*Scopus*)
2. Особенности изменений ультраструктурной организации кардиомиоцитов и эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда крыс в динамике старения / **Ю. В. Руднева**, В. П. Невзоров, В. Г. Бабийчук, Е. А. Чернявская, В. В. Кулик // Вісник проблем біології і медицини. 2014. Вип. 4, Т. 2 (114). С. 253–258.
3. **Мартынова Ю. В.**, Бабийчук Л. В. Оценка нейрогуморальной регуляции сердечного ритма в динамике старения крыс на фоне повторного введения ядросодержащих клеток кордовой крови // Вісник Луганського національного університету імені Тараса Шевченка. 2014. Частина І: Біологічні науки. № 12 (295). С. 14–22.
4. Особенности изменений ультраструктурной организации кардиомиоцитов и эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда крыс в динамике старения после сочетанного применения кордовой крови и экстремального охлаждения (-120°C) / **Ю. В. Мартынова**, В. П. Невзоров, В. Г. Бабийчук, Е. А. Чернявская, В. В. Кулик // Вісник проблем біології і медицини. 2015. Вип. 2, Т. 1 (118). С. 244–250.
5. Ультраструктурная организация эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда в динамике старения крыс на фоне применения криоконсервированного препарата кордовой крови / **Ю. В. Мартынова**, В. П. Невзоров, В. Г. Бабийчук, Е. А. Чернявская, В. В. Кулик // Світ медицини та біології. 2015. №2 (49). С. 104–107.

Статті в журналах та збірках матеріалів конференцій інших країн, які
входять до міжнародних наукометричних баз

6. Neurohumoral changes in rats of different age groups on the background of injection of cryopreserved cord blood nucleated cells / **Yu. V. Martynova**, V. G. Babychuk, L. A. Sirotenko, N. G. Malova, L. V. Babychuk // *Advances in Gerontology*. 2016. Vol. 6, No. 4. P. 304–310. (*Scopus*)

7. Impact of Frozen-Thawed Cord Blood Nucleated Cells Combined with Extreme Whole Body Cooling on Rat's Neurohumoral Regulation in Dynamics of Aging / **Yu. V. Martynova**, L. V. Babychuk, V. G. Babychuk, L. A. Sirotenko, N.G. Malova // *Cold Applications in Life Sciences: proceedings of the IIR Workshop (Dresden, 08–09 September 2016)*. P. 40–44. DOI: 10.18462/iir.cals.2016.0010 (*Scopus*)

Статті в наукових періодичних виданнях інших країн

8. **Руднева Ю. В.**, Бабийчук В. Г., Чернявская Е. А. Влияние ядродержащих клеток кордовой крови на показатели спектрального анализа вариабельности сердечного ритма у молодых и старых крыс // «Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі»: Серия біялогічных наук; серия медыцынскіх наук. 2014. Ч. 4., прил. С. 131–135. (*“Перечень научных изданий Республики Беларусь для опубликования результатов диссертационных исследований”*)

9. Влияние ритмических экстремальных холодовых воздействий и кордовой крови на состояние вегетативной регуляции сердечным ритмом у животных различных возрастных групп в норме и при алиментарном ожирении / **Ю. В. Руднева**, В. Г. Бабийчук, Е. А. Чернявская, В. В. Кулик, Л. В. Бабийчук // *Криоконсервация генетических ресурсов. Современное состояние, проблемы и перспективы: материалы науч.-практ. конф. с междунар. участ. (г. Пущино, 28–30 окт. 2014 г.)*. Биофизика живой клетки. 2014. Т.10. С. 171–173.

Статті в збірках матеріалів конференцій

10. Влияние ритмических экстремальных холодовых воздействий (-120°C) и кордовой крови на состояние вегетативной регуляции сердечного ритма в динамике старения крыс / Е. А. Чернявская, В. Г. Бабийчук, **Ю. В. Руднева**, В. В. Кулик, В. В. Мамонтов // Теоретические и практические аспекты современной криобиологии: материалы междунар. заочн. науч.-практ. конф. (Россия — Украина, 24 марта 2014 г.). Сыктывкар, 2014. С. 392–398.

11. **Руднева Ю. В.** Состояние нейрогуморальной регуляции сердечным ритмом в динамике старения крыс при повторных сеансах ритмического общего экстремального (-120°C) охлаждения // Адаптация биологических систем к естественным и экстремальным факторам среды: материалы V междунар. науч.-практ. конф. (г. Челябинск, 2–3 окт. 2014 г.). Челябинск, 2014. С. 219–224.

12. **Руднева Ю. В.**, Бабийчук В. Г. Влияние кордовой крови и ритмического экстремального охлаждения (-120°C) на состояние основных показателей спектрального анализа вариабельности сердечного ритма в динамике старения крыс // Вариабельность сердечного ритма: теоретические и прикладные аспекты: материалы Всероссийской заочн. науч.-практ. конф. (г. Чебоксары, 1 ноября 2014 г.). Чебоксары, 2014. С. 138–142.

13. **Мартинова Ю. В.**, Невзоров В. П., Бабийчук В. Г. Изменение ультраструктурной организации кардиомиоцитов после применения кордовой крови в динамике старения крыс // Микро- и макроанатомия: материалы II межкафедр. науч.-практ. конф. с междунар.участ. студентов и молодых ученых, посвящен. памяти Лойко Ромуальда Михайловича (г. Гомель, 13 марта 2015 г.). Гомель, 2015. С. 64–69.

Тези конференцій

14. **Руднева Ю. В.**, Бабийчук В. Г., Чернявская Е. А. Состояние вегетативной регуляции сердечного ритма у старых крыс при сочетанном применении ритмических экстремальных холодовых воздействий (-120°C) и

криоконсервированного препарата кордовой крови // Актуальные проблемы геронтологии и гериатрии: от теории к практике: материалы научно-практ. конф. и школы, посвящен. памяти академика В. В. Фролькиса (г. Киев, 16–17 мая 2013 г.). Проблемы старения и долголетия. 2013. Том 22, прил. С. 56.

15. **Руднева Ю. В.**, Бабийчук В. Г., Чернявская Е. А. Влияние ритмического экстремального охлаждения (-120°C) и ядросодержащих клеток кордовой крови на функциональное состояние систем нейрогуморальной регуляции у молодых и старых крыс // Холод в биологии и медицине — 2013: Актуальные проблемы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии: материалы 37-ой ежегодн. конф. молодых ученых (г. Харьков, 20–21 мая 2013 г.). Проблемы криобиологии и криомедицины. 2013. Т. 23, № 2. С. 16.

16. **Руднева Ю. В.**, Бабийчук В. Г., Чернявская Е. А. Влияние ядросодержащих клеток кордовой крови на показатели спектрального анализа вариабельности сердечного ритма у молодых и старых крыс // Молодежь в науке – 2013: материалы междунар. науч.-практ. конф., (г. Минск, 19–22 ноября 2013 г.). Минск, 2013. С. 270–273.

17. **Руднева Ю. В.**, Бабийчук В. Г., Чернявская Е. А. Особенности состояния вегетативной регуляции сердечного ритма у молодых крыс при сочетанном применении ритмических экстремальных холодовых воздействий (-120°C) и ядросодержащих клеток кордовой крови // матеріали XIX з'їзду Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнар. участю, (м. Львів, 26–29 травня 2014 р.). Фізіологічний журнал. 2014. Т. 60, № 3, дод. С. 92.

18. Вариабельность сердечного ритма в динамике старения крыс на фоне повторных сеансов ритмических экстремальных криовоздействий / **Ю. В. Руднева**, В. Г. Бабийчук, Е. А. Чернявская, В. В. Кулик // Холод в биологии и медицине — 2014: Актуальные проблемы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии: тезисы 38-ой ежегодн. конф. молодых ученых (г. Харьков, 21–22 мая 2014 г.) Проблемы криобиологии и криомедицины. 2014. Т. 22, № 2. С. 169.

19. **Мартінова Ю. В.** Гематоенцефалічний бар'єр та його зміни в умовах ритмічних холодових впливів // Біологічні дослідження — 2015: зб.наук. праць наук.-практ. конф. для молодих учених і студентів (м. Житомир, 11–12 березня 2015 р.). Житомир, 2015. С. 390–394.

20. **Martynova Yu. V.**, Babiichuk V. G., Nevzorov V. P. Influence of repeated sessions of rhythmic extreme whole-body cooling (-120°C) on features of cardiomyocyte's ultrastructure in dynamics of rats' aging // The 52nd Annual Meeting of the Society for Cryobiology: conference proceedings (Ostrava, 26–29 July, 2015). Cryobiology. 2015. Vol. 71, Is. 3. P. 561.

21. **Мартынова Ю. В.**, Бабийчук В. Г. Влияние повторных циклов ритмических криовоздействий (-120°C) на ультраструктурную организацию эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда в динамике старения крыс // Холод в биологии и медицине — 2015: Актуальные проблемы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии: материалы 39-ой ежегодн. конф. молодых ученых, посвящ. 70-летию ЮНЕСКО (г. Харьков, 20–21 мая 2015 г.). Проблемы криобиологии и криомедицины. 2015. Т. 25, № 2. С. 166.

22. **Мартынова Ю. В.**, Бабийчук В. Г. Ультраструктурные перестройки эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда в динамике старения крыс на фоне сочетанного применения экстремального охлаждения (-120°C) и клеток кордовой крови // Ендотеліальна дисфункція при вік-залежній патології — діагностика, профілактика, лікування: матеріали конф. (м. Київ, 12–13 листопада 2015 р.). Кровообіг та гемостаз. 2015. № 1–2 (47–48). С. 120–121.

23. **Мартынова Ю. В.**, Бабийчук В. Г., Сиротенко Л. А. Содержание тиреоидных гормонов в сыворотке крови крыс на фоне ритмического экстремального охлаждения (-120°C) // Advances in Science and Technology: материалы II междунар. науч.-практ. телеконф. (г. Пенза, 25 декабря 2015 г.). Actualscience. 2015. Т. 1, № 5 (5). С. 10–11.

24. **Мартынова Ю. В.**, Бабийчук В. Г. Влияние ритмических экстремальных холодовых воздействий на состояние вегетативной и

гуморально-метаболической регуляции сердечного ритма старых крыс // Біологічні дослідження — 2016: збірник наук. праць VII всеукраїнськ. наук.-практ. конф. для молодих учених і студентів (м. Житомир, 10-11 березня 2016 р.). Житомир: ПП «Рута», 2016. С. 278–280.

25. **Мартынова Ю. В.**, Бабийчук В. Г. Содержание тиреоидных гормонов в сыворотке крови крыс в динамике старения на фоне сочетанного применения экстремального охлаждения и ядросодержащих клеток кордовой крови // Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології: матеріали IV міжнар. наук. конф. студентів, аспірантів і молодих вчених (м. Вінниця, 12–14 квітня 2016 р.). Вінниця: ДРУК, 2016. С. 360–361.

26. **Мартынова Ю. В.**, Бабийчук В. Г. Влияние повторных циклов ритмических экстремальных холодовых воздействий (-120°C) на структурное состояние миокарда в динамике старения крыс // Холод в биологии и медицине — 2016: Актуальные проблемы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии: материалы 40-ой ежегодн. конф. молодых ученых (г. Харьков, 23–24 мая 2016 г.). Проблемы криобиологии и криомедицины. 2016. Т. 26, № 2. С. 159.

27. **Martynova Yu. V.**, Babiychuk V. G. Effects of repeated cycles of rhythmic extreme whole body cooling on indices of neurohumoral regulation in rat's aging // SLTB Symposium 2016: Book of abstracts annual meeting of the Society of Low Temperature biology (Dresden, 7 September 2016). Dresden, 2016. P. 13.

28. **Martynova Yu.**, Babiichuk V. Vegetative regulation of heart rhythm and myocardium structure after whole-body cryostimulation in dynamics of aging in rats: remote effect // LIMSC 2017: Book of abstracts Leiden International (bio-)Medical Student Conference (Leiden, 16–19 March 2017). Leiden, 2017. P. 184.

29. **Мартынова Ю. В.** Влияние ядросодержащих клеток пуповинной крови на морфометрические показатели миокарда крыс в динамике их старения // Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье: тезисы XX междунар. мед.-биолог. конф. молодых исследователей

(г. Санкт-Петербург, 22 апреля 2017 г.). Санкт-Петербург: Изд-во СПбГУ, 2017. С. 348–349.

30. **Мартінова Ю. В.**, Бабійчук В. Г. Вплив екстремального охолодження (-120°C) на функціональний стан організму молодих та старих щурів // VIII МАК 2017: тези VIII Міжнар. Антарктичн. Конф., присвяч. 25-ій річниці приєднання України до Договору про Антарктику (17 вересня 1992 р.) (м. Київ, 16–18 травня 2017 р.). Київ, 2017. С. 71–73.

31. **Мартінова Ю. В.**, Бабійчук В. Г., Логінова О. О. Вплив ритмічного екстремального охолодження (-120°C) на функціональний стан організму щурів у динаміці їх старіння // Холод в біології та медицині — 2017: Актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології: матеріали 41-ої щорічн. конф. молодих учених (м. Харків, 24–25 травня 2017 р.). Проблемы криобиологии и криомедицины. 2017. Т. 27, № 2. С. 159.

Додаток Б

Відомості про апробацію результатів дисертації

Матеріали дисертаційної роботи були представлені і обговорювалися на наукових форумах:

- конференціях молодих вчених ІПКіК НАН України «Холод в біології та медицині» (Харків, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017), особиста участь, усні доповіді;

- міжнародній науково-практичній конференції «Молодь у науці – 2013» (Республіка Білорусь, Мінськ, 2013), особиста участь, усна доповідь;

- науково-практичній конференції і школі, присвяченій пам'яті академіка В. В. Фролькіса, «Актуальні проблеми геронтології та геріатрії: від теорії до практики» (Київ, 2013), заочна участь;

- ХІХ з'їзді Українського фізіологічного товариства ім. П. Г. Костюка з міжнародною участю (Львів, 2014), заочна участь;

- міжнародній заочній науково-практичній конференції «Теоретичні та практичні аспекти сучасної кріобіології» (Росія–Україна, Сиктивкар, 2014), заочна участь;

- науково-практичній конференції з міжнародною участю «Кріоконсервація генетичних ресурсів. Сучасний стан, проблеми та перспективи » (Росія, Пушино, 2014), заочна участь;

- V міжнародній науково-практичній конференції «Адаптація біологічних систем до природних та екстремальних факторів середовища» (Росія, Челябінськ, 2014), заочна участь;

- всеросійській заочній науково-практичній конференції «Варіабельність серцевого ритму: теоретичні та прикладні аспекти» (Росія, Чебоксари, 2014), заочна участь;

- науково-практичних конференціях для молодих вчених та студентів «Біологічні дослідження – 2015» та «Біологічні дослідження – 2016» (Житомир, 2015, 2016), заочна участь;

- II міжкафедральній науково-практичній конференції з міжнародною участю студентів та молодих вчених, присвяченій пам'яті Лойко Ромуальда Михайловича «Мікро- та макроанатомія» (Республіка Білорусь, Гомель, 2015), заочна участь;
- міжнародній конференції «52nd Annual Meeting of the Society for Cryobiology and International Conference on Regenerative Medicine CRYO – 2015» (Чехія, Острава, 2015), особиста участь, стендова доповідь;
- конференції «Ендотеліальна дисфункція при вік-залежній патології – діагностика, профілактика, лікування» (Київ, 2015), заочна участь;
- II міжнародній науково-практичній телеконференції «Advances in Science and Technology» (Росія, Пенза, 2015), заочна участь;
- IV міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів і молодих вчених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології» (Вінниця, 2016), заочна участь;
- міжнародній конференції «Cold Applications In Life Sciences» (Німеччина, Дрезден, 2016), особиста участь, усна доповідь;
- міжнародній конференції «SLTB Symposium 2016» (Німеччина, Дрезден, 2016), особиста участь, стендова доповідь;
- 10-ій ювілейній Лейденській міжнародній біомедичній студентській конференції «LIMSC» (Лейден, Нідерланди, 2017), особиста участь, усна доповідь;
- VIII Міжнародній Антарктичній Конференції, присвяченій 25-ій річниці приєднання України до Договору про Антарктику «VIII МАК 2017» (Київ, 2017), заочна участь.

Додаток В

Матеріал допоміжного характеру

Таблиця. В.1

Концентрація сумарних метаболітів NO у сироватці крові щурів на тлі ритмічного екстремального охолодження, введення кЯВК КК та за їх поєднання, $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$, мкмоль/л

Вік тварин		Група впливу			
		Контроль	РЕХВ	кЯВК КК	РЕХВ+кЯВК КК
У динаміці старіння	6 міс.	25,02±5,05	34,12±6,96	23,53±3,82	21,30±3,99
	12 міс.	14,50±1,43	25,88±5,25	17,00±1,83	26,65±6,11
	18 міс.	13,07±0,87	10,05±1,38	17,53±3,52	23,38±6,91
	24 міс.	7,98±0,82	-	21,57±2,77*	23,55±5,61*
Одноразово	24 міс.	9,44±0,38	14,08±2,38	24,07±3,29*	25,13±3,01*

Примітка. * — статистично значущі відмінності від контрольної групи відповідного віку (p<0,05).

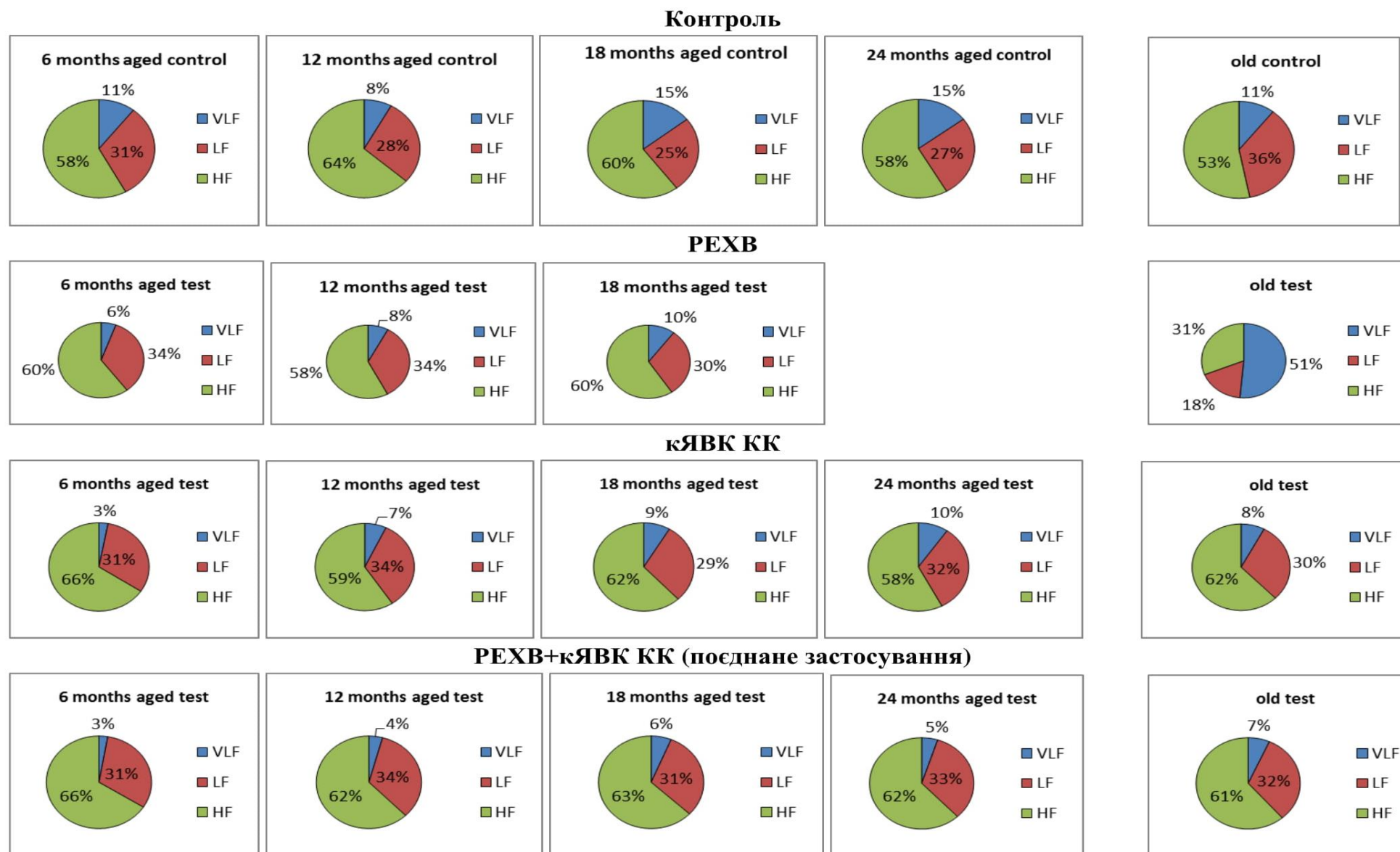


Рис. В.1. Співвідношення показників спектрального аналізу ВСР у щурів різного віку через місяць після маніпуляцій