

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ**

МАРТИНОВА ЮЛІЯ ВІКТОРІВНА

УДК 616-001.18/19:612.649.011.87:612.67.019

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

03.00.19 – кріобіологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Харків – 2018

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Науковий керівник: доктор медичних наук, старший науковий співробітник
Бабійчук Владислав Георгійович,
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України, м. Харків
виконуючий обов'язки завідувача
відділу кріофізіології.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, старший науковий
співробітник
Шкорбатов Юрій Георгійович,
Харківський національний університет
імені В. Н. Каразіна, професор кафедри молекулярної
біології та біотехнології;

кандидат біологічних наук, доцент
Денисова Ольга Миколаївна,
Харківська державна зооветеринарна академія
України, доцент кафедри хімії та біохімії
імені професора О. В. Чечоткіна.

Захист відбудеться «22» травня 2018 р. о 13:30 годині на засіданні спеціалізованої
вченої ради Д 64.242.01 в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН
України за адресою: 61016, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту проблем кріобіології і
кріомедицини НАН України за адресою: 61016, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

Автореферат розісланий «11» квітня 2018 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01

О. В. Фалько

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Старіння являє собою послідовний природний процес, який супроводжується виснаженням захисних і регуляторних механізмів (Carro A., Kaski J. C., 2011; Герасимов И. Г., 2012), зниженням адаптаційних можливостей (Кульчицкий О. К., 2009; Коркушко О. В., Шатило В. Б., 2009) та загальної життєздатності організму (Крутько В. Н. та ін., 2009), і, як наслідок, розвитком гострих і хронічних захворювань.

Відомо, що загальне екстремальне охолодження (-120°C) активує процеси саморегуляції організму і збільшує його адаптаційні резерви (Lubkowska A., 2012; Bouzigon R. et al., 2016). Вплив кріотерапії на організм являє собою системний фізіологічний процес, який протікає на різних організаційних та регуляторних рівнях (Rymaszewska J. et al., 2003; Альтман Д. Ш., Давыдова Е. В., 2012). Ритмічне екстремальне охолодження, яке є модулятором активності власних ендогенних ритмів, підвищує лабільність регуляторних процесів у центральній нервовій і серцево-судинній системах, стимулює їхні прямі та зворотні зв'язки, нормалізує симпато-парасимпатичний баланс вегетативної нервової системи (ВНС) з подальшою оптимізацією механізмів гомеостазу (Бабийчук В. Г., 2010).

У якості перспективного геропротектора можна розглядати кордову кров (КК), до складу якої входять стовбурові клітини (СК) і велика кількість ростових факторів (Гольцев А. М. та ін., 2012; Домбровський Д. Б. та ін., 2013), які при введенні в літній організм, імовірно, здатні надавати «омолоджуючий» вплив на власні СК, кількість, різноманітність і активність котрих знижується з віком (Hariharan N., Sussman M. A., 2015; Goodell M. A., Rando Th. A., 2015).

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. Тому доцільним є визначення дії ритмічних екстремальних холододових впливів (РЕХВ), кріоконсервованих ЯВК КК (кЯВК КК) та 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 холододових 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 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 ультраструктуру 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 поєданого 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 поєданого 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. В опублікованих зі співавторами роботах особистий внесок здобувача зазначено, допомога співавторів була спрямована на виконання окремих методичних завдань або консультування.

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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. У розділі представлено аналіз літературних даних, які розкривають загальнобіологічні та фізіологічні особливості процесу старіння й наведено типові вікові зміни, котрі відбуваються в регуляторних системах організму людини. На підставі аналізу наукових публікацій доведено актуальність і перспективність застосування екстремального охолодження, зокрема РЕХВ, ЯВК КК та їх поєднання в геронтологічній практиці для підвищення власних адаптаційно-регуляторних можливостей організму, з метою профілактики розвитку захворювань часто супутніх старінню.

Матеріали й методи дослідження. Експерименти виконані на 163 безпородних білих щурах самцях (рис.1).

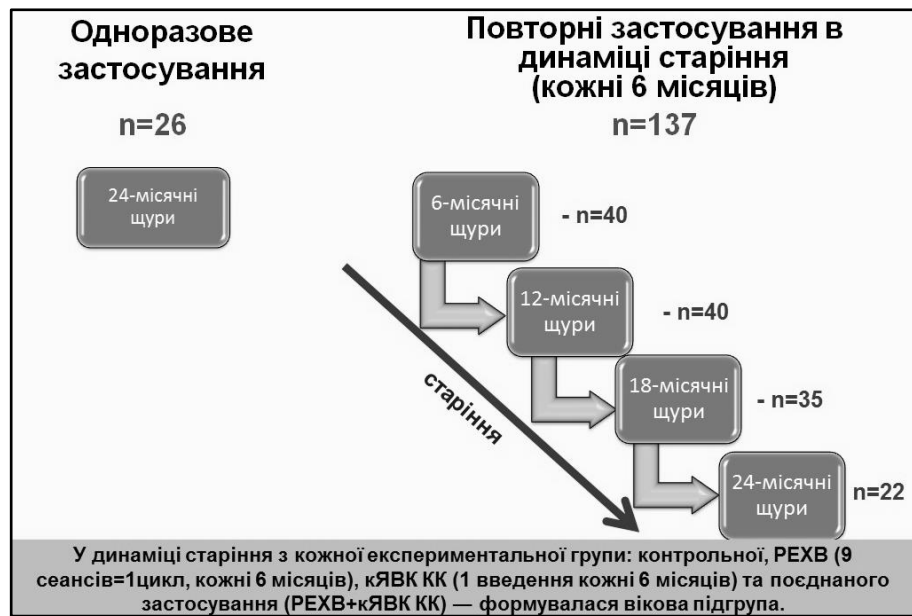


Рис. 1. Дизайн експерименту

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. Науково-дослідна робота складалася з двох частин (рис.1). Вивчення впливу РЕХВ, кЯВК КК та їх поєднання в динаміці старіння щурів із повторним використанням кожні півроку (6, 12, 18 і 24 місяці) проведено для отримання динамічної картини розвитку процесу старіння, починаючи з найбільш повного з погляду функціонального стану й адаптаційного потенціалу віку (Герасимов І. Г., 2012). Кількість щурів, які дожили до 24-місячного віку, у групах поєднаного впливу та кЯВК КК була в 1,8 та 1,6 раза вищою від контрольної, відповідно.

РЕХВ (-120°C) виконували в метрологічно атестованій кріокамері для охолодження експериментальних тварин (Кріокамера для екстремального..., 2009). Загальний цикл охолодження складався з 9 сеансів протягом 5 днів: три сеанси на день із наступною одноденною перервою (Бабийчук В.Г., 2010).

Експериментальним тваринам внутрішньочеревно вводили отриманий в ІПКіК НАН України готовий препарат кЯВК КК (Спосіб виділення ядровмісних..., 2007, Спосіб кріоконсервування ядровмісних..., 2010), котрий являв собою суспензію кЯВК КК в аутоплазмі КК, з розрахунку 1×10^5 життєздатних CD34^{+} -клітин на кілограм маси тіла тварини. Препарат доводили до об'єму 1 мл аутоплазмою КК. 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.

Функціональний стан ВНС оцінювали за допомогою спектрального аналізу ВСР (програма «Полі-Спектр-Ритм» («Нейро-софт», Росія)) в діапазонах частот, рекомендованих для щурів (Kuwahara M. et al., 1994; Hauton D. et al., 2011).

Реєстрацію ЕКГ здійснювали протягом 5 хвилин на електрокардіографі «Полі-Спектр» («Нейро-софт», Росія).

Вміст тироксину (T_4), трийодтироніну (T_3), тестостерону (T_c), естрадіолу (E_c) і дегідроепіандростерон-сульфату (ДГЕАС) визначали методом імуноферментного аналізу за допомогою стандартних комерційних наборів («ХЕМА Со. Ltd.», Росія): « T_4 -ІФА», « T_3 -ІФА», «ТЕСТОСТЕРОН-ІФА», «ЕСТАРДІОЛ-ІФА» й «ДГЕАС-ІФА» відповідно, за методиками виробника. Рівень сумарних метаболітів NO оцінювали спектрофотометричним методом визначення нітрит-іона (Метельская В. А., Гуманова Н. Г., 2005) з використанням реактивів фірми SIGMA-ALDRICH (США–Німеччина).

Дослідження морфологічного стану міокарда проводили за допомогою світлової мікроскопії гістологічних препаратів. Застосовували 2 типи фарбування: гематоксиліном Ганзена та еозином; пікрофуксином за методом Ван Гізона (забарвлення сполучної тканини) та залізним гематоксиліном Вейгерта (забарвлення клітинних ядер). Для підрахунку морфометричних параметрів використовували комп'ютерну програму AxioVision Rel. 4.8 (Carl Zeiss Imaging Solution GmbH, Німеччина). Для вивчення ультрамікроскопічних перебудов у кардіоміоцитах та ендотеліоцитах кровоносних капілярів міокарда використовували метод трансмісійної електронної мікроскопії. Попередню фіксацію проводили в глютарового-формальдегідномі фіксаторі Карновського за методикою (Кравченко С. А., 2011), для остаточної фіксації використовували 1% забуферений розчин (рН 7,2–7,4) тетраоксиду осмію (OsO_4) (Морозова К. Н., 2013).

Отримані дані обробляли статистично. За нормального розподілу використовували параметричний t -критерій Стьюдента та дисперсійний параметричний аналіз ANOVA, в іншому випадку — непараметричний U -критерій Уїлкоксона (Манна-Уїтні) та H -критерій Краскла-Уолліса з наступним вирахуванням попарно критерію Манна-Уїтні з внесенням поправки Бонферроні (Лакин Г.Ф., 1990, Атраментова Л. А., Утевская О. М., 2008). Статистично значущими вважали відмінності за $p < 0,05$ (для рівня гормонів $p \leq 0,05$). Розрахунки проводили за допомогою комп'ютерних програм Excel, «НейроСтат», «Past3».

Результати власних досліджень та їх обговорення

Вплив ритмічного екстремального охолодження (-120°C), кЯВК КК та їх поєднання на стан вегетативної регуляції серцевого ритму в динаміці старіння щурів. Під час старіння слабшають вегетативні впливи на міокард, погіршується загальна регуляція серцевого ритму. Це відображається у зниженні показників ВСР, що і було нами підтверджено (рис. 2). Встановлено, що в старих тварин на тлі одноразового застосування циклу РЕХВ (рис. 2, А) пік активності регуляторних систем, за винятком гуморально-метаболічної ланки (VLF-компонент), відзначався після 9-ї процедури охолодження. Через місяць показник загальної спектральної потужності ВСР (ТР) залишався вищим від контрольного в 1,5 раза за рахунок збільшення VLF-компонента в 7 разів проти контрольного. У 18-місячних щурів (рис. 2, Б), як у 6- та 12-місячних, за повторного використання РЕХВ у динаміці старіння, визначено значний підйом ТР, відносно контрольних значень, в усі строки спостережень. Зростання ТР відбувалося не стільки завдяки підвищенню активності

гуморально-метаболической ланки регуляції, скільки завдяки збільшенню тону вегетативних центрів, причому парасимпатичні впливи на міокард превалювали над симпатичними. Найбільше значення TP у 12- та 18-місячних щурів спостерігалось через тиждень після циклу РЕХВ.

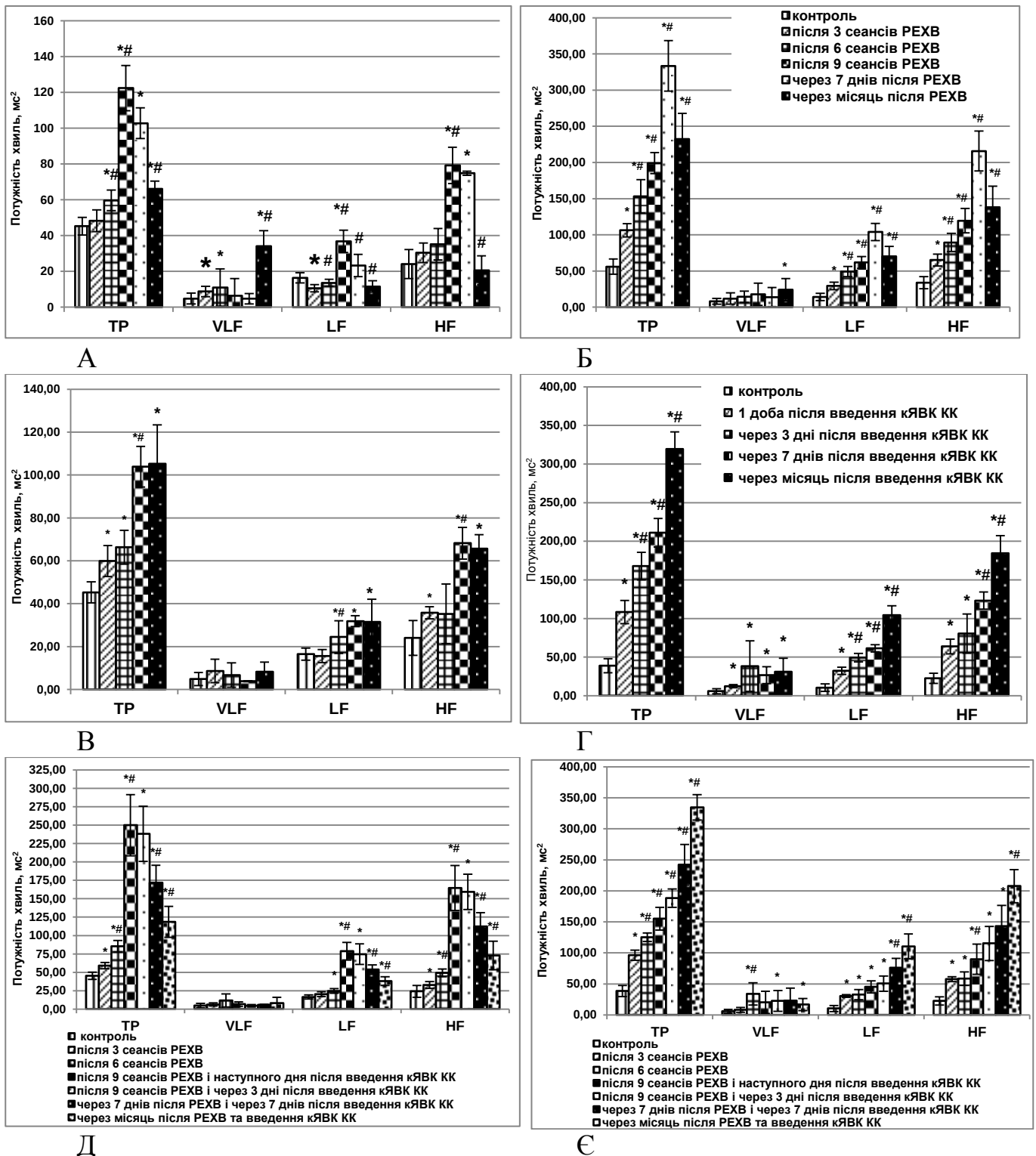


Рис. 2. Показники спектрального аналізу ВСР у старих щурів на тлі одноразового (А, В, Д) і повторного (Б, Г, Е) самостійного та поєднаного застосування РЕХВ і КЯВК КК

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

У 24-місячних тварин, яким вводили кЯВК КК, починаючи з молодого віку, показник ТР перевищував аналогічний контрольний у 8,3 раза (рис. 2, Г), тоді як у старих щурів після одноразового введення зафіксовано його збільшення лише у 2,3 раза (рис. 2, В). Окрім того, у першому випадку спостерігалася поступова активація не тільки ВНС, а й гуморально-метаболічної ланки регуляції (як у 6-, 12-, 18-місячних тварин цієї дослідної групи).

На тлі одноразового поєднаного застосування РЕХВ і кЯВК КК 24-місячним щурам (рис. 2, Д) найвищі показники ТР спостерігалися на наступну добу й через 3 дні після 9 сеансів РЕХВ і введення кЯВК КК, унаслідок підвищення тону вегетативних центрів. Через місяць значення ТР перевищувало контрольне у 2,6 раза. У 18-місячних щурів повторне поєднане використання супроводжувалося значним зростанням ТР у всі терміни експерименту, також завдяки підвищення тону вегетативних центрів. У групі 24-місячних тварин після повторного застосування (рис. 2, Є) спостерігалася аналогічна динаміка, однак відзначалося збільшення активності ще й гуморальної ланки регуляції (як у 6- та 12-місячних тварин цієї дослідної групи). Через місяць показник ТР підвищувався у 8,6, VLF — у 2,9, LF — у 10,6, HF — у 9,7 раза.

Отже, повторне поєднане застосування РЕХВ і кЯВК КК у динаміці старіння має більш виражену позитивну дію на стан регуляторних систем і здатне тривалий час зберігати «молоду» ритміку нейрогуморальних впливів на організм експериментальних тварин. Одноразове ж використання РЕХВ, кЯВК КК та їх поєднання в старих тварин не призводить до збалансованої активації всіх регуляторних ланок організму.

Вплив ритмічного екстремального охолодження (-120°C), кЯВК КК та їх поєднання на рівень тиреоїдних і статевих гормонів сироватки крові в динаміці старіння щурів. Відомо, що рівень T_4 , T_c та співвідношення T_c/E_c знижуються з віком. Нами виявлено зниження рівня T_4 у тварин 24-місячного віку в 1,5 та 2 рази відносно 6- та 12- (й 18-) місячних щурів, відповідно. Така концентрація T_4 зумовлена зменшенням функціональної активності щитоподібної залози. Вміст T_c і співвідношення T_c/E_c знижувались у 18- і 24-місячних щурів у 1,6–2,2 раза та 1,9–2,4 раза, відповідно. Рівень ДГЕАС у динаміці природного старіння значуще не змінювався. 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 T_c у молодих щурів. Введення кЯВК КК та їх поєднання з РЕХВ не спричиняє функціональних порушень щитоподібної і статевих залоз та покращує їхній функціональний стан у старих тварин завдяки відновленню гормонсинтезуючої здатності. Так, на тлі введення кЯВК КК та поєднаного впливу встановлено збільшення проти контрольних показників концентрації T_4 у 24-місячних щурів як після одноразового (в 1,07 та 1,4 раза, відповідно), так і після повторних застосувань у динаміці старіння (в 1,3 та 2,3 раза, відповідно). Після повторного поєднаного застосування в динаміці старіння підвищувався вміст як T_c (у 1,4–3,1 раза), так і співвідношення T_c/E_c (у 1,7–2,2 раза) у всіх вікових групах, за винятком 12-місячної (табл. 1). У 24-місячних щурів лише на тлі поєднаного застосування в динаміці старіння (на відміну від самостійного та

одноразового) підвищувалися не тільки концентрація Тс (у 1,9 раза), а і співвідношення Тс/Ес (у 2,1 раза) (табл. 1). Отже, поєднане використання РЕХВ і кЯВК КК призводить до нормалізації рівня Т₄, Тс і співвідношення Тс/Ес з віком. Оскільки брак андрогенів супроводжується порушенням метаболізму ліпідів, розвитком атеросклерозу й підвищенням ризику розвитку серцево-судинних захворювань (Князькова И. И., 2012; Ruiz-Cortés Z. T., 2012), збільшення їх вмісту у сироватці крові 18- і 24-місячних щурів у групі поєданого впливу підтверджує ефективність та доцільність такого застосування.

Таблиця 1

Співвідношення Тс/Ес у сироватці крові щурів, $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$

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

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

Вміст кінцевих продуктів метаболізму оксиду азоту сироватки крові в процесі старіння щурів після РЕХВ (–120 °С), введення кЯВК КК та їх поєданого застосування. Оксид азоту (NO) — біологічний медіатор, залучений у безліч фізіологічних і патофізіологічних процесів (Brandes R. P. et al., 2005; Чеботарёва А. А. и др., 2016). Ознакою розвитку з віком ендотеліальної дисфункції є зниження вмісту сумарних метаболітів NO в сироватці крові. Результати проведеного дослідження вмісту кінцевих продуктів метаболізму NO сироватки крові щурів представлено на рис. 3. Нами виявлено зниження цього показника в 3,1 раза. Після проведення циклів РЕХВ статистично значущих змін у вмісті кінцевих продуктів обміну NO проти відповідних контрольних показників не спостерігалось. На тлі поєданого використання РЕХВ і кЯВК КК рівень NO статистично значуще не змінювався у 12-, 18- і 24-місячних тварин щодо 6-місячних, водночас він значно підвищувався проти контрольних показників відповідного віку. У старих щурів як після одноразового, так і повторних застосувань кЯВК КК і їх поєднання з РЕХВ вміст кінцевих метаболітів NO у 2,5–3 рази перевищував контрольні показники аналогічного віку, що може бути пов'язано з активацією NO-синтаз та експресією їхніх генів. Отже, введення кЯВК КК та 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.

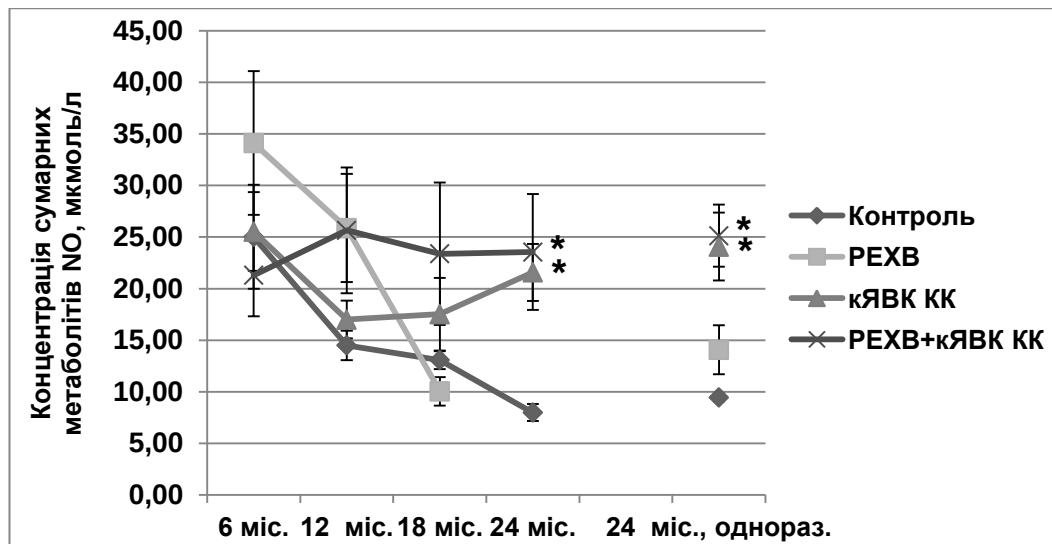


Рис. 3. Концентрація сумарних метаболітів NO у сироватці крові щурів на тлі РЕХВ, введення кЯВК КК та за їх поєднання

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

Особливості гістологічного стану міокарда в динаміці старіння щурів після РЕХВ (-120°C), введення кЯВК КК та за їх поєднання. Оскільки захворювання серцево-судинної системи зберігають першість серед причин смерті людей похилого віку (Carro A., Kaski J. C., 2011; World Health Organization, 2015), а морфо-функціональну інволюцію серця можна розглядати як один із головних маркерів, який відображає процес старіння, на наступних двох етапах роботи нами були вивчені особливості мікроскопічної та ультрамікроскопічної будови міокарда в динаміці старіння щурів. Нами показано, що в динаміці природного старіння щурів (рис. 4, А–Г) вікові зміни структури міокарда пов'язані зі збільшенням відносного об'єму 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. Зрив компенсаторних можливостей міокарда в щурів відбувався до 24-місячного віку.

Використання РЕХВ супроводжувалося збільшенням лише кількості капілярів на одиницю площі тканини, починаючи з 12-місячного віку (на тлі зменшення кількості та площі ядер кардіоміоцитів, яке відбувалося у 18-місячних щурів). На тлі введення кЯВК КК тваринам різних вікових груп, структура серцевого м'яза істотно покращувалася, порівнюючи з контрольними групами. Ознаки порушення кровообігу, набряк, кардіосклероз у 24-місячних тварин (рис. 4, Д, Є) були виражені помірно, лімфо-гістіоцитарні інфільтрати відсутні. Кількість і площа ядер кардіоміоцитів значно зростали. Відзначалася тенденція до збільшення кількості капілярів. Поєднане застосування РЕХВ і кЯВК КК упродовж життєвого циклу тварин супроводжувалося покращенням мікроскопічної будови міокарда (рис. 4, Ж, З), вірогідно, завдяки розвитку репаративних процесів. Підвищувалися компенсаторні можливості серцевого м'яза завдяки збільшенню як кількості, так площі ядер кардіоміоцитів, поліпшувалася трофіка внаслідок неоангіогенезу. Це

підтверджувалося проліферацією в інтерстиціальній тканині фібробластів, які, як відомо, продукують проангіогенні фактори. Описані зміни перешкоджають розвитку ішемії міокарда, кардіосклерозу й некрозу.

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 самостійним застосуванням РЕХВ.

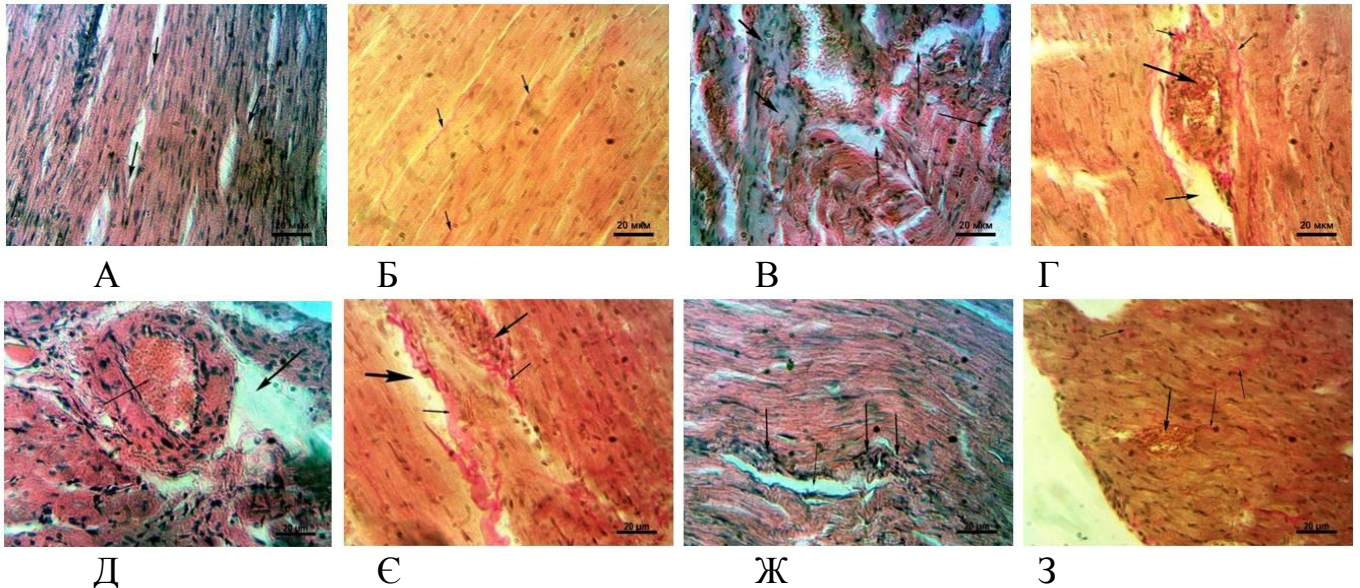


Рис. 4. Ділянки міокарда лівого шлуночка щурів контрольної групи 6- (А, Б) і 24- (В, Г) місячного віку та 24-місячного віку на тлі повторних застосувань кЯВК КК (Д, Є) та їх поєднання з РЕХВ (Ж, З): А — м'язові волокна рівномірної товщини з анастомозами (стрілки); Б — м'язові волокна, оточені тонким шаром інтерстиціальної сполучної тканини (стрілки); В — інтерстиціальний набряк (тонкі стрілки), підвищена щільність фібробластів (фіброз) в інтерстиції (товсті стрілки); Г — периваскулярний набряк (стрілка середньої товщини), повнокров'я судин (товста стрілка), кардіосклероз (тонка стрілка); Д — периваскулярний набряк (середня стрілка), розширена та заповнена кров'ю судина (тонка стрілка); Є — помірний інтерстиціальний набряк (товста стрілка), венозна гіперемія (стрілка середньої товщини) і склероз (тонкі стрілки); Ж — помірний набряк (тонка стрілка) та порушення кровообігу (стрілка середньої товщини); З — венозна гіперемія (середня стрілка) та помірний кардіосклероз (тонка стрілка)

Примітка: А, В, Д, Ж — забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 300$; Б, Г, Є, З — забарвлення пікрофуксином за методом Ван Гізона, $\times 300$.

Субмікроскопічні перебудови тканин і судин міокарда щурів у динаміці їхнього старіння, після РЕХВ (-120°C), введення кЯВК КК та їх поєднаного використання. Результати електронно-мікроскопічного дослідження показали, що у щурів контрольної групи у процесі їхнього старіння ознаки розвитку дистрофічних процесів (набухання мітохондрій, вогнищеве просвітлення їхнього матриксу, деструкція деяких крист) починали виявлятися з 18-місячного віку. У 24-місячних щурів траплялися тотально зруйновані мітохондрії та спостерігалися інші ознаки досить високої активності катаболічних процесів, такі як вторинні лізосоми, включення ліпідів і ліпофусцину, зниження кількості рибосом, полісом і гранул

глікогену. На тлі застосування повторних сеансів РЕХВ (-120°C) у динаміці старіння тварин уже з 12-місячного віку відзначалось істотне зменшення ступеня прояснення саркоплазми, кількості електронно-прозорих зон, зростала кількість мітохондрій і крист у них. Значна кількість кардіоміоцитів і ендотеліоцитів містила мітохондрії з перетяжками. Введення кЯВК КК майже не впливало на ультрамікроскопічну будову кардіоміоцитів і ендотеліоцитів кровоносних капілярів серцевого м'яза 6- і 12-місячних тварин. У 18- і 24-місячних щурів повторні введення кЯВК КК супроводжувалися виявленням ознак підвищеної активності метаболічних та синтетичних процесів. Поєднане використання РЕХВ і кЯВК КК мало найбільш виражений позитивний вплив на субмікроскопічну будову досліджуваних клітин (рис. 5). Виявлялися мітохондрії, які діляться, збільшувалася кількість крист у них.

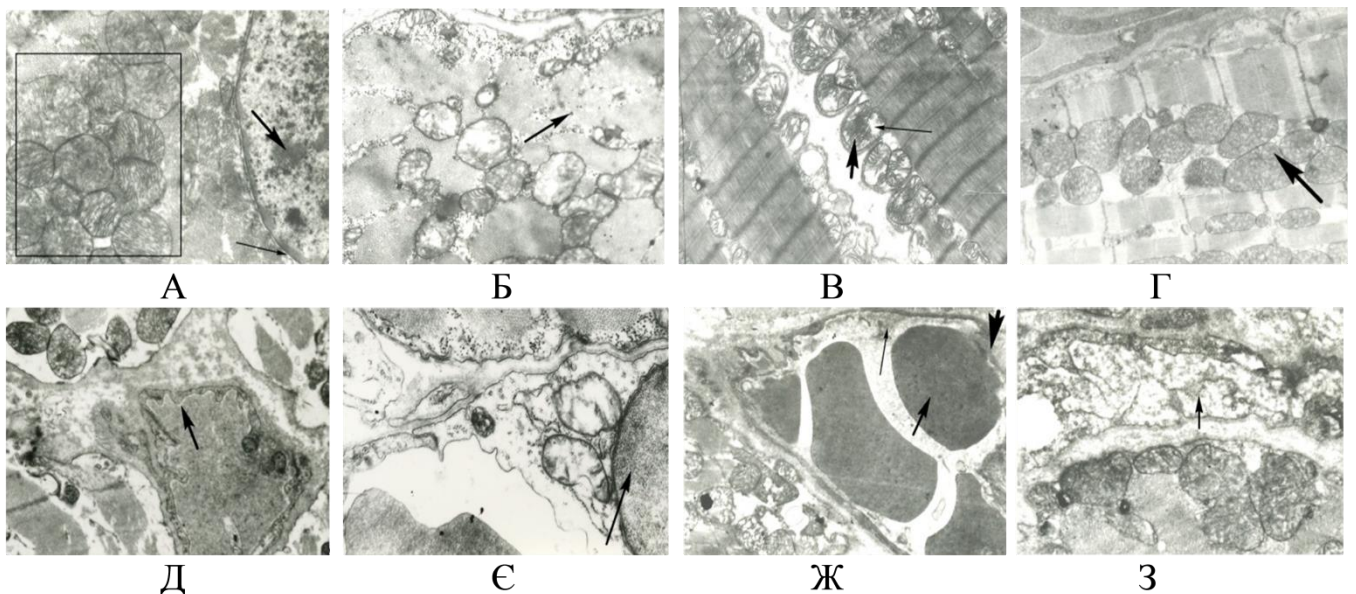


Рис. 5. Ультраструктура кардіоміоцитів (А–Г) та ендотеліоцитів (Д–З) кровоносних капілярів міокарда щурів у динаміці старіння на тлі поєднаного застосування РЕХВ та кЯВК КК: 6 (А, Д), 12 (Б, Є), 18 (В, Ж), 24 (Г, З) місяці. Контрастовано цитратом свинцю

Примітка: А — деконденсація хроматину (товста стрілка), рівномірне розширення перинуклеарного простору (тонка стрілка), скупчення мітохондрій у перинуклеарному просторі (рамка), $\times 40\,000$; Б — численні гранули глікогену в саркоплазмі (стрілка), $\times 40\,000$; В — ділянки просвітлення матриксу мітохондрій (тонка стрілка), паралельна орієнтація крист (товста стрілка), $\times 38\,000$; Г — велика кількість крист у мітохондріях (стрілка), $\times 36\,000$; Д — інвагінації цитоплазматичної мембрани, зверненої до току крові (стрілка), $\times 42\,000$; Є — деконденсація хроматину (стрілка), $\times 42\,000$; Ж — розпушення цитоплазматичної мембрани (товста стрілка), еритроцити (стрілка середньої товщини), детрит осміофільної субстанції (тонка стрілка), $\times 65\,000$; З — велика кількість мікропіноцитозних пухирців у цитоплазмі (стрілка), $\times 68\,000$.

У 18-місячних щурів майже не було ознак розвитку дистрофічного процесу, характерного для тварин контрольної групи. Найбільш виражені зміни репаративного характеру виявлялися у 24-місячних щурів (рис. 5, Г, З): значно

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, 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 рівнях.

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 самостійного 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 раза) і повторних застосувань (в 1,3 та 2,3 раза), що свідчить про підвищення функціональної активності щитоподібної залози завдяки відновленню її гормонсинтезуючої здатності. У старих тварин на тлі повторного поєднаного застосування РЕХВ і кЯВК КК, на відміну від самостійного, підвищувалися не тільки концентрація Тс (у 1,9 раза), а і співвідношення Тс/Ес (у 2,1 раза), 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.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ 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) *(Внесок здобувача: планування експериментів; проведення РЕХВ (–120 °С); розрахунок і введення кЯВК КК; запис ЕКГ, проведення спектрального аналізу ВСР; статистична обробка, аналіз, узагальнення отриманих даних; підготовка матеріалів до друку.)*

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. Вып. 4, Т. 2 (114). С. 253–258. *(Внесок здобувача: планування експериментів; забір тканин, аналіз електронно-мікроскопічних фотографій клітин міокарда щурів; узагальнення отриманих даних; підготовка матеріалів до друку.)*

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. *(Внесок здобувача: планування експериментів; розрахунок і введення кЯВК КК; запис ЕКГ, проведення спектрального аналізу ВСР; статистична обробка, аналіз та узагальнення отриманих даних; підготовка матеріалів до друку.)*

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. (Внесок здобувача: планування експериментів; проведення PEXB (-120°C); розрахунок і введення кЯВК КК; забір тканин, аналіз електронно-мікроскопічних фотографій клітин міокарда щурів; узагальнення отриманих даних; підготовка матеріалів до друку.)

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. (Внесок здобувача: планування експериментів; розрахунок і введення кЯВК КК; забір тканин, аналіз електронно-мікроскопічних фотографій клітин міокарда щурів; узагальнення отриманих даних; підготовка матеріалів до друку.)

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) (Внесок здобувача: планування експериментів; розрахунок і введення кЯВК КК; запис ЕКГ, проведення спектрального аналізу ВСР; заготівля сироватки крові щурів; статистична обробка, аналіз, узагальнення отриманих даних; підготовка матеріалів до друку.)

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) (Внесок здобувача: планування експериментів; проведення PEXB (-120°C); розрахунок і введення кЯВК КК; запис ЕКГ, проведення спектрального аналізу ВСР; заготівля сироватки крові щурів; статистична обробка, аналіз, узагальнення отриманих даних; підготовка матеріалів до друку.)

Статті в наукових періодичних виданнях інших країн

8. **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 // «Весті 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”) (Внесок здобувача: планування експериментів; розрахунок і введення кЯВК КК; запис ЕКГ, проведення спектрального аналізу ВСР; статистична обробка, аналіз, узагальнення отриманих даних; підготовка матеріалів до друку.)

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 // Кримоконсервация 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. *(Внесок здобувача: планування експериментів; проведення РЕХВ (–120 °С); розрахунок і введення кЯВК КК; запис ЕКГ, проведення спектрального аналізу ВСР; статистична обробка, аналіз, узагальнення отриманих даних; підготовка матеріалів до друку — частина дослідження без ожиріння.)*

Статті в збірках матеріалів конференцій

10. Влияние ритмических экстремальных холодовых воздействий (–120 °С) 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. *(Внесок здобувача: планування експериментів; проведення РЕХВ (–120 °С); розрахунок і введення кЯВК КК; запис ЕКГ, проведення спектрального аналізу ВСР; статистична обробка, аналіз, узагальнення отриманих даних; підготовка матеріалів до друку.)*

11. **Руднева Ю. В.** Состояние нейрогуморальной регуляции сердечным ритмом в динамике старения крыс при повторных сеансах ритмического общего экстремального (–120 °С) 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. *(Внесок здобувача: планування експериментів; проведення РЕХВ (–120 °С); запис ЕКГ, проведення спектрального аналізу ВСР; статистична обробка, аналіз, узагальнення отриманих даних; підготовка матеріалів до друку.)*

12. **Руднева Ю. В.**, Бабийчук В. Г. Влияние кордовой крови и ритмического экстремального охлаждения (–120 °С) 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. *(Внесок здобувача: планування експериментів; проведення РЕХВ (–120 °С); розрахунок і введення кЯВК КК; запис ЕКГ, проведення спектрального аналізу ВСР; статистична обробка, аналіз, узагальнення отриманих даних; підготовка матеріалів до друку.)*

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. *(Внесок здобувача: планування експериментів; розрахунок і введення*

кЯВК КК; забір тканин, аналіз електронно-мікроскопічних фотографій клітин міокарда щурів; узагальнення отриманих даних; підготовка матеріалів до друку.)

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 ядродержащих 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 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.

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 ядродержащих 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. **Мартинова 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 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.

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.-биол. конф. молодых исследователей (г. Санкт-Петербург, 22 апреля 2017 г.). Санкт-Петербург: Изд-во СПбГУ, 2017. С. 348–349.

30. **Мартинова 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. **Мартинова 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.

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.

Дисертаційна робота присвячена вивченню дії ритмічних екстремальних холодових впливів (РЕХВ), кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові (кЯВК КК), а також їх поєднання на стан нейрогуморальної регуляції у щурів за одноразового застосування у старечому віці та за повторних використань у процесі старіння, починаючи зі статевозрілого віку (з 6 до 24 місяців).

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. Показано, що поєднане використання РЕХВ і кЯВК КК призводить до нормалізації рівня тиреоїдних і статевих гормонів сироватки крові щурів, має стимулюючий вплив на синтез оксиду азоту в разі його дефіциту та не призводить до надлишку цієї молекули, супроводжується поліпшенням трофіки серцевого м'яза завдяки утворенню нових капілярів і підвищенням його компенсаторних можливостей, унаслідок збільшення як кількості, так і площі ядер кардіоміоцитів, а також активації метаболічних і синтетичних процесів у кардіоміоцитах та ендотеліоцитах кровоносних капілярів міокарда.

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

АННОТАЦИЯ

Мартынова Ю. В. Влияние ритмического экстремального охлаждения и кордовой крови на состояние систем нейрогуморальной регуляции в динамике старения крыс. — Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук (доктора философии) по специальности 03.00.19 «Криобиология». — Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, 2018.

Диссертационная работа посвящена изучению влияния ритмических экстремальных холодовых воздействий (РЭХВ), криоконсервированных ядродержащих клеток кордовой крови (кЯСК КК), а также их сочетания на состояние нейрогуморальной регуляции у крыс при однократном применении в старческом возрасте и при повторных в процессе старения, начиная с половозрелого возраста (с 6 до 24 месяцев). В результате проведенных исследований дана оценка структурно-функциональным изменениям, которые происходят в регуляторных системах организма животных после РЭХВ (-120°C), введения кЯСК КК и при их сочетании в динамике естественного старения. Показана эффективность самостоятельного и совместного применения РЭХВ и кЯСК КК, начиная с молодого возраста, с целью повышения собственных адаптационно-регуляторных возможностей организма, которые существенно снижаются с возрастом.

Установлено, что в процессе естественного старения крыс значение общей спектральной мощности нейрогуморальной регуляции снижается вследствие уменьшения тонуса симпатического и парасимпатического отделов вегетативной нервной системы. Однократное использование РЭХВ, кЯСК КК и их сочетания у старых животных сопровождается увеличением этого показателя, однако не приводит к сбалансированной активации всех регуляторных звеньев. Повторные процедуры РЭХВ, введения кЯСК КК и их сочетания в течение жизненного цикла крыс способны повышать адаптационно-компенсаторные возможности организма животных независимо от их возраста благодаря увеличению активности всех регуляторных звеньев, при этом сочетанное применение оказывает более выраженное положительное влияние. Показано, что сочетанное использование РЭХВ и кЯСК КК способствует нормализации содержания тироксина, тестостерона и соотношения тестостерон/эстрадиол в сыворотке крови старых крыс. Установлено, что введение кЯСК КК, а также сочетанное применение РЭХВ и кЯСК КК в динамике старения животных оказывает стимулирующее влияние на синтез оксида азота при его дефиците, но не приводит к избытку данной молекулы. При гистологическом исследовании сердечной мышцы и анализе морфометрических показателей в процессе естественного старения крыс обнаружены возрастные изменения, связанные с диффузными склеротическими процессами в миокарде, уменьшением числа капилляров, количества и размеров ядер кардиомиоцитов. Использование РЭХВ сопровождается увеличением количества капилляров в сердечной мышце стареющих животных на фоне уменьшения количества и площади ядер кардиомиоцитов. Введение кЯСК КК, а также сочетанное применение РЭХВ и кЯСК КК улучшает трофику миокарда за счет образования новых капилляров и повышения его компенсаторных возможностей. При электронно-микроскопическом исследовании кардиомиоцитов и эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда крыс в процессе их старения определялись признаки развития дистрофических процессов на субклеточном уровне, наблюдалась высокая активность катаболических процессов. Применение повторных сеансов РЭХВ, введения кЯСК КК и их сочетания повышает активность метаболических и

синтетических процессов в кардиомиоцитах и эндотелиоцитах кровеносных капилляров миокарда благодаря нормализации внутриклеточной биоэнергетики, связанной со структурно-функциональным состоянием митохондрий.

Полученные экспериментальные данные, раскрывают направленность и уровень активности адаптационных и компенсаторных процессов, которые происходят в регуляторных системах организма животных на фоне РЭХВ, введения кЯСК КК, а также их сочетания, характеризуют возможный механизм действия, доказывают целесообразность применения РЭХВ и кЯСК КК, начиная с молодого возраста.

Ключевые слова: криоконсервированные ядродержащие клетки кордовой крови, ритмические экстремальные холодовые воздействия, нейрогуморальная регуляция, миокард, старение, крысы.

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.

The thesis is dedicated to the study of the effect of rhythmic extreme whole body cooling (RE WBC), cryopreserved cord blood nucleated cells (cCBNCs), as well as their combinations on the state of neurohumoral regulation in rats at a single use in the old age and at repeated ones in aging, starting from the sexually mature age (from 6 to 24 months).

It has been established, that the repeated use of RE WBC, injection of cCBNCs and combined application of them during the life cycle, was able to enhance the adaptive compensatory capacities of the body in experimental animals regardless of their age due to the increase of activity of all the regulatory units. It has been shown, that a combined use of RE WBC and cCBNCs invoked the normalization in the levels of the thyroid and sex hormones in blood serum, stimulated the NO synthesis in case of its deficiency and did not lead to an overexpression of this molecule, was accompanied with an improvement of the myocardium trophy due to neoanogeogenesis and enhanced the compensatory ability of myocardium due to an increase of both the number and area of cardiomyocyte nuclei, activated metabolic and synthetic processes in cardiomyocytes and endotheliocytes in myocardium's capillaries.

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

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ВНС — вегетативна нервова система; **ВСР** — варіабельність серцевого ритму; **ЕКГ** — електрокардіограма; **Ес** — естрадіол; **КК** — кордова кров; **кЯСК КК** — криоконсервовані ядровмісні клітини кордової крові; **РЕХВ** — ритмічні екстремальні холодові впливи; **T₃** — трийодтиронін; **T₄** — тироксин; **Тс** — тестостерон; **НФ** — потужність високочастотного компонента спектра ВСР; **LF** — потужність низькочастотного компонента спектра ВСР; **NO** — оксид азоту; **TP** — загальна потужність спектра ВСР; **VLF** — потужність дуже низькочастотного компонента спектра ВСР.