

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ

На правах рукописи

БАБИЙЧУК ВЛАДИСЛАВ ГЕОРГИЕВИЧ

УДК [616.1.+616.43.+616.8]-001.18/9-092.9

**МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ЭКСТРЕМАЛЬНО НИЗКИХ
ТЕМПЕРАТУР НА СТРУКТУРНО–ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ
СОСТОЯНИЕ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ И
СЕРДЕЧНО–СОСУДИСТОЙ СИСТЕМ У ЖИВОТНЫХ
РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП**

14. 01. 35 – криомедицина

Диссертация на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научный консультант:
д.мед.н., профессор, академик НАН Украины
Валентин Иванович Грищенко

Харьков – 2010

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	8
РАЗДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	21
1.1. Искусственное охлаждение человека и животных - важнейшая медико-биологическая задача.....	21
1.2. Этапы становления криотерапии как метода кратковременного воздействия экстремально низких температур на организм человека.....	35
РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	69
2.1. Методики охлаждения и количество исследуемых животных.....	69
2.2. Методика моделирования алиментарного ожирения.....	73
2.3. Электронно-микроскопические и гистохимические исследования.....	73
2.4. Электрофизиологические методы исследования.....	76
2.5. Биохимические методы исследования.....	80
2.5.1. Исследование параметров хемилюминесценции.....	80
2.5.2. Определение базального уровня ТБК-активных продуктов.....	80
2.5.3. Определение интенсивности индуцированного перекисного окисления липидов.....	81
2.5.4. Определение содержания восстановленного глутатиона.....	82
2.5.5. Определение активности каталазы.....	83
2.5.6. Определение глутатионпероксидазной активности.....	83
2.5.7. Определение глутатионредуктазной активности.....	84
2.6. Определение концентрации гормонов.....	84
2.6.1. Определение концентрации общего тироксина в сыворотке крови.....	84
2.6.2. Определение концентрации 11-оксикортикостерона в сыворотке крови.....	86
2.6.3. Определение концентрации тестостерона	

в сыворотке крови.....	87
2.6.4. Определение концентрации эстрадиола в сыворотке крови.....	88
2.7. Методика определение содержания конечных продуктов обмена NO.....	89
РАЗДЕЛ 3 ВЛИЯНИЕ РИТМИЧЕСКИХ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ХОЛОДОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ (-120 °C) НА СТРУКТУРНО- ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ГИПОТАЛАМУСА МОЛОДЫХ И СТАРЫХ КРЫС.....	
3.1. Ультроструктура гипоталамуса молодых контрольных крыс.....	91
3.2. Влияние ритмических экстремальных холодových воздействий (-120°C) на структурно-функциональные особенности гипоталамуса молодых крыс.....	94
3.3. Ультроструктура гипоталамуса контрольных старых крыс.....	98
3.4. Влияние ритмических экстремальных холодových воздействий (-120°C) на структурно-функциональные особенности переднего и заднего отделов гипоталамуса старых крыс.....	108
3.5. Сравнительная характеристика частоты сердечных сокращений у молодых и старых крыс при различных методах экстремального охлаждения.....	124
РАЗДЕЛ 4. УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИОКАРДА КРЫС ПОСЛЕ РИТМИЧЕСКИХ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ХОЛОДОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ.....	
4.1. Ультроструктура миокарда молодых контрольных крыс.....	129
4.2. Ультроструктура кардиомиоцитов молодых крыс после охлаждения по стандартной методике.....	130
4.3. Изменение субмикроскопической структуры кардиомиоцитов молодых крыс после ритмических экстремальных холодовых воздействий.....	136
4.4. Ультроструктура миокарда контрольных старых крыс.....	147

4.5. Ультраструктура миокарда старых крыс после стандартного охлаждения.....	151
4.6. Ультраструктурные перестройки органелл кардиомиоцитов и эндотелиоцитов миокарда старых крыс после ритмических экстремальных холодовых воздействий.....	153
РАЗДЕЛ 5. УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИОКАРДА У ПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС С АЛИМЕНТАРНЫМ ОЖИРЕНИЕМ ПОСЛЕ РИТМИЧЕСКИХ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ХОЛОДОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ	
5.1. Ультраструктура миокарда крыс с моделированным алиментарным ожирением.....	165
5.2. Ультраструктура кардиомиоцитов крыс с моделированным алиментарным ожирением после ритмических экстремальных холодовых воздействий.....	170
РАЗДЕЛ 6. ВЛИЯНИЕ РИТМИЧЕСКИХ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ХОЛОДОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ СИСТЕМ НЕЙРОГУМОРАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ МОЛОДЫХ И СТАРЫХ КРЫС.....	
РАЗДЕЛ 7. ВЛИЯНИЕ РИТМИЧЕСКИХ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ХОЛОДОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ НА ПОКАЗАТЕЛИ СПЕКТРАЛЬНОГО АНАЛИЗА ВАРИАБЕЛЬНОСТИ СЕРДЕЧНОГО РИТМА У КРЫС С АЛИМЕНТАРНЫМ ОЖИРЕНИЕМ.....	175
РАЗДЕЛ 8. УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОК НАДПОЧЕЧНИКОВ И ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ СТАРЫХ КРЫС ПОСЛЕ РИТМИЧЕСКИХ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ХОЛОДОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ.....	189
РАЗДЕЛ 9. ИЗМЕНЕНИЯ ГОРМОНАЛЬНЫХ ФУНКЦИЙ У МОЛОДЫХ И СТАРЫХ КРЫС ПОСЛЕ РИТМИЧЕСКИХ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ХОЛОДОВЫХ	

ВОЗДЕЙСТВИЙ.....	210
РАЗДЕЛ 10. ОСОБЕННОСТИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ У МОЛОДЫХ И СТАРЫХ КРЫС ПОСЛЕ РИТМИЧЕСКИХ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ХОЛОДОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ.....	223
РАЗДЕЛ 11. СОДЕРЖАНИЕ КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ ОБМЕНА NO В ТКАНЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА, СЫВОРОТКЕ КРОВИ И МИОКАРДЕ МОЛОДЫХ И СТАРЫХ ЖИВОТНЫХ ДО И ПОСЛЕ РИТМИЧЕСКИХ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ХОЛОДОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ	244
ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	269
ВЫВОДЫ.....	294
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	298

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

А – адреналин

АД – артериальное давление

АКТ – аэрокриотерапия

АКТГ – адренокортикотропный гормон

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

АНС – автономная нервная система

АТФ - аденозинмонофосфат

АОС – антиоксидантная система

АХ – ацетилхолин

БЭА – биоэлектрическая активность

ВНС – вегетативная нервная система

ВСР – вариабельность сердечного ритма

ВЧ - высокочастотный

ГГНС – гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система

ГТ – гипоталамус

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДНП – диабетические нейропатии

ЗГТ – задний гипоталамус

ИЛ - интерлейкин

КА – катехоламины

КРГ - кардиоритмограмма

КЦГ краниocereбральная гипотермия

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

ЛГ – лютеинизирующий гормон

МЖ – молодые животные

МДА – малоновый диальдегид

НА – норадреналин

НЧ – низкочастотный

11ОКС - оксикортикостерон

ОМС – общая мощность спектра

ОНЧ – очень низкочастотный

ОП – оптическая плотность

ПГТ – передний отдел гипоталамуса

ПОЛ – перекисное окисление липидов

РХВ - ритмические холодовые воздействия

РЭХВ – ритмические экстремальные холодовые воздействия

СЖ – старые животные

ССС – сердечно-сосудистая система

СТ - серотонин

СТГ – соматотропный гормон

T₃, T₄ – тиреоидные гормоны

ТБК – тиобарбитуровая кислота

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

ХЛ – хемилюминесценция

ЦНС – центральная нервная система

ЧСС – частота сердечных сокращений

ЭК – экстремальная криотерапия

ЭКГ – электрокардиограмма

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

GSH - восстановленный глутатион

NO – оксид азота

ВВЕДЕНИЕ

Значительные достижения криомедицины в области фундаментальных и прикладных исследований воздействия холода на организм человека в значительной степени предопределили интерес врачей к возможному использованию низких температур в практическом здравоохранении [1-7]. Одним из таких методов является экстремальная криотерапия (ЭК), которая нашла широкое применение благодаря появлению криокамер с температурой ниже -100°C [8-11]. Экстремальная криотерапия считается одной из наиболее мощных физиотерапевтических процедур, которая в сочетании с традиционными методами может быть использована при лечении патологий различного генеза. Однако до сегодняшнего дня данный физиотерапевтический метод остаётся нетрадиционным и малоизученным. Метод значительно отличается от традиционного лечения ряда заболеваний - краниocereбральной гипотермии, при которой понижается температура тела. При ЭК организм реагирует на воздействие холода механизмами адаптации, при этом активируются гипоталамо-гипофизарно-адреналовая, иммунная, эндокринная и другие системы. Непродолжительное действие низких температур не истощает энергетические и функциональные резервы организма, замедляет процессы перекисного окисления и фосфорилирования в покровных тканях, трансмембранный перенос клеточных метаболитов, снижает потребность клеток в кислороде, питательных веществах. Явления, развивающиеся в глубоко расположенных тканях и органах, в т.н. «ядре» тела, имеют вторичное рефлекторное и нейрогуморальное происхождение, так как температура «ядра» тела практически не меняется. Экстремальная криотерапия, является универсальным методом, позволяющим создавать новые медицинские технологии, обладающие высокой лечебной эффективностью и направленные на получение клинических, реабилитационных и профилактических эффектов.

По признанию специалистов, ЭК эффективна при комбинированном лечении воспалительных и дегенеративных заболеваний суставов и позвоночника, коллагенозов, аутоиммунных нарушений и заболеваний кожи [12].

Криотерапия хорошо сочетается с другими лечебными, реабилитационными и оздоровительно-профилактическими методами.

Реакция сердечно-сосудистой системы (ССС) на охлаждение зависит от индивидуальной реактивности организма и может быть разнообразной, в частности, включая неоднократное сужение и расширение сосудов. Реакция сосудов глубоко расположенных органов и тканей на холодное воздействие менее выражена, а усиление кровоснабжения внутренних органов, как правило, связано с образованием вазоактивных веществ в сосудах.

Особый интерес представляет исследование физиологических механизмов краткосрочного действия экстремально низких температур на деятельность вегетативных центров и систем нейроэндокринной регуляции, которые непосредственно отвечают за температурный гомеостаз, так как реакция этого сложного «ансамбля» высших нейроэндокринных регуляторных механизмов на данный вид воздействия не изучена.

Важную роль в реакции организма на охлаждение играет проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Существующие концепции центральной терморегуляции убедительно объясняют сложные нейрофизиологические процессы, но ни в одной из них до последнего времени не учитывались активность и ультраструктурное состояние ГЭБ гипоталамуса. Возможно, именно поэтому схемы участия нейромедиаторов в организации температурного гомеостаза не объясняют некоторые специфические эффекты экстремальных температурных влияний. Функционирование ГЭБ стимулируется охлаждением и не ограничивается только влиянием на состояние терморегуляции. Очевидно, ГЭБ влияет на многие адаптационные процессы.

Известно, что большинство специализированных функциональных систем организма (дыхательная, нервная, сердечно-сосудистая) наряду со своей основной функцией принимают участие в активации и подавлении системы терморегуляции. Используя различные программы охлаждения, можно стимулировать появление феномена долговременной потенциации, регулировать активность физиологических систем, подавляя или активируя их. В этой свя-

зи важнейшими являются механизмы функционирования ГЭБ, как структурно-функциональной основы медленной управляющей системы головного мозга, определяющей состояние вегетативной нервной системы (ВНС), в частности функциональный баланс симпатического и парасимпатического отделов [13-18].

Адаптация организма к экстремальным температурным воздействиям сопровождается поддержанием оптимального уровня гомеостаза. Наблюдаемые изменения отличаются физиологической целесообразностью, поскольку они способствуют быстрой мобилизации различных функциональных систем, что является необходимым условием перехода организма из состояния покоя в состояние активности и, наоборот. Такая физиолого-морфологическая реакция имеет динамический и временный характер, целесообразна для организма в состоянии «мягкого» стресса и исключительно актуальна в ряде случаев для нормализации нарушенного гомеостаза.

В настоящее время классические представления об общем адаптационном синдроме трансформируются в концепцию эмоционального стресса. Если по Селье процессы запуска стрессовых реакций осуществляются гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системой (ГГНС), то согласно научным положениям об эмоциональном стрессе этими процессами управляют лимбико-ретикулярные структуры мозга. Мы считаем, что «пусковым» звеном в механизмах общего адаптационного синдрома при ритмических воздействиях холода является функциональная система ГЭБ, изменения проницаемости которого могут быть инициированы медленной управляющей системой мозга во взаимодействии с терморегуляторными, иммунными, биоэлектрическими и другими системными процессами. Тесно связанная с этими процессами структурно-функциональная организация ВНС, прежде всего, определяет интегрирование функций организма, обеспечивая приспособительные реакции, направленные на повышение жизнеспособности организма. Кроме того, ей принадлежит важная роль контролировать возрастные изменения, в том числе и в центральной нервной системе (ЦНС), которые являются ведущим фак-

тором в старении организма. Изменения структуры и функции вегетативных центров приводят к ослаблению механизмов адаптации.

С возрастом нарастают изменения в нейрогуморальной регуляции гемодинамики, ослабевает адрен- и холинергический контроль за деятельностью сердца.

При старении снижается поступление из крови в клетки питательных веществ и кислорода, лимитируется возможность выведения кислых продуктов обмена из клеток в кровь. Возникающая ацидотическая альтерация клеток, особенно нервных, воздействует на их геном и приводит к вторичным изменениям, в результате утрачиваются не только нервные клетки (в первую очередь, интернейроны), но и волокна мышечной системы; изменяется ВНС. Снижаются жизнеспособность и общая неспецифическая резистентность организма. Одновременно редуцируется свойство организма отвечать на раздражения окружающей среды. Подавляющее число научных аргументов и гипотез свидетельствует о том, что скорость старения по многим причинам зависит от характера стрессовых воздействий окружающей среды. С возрастом, наряду с ослаблением обмена веществ и других функций организма, мобилизуются важные приспособительные механизмы.

Старение может перерасти в болезнь или быть причиной ее неизбежного развития. Для старости характерно снижение митотической активности, биосинтеза белка. С возрастом повышается артериальное давление (АД) на фоне повышенного тонуса сосудов, увеличения общего периферического сосудистого сопротивления и снижения сердечного выброса.

Каждому возрасту соответствует определенный уровень адаптации, особенности обмена, структуры и функции организма. Эти качественные изменения, возникающие при старении в организме человека, определяют специфику и тяжесть возрастной патологии, исчезновение или, наоборот, прогрессирование определённых заболеваний [19-22].

По мнению геронтологов, старость приводит человека к «пропасти», а большинство людей в наше время умирают не от старости, а от болезней –

это важная медико-биологическая проблема, требующая современных подходов к оздоровлению или профилактике заболеваний у пожилых людей. «Смерть раньше 150 лет – насильственная смерть» – слова знаменитого ученого И.И.Мечникова. Факторами риска, сопровождающими старение, являются многие заболевания внутренних органов, а также нерациональное питание, алкоголизм, курение, ионизирующая радиация.

Понимание патофизиологических механизмов старения, изменений гомеостаза важны для клинической оценки симптомов, а также выбора целесообразного терапевтического воздействия. В этих условиях сохранение здоровья и продление активного периода жизни людей пожилого возраста – одна из важнейших государственных задач.

Лечебную эффективность ритмических экстремальных холодовых воздействий (РЭХВ) мы изучали на организме в процессе старения, что позволяет исследовать влияние холода на лимитирующие звенья патофизиологических изменений в организме стареющих животных. Установлено, что у человека и крысы причины и проявление старения практически одинаковы.

Важной особенностью теоретической и практической медицины является то, что реакции живых систем при старении рассматриваются в неразрывной связи с их структурой, а скорость и направленность этих реакций – как комплекс обратных связей, обеспечивающих устранение или максимальное ограничение действия патологических факторов.

В стареющем организме снижаются функциональные возможности почти всех систем и органов. Повышенная заболеваемость людей пожилого возраста связана с возрастными изменениями клеток, систем и органов, уменьшением резервных возможностей и компенсаторных процессов. Для них характерен определенный «спектр» основных заболеваний: сердечно-сосудистых, злокачественных опухолей, дегенеративных заболеваний мозга и внутренних органов, диабет и ожирение.

При изучении состояния функциональных систем молодых и старых животных чрезвычайно важно сравнение уровня адаптации их организма, го-

меостаза, взаимосвязи отдельных клеточных процессов и функциональных систем. Предупреждение или уменьшение выраженности патологии, возможность влиять на адаптационно-регуляторные процессы и гомеостаз с помощью РЭХВ обосновывают целесообразность разработки методов, направленных на профилактику осложнений, развивающихся при старении.

Для определения общего, неспецифического влияния РЭХВ на животных выбрана модель алиментарного ожирения у половозрелых животных, на фоне которого при охлаждении изучали структурные изменения миокарда и состояние variability сердечного ритма (ВСР).

Наши предыдущие исследования показали, что различные режимы охлаждения могут усиливать противофазные колебания проницаемости ГЭБ для симпато- и парасимпатомиметиков, восстанавливать характерную для молодых крыс «молодую» ритмику функционирования ГЭБ, оптимизировать прямые и обратные связи в ЦНС и ССС. Следовательно, модуляция медленной волновой активности мозга и ГЭБ с целью коррекции нарушений функции центральной нервной и сердечно-сосудистой систем стареющего организма является чрезвычайно перспективным направлением для практической медицины.

Основываясь на вышеизложенном, можно предположить, что РЭХВ являются эффективным лечебным методом, направленным на повышение адаптационных возможностей организма и коррекцию соматовегетативных нарушений, характерных для пожилого возраста.

Актуальность темы. В последние годы криобиология и криомедицина в Украине достигли значительного прогресса в использовании низких температур с целью создания новых криобиотехнологий для нужд медицины. Этому способствовало углубленное изучение принципов морфофункциональной организации живого, метаболических циклов, процессов жизнедеятельности систем в условиях действия низких температур на клетки, ткани, органы и организм млекопитающих.

Решение вопросов о лечебном действии РЭХВ невозможно без углубленного понимания явлений, которые происходят в регуляторных системах гомеостаза и сопровождаются патофизиологическими изменениями на разных уровнях организации. Применение ритмических экстремальных краткосрочных режимов охлаждения повышает лабильность регуляторных процессов в ЦНС и ССС, стимулирует их прямые и обратные связи, нормализует симпатические и парасимпатические взаимоотношения ВНС с последующей оптимизацией механизмов гомеостаза.

РЭХВ осуществляются в специализированной камере при температуре -120 °С. Подобные устройства успешно применяются в лечебных учреждениях многих стран.

На основании полученных экспериментальных данных можно сделать вывод о целесообразности и обоснованности дальнейшего применения метода ритмической экстремальной криотерапии в медицинской практике, особенно для коррекции нарушений гомеостаза у лиц пожилого возраста. Это позволит повысить работоспособность, снизить профессиональные депрессии, утомляемость, нарушения сна, головные боли, получить существенный лечебный результат и создать высокоэффективный, не имеющий аналогов метод оздоровления населения Украины.

Связь работы с научными программами, планами, темами. Диссертационная работа выполнялась в рамках ведомственных научных тем Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины в соответствии с утвержденным Президиумом НАН Украины и выполняемым в отделе криофизиологии научным направлением по теме № 29 (номер государственной регистрации 0106U002162): «Физиологические и патофизиологические механизмы действия низких температур на состояние центральной нервной, сердечно-сосудистой и эндокринной систем у животных разных возрастных групп». По целевой программе прикладных исследований НАН Украины «Новые медико-биологические проблемы и окружающая среда» выполнена

тема № 17 (номер государственной регистрации 0104U006435): «Разработка новых программ экстремальной криотерапии (-120°C) на основе научно-экспериментального обоснования медико-биологической технологии повышения проницаемости ГЭБ и разнонаправленного транспорта в ЦНС и другие ткани организма человека биоактивных веществ». По целевой программе прикладных исследований НАН Украины «Новые медико-биологические проблемы и окружающая среда» выполнена тема № 37 (номер государственной регистрации 0109U006896): «Механизмы регуляции функции гистогематических барьеров при ритмических холодовых воздействиях». Автор был ответственным исполнителем вышеуказанных тем НИР.

Цель работы и задачи исследования. На основании экспериментальных исследований установить механизмы действия экстремально низких температур (-120°C) на структурно-функциональные показатели деятельности ЦНС и ССС у животных различных возрастных групп. Определить роль физиологической системы ГЭБ в регуляции адаптационных реакций после применения ритмических экстремальных криовоздействий.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Изучить ультраструктурные изменения тканей гипоталамуса старых и молодых животных в зависимости от количества сеансов РЭХВ;
2. Провести сравнительный анализ ультраструктурных изменений тканей и сосудов миокарда старых и молодых животных после стандартного охлаждения и РЭХВ;
3. Исследовать особенности реакции систем нейрогуморальной регуляции у животных разных возрастных групп в динамике охлаждения;
4. Проанализировать состояние систем нейрогуморальной регуляции животных с алиментарным ожирением до и после РЭХВ;
5. Исследовать изменения функционального состояния эндокринной системы молодых и старых животных до и после РЭХВ;

6. Изучить особенности свободнорадикальных процессов в сыворотке крови и миокарде крыс разных возрастных групп в зависимости от количества сеансов РЭХВ;

7. Изучить динамику изменения содержания конечных продуктов обмена NO в тканях головного мозга, миокарда и сыворотке крови молодых и старых крыс до и после РЭХВ.

Объект исследования. Структурно–функциональное состояние центральной нервной и сердечно-сосудистой систем организма животных разных возрастных групп в норме, при ожирении и после РЭХВ.

Предмет исследований. Морфофункциональные, биохимические, цитохимические, эндокринные и электрофизиологические показатели состояния животных и динамика их изменений при ритмическом охлаждении.

Научная новизна полученных результатов. Впервые обоснована возможность использования РЭХВ ($-120\text{ }^{\circ}\text{C}$) для стимуляции и улучшения деятельности ЦНС и ССС, особенно у старых животных, за счет активации функционирования ГЭБ, унификации действия вторичных ретроградных мессенджеров с целью восстановления функциональной активности физиологических систем организма, активации компенсаторных и адаптационных возможностей, повышения устойчивости организма к действию неблагоприятных факторов.

Впервые экспериментально обосновано преимущество предложенной методики холодовых воздействий по сравнению с традиционной методикой. Метод РЭХВ способствует более быстрому восстановлению соотношения функций симпатического и парасимпатического отделов ВНС, замедлению или ускорению сердечного ритма в зависимости от потребностей организма, в результате чего значительно повышаются адаптационные возможности у старых животных. В этом особая роль отводится ГЭБ как важному звену центральных механизмов терморегуляции.

На модели алиментарного ожирения у контрольных животных отмечено значительное уменьшение общей мощности спектра нейрогуморальной регуляции, которое характеризовалось низким уровнем симпатических и парасимпатических влияний в модуляции сердечного ритма. После 9 сеансов РЭХВ показатели общей спектральной мощности у этих животных возрастали и практически не отличались от показателей у контрольных животных. РЭХВ способствовало восстановлению функциональных резервов организма животных с моделью алиментарного ожирения.

Впервые показано, что РЭХВ (-120°C) приводят к периодическим изменениям структурно-физиологической активности ГЭБ, долгосрочной активации синаптического аппарата нейронов гипоталамуса. Установлен феномен возобновления фрактальной («молодой») геометрии структур мозга после 9-го сеанса РЭХВ, о чем свидетельствуют показатели фрактальной размерности.

Установлено, что при РЭХВ в ультраструктурной архитектонике кардиомиоцитов старых крыс наблюдаются перестройки компенсаторного типа: увеличение количества митохондрий; уменьшение очагов деструкции и дегенеративных изменений; повышение метаболической активности; активация в эндотелиоцитах компенсаторно-регенеративных процессов; усиление трансцеллюлярного обмена веществ.

Выявлены благоприятные эффекты от применения холодových воздействий не только при электронно-микроскопическом исследовании капилляров миокарда старых крыс, но и при алиментарном ожирении, которое моделировали у молодых животных. Экспериментальные данные подтверждают неспецифическое воздействие РЭХВ на патофизиологические процессы, которые протекают в сердце при старении и алиментарном ожирении у половозрелых крыс.

Установлено, что одним из механизмов действия РЭХВ является активация антиоксидантной системы (АОС) миокарда, вследствие чего повышается резистентность организма, особенно, если учесть, что одной из концепций

развития старения является активация перекисного окисления липидов (ПОЛ). Определена важная роль NO как внутриклеточного посредника в регуляции вегетативных функций путем повышения функциональной активности ГЭБ.

По результатам проведенных исследований можно утверждать, что РЭХВ повышают адаптационные возможности организма, мобилизуя и восстанавливая нарушенный гомеостаз у старых животных.

Полученные экспериментальные данные являются важными для перспективных фундаментальных и прикладных исследований в этом направлении с целью обоснования возможного применения метода РЭХВ для коррекции нарушений функциональных систем организма у пожилых людей.

Практическое значение полученных результатов.

Фундаментальные исследования действия РЭХВ на функциональные системы организма животных разных возрастных групп показали перспективность и являются обоснованием для применения метода РЭХВ для коррекции нарушений гомеостаза. Полученные результаты расширили представления о механизмах адаптации животных при ритмических криовоздействиях. Применение РЭХВ в динамике старения организма млекопитающих улучшает эффективность нейрогуморальной регуляции, создает условия для повышения устойчивости организма к действию неблагоприятных факторов. Результаты исследований позволили обосновать и подтвердить патентами возможность создания метода коррекции нарушенных вследствие старения организма функций систем гомеостаза, улучшить и «омолодить» ритмику вегетативных влияний на организм и в случае внедрения метода получить высокую лечебную эффективность.

Материалы диссертации используются в учебном процессе ряда факультетов Харьковского национального университета.

Личный вклад соискателя.

Полученные данные являются результатом самостоятельной работы автора и заключаются в разработке оригинальной методики РЭХВ на организм

животных в условиях криокамеры. Проанализирована научная литература по изучаемой проблеме, сформированы цель и задачи исследования, а также средства их решения. Все эксперименты по ритмическому охлаждению животных выполнены диссертантом лично. Морфологические, цитогистохимические исследования выполнены с непосредственным участием автора.

Автором самостоятельно проведены статистическая обработка и анализ полученных данных, обоснованы основные положения, сформулированы выводы и практические рекомендации диссертационной работы. Ввиду широкого использования смежных дисциплин диссертационная работа выполнялась при консультативной помощи сотрудников отделов криоморфологии и криобиохимии ИПКиК НАН Украины.

Опубликованные в соавторстве научные статьи отображают концепцию работы и подтверждают идеи и решения поставленных диссертантом задач. Помощь соавторов была направлена на выполнение отдельных методических задач.

В опубликованных совместно с соавторами работах личный вклад соискателя состоит:

- в работах [1,3,5] по результатам экспериментов раздела 3 диссертант планировал и проводил эксперименты, участвовал в постановке методик электронно-микроскопических исследований, проводил статобработку, анализировал и описывал полученные результаты ;

- в работах [1,2,4] раздела диссертации 4 лично планировал и проводил эксперименты. Совместно с соавторами анализировал и описывал ультраструктурные изменения миокарда крыс;

- в работе [1] раздела 5 и раздела 7 моделировал алиментарное ожирение у крыс, проводил спектральный анализ вариабельности сердечного ритма, описывал полученные результаты;

- в работе [3] раздела 6 соавтор помогал осуществлять методику охлаждения крыс;

– в работах [1,2] раздела 8 проводил методику охлаждения животных, участвовал в анализе электроннограмм;

– в работах [1,4,5,6,7] раздела 10 соавторами была оказана помощь в постановке и проведении методик определения состояния про и антиоксидантной системы.

Апробация результатов диссертации.

Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на научных форумах: 19 съезде Физиологического общества им. И.П.Павлова (Россия, Екатеринбург, 19 сентября 2004 г.); XX Российской конференции по электронной микроскопии (Черноголовка, 2004 г.); III конференции Украинского общества нейронаук с международным участием (2005 г.); IV Национальной научно-практической конференции «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека» (Россия, Смоленск, 2005 г.); конференции «Актуальні проблеми функціональної морфології» (Полтава, 2005 г.); конференции «Биология – наука XXI века» (Россия, Пущино, 2006 г.); международной конференции «Молодежь и современные проблемы радиотехники и телекоммуникаций «РТ-2006» (Севастополь, 2006 г.); научно-практической конференции «Профілактика, діагностика та лікування – основні складові терапії» (Харьков, 2006 г.); научно-практической конференции «Щорічні терапевтичні читання: роль медичної науки в рішенні проблем внутрішніх хвороб (Харьков, 28 марта 2007 г.); конференции с международным участием «Новые криобиотехнологии для решения фундаментальных и прикладных задач медицины» (Харьков, 2008 г.); докладе на расширенном заседании отделения биохимии, физиологии и молекулярной биологии НАН Украины (Киев, 2010 г.).

Публикации. Основные положения диссертации изложены в 45 научных работах: в научных профильных изданиях – 21 статья, из них 10 моностатей. Получено 5 патентов Украины на изобретение и опубликовано 12 тезисов докладов.

РАЗДЕЛ 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Искусственное охлаждение человека и животных – важнейшая медико-биологическая задача

С большим успехом холод применяли в древней медицине. Холодный воздух и воду для закаливания использовали ассирийцы и египтяне. 2500 лет до нашей эры египтяне применяли холодные компрессы при ранениях, повреждениях черепа и костей. Более 27 веков тому назад тибетские медики отмечали улучшение течения заболеваний суставов после применения холода.

Рецепты лечения холодом создавались в Древнем Египте, многих арабских странах. Гиппократ и его ученики использовали лед и холодную воду для оказания помощи при подагре, кровотечениях, травмах. Жители Древнего Рима успешно лечили ревматизм и поражения суставов, периодически погружая голову больного в холодную воду.

На Руси было распространено закаливание холодом после предварительного пребывания в горячей бане. Благодаря этой методике А.В.Суворову удавалось сохранять высокий уровень работоспособности и укреплять здоровье.

В 1855 г. в Австрии был открыт первый в мире институт по закаливанию организма. Впервые холод, как обезболивающее средство применил в военно-полевых условиях И.И.Пирогов, оказывая помощь раненым солдатам во время русско-турецкой войны.

Профессор Киевского университета А.П.Вальтер [23] начал изучать влияние холода на живые существа. Им было показано, что по мере снижения температуры тела замедляется частота сердечных сокращений. Охлажденное животное теряло чувствительность к боли, что давало возможность опериро-

вать животных без применения наркотических средств. Его учеником А.Н.Хорватом [24] описаны изменения сердечно-сосудистой системы у животных при общем охлаждении и охлаждении головы. Им показано, что при этих методах охлаждения изменяется кровяное давление, замедляется частота сердечных сокращений (ЧСС), угнетаются рефлекторные реакции. Многим ученым казалась заманчивой идея поиска путей продления жизни людей, одним из которых являлось введение пострадавших в состояние гипобיוза с тем, чтобы через определенное время вернуть их к жизни.

Однако, этим утопическим надеждам не суждено было сбыться, так как теплокровные животные и человек в специальных условиях не могут выдерживать глубокого охлаждения, а температура тела 28-24 °С является критической для жизни. Обладая рядом лечебных свойств, общая гипотермия таит в себе риск тяжелых осложнений, заканчивающихся в ряде случаев летальным исходом. При быстром общем охлаждении возникает фибрилляция желудочков сердца с последующей его остановкой.

Многими учеными [25-34] отмечено, что введение в состояние общей гипотермии гомойотермов без применения блокирующих терморегуляцию средств, сопровождается выраженной стрессовой реакцией, гипоксией, эмоциональным перенапряжением с нарушением компенсаторных функций. Выброс в кровь адреналина (А) и норадреналина (НА) повышает концентрацию свободных жирных кислот, способствующих разобщению окисления и дыхания митохондрий, что увеличивает энергетические затраты на синтез АТФ. Кроме того, при общей гипотермии из-за возможности развития фибрилляции желудочков не удастся достаточно быстро охладить весь организм, так как из-за интенсивной перекачки крови сердце охлаждается значительно быстрее, чем ткани мозга, между ними возникает большой температурный градиент, что таит в себе большую степень риска для жизни. В ряде случаев метод общей гипотермии не дает возможность достаточно быстро снизить температуру тканей мозга, особенно если учесть, что нейроны при выражен-

ной гипоксии или аноксии могут оставаться жизнеспособными несколько минут.

Следует учитывать, что общее охлаждение не исцеляет организм от болезни, а лишь пролонгирует время, необходимое для лечения пострадавшего. Установленный факт, что чем ниже температура тела, тем ниже потребность организма в кислороде, тем медленнее протекают обменные процессы в организме [35-40] дали в руки специалистов эффективный метод для оказания помощи с тяжелыми мозговыми осложнениями, при операциях на сердце, особенно у детей.

В работе Бернштейна И.А. [41] показано, что снижение температуры тела у животных до 25 °С снижает ЧСС в 2 раза, уменьшает минутный объем сердца на 5%, а АД - на 45%.

Глубокая локальная гипотермия оказывает благоприятное действие на сохранность функции миокарда при длительной остановке сердца [42-57]. Вместе с тем, глубокая гипотермия, как правило, сопровождается фибрилляцией желудочков сердца [58, 59]. Степень риска существенно возрастает при температурах ниже 29 °С, что связано с возникновением сопутствующей гипоксии [60], рефрактерностью сердца [61, 62], замедлением проводимости [63] и температурной асимметрией сердца [64]. Среди других факторов нарушения сердечно-сосудистой деятельности при глубокой гипотермии имеет значение возникающий ацидоз [65], тканевая гипоксия и нарушение метаболизма [66, 67].

Поиски ученых привели к созданию метода кранио-церебральной гипотермии (КЦГ), при котором в первую очередь охлаждаются ткани мозга. При таком способе охлаждения температура тканей мозга снижалась всегда быстрее, чем температура органов грудной и брюшной полости. Температурный градиент между мозгом и ядром тела при этом методе был всегда ниже, чем при общем охлаждении, уменьшалась степень риска нарушений со стороны ССС. Метод оказался практичнее и перспективнее для применения в медицине [68-87]. При КЦГ создаются оптимальные условия для сохранения

функции тех жизненно важных систем гомеостаза, которые являются менее устойчивыми к кислородному голоданию, при этом сохраняются адекватные условия для обеспечения кислородом организма.

Было доказано, что при КЦГ потребление O_2 тканями мозга наиболее уменьшается при понижении температуры тела от 31 °С до 27 °С и мало изменяется при дальнейшем снижении температуры до 26 °С.

КЦГ, замедляя скорость обменных процессов в тканях мозга, способствует сопряжению между окислением и фосфорилированием, что обеспечивает поддержание энергообеспечения мозга (с учетом потребностей при пониженных температурах) на адекватном уровне. Ряд авторов, изучая действие КЦГ на организм, установили закономерности изменения кислотно-щелочного баланса, увеличение кислородной емкости крови за счет растворимости его в плазме, повышения сродства O_2 к гемоглобину [88-98]. Однако, сохранение показателей кислотно-щелочного баланса в физиологических пределах при поверхностном и умеренном снижении температуры тела, равно как и функции других систем, возможно только в случае адекватной анестезии. Имеются сведения о лечебном эффекте КЦГ при отравлении окисью углерода, при экзогенных и эндогенных интоксикациях и при травмах [99], в случаях отравления снотворными препаратами [100, 101].

В исследованиях механизмов действия КЦГ на состояние коронарной недостаточности в эксперименте большой интерес представляли работы ряда ученых. Было установлено [102], что наиболее благоприятный эффект оказывает умеренная гипотермия тела (32-30 °С). При таких температурах тела замедляется метаболизм миокарда, а потребность его в кислороде снижается на одну треть, уменьшается ЧСС, но возрастает сократительная способность миокарда. В условиях экспериментальной острой коронарной недостаточности гипотермия вызывает замедление скорости кровотока в коронарных сосудах, снижение расхода тканями макроэргических соединений [103], предупреждает появление аритмии [104] и снижает повышенное конечно-диастолическое давление в желудочках [105-109].

КЦГ понижает уровень энергозатрат, создает условия, при которых устойчивость ССС и организма в целом повышается к действию стресса, препятствует развитию декомпенсации и сердечной недостаточности [110, 111].

Лечебные свойства охлаждения организма людей и животных при нарушениях функции ССС заключаются в улучшении гемодинамики, нормализации АД, урежении ЧСС и возникновении аритмии [112-116].

Была установлена зависимость сверхмедленных процессов от температуры мозга. Показаны монофазные колебания в супраоптическом поле гипоталамуса длительностью около 1 минуты и амплитудой 1 мВ [117]. Понижение температуры мозга на 1 °С изменяло амплитуду биопотенциала, а сверхмедленные колебания имели волнообразный характер. Установлена корреляция «медленного потенциала» от температуры в переднем гипоталамусе (ПГТ) [118]. Воздействие разных температур (холод-тепло) на рецепторы кожных покровов вызывали изменения потенциалов и появление или исчезновение сверхмедленных колебаний потенциалов в гипоталамусе [119].

Холодовые воздействия изменяли омега-потенциалы гипоталамуса с периодом 1-3 минуты, которые удерживались до 5 минут [120].

Центральные механизмы терморегуляции координируются функцией переднего и заднего гипоталамуса [121, 122], где расположены нейроны, контролирующие выработку, хранение и потерю тепла. Предполагается, что роль периферических терморецепторов заключается в повышении активности реакций терморегуляции до изменения температуры тканей мозга. Исследованиями [25, 26] показано, что гипотермия без применения фармакологических средств, блокирующих центры терморегуляции, вызывает комплекс неспецифических стрессовых реакций, болевые ощущения, эмоциональное перенапряжение с последующим нарушением компенсаторных функций [34]. Применение наркоза при охлаждении организма существенно меняет выраженность стрессорных реакций. В этом случае фаза возбуждения организма

выражена незначительно, угнетается обмен веществ и функциональная активность систем организма, обеспечивающих гомеостаз.

В ответных реакциях гипоталамических центров температурного гомеостаза важная роль отводится балансу между секрецией НА, серотонина (СТ) и ацетилхолина (АХ) [123-127].

КЦГ приводит к стадийным изменениям нейромедиаторных систем головного мозга. В первые 15 минут КЦГ происходит усиление секреции НА в преоптической области гипоталамуса [128-130]. При ректальной температуре 34 °С подавлялась секреция СТ, а секреция НА синапсами усиливалась. Повышение секреции НА в ответ на охлаждение – результат активации норадренергических нейронов ствола мозга. В этом температурном диапазоне значительно изменяются кинетические параметры обратного захвата из синаптической щели выделенного СТ и НА. Отмечено снижение сродства переносчика к нейромедиаторам. В этих условиях, когда в организме наблюдается дефицит тепла, именно такие скоординированные изменения процессов секреции НА и СТ в гипоталамусе отражают процессы компенсации, которые имеют неспецифический характер. Установлено, что спонтанная секреция нейромедиаторов обусловлена содержанием Ca^{2+} в нервных окончаниях, Ca^{2+} деполяризацией клеточных мембран. Применяемая гипотермия приводила к однонаправленным изменениям секреции НА из синапсом коры и гипоталамуса и захвату Ca^{2+} .

Очевидно, в данном случае имеет место высокая функциональная активность Ca^{2+} -каналов как механизма адаптации в условиях умеренного охлаждения. При ректальной температуре 32 °С в синаптической мембране обнаруживаются две популяции альфа1-рецепторов с различными константами диссоциации. Появление популяций с высоким и низким сродством к нейромедиатору является результатом проявления функциональной неоднородности рецепторов одного и того же фармакологического типа.

Установлено, что в процессе КЦГ обнаруживается синхронизация медленной биоэлектрической активности (БЭА) коры и гипоталамуса головного мозга, что связано с активацией норадренергической системы мозга.

При частичном фармакологическом подавлении центров терморегуляции КЦГ способствует более быстрому и менее пагубному для организма развитию реакций приспособления. Развивающаяся реакция компенсации направлена на восстановление в организме нарушенных функций и характеризуется коротким периодом своего развития.

В потоке информации, связанной с проблемой охлаждения организма, особо выделяют оценку роли ГЭБ в температурных процессах [13, 14].

В экспериментах на крысах проводили КЦГ, определяли содержание А и НА в тканях. Проницаемость ГЭБ для нейромедиаторов в структурах мозга определяли радиоизотопным методом, измеряли также активность аденيلاتциклазы (АЦ), концентрацию простагландинов в плазме крови.

Показано, что на начальных стадиях КЦГ (34 °С) появляется тенденция к снижению А в плазме крови, а содержание НА не изменялось. При ректальной температуре 32 °С отмечалось увеличение содержания А и, в меньшей степени, НА в плазме крови, при этом содержание НА в тканях надпочечников уменьшалось до уровня контроля. Повышенное содержание моноаминов в крови изменяет содержание цАМФ прямо или опосредовано простагландинами. При температуре тела 32 °С умеренно повышалось содержание в крови простагландина Е в динамике охлаждения и через сутки, в то время как концентрация простагландина F₂альфа не подвергалась существенным изменениям.

При КЦГ 32 °С в сердечной мышце отмечено увеличение содержания цАМФ за счет увеличения каталитической активности АЦ, опосредованной β-адренорецепторами или простагландинами группы Е.

Происходит значительное повышение проницаемости ГЭБ структур головного мозга для биологически активных веществ. Возможно, что пептиды, простагландины, циклические нуклеотиды, нейромедиаторы, гормоны и др.

служат коммуникативными сигналами межклеточных взаимодействий, изменяющих проницаемость ГЭБ и передающих информацию в ЦНС.

Изучение вышеописанных изменений позволило установить закономерности изменения функции центральной нервной и сердечно-сосудистой систем в условиях применения КЦГ, оптимизировать глубину понижения температуры тела, разработать и внедрить в практическую медицину методы лечения депрессивных состояний, острого отравления различными суррогатами, коматозных состояний, алкоголизма. Воздействуя на патогенетические звенья, КЦГ существенно улучшает состояние больных. Существуют многочисленные данные об использовании антидепрессантов при депрессивных расстройствах с аутоагрессивными тенденциями. Общей мишенью их служит моноаминергическая система. Вместе с тем, в ряде случаев обнаруживается развитие к ним резистентности.

Поэтому для коррекции эмоциональных расстройств с аутоагрессивной направленностью использовали КЦГ, результаты ее применения в комплексной терапии психических заболеваний показали эффективность метода [131-135], позволившего устранить тяжелые церебральные проявления алкогольного делирия, судорожного синдрома, сохранить интеллектуально-мнестические функции. Несмотря на достигнутые успехи в изучении действия гипотермических температур на организм человека и животных, обоснование целого ряда методов лечения различных заболеваний на основе применения метода КЦГ в конце прошлого столетия начали терять свои позиции, как методы выбора при многих опасных для жизни ситуациях. Прежде всего, это было связано с необходимостью понижения температуры тела до 32 °С, требующей наркоза и искусственного дыхания, так как незначительное понижение температуры тела (ниже 30 °С) таит в себе опасность развития фибрилляции сердца, возникновения аритмии. Такие процедуры требовали высококвалифицированного персонала и проводились в стационарных условиях под строгим наблюдением врачей специалистов. Сама процедура охлаждения-отогрева длилась несколько часов. Кроме того, опыт показал, что

применение КЦГ в комплексном лечении ряда заболеваний не всегда эффективно, что обычно связано с особенностями индивидуальной реакции организма на понижение температуры тела, а также развития в ряде случаев парадоксальных реакций организма на введенные лекарственные препараты.

Вместе с тем, в ряде специализированных клиник при операциях на «сухом» сердце у детей применяется умеренная гипотермия мозга и глубокая местная гипотермия сердца, что дает возможность проведения операции на неработающем органе до 1 часа с последующим восстановлением его функций.

В последние годы в медицине успешно развиваются методы неинвазивной терапии, связанные с применением слабых, но ритмически повторяющихся сенсорных воздействий физических факторов колебательно-волновой природы [13, 15, 128, 130, 136, 137].

Роль резонансных явлений в процессе жизнедеятельности, регуляции активности различных систем организма признается многими учеными [16, 17, 140], в том числе и для нервных клеток, биологических мембран [141-143]. Подбирая определенный ритм периодических воздействий физическими факторами, скоординированными с частотой биоритмов организма, можно попытаться управлять физиологическими реакциями организма [144]. Учеными установлено, что у человека и животных имеет место особая чувствительность к низкочастотным внешним раздражителям [145-147], особенно в случаях соответствия параметров стимуляции с индивидуальными особенностями регуляторных систем [15].

В связи с этим ряд ученых криобиологов обосновали [16] возможность применения ритмической гипотермии как модулирующего воздействия для нормализации нарушенного функционального состояния организма собственными эндогенными ритмами.

Гипотермические воздействия могут привести к нарушениям функции регуляторных систем и структуры мембран, модификации генома. Следовые реакции этих температурных воздействий способствуют формированию тер-

морегуляторного условного рефлекса и явлений адаптации. Возможно, в основе следовых реакций после температурных воздействий лежат механизмы «вегетативной» памяти, образующей связи не только между центрами анализаторами и центрами эффекторами, но и элементами отдельных систем, тканевыми процессами, сосудистыми реакциями, изменениями гормональных функций [136-139].

В зависимости от интенсивности и вида однократного внешнего воздействия формируется специфическая системная приспособительная реакция, подготавливающая организм к повторному возможному воздействию через сутки, реализуя при этом функциональные резервы и структурные перестройки, обеспечивая менее выраженное напряжение органов и тканей, принимающих в этом процессе адаптации непосредственное участие [148, 149].

В работах [130, 149] КЦГ проводили под внутрибрюшинным наркозом смеси тиопентала натрия и оксибутирата натрия, определяли содержание А и НА в тканях, а также секрецию и проницаемость ГЭБ для нейромедиаторов методом push-pull канюли и ex vivo на переживающих срезах гипоталамуса. БЭА мозга в диапазоне 0,1-15 Гц в переднем и заднем гипоталамусе регистрировали на электроэнцефалографе BST-1. Однократная КЦГ до температуры тела 32 °С повышала устойчивость крыс к действию субнулевых температур (длительное плавание в ледяной воде). Эффект устойчивости наиболее выражен был через 24 часа и сохранялся до 48 часов, что, по мнению авторов, было связано с эффектом «реакции ожидания» гипотермии. Эта реакция заключается в формировании комплекса условий, обеспечивающих через 24 часа после КЦГ сохранение в крови и гипоталамусе НА на достаточно высоком уровне. После повторного сеанса КЦГ активность норадренергической системы мозга была подобна ответу на первое охлаждение, однако система реагировала более экономно и специфично.

Применяя повторную КЦГ, удалось повысить холодовую устойчивость организма на 75%, что, очевидно, связано с повышением проницаемости ГЭБ для биоактивных веществ. Проницаемость ГЭБ имела периодический харак-

тер, что позволило предположить наличие в гомеостатических механизмах ГЭБ существенных резонансных явлений на частотах медленной БЭА мозга, синхронизации активности коры и гипоталамуса в этом же диапазоне частот. При этом происходит замедление скорости охлаждения организма на фоне повышения функции когерентности и синхронизации секундного ритма в гипоталамусе и сенсомоторных областях коры головного мозга, в 2-3 раза повышается проницаемость ГЭБ для норадреналина.

Происходящие при этом изменения проницаемости ГЭБ обратимы и имеют функциональный характер. Авторы делают вывод, что как ультраструктурный, так и функциональный «след» ритмических холодовых воздействий следует искать в терморегуляторных центрах гипоталамуса.

Существует температурный уровень (34-30 °C), при котором ГЭБ значительно проницаем для катехоламинов [149], причем после повторного охлаждения проницаемость барьера в 2 раза увеличивается. Достаточная концентрация НА в тканях гипоталамуса является результатом повышенной проницаемости ГЭБ и повышения его синтеза. Показано, что «резерпиновое истощение» значительно снижает уровень НА в крови. После первого и второго сеанса КЦГ его содержание возрастает более, чем в 2 раза по сравнению с контролем и в 9 раз по сравнению с уровнем, отмечаемым после «резерпинового истощения». Следует отметить, что введения животным резерпина не изменяло проницаемость ГЭБ. После повторной КЦГ введение животным резерпина не сопровождалось истощением запасов НА. Проанализировав данные, авторы пришли к заключению, что при повторном сеансе КЦГ формируется приспособительная функциональная система, которая подготавливает организм к повторному воздействию холода по типу «реакции ожидания», которая может реализоваться благодаря концентрации в крови и гипоталамусе НА спустя сутки после первой процедуры КЦГ.

Возможность управления функцией ГЭБ является важной медико-биологической проблемой. Работа [15] посвящена изучению проблемы нейромедиаторных механизмов функционирования ГЭБ и биоэлектрических

реакций мозга в процессе ритмических холодовых воздействий (РХВ). Авторы предположили, что проникший через ГЭБ нейромедиатор принимает участие в синаптических процессах. Для этого через 40 мин после внутрибрюшинного введения ^3H -НА при помощи push-pull-канюли проводили прижизненную перфузию отделов гипоталамуса раствором Кребса-Рингера с повышенным содержанием ионов калия, который способствует усилению секреции НА. Показано, что происходит захват и К-индуцированная секреция синаптическими окончаниями экзогенного НА, проникшего через ГЭБ, что подтверждалось и характерными изменениями БЭА мозга, происходящими параллельно и однонаправленно с изменениями проницаемости ГЭБ.

Поэтому чрезвычайно важным представлялось изучить изменения БЭА гипоталамуса и коры головного мозга и проницаемости ГЭБ при навязывании секундного биоритма РХВ с частотой, близкой к секундному ритму мозга.

Показано, что при РХВ происходит увеличение проницаемости ГЭБ для НА и А в среднем в 3-4 раза. При применении РХВ по сравнению с однократным охлаждением при ректальной температуре 32 °С более существенно повышается пространственная синхронизация секундных биоритмов, синхронно повышается проницаемости ГЭБ, что свидетельствует о взаимосвязи этих процессов. В этих случаях введение резерпина, вызывающего истощение катехоламиновых депо, в тканях мозга не оказывало какого-либо влияния на процесс проникновения НА через ГЭБ, также как и не была подавлена К-индуцированная секреция медиатора, что исключает влияние собственной секреции норадренергических нейронов на БЭА исследуемых структур мозга и проницаемость ГЭБ.

Известно, что НА и А обладают различным действием при центральном и периферическом введении. Введение их в кровяное русло вызывает повышение ЧСС, а введение в гипоталамус, приводит к урежению ЧСС. Периферическое введение нейромедиаторов на фоне КЦГ 32 °С вызывало снижение ЧСС, более выраженное при РХВ. Это может быть связано с проникновением

в условиях гипотермии катехоламинов в гипоталамус, где они оказывают парасимпатическое влияние на нейрорегуляторные центры ССС, об этом свидетельствуют также и изменения динамического ряда кардиоинтервалов, отображающих различные формы процессов регуляции. Проникший через ГЭБ в мозг нейромедиатор захватывается окончаниями нейронов, секретируется в синаптическую цель и, взаимодействуя с соответствующими рецепторами, активирует функциональное состояние мозга.

Охлаждение животных до 32 °С более, чем в 2 раза повышает проницаемость ГЭБ для НА и А, которые при нормотермии, поверхностной или глубокой гипотермии в мозг не проникают [15, 139]. Установлено, что на 45 и 65-й мин холодового воздействия при системном введении АХ и НА, последний не повышает, а снижает ЧСС, а АХ не урежает, а учащает ЧСС. Очевидно, процессы, приводящие к повышению проницаемости ГЭБ для НА и АХ, разнесены во времени и пространстве. Физиологическая целесообразность этого процесса заключается в поддержке усиленного функционирования доминирующих нейротрансмиттерных процессов при охлаждении мозга поступающими из крови катехоламинами и влияющих на состояние гомеостаза.

При действии холода на организм теплокровных животных и человека всегда актуально изучение состояния нейрорегуляторных систем, ответственных за состояние гомеостаза. Эта проблема представляет большие трудности, так как связана с необходимостью одновременного изучения множества структурно-функциональных изменений, приводящих к повышению или снижению активности ГЭБ [130, 144-147], сверхмедленной управляющей системы мозга. Важным посредником, определяющим физиологические процессы в клетках и тканях, является оксид азота. В ССС оксид азота является важным компонентом, влияющим на расслабление сосудов, а в мозге - играет роль посредника, обеспечивающего многие нейротрансмиттерные процессы. Оксид азота – один из факторов нейрональной пластичности, обеспечивающий, в том числе, и состояние терморегуляторных функций

ГЭБ. Неспецифическая активация функциональных систем организма, которая наблюдается при действии холода на организм, сопровождается стимуляцией синтеза оксида азота [16], способствующего изменению ультраструктуры эндотелиоцитов, облегчая процессы эндоцитоза.

После 2 часов РХВ и внутрибрюшинного введения НА у животных происходит плавное снижение ЧСС, начиная с 30-40 мин и к 120 мин составляет от исходной 70 %. В то же время, у всех животных, которым не применяли РХВ, в 100 % случаев наблюдалось учащение сердечных сокращений. РХВ, являясь сенсорным раздражителем, обуславливает активное воздействие на центры терморегуляции [17]. Возможно, РХВ возбуждает лимбико-гипоталамические структуры мозга. Все большее число повторяющихся воздействий активирует синапсы, создавая на постсинаптических мембранах состояние деполяризации. Очевидно, частота холодových воздействий, соответствующая секунднему эндогенному ритму, оказывает резонансный эффект на проницаемость ГЭБ. Синергизм активности ряда функциональных систем создает определенное состояние мозга, отражающее активность сверхмедленной управляющей системы мозга, влияющей на центры терморегуляции, которые повышают холодovou устойчивость организма, и формирует специализированную функциональную систему после окончания действия РХВ – «вегетативную терморегуляторную память».

Экспериментально доказано, что в отличие от традиционного метода КЦГ, когда на фоне блокады центров терморегуляции снижается температура тела (32 °С), метод РХВ не приводит к изменению температуры тела более, чем на 1-2 °С, вызывает изменения проницаемости ГЭБ с первых минут воздействия. Метод РХВ не требует нейровегетативной блокады и медикаментозного торможения терморегуляторных реакций.

Анализ работ, посвященных влиянию РХВ на организм животных, показывает, что важная роль при этом принадлежит функциональной системе ГЭБ, от уровня проницаемости которой зависят адаптивные реакции сердечно-сосудистой и центральной нервной систем на действие стрессоров раз-

личной модальности и интенсивности. Установлена триггерная роль повышенной проницаемости ГЭБ для нейромедиаторов, в свою очередь, функция ГЭБ зависит от адаптивных реакций сердечно-сосудистой и иммунной систем и подконтрольна им. РХВ существенно изменяет взаимоотношения центральных и периферических контуров регуляции сердечной деятельности, при этом изменяется знак хронотропного эффекта катехоламинов и АХ, нормализуется симпато-парасимпатические влияния, что является важным фактором, позволяющим восстанавливать физиологическую ритмику функционирования ГЭБ и нарушенный гомеостаз.

1.2. Этапы становления криотерапии как метода кратковременного воздействия экстремально низких температур на организм человека

Около 100 лет тому назад было замечено, что охлаждение тканей с помощью орошения хлорэтилом вызывает обезболивание. При охлаждении в организме формируется дефицит тепла, приводящий вначале к понижению температуры кожи, а затем и внутренних органов. В связи с сужением кровяных сосудов кожа бледнеет, одновременно идет «отток» крови к органам «ядра» тела, где температура может повышаться. В связи с этим при обливании холодной водой или растирании кожи снегом, особенно после парной, на фоне сужения сосудов кожи у человека появляется ощущение прилива тепла. В этих условиях осуществляется своеобразный массаж сосудов, а сердце способно снижать или увеличивать свою мощность в 6-8 раз в зависимости от действия температуры. Реакции организма на действие холода соподчинены закону количественной зависимости величины раздражения температурных рецепторов тела и ответной реакции организма. Однако при очень значительных воздействиях низких температур возникает эффект запредельного торможения по И.П.Павлову.

Так, при чрезмерных купаниях в холодной воде у людей появляется озноб, отдышка, учащенное сердцебиение, головокружение, потеря сознания.

Холод, в зависимости от цели его применения и состояния организма, может оказывать специфическое и неспецифическое воздействие. При лечебном воздействии изменения в организме направлены на получение полезного физиологического результата, обеспечивающего экономное функционирование организма.

До настоящего времени не существует единого общепринятого определения термина «криотерапия». В научных источниках чаще всего встречаются термины аэрокриотерапия (АКТ), экстремальные холодовые воздействия, криотерапия, ритмические холодовые воздействия. Однако, в основе всех этих понятий лежит использование низких температур от -100°C до -180°C для кратковременного охлаждения тканей, органов и всего организма в целом с целью активации специфических и неспецифических систем адаптации, направленных на повышение устойчивости гомеостаза. В этих условиях терморегуляторные механизмы организма обеспечивают температурный гомеостаз, включающий систему интер- и экстерорецепторов, управляющую систему гипоталамуса как главного интегратора, определяющего функцию эндокринной и вегетативной нервной систем.

Криотерапия как метод лечебного воздействия сверхнизких температур на организм человека впервые был представлен японским врачом Тосимо Ямаучи в 70-е годы прошлого столетия на Международном ревматологическом конгрессе в Висбадене. Им доложены результаты успешного лечения ревматоидных полиартритов в специальной воздушной криокамере с температурой $-160 - -180^{\circ}\text{C}$. Спустя несколько лет Т.Ямаучи посетил Харьковский Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, где представил комплекс методик реабилитации заболеваний опорно-двигательного аппарата, которые были им разработаны и применены в специализированной клинике на острове Кюсю. Предложенный Т.Ямаучи цикл лечения ревматоидных полиартритов состоит из 2-х фаз. На первом этапе с помощью холода у пациентов снимаются боли и улучшается двигательная активность суставов, особенно это важно для лиц с запущенными формами заболевания. Эта

процедура осуществляется в специальном боксе-криокамере, где температура воздуха достигает -160°C . Пациент находится в камере не более 2-3 минут. После охлаждения пациент с помощью специальной аппаратуры разрабатывает подвижность в суставах конечностей. Специально созданные механизмы способствуют этому этапу лечения.

После воздействия холода на тело человека происходят благоприятные изменения в крови и суставной жидкости. По его мнению, холод побуждает организм к выработке «антиревматических» гормонов. По его словам, люди, прикованные годами к постели, уже через неделю начинают самостоятельно передвигаться, в то время, как ни один из существующих методов терапии не оказывает такой лечебный эффект. Получившие криотерапию пациенты не нуждались в последующем хирургическом вмешательстве.

Недостаточная медицинская изученность проблемы, отсутствие фундаментальных исследований, не подтвержденные выводы о выработке «антиревматического парагормонального криофактора» в ответ на действие сверхнизких температур, некорректность статистики и спорность ряда положений и выводов по клиническим результатам затормозило широкомасштабное внедрение представленной им методики в практическое здравоохранение. Следует отметить, что во время посещения академического института, Т.Ямаучи была продемонстрирована установка для экспериментального исследования действия сверхнизких температур на организм мелких лабораторных животных с программным обеспечением, на которой в то время учеными института уже проводились фундаментальные исследования по изучению влияния низких температур на организм животных.

Ради справедливости необходимо отметить, что представляемые им методические приемы и результаты по восстановлению ограниченной функции суставов, лечению дегенеративно-воспалительных процессов не имели аналогов. Изготовленные для этих целей криокамеры, локальные холодовые водные процедуры, позволили ему успешно решать поставленные задачи. Спустя несколько лет профессором Р.Фрике (Германия) был создан клиниче-

ский модуль – криокамера и аппарат для локальной АКТ, которые успешно применены в медицинской практике. Наряду с традиционными хладоносителями (вода, лед, хлорэтил, солевые и гелевые криопакеты), появились газовые носители сверхнизких температур, представляющие собой сжиженные газы: азот, гелий, кислород, аргон и др., что предопределило возросший интерес медиков и конструкторов к созданию охлаждающих устройств и разработке показаний к их применению. Однако, в появившихся «аэрокриотехнологиях», где заинтересованность коммерческих медицинских соисполнителей и конструкторских разработчиков слились в единую цель – быстрее применение с получением коммерческой прибыли, ничего хорошего пациентам не сулили. Появилось множество необоснованных иллюзий сторонников прикладной криомедицины, которые свои выводы о лечебном эффекте основывают на принципах суггестии, таинственных миражах и выводах, основанных на субъективных ощущениях пациентов, которые в ряде случаев не подтверждены достоверными результатами. Это способствовало тому, что практическое применение метода значительно опережало обоснование показаний и противопоказаний. Появились разработки криоустановок и был налажен их промышленный выпуск, таких, как «Крио-Спейс» фирмы «Медицинкриотехник» (Германия), «КАЭКТ -01-Крион» НПО «Крион» (Россия) [10, 11], «Криосауна» ОАО «Холод» (Украина) и др. В настоящее время метод АКТ как физиотерапевтическая методика получил широкое распространение в Японии, Германии, Польше, России и, в меньшей степени, в Украине.

Экстремальная криотерапия, как специфическая стресс-модулирующая технология, предполагает воздействие на человека экстремально низких температур ($-100\text{ }^{\circ}\text{C}$) с экспозицией 2-3 минуты. При этом в организме отмечаются краткосрочные активации адаптивных реакций, приводящих к усилению вегетативных, эндокринных и иммунных реакций.

Данные экспериментальных работ [12, 15-17, 145, 146, 150, 151] указывают на то, что кратковременное холодовое воздействие приводит к замедлению кислородного метаболизма, процессов окислительного фосфорилирова-

ния глюкозы в покровных тканях, снижению потребления клетками кислорода и питательных веществ, трансмембранного транспорта клеточных метаболитов. Эти изменения носят обратимый характер и развиваются в тканях «оболочки» тела в результате непосредственного действия холодового фактора. Явления, развивающиеся в глубоко расположенных тканях «ядра» тела, не связаны с прямым влиянием холодового раздражителя и имеют вторичное рефлекторное нейрогуморальное происхождение. В тоже время АКТ вызывает периодические изменения функционального состояния гистогематических барьеров (кровь – ткань), в том числе – гематоэнцефалического, а, следовательно, мозга и всего организма. Эти изменения необходимы для реализации процессов адаптации, участия в терморегуляторных реакциях всех систем организма, а также в общих механизмах поддержания гомеостаза. Для ГЭБ характерны изменения проницаемости только для тех веществ, которые физиологически необходимы мозгу.

Экстремальное криовоздействие приводит к развитию компенсаторно-адаптационных реакций, направленных на повышение интенсивности метаболических внутриклеточных репаративных процессов, что подтверждается увеличением количества рибосом, полисом и липосом в цитоплазме исследуемых клеток. Метод АКТ направлен, прежде всего, на активацию собственных гомеостатических регуляторных систем. Лечебные эффекты, которые наблюдаются при АКТ, могут быть связаны с тем, что организм реагирует на влияние холода не только системой терморегуляции, но и всеми возможными адаптационными механизмами, включая гипоталамо-гипофизарно-адреналовую, иммунную и эндокринную системы. Проведенные клинические исследования действия ЭК и оценка объективных данных функциональных исследований дают основания утверждать, что используемые при АКТ параметры холодового воздействия на организм не вызывают перенапряжения центральных механизмов терморегуляции. Напротив, общая АКТ оказывает на них тренирующее действие.

Из многовековой практики народной медицины и новейшего опыта применения криотерапии хорошо известны факты дозированного охлаждения на организм человека в норме и патологии. К числу наиболее очевидных положительных эффектов относятся общетренирующий (закаливающий) эффект, обезболивающий, противовоспалительный, сосудорасширяющий и миорелаксирующий.

Общетренирующий (закаливающий) эффект АКТ основан, прежде всего, на возникающей перестройке деятельности сердечно-сосудистой, нервной и нейроэндокринной систем. АКТ приводит к выраженным изменениям деятельности периферических сосудов, которые проявляются спазмом мелких артерий и артериол, прекапиллярных сфинктеров, замедлением скорости кровотока. Терапевтически значимое сужение сосудов кожи отмечается при воздействии температуры -60 - -120 °C в течение 2 минут. При этом происходит быстрое снижение температуры кожи на поверхности [152].

Сужение кожных сосудов является 1-й защитной фазой сосудистой реакции на экстремальное охлаждение, направленной на предотвращение проникновения холодового фактора через покровы (оболочку) тела к внутренним тканям (ядру) тела. Затем развивается 2-я защитная фаза сосудистой реакции в виде выраженного расширения периферических артериальных сосудов, что приводит к активной артериальной гиперемии, продолжительность которой варьирует от 1 до 30 минут, в зависимости от активности охлаждения. Вторая сосудистая фаза является компенсаторной, способствует усиленному теплообразованию, препятствует ишемии и нарушению питания тканей. Визуально последствия криотерапии проявляются изменением цвета кожных покровов после процедуры в виде разлитой, яркой и устойчивой эритемы. Системное расширение покровных сосудов стимулирует работу аппарата кровообращения, улучшает питание и оксигенацию всех тканей организма, снижает гемодинамическую нагрузку на сердечную мышцу. Наряду с изменениями артериального и капиллярного кровообращения АКТ дает уме-

ренное улучшение венозного оттока и при терапевтических экспозициях не приводит к явлениям застоя венозной крови.

Фазовость сосудистой реакции организма на охлаждение при АКТ может быть сложной, включая многократно перемежающиеся фазы сужения и расширения сосудов в зависимости от индивидуальной реактивности организма. Реакция сосудов глубоко расположенных органов и тканей на экстремальный холодовой раздражитель менее выражена, чем реакция сосудов кожи. Процедуры общей АКТ приводят к усилению кровоснабжения внутренних органов, что связано, предположительно, с образованием вазоактивных веществ.

АКТ не вызывает заметных изменений центральной гемодинамики, практически не влияет на деятельность сердца, не провоцирует развития ишемии миокарда, нарушений сердечного ритма и проводимости, не вызывает существенного повышения АД в процессе процедуры. Это позволяет допускать к процедурам пациентов с сопутствующими сердечно-сосудистыми заболеваниями в начальных стадиях, а также пациентов пожилого и старческого возраста. Длительное расширение сосудов кожи во 2-й фазе сосудистой реакции, возникающее после процедуры, вызывает снижение общего периферического сосудистого сопротивления и, таким образом, уменьшает нагрузку на сердце, что является благоприятным фактором для больных кардиологического профиля.

Экстремальный холодовой раздражитель активно воздействует на состояние периферической нервной и мышечной систем. Эффекты общей АКТ связаны с изменением состояния рецепторов кожи и снижением тонуса поперечно-полосатых мышц, снятием мышечных спазмов. Воздействие холода на рецепторы кожи вызывают кратковременную первичную фазу возбуждения с последующим нарастающим торможением, что субъективно проявляется ощущениями холода и жжения в начале процедуры и анальгезией в конце. Развитие холодовой анестезии кожных рецепторов является частичным объяснением обезболивающего действия АКТ. Обратимые изменения функцио-

нального состояния рецепторов кожи является одним из факторов, лежащих в основе общетренирующего профилактического воздействия метода.

Общая АКТ приводит к снижению тонуса поперечно-полосатых мышц. Поскольку кратковременное воздействие охлажденного воздуха не вызывает существенного снижения температуры мышц и нервных стволов, очевидно, что миорелаксирующий эффект АКТ опосредован рефлекторно через экстерорецепторный аппарат кожи в мотонейрональную систему. Охлаждения кожи вполне достаточно для минимизации функциональной активности рецепторов кожи и моторной реакции. Это обеспечивает миорелаксацию и снятие спазмов мышц. Влияние АКТ на тонус мышц способствует усилению висцерального кровообращения и купированию болей при заболеваниях опорно-двигательного аппарата и периферической нервной системы.

К числу наиболее важных аспектов физиологического действия АКТ относится, прежде всего, выраженное обезболивающее действие генерализованного характера, обязанное своим происхождением холодовой анестезии рецепторов и стимуляции выработки эндорфинов, противовоспалительному и противоревматическому действию, связанному с увеличением уровня кортикостероидов, интенсивному сосудорасширяющему и миорелаксирующему эффектам.

Первый и наиболее ценный результат от применения АКТ был получен Т.Ямаучи при лечении ревматических полиартритов [8, 153]. Как опытный врач, он и его сотрудники, обратили внимание, что при локальном охлаждении суставов наступает обезболивающий эффект. Японские ревматологи провели ряд исследований в поисках метода, позволяющего максимально снизить температуру для достижения выраженного анальгезирующего эффекта и избежать отморожений кожных покровов. На первом этапе при помощи охлажденного газа обдували струей отдельные больные суставы. Ими было установлено, что, чем большая площадь тела охлаждается струей газа, тем сильнее лечебный эффект. Спустя время, по мере накопления опыта возникла идея непродолжительного тотального охлаждения в специально скон-

струированной камере. Достигнутые положительные результаты в лечении пациентов с ревматоидными полиартритами – результат сочетанного применения температур ($-160\text{ }^{\circ}\text{C}$) в криокамере и специальных методик ЛФК до 8-10 ч. в сутки. Следует отметить, что даже в Японии достижения Т.Ямаучи и его сотрудников были восприняты неоднозначно, а полученные результаты в ряде случаев подвергались сомнению и критике. Особенно негативное отношение к методу лечения ревматоидных полиартритов с помощью криотерапии было высказано учеными-медиками из России после посещения клиники, где работал Т.Ямаучи, что на годы затормозило энтузиазм медиков и ученых в поисках обоснования и применения криотерапии как эффективного физиотерапевтического метода для лечения ряда заболеваний.

Обобщив свои результаты, используя огромный статистический материал, Т.Ямаучи сделал доклад на конгрессе ревматологов в 1992 г., который произвел сенсацию среди ряда специалистов, так как открывал новый путь эффективного лечения заболеваний опорно-двигательного аппарата. Несмотря на критику метода ревматологами специалистами, придерживающимися традиционных взглядов на методологию лечения, нашлось много энтузиастов, пожелавших внедрить данный метод в специализированных центрах стран Европы. Следует вспомнить, что одним из научных центров, который в 80-х годах посетил Т.Ямаучи и его сотрудники, была Академия наук Украины. В частности, японские медики посетили Институт низких температур и Институт проблем криобиологии и криомедицины НАНУ г. Харькова, где на научном форуме доложили о своих результатах и возможном научном сотрудничестве. Украинскими учеными, как и Т.Ямаучи, был выбран азотный вариант создания устройства для охлаждения организма человека и животных.

В СКТБ ИПКиК НАН Украины был создан азотный вариант гипотерма с программным управлением для модуляции охлаждения в соответствии с собственными сверхмедленными биоритмами мозга. Для реализации и внедрения результатов был заключен договор между ИПКиК НАН Украины и Ин-

ституте биофизики (г. Москва). Многочисленные совместные научные семинары привели к выработке медико-технических требований на устройство для охлаждения организма человека, однако отсутствие финансирования замедлило выполнение работ, а в связи с распадом СССР они полностью прекратились. Невзирая на достигнутые результаты и высокую заинтересованность ряда государств в развитии и внедрении криотерапии в медицину, применение японской технологии по ряду причин осталось не востребованным. В Европе начался поиск альтернативных путей технических и медицинских решений задачи.

Значительных успехов в разработке стационарных устройств для криотерапии добились в сотрудничестве с медиками инженеры фирмы “Cryo medisntechnik” (Германия). Сконструированное ими устройство «Крио Спейс» представляет собой двухкамерную кабину с разными температурами. В первой камере температура воздуха $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, а во второй - $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$. Установка оснащена несколькими системами безопасности. В процессе процедуры через смотровое окно и компьютер за пациентом ведется наблюдение. При необходимости пациент может покинуть камеру в любой момент. По предложенной методике в первой камере с температурой воздуха $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ пациент должен находиться 10-15 сек., во второй ($-120\text{ }^{\circ}\text{C}$) – 2 минуты. В последующих процедурах время пребывания пациента в камере может увеличиваться до 3 минут. Время пребывания в камере устанавливается индивидуально. Процедура охлаждения проводится 1 раз в день в течение 5 дней с интервалом между процедурами 2 дня. Курс лечения может быть продлен до 15 процедур. Непосредственно перед процедурой пациенту измеряется ЧСС, АД, проводится инструктаж [9, 151, 154-158].

Большого успеха в разработке оригинальных технических устройств для криотерапии добились Санкт-Петербургская и Московская группы российских ученых и инженеров-конструкторов. На этот период их установки наиболее предпочтительные в оценке «цена-качество». Благодаря им разработки криокамер в России по своим техническим и конструкторским реше-

ниям не имеют аналогов и нашли широкомасштабное применение в различных странах мира [10, 11]. По их убеждению, АКТ является стресс-провоцирующей технологией, которая должна реализовываться на уровне экстремально низких для человека температурах, что дает возможность сократить экспозицию и вызвать максимальную амплитуду реакции стресс-лимитирующих систем и достижение минимального градиента температур по всей высоте рабочей камеры. По мнению авторов, в их криокамерах достигается оптимальный спектр терапевтических эффектов от действия холода на организм: обезболивающий, противовоспалительный, противоотечный, релаксирующий, репаративный, что обуславливает применение методики как патогенетического лечения при обширном круге заболеваний.

По данным [159], показания к применению криотерапии весьма широки и практически метод не имеет противопоказаний. Лечению подлежат пациенты с проявлениями недостаточности иммунной реактивности, а также с различными патологическими кожными процессами, извращенными вегетативными реакциями, хроническими интоксикациями, при остеохондрозе, ожирении и др. У адаптированных к холоду пациентов время пребывания в криокамере приближается к 3 мин, курс 7-10 процедур, затем повторно 1 раз в неделю и, в последующем, – 1 раз в месяц. По мнению авторов, криопроцедуры являются отличным средством регулярной личной гигиены и профилактической медицины.

По своему характеру ощущение от процедуры напоминает обтирание снегом, купание в проруби, но физиотерапевтический эффект от посещения криокамеры в несколько раз выше, поэтому она становится доминирующей лечебной технологией в любых клинических, реабилитационных и общеоздоровительных программах. Наиболее выраженный терапевтический эффект от применения общей АКТ проявляется при $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ и ниже, поэтому создаваемая в разных странах аппаратура должна иметь такие температурные характеристики [12, 150].

Экспериментальное охлаждение больных в течение 1-3 минут в криокамере вызывает цепь защитных реакций, которые проявляются вегетососудистыми изменениями, связанными с активацией надпочечниковой системы.

Благоприятный эффект от применения криотерапии при заболеваниях опорно-двигательного аппарата обусловлен активацией функции передней доли гипофиза. Установлено, что уровень кортизола в сыворотке крови после холодовых процедур снижался, повышалось содержание НА и не изменялся уровень адреналина, пролактина и соматотропного гормона.

Не исключено, что АКТ способствует выработке морфиноподобных веществ - опиоидов, в частности, эндорфинов [158].

Общая криотерапия способна изменять обмен веществ. Установлено [160], что спустя 3 часа после 3-х минутного пребывания в криокамере при температуре -110°C у больных с полиартритом отмечалось повышение сахара в крови, мочевой кислоты, холестерина, триглицеридов, снижение уровня свободных жирных кислот. Уровень насыщения крови кислородом повышался и уменьшалось количество CO_2 . Неотъемлемым условием охлаждения пациентов в криокамере является сухой воздух, что дает возможность избежать отморожений поверхностных тканей тела и дыхательных путей. При таком охлаждении температура организма может понизиться на $0,5^{\circ}\text{C}$ от нормы. Кратковременного (1-2 мин) пребывания пациента в криокамере достаточно, чтобы вызвать комплекс биохимических реакций, в результате чего уже через 0,5 мин больные ощутили уменьшение интенсивности боли в позвоночнике, суставах или мышцах. Больные с заболеваниями позвоночника и суставов, покидая криокамеру, не ощущали боли, эффект длился до 6 часов. Характерным для них было ощущение теплоты во всем теле, спокойный сон. После серии криопроцедур больные с заболеваниями суставов отмечали увеличение объема движений в суставах, уменьшение спонтанных и двигательных болевых реакций. 70% пациентов существенно снизили применение медикаментозных средств. При лечении болезни Бехтерева ряд больных вообще отказались от применения медикаментов. У них увеличился дыхательный

объем, повысилась кислородная емкость крови на фоне снижения уровня CO_2 . Существенное улучшение состояния после курса криотерапии было отмечено у больных с нейродермитом и псориазом [9, 151, 158, 161, 162].

В 70-90-х годах прошлого столетия работами ученых из разных стран было установлено, что общая криотерапия не изменяет существенно показатели гемодинамики. При применении АКТ не нарушается сердечный ритм, АД не повышается более, чем на 10 мм рт.ст., но при гипертонической болезни может повышаться более существенно. Показатели ЭКГ, как правило, не изменяются, в том числе и у лиц, страдающих кардиосклерозом, миокардитом.

В то же время АКТ в условиях эксперимента и клиники по данным ряда авторов сопровождалась сужением капилляров и артерий кожи при воздействии температур -170°C , а температура поверхностных слоев кожи понижалась до $8-10^\circ\text{C}$. После сеанса криотерапии сосуды кожи продолжали сужаться в течение 30 минут наблюдения. Вторая защитная реакция расширения кровеносных сосудов кожи начинает проявляться спустя 1-3 часа после криотерапии. Реакция сосудов подкожной жировой клетчатки, суставных капсул, мышечной ткани мало изучены, однако, существуют данные, что она менее выражена. При проведении общей процедуры АКТ обнаруживается кратковременное увеличение общего числа клеток крови, которое нормализуется спустя 3 часа.

Противовоспалительный эффект АКТ коррелирует с обезболивающим действием холода. У больных ревматоидным артритом криотерапия уменьшала порог болевых ощущений в среднем на 50,6 %, что связано с блокированием болевых рецепторов кожи, нормализацией возбудимости нейронов спинного мозга, выделением опиоидов, в результате чего разрывается порочный круг «боль - мышечный спазм - боль». Реакция нервно-мышечных структур на низкотемпературное воздействие имеет фазовый характер, в основе которого лежат явления деполяризации, замедление проводимости

нервного импульса по демиелизированным волокнам, уменьшением эффекта растяжения [9, 12, 151, 158].

Впервые в Германии в 1984 г. врач профессор Р.Фрике создал установку для локальной АКТ, которая успешно функционирует в настоящий момент в странах Западной Европы. Считается, что для закрепления эффекта процедуры АКТ целесообразно повторять с интервалом 5-6 часов. У больных с ревматоидным полиартритом наряду с уменьшением боли отмечали достоверное улучшение функций суставов, общего самочувствия. При развившемся дегенеративном процессе в суставах, поражениях хряща, связок, суставной жидкости, выраженном остеопорозе необходимо применение ЛФК, а также применять все необходимые меры для лечения хронического тонзиллита, фарингита, других изменений лимфоидных тканей.

До настоящего времени проблемы, связанные с медикаментозным лечением бронхиальной астмы, остаются нерешенными. По мнению [163-165], одним из наиболее перспективных методов лечения астмы является АКТ – кратковременные воздействия на кожные покровы пациента температур от -120 °С до -170 °С при длительности процедуры более 30 секунд.

При таких воздействиях наступает кратковременный спазм поверхностных сосудов с последующей гиперемией и компенсаторным повышением температуры кожных покровов, длящихся до 3-х часов. В этот период уменьшается инфильтрация тканей, отмечается стойкое торможение иммунного ответа наряду с активацией пролиферации и репаративной регенерации. На фоне уменьшения клинических признаков воспаления замедляется дифференцировка Т-лимфоцитов, увеличивается скорость миграции лейкоцитов, разрушаются иммуноглобулины. Изменения сосудистого тонуса способствуют повышению сократительной способности миокарда, снижению АД, повышают кровенаполнение органов и тканей, синтез гормонов, усиливают метаболизм. Также усиливается функция внешнего дыхания, восстанавливается нормальная структура сна. Эта симптоматическая и патогенетическая направленность метода АКТ позволила установить высокую лечебную эф-

фективность в терапии больных бронхиальной астмой. Было обследовано 89 больных бронхиальной астмой, 65 из них получили в комплексе лечение АКТ. Продолжительность проводимых процедур составляли 30 сек., курсом 8-10 процедур. Температура в камере составляла от -130 °С [163-165].

В результате курса АКТ у больных прекратился кашель, мокрота к концу лечения отсутствовала у 52% больных, у остальных снижалась ее вязкость, уменьшились или прекратились сухие хрипы в легких.

Под действие АКТ отмечено значительное снижение бронхоспазма. Существенно уменьшилось количество пациентов с преобладанием симпатических влияний, возрастало с 58 до 74 % число больных с нормотонией.

В процессе процедур АКТ произошла коррекция вегетативного тонуса к концу курса лечения с преобладанием парасимпатической иннервации, перехода ваготонии в симпатикотонию не произошло, что свидетельствует о вегетокорректирующем эффекте АКТ. Холодовые процедуры уменьшали продукцию интерлейкина-4 (ИЛ-4) клетками, находящимися в тканях, что обуславливало снижение сывороточного ИЛ-4, наблюдали выраженное действие холода на реакции естественного иммунитета, было обнаружено повышение НК-клеток, осуществляющих защиту от внутриклеточных инфекционных агентов.

Проведенные исследования позволили авторам утверждать, что АКТ оказывает выраженное воздействие на основные патогенетические звенья механизмов воспалительного процесса бронхообструктивного синдрома, позволившего существенно улучшить дренажную функцию легких и течение заболевания.

Аэрокриотерапия – один из наиболее эффективных методов лечения и реабилитации спортивных травм. Это, прежде всего, связано с выраженной эффективностью, безвредностью и незначительными материальными затратами на восстановительную терапию. Установлено, что АКТ обладает болеутоляющим эффектом, уменьшает воспалительный отек, снимает мышечный спазм, оказывает антигипоксическое, гемостатическое и репаративное влия-

ние. Результат воздействия холодом зависит от количества и скорости ответного тепла, а также от реактивности организма, которая компенсирует вызванные действием низких температур изменения в организме. При локальном охлаждении мышечной ткани активность мышечных веретен и сократительной способности мышц снижается, увеличивается вязкость синовиальной жидкости. При общей АКТ процессы сопряжения дыхания и окислительного фосфорилирования в скелетной мышце усиливаются. При улучшении системной реакции ССС в ответ на действие АКТ было показано, что АД повышается на 10 мм рт.ст. После однократной процедуры АКТ ЧСС не изменяется. Одним из наиболее ценных свойств АКТ является возможность регулирования мышечного тонуса, при этом возрастает сила и выносливость мышц. АКТ оказалась эффективной при травмах в коленном суставе, явлениях реактивного синовита, вторичных изменениях периартикулярных тканей [166].

Использование АКТ как наиболее эффективного метода обезболивания в спорте с целью подавления болевой реакции стало традиционным. В арсенале медицинского обеспечения лечения травм и связанных со спортом профессиональных заболеваний АКТ как физиотерапевтическому методу отводится важная роль. Показано, что понижение температуры газа от -100°C до -130°C в 10 раз увеличивает время анальгезирующего эффекта [12, 166]. По данным авторов важным является площадь контакта поверхностей тела с криогенным газом. Увеличение площади холодового раздражения температурных рецепторов качественно изменяет реакцию организма, поэтому общая криотерапия значительно эффективнее локальной. Общепризнанный факт способности АКТ купировать на 6-8 часов любые болевые реакции делает метод чрезвычайно перспективным в спортивной травматологии.

Вместе с тем, общую криотерапию не используют для быстрого снятия болевого синдрома вместо хлорэтила, так как после общего охлаждения спортсмены не могут участвовать в соревнованиях в связи со снижением индивидуальных физических показателей.

Было изучено стимулирующее действие общей АКТ у 20 мужчин возраста 19-20 лет, методом измерения скорости реакции на цветной раздражитель на компьютере. Все испытуемые после контрольного теста проходили процедуру в криосауне с температурой -140°C . После процедуры испытуемые проходили повторный тест, который повторялся через 30 мин. Статистическая обработка данных позволила построить диаграмму, в результате чего установлено, что применение АКТ выравнивало скорость реакции разных членов группы на цветной раздражитель и эффект сохранялся в течение 1,5 ч, после чего время реакции возвращалось в исходное состояние. Происходит тенденция не подъема, а спада физических показателей у части испытуемых, у которых до применения КТ были наилучшие показатели. Авторы полагают, что после криопроцедур и спринтер и стайер утратят свои отличия и не смогут показать даже обычных результатов. Следовательно, криотерапия не пригодна для предстартовой стимуляции [167].

А.Ю.Баранов и соавторы [12] утверждают, что при проведении АКТ в организме наступает процесс коррекции отклонений от физиологической нормы, обеспечивается выброс эндорфинов, нормализуются обменные процессы и функция иммунной системы, улучшается периферическое кровообращение, ускоряются регенеративные процессы.

Проводили оценку стимулирующего действия общей АКТ в эксперименте на 20 мужчинах-добровольцах. Испытуемые тестировались по скорости реакции на световые раздражители после нахождения в криокамере 2,5 мин при температуре газовой среды -140°C .

АКТ может сопровождаться незначительно выраженным окислительным стрессом, однако очень быстро активируется антиоксидантная система. Авторы не наблюдали существенных изменений со стороны иммунной системы, в то же время установлено уменьшение провоспалительных цитокинов. В то же время, при воспалительном процессе стабилизируется содержание лизосомальных ферментов. Со стороны функции сердечной мышцы не отмечено каких-либо изменений, в том числе и на уровне сократительных белков.

Криопроцедуры стимулировали функцию гипофизарно-надпочечниковой системы, что характерно для адаптации организма к незначительному стрессу. Авторы пришли к выводу, что криотерапия не противопоказана для спортсменов, так как не влечет за собой патологических изменений биохимических и гематологических параметров крови, но в ряде случаев полезна для реабилитации спортсменов [168].

Поэтому процедуры криотерапии наиболее целесообразно применять в спортивной травматологии, для улучшения функции иммунной системы с целью повышения жизненного тонуса, в реабилитации с целью уменьшения отеков, ограничения движений, блокирования болей, улучшения обменных процессов.

Систематическое применение АКТ – мощное профилактическое средство против инфекционных и простудных заболеваний, поддержка положительных психологических эмоций, средство для интенсификации тренировочного процесса [169, 170].

Как известно, остеохондроз позвоночника, сопровождающийся дегенеративно-дистрофическими повреждениями межпозвоночных дисков, часто становится причиной нетрудоспособности людей, а в ряде случаев и инвалидности. В основе этого заболевания лежат сосудисто-биохимические нарушения, которые приводят к недостаточности функции позвоночника. Одним из ведущих симптомов этой патологии есть болевой синдром, обусловленный повреждением связочного аппарата, дисков, дистрофических изменений и раздражений нервных корешков.

Ряд авторов, используя криотерапию [158, 169, 171], преследовали цель добиться расслабления спазмированных мышц, улучшения анатомических взаимоотношений в позвоночнике, повысить устойчивость позвоночника к динамическим нагрузкам.

У 160 больных от 23 до 78 лет наблюдали существенное нарушение движений. Как правило, пациенты носили корсеты и другие ортопедические приспособления с целью снижения нагрузки на позвоночник и мышцы спи-

ны, применяли медикаментозное лечение и физиотерапевтические методы противовоспалительной и миорелаксирующей направленности. Курс лечения методом АКТ составлял 15-20 процедур. В динамике лечения больные отмечали отсутствие негативных реакций на охлаждение. Пациенты отмечали уменьшение болей, увеличение объема движений. Улучшение состояния наступало сразу же после нескольких процедур. Существенно уменьшалась болевая реакция, вплоть до полного купирования болевого синдрома и деструктивных воспалительных реакций, увеличился объем движения в позвоночнике. Время полного купирования вертеброгенного болевого синдрома составило от 2 до 5 дней, а корешковых болей – 4-12 дней. Более чем у половины больных удалось частично снизить дозу и сократить длительность приема противовоспалительных лекарственных препаратов. У некоторых пациентов после комплексного лечения с применением АКТ появились признаки уменьшения степени протрузии межпозвоночного диска, ухудшения состояния не определяли ни в одном случае, как и возникновения каких-либо сопутствующих нарушений. Следовательно, метод криотерапии является одним из действенных и перспективных методов лечения и реабилитации у больных с дегенеративно-деструктивными заболеваниями позвоночника.

В работе [165] отмечается, что криотерапия всего тела не приводит к выраженному стрессу организма. Ежедневно от 40 до 60 пациентов с заболеваниями опорно-двигательного аппарата, кожи принимали лечение в криокамере при температуре воздуха -110°C . Пациенты заходили в холодовую камеру в масках, закрывали нос, надевали повязку на голову и перчатки, а также закрытые туфли. После проверки кровяного давления и разрешения врача, который находился за пультом управления для наблюдения за пациентом, больные входили в криокамеру в сопровождении ассистента. Процедура длилась до трех минут. Благодаря туману, который образуется в холодной камере в результате поступления тепла, воздух обволакивает пациентов, которые ходят по камере. Через 0,25-1 мин после выхода пациента из криокамеры

сильно стимулируется приток крови к коже, вызывая приятные комфортные ощущения.

Изучение влияния охлаждения в условиях криокамеры проводили на добровольцах-курсантах Военно-медицинской Академии [172]. По содержанию сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов определяли реакцию тренировки, активацию на воздействие холодового стресса. У пациентов после криопроцедур отмечено нарастание числа сегментоядерных нейтрофилов и уменьшение числа лимфоцитов в крови, так как в зимне-весенний сезон происходит ряд изменений в периферической крови у человека, которые характеризуются нарастанием сегментоядерных нейтрофилов. Авторы расценили эти изменения как адаптивную реакцию здоровых людей на сезон вирусных инфекций, так как подобранные пациенты были здоровыми. Установлено, что общая АКТ оказывает иммунокорректирующее и иммуномодулирующее действие. У пациентов до воздействия холодом активность естественных киллеров и бактерицидная активность лейкоцитов была меньше, чем после процедур. Отмечено также нормальное соотношение Т-хелперов, которые продуцируют ИЛ-2, влияющий на клеточный фагоцитоз, и ИЛ-4, стимулирующий В-лимфоциты.

Установлено, что процедуры АКТ снижают концентрацию кортизола в крови. Автор не наблюдал изменения концентрации глюкозы в крови. Двухминутное охлаждение при температуре воздуха в камере -100°C не повышало секрецию пролактина и соматотропного гормона, не было отмечено и повышено содержания НА [151], что, по мнению авторов, связано с активацией синапсов нервных окончаний кожи, которое индуцируется необходимостью усиления кровоснабжения. Наблюдалось незначительное, до 5-10 мм рт.ст., увеличение АД. После холодовых процедур отмечали повышение содержания кислорода как у больных, так и у контрольной группы пациентов, что связано с более глубоким дыханием и вдыханием большого количества молекул кислорода на литр воздуха при температуре -110°C .

Повышенное содержание кислорода в крови улучшает коронарный кровоток. После посещения криокамеры у пациентов с коронарными заболеваниями не отмечалось признаков стенокардии. Более того, экстрасистолы были значительно редуцированы, что свидетельствует об улучшении снабжения кислородом сердечной мышцы. Через 30 сек пациенты разных возрастных групп (в том числе дети от 6 месяцев и старики до 82 лет) испытывали блокаду болевых ощущений. Значительно увеличивалась подвижность суставов. Такой терапевтический эффект длился несколько часов. У пациентов с хроническим полиартритом или анкилозирующим спондилитом отмечено функциональное улучшение в работе всех суставов [173]. У пациентов количество лимфоцитов в периферической крови уменьшалось.

При хроническом ревматоидном полиартрите и болезни Бехтерева уменьшается количество Т-хелперных лимфоцитов [174, 175]. Это приводит к увеличению количества Т-супрессорных клеток, контролирующих Т-хелперные лимфоциты путем ингибирования их тканеразрушающей активности. Наблюдалось снижение ИЛ-2 и ИЛ-4, что может свидетельствовать об иммуномодулирующем воздействии криотерапии на организм. Кроме того был отмечен бронхоспазмолитический эффект при эмфизематозном бронхите и бронхиальной астме.

В работах [176, 177] 30 пациентов, занимающихся спортом, были распределены на 3 группы с последующим охлаждением в криокамере при температуре -110°C в течение 1 мин (1 группа), 2 мин (2 группа), 3 мин (3 группа). Определяли скорость сгибания в суставах, общее состояние и эффективность тренировки, активность мускулатуры нижних конечностей до и после криотерапии. Криотерапия всего организма при -110°C в течение 1-3 мин создает условия для активации мускулатуры. Самые оптимальные результаты были получены после пребывания в криокамере в течение 2 мин. Терапевтический эффект криотерапии всего организма можно объяснить улучшением кровоснабжения тканей, оптимизацией состояния микроциркуляторного русла, снабжения клеток и тканей кислородом. У пациентов с синдромом фиб-

ромиалгии наблюдали обезболивающий эффект как при экспериментальном определении болевого порога, так и при симптомах реальных болевых ощущений. У пациентов, имевших спортивные травмы, отмечено увеличение амплитуды движений в суставах. По данным [178, 179], терапевтический эффект от лечения в криокамере выражен в случае лечения фибромиалгии. Согласно результатам температура воздействия на уровне -65°C является достаточной для получения обезболивающего эффекта. Однако клинический результат более выражен в случае применения более низких температур (-110°C до -120°C). Снижение порога болевой чувствительности имело тесную корреляцию с состоянием вегетативных центров, которое контролируется ЦНС на уровне ретикулярной формации [180-182]. Полученные авторами результаты могут иметь огромное практическое значение в лечении синдрома фибромиалгии, которая сопровождается выраженными болевыми ощущениями и нарушениями общего состояния больных.

Изучая температурные ощущения и комфортность у женщин после криотерапии и плавания в ледяной воде [181, 183], было установлено, что применяемый холод (-110°C) является сильнейшим фактором воздействия на организм. Обследовали 20 женщин одинакового телосложения, возраста и физической активности. Продолжительность сеанса криотерапии составляла 2 мин, которые повторяли трижды в течение недели. Похожая частота сеансов использовалась и для купания в ледяной воде. Всех испытуемых опрашивали по поводу ощущения температуры и комфортности по стандартной шкале. После криотерапии 65% испытуемых отмечали ощущения как «нейтральные» или «слегка холодные». После купания в ледяной воде 81% испытуемых описывали ощущения температуры как «нейтральные» или «слегка холодные». Большинство испытуемых -98%, отметили комфортность сразу же после криотерапии, а в группе с купанием - 93% отметили как «комфортность» или «не совсем комфортность». Обе группы привыкали к ощущениям температуры и комфортности на ранних стадиях испытаний, но изменения были менее убедительные в группе с купанием из-за вариабельно-

сти температуры окружающей среды. В группе с криотерапией холодовые ощущения были менее интенсивными уже после второго сеанса.

Авторы сделали вывод, что здоровые женщины хорошо переносят повторные сеансы криотерапии и купания в холодной воде. При повторных коротких сеансах холодового стресса всего организма уже во время первого сеанса наступает привыкание к ощущениям температуры и комфорт.

В работах [184, 185] изучали клинико-патогенетические аспекты влияния экстремальной криотерапии на состояние дисфункциональных маточных кровотечений (ДМК). Исследование выполнено на основании обследования 123 женщин, которые были разделены на контрольную группу и группы, подвергнутые применению в комплексе лечения криотерапии. Охлаждение больных проводили в криокамере с температурой от -60 до -120 °С, продолжительность процедуры от 90 до 300 сек. Были изучены показатели гормонального статуса у женщин репродуктивного возраста, имеющих нарушения менструального цикла в виде ДМК. У всех пациенток отмечал и дисбаланс в содержании основных гормонов, которые отвечают за регуляцию менструального цикла: уменьшение уровня фолликулостимулирующего (ФСГ) и лютеинизирующего (ЛГ) гормонов и их соотношения, что свидетельствует об угнетении функции системы гипофиз-надпочечники-яичники. Достоверно увеличивалось у больных содержание гистамина, дофамина и адреналина по сравнению с контролем. У больных увеличивалась активность ПОЛ и снижалась активность антиоксидантной системы. Применение криотерапии в комплексном лечении ДМК привело к нормализации содержания катехоламинов, особенно дофамин, который принимает непосредственное участие в продукции гормонов гипофиза. У 70% женщин восстанавливался менструальный цикл, а через 3 месяца - у 93,3%. Рецидивы после года наблюдения отмечены у 13,3% пациенток. По утверждению авторов, метод приводит к выраженному клиническому эффекту, нормализации гормонального и катехоламинового статуса, улучшению состояния гомеостаза.

Исследовано влияние криотерапии у 23 пациентов от 37 до 70 лет на состояние психики и перепады настроения с целью создания метода лечения депрессии [186, 187]. Пациенты получали по 10 процедур длительностью 160 сек. при температуре воздуха в камере -150°C на протяжении 2-х недель. Все пациенты посещали дневной стационар. На период прохождения криопроцедур медикаментозное лечение антидепрессантами не прекращалось. Состояние пациентов оценивалось в начале и в конце воздействия холодových процедур при помощи общепринятой шкалы оценки депрессии Гамильтона.

Были проанализированы изменения в баллах для каждого пациента по пунктам шкалы, а также всех пациентов вместе. После статистического анализа общий балл оценки депрессии был значительно ниже после проведения криотерапии. Это означало, что на все симптомы депрессии Гамильтона, в том числе и круглосуточных перепадов настроения, АКТ оказывала выраженный лечебный эффект. Таким образом, у каждого пациента было улучшение состояния организма после применения криотерапии по сравнению с исходным состоянием. Проведенные исследования дают авторам основание предположить, что криотерапия организма помогает снять симптомы депрессии и может быть вспомогательным методом в комплексной терапии этого заболевания.

Психоэмоциональный аспект синдрома хронической усталости исследовали у 20 пациентов в возрасте от 20 до 50 лет, занятых в производственной сфере деятельности, характер которой требует повышенной умственной и психологической нагрузки. Основными жалобами были снижение работоспособности, утомляемость, сонливость, депрессия без связи с какой-либо причиной. У всех пациентов исключены обострения хронической патологии. Криотерапию пациентам осуществляли в камере при температуре -130 , -160°C продолжительностью 90-180 сек. Результаты психологического тестирования по Спенбергу выявили средний уровень тревожности и ситуационной и личностной.

После сеансов криотерапии показатели возросли до нормальных, характерных для отдохнувшего человека. В частности, показатель ситуационной тревожности снизился с $43,3 \pm 1,9$ до $27,3 \pm 1,3$ баллов, что свидетельствует об улучшении общего и психоэмоционального состояния пациентов, восстанавливалась работоспособность [188].

В работе [189] использовали криотерапию всего организма для облегчения боли и снятия воспаления при ревматических заболеваниях. В сравнении с криотерапией организма при использовании криокамеры предлагается новый вид криотерапии всего организма – криострим (криопоток) для достижения быстрого терапевтического эффекта. Исследовали эффект криотерапии всего организма и криострима на снижение болевых ощущений, содержания провоспалительных цитокинов (фактор некроза опухоли – альфа и интерлейкин-1), а также улучшение функциональных показателей, поврежденных суставов.

Для этих целей обследовали 10 пациентов с различными воспалительными ревматоидными заболеваниями (4 с ревматоидным артритом, 3 с анкилозным спондилитом и 3 с псориазным артритом/спондилитом). Проведено 9 сеансов криотерапии всего организма в течение 5 дней. Длительность процедур от 90 сек. до 2, 5 мин с удлинением воздействия холода. У больных после лечения значительно снизились показатели болевых ощущений и остроты заболевания, улучшились функциональные показатели поврежденных суставов. Авторы отметили достоверное снижение провоспалительных интерлейкинов. Побочные эффекты отмечены только после первого применения у двух пациентов (головная боль и чувство холода).

Авторы делают вывод, что криотерапия охлажденным воздухом, как лечебное средство при комбинированном лечении воспалительных ревматоидных заболеваний, является эффективным методом.

В работе [190] авторы исследовали у 10 спортсменов национальной сборной состояние цитокинов и мышечных ферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и креатинкиназы в сыворотке крови. Процедуры проводили в криока-

мере в течение недели по 1 процедуре в день. В период исследований все спортсмены получали физические нагрузки, обычные для тренировочного процесса. Установлено, что по сравнению с исходным состоянием показатели функции иммунной системы после процедур не изменялись, в то время как уровень ЛДГ и креатинкиназы существенно снижался.

По мнению авторов, отмеченные изменения исследуемых параметров свидетельствуют об ускорении восстановления и реабилитации спортсменов после интенсивных мышечных нагрузок в условиях применения криотерапии.

Значительный опыт клинического применения общей криотерапии в клиниках России обеспечили накопление большого объема информации. Отмечены и описаны [150, 191, 192] эффекты криотерапевтического лечения, сформировались методики специфического применения.

Представлен анализ лечения более, чем 250 пациентов с разной формой и тяжестью псориаза. При обращении всем больным проводили клинические и биохимические исследования крови, иммунологические исследования. Проведенные лабораторные и клинические обследования подтверждали системный характер заболевания. В 100% случаев заболевание сопровождалось хроническим воспалением носоглотки, в 87% - нарушением функций печени и поджелудочной железы. Больные с легкой формой псориаза проходили курс лечения, состоящий из 10 процедур, а больные с тяжелой формой – 14-20 процедур. В первом случае ремиссия достигнута через месяц от начала лечения, а во втором – через 1-3 месяца. Отмечено, что ремиссия у больных, получавших криотерапию, была значительно большей, чем у больных, леченных другим способом. Длительность ремиссии у больных, получивших 14-20 процедур, продолжалась до 2 лет. Авторы делают вывод, что введение в курс лечения больных псориазом криотерапии позволяет сократить длительность интенсивного курса лечения до достижения стойкой ремиссии. Каждое последующее обострение протекает в более легкой форме, что дает основание рекомендовать криотерапию в курс лечения больных псориазом [193].

Обобщая выступления участников конференции «Криотерапия в России 2009» [192, 194-198], можно сделать два основных вывода: общая криотерапия в России быстро развивается, накопленный объем практических наблюдений обеспечивает начало работ по систематизации метода общей криотерапии.

Достаточное количество криотерапевтических установок в России обеспечивает беспрецедентно широкий доступ практиков к методам криостимуляции. Следствием широкого доступа к криосаунам является применение криотерапии в самых необычных ситуациях. Массовое и многообразное применение АКТ обеспечивает накопление большого объема практических наблюдений.

Вместе с тем, в большинстве случаев новые позитивные результаты от использования криотерапевтического воздействия не получают широкой огласки, т.к. практикующие врачи неохотно публикуют данные о своей работе, поэтому новейшая информация распространяется неоправданно медленно. По мнению участников конференции, общий объем наблюдений настолько велик, что неизбежным становится переход метода АКТ к следующей фазе развития – этапу обобщения накопленных знаний.

Судя по содержанию докладов конференции «Криотерапия в России 2009», в ближайшие годы следует ожидать тенденции развития теории АКТ, четкого обоснования списка противопоказаний.

По мнению участников конференции, следующим направлением использования криотерапии, вопреки противопоказаниям, станут заболевания ССС, когда АКТ используют как средство профилактики и реабилитации, в том числе и для лечения гипертонической болезни, так как метод не вызывает «включения» терморегуляторных механизмов, но обладает крайне выраженным общестимулирующим, мобилизующим действием на организм.

Криотерапия сопровождается стимуляцией физиологических резервов организма, оптимизацией механизмов регуляции кровообращения, гипотензивным эффектом, повышением неспецифической резистентности, пере-

стройкой метаболизма за счет интенсификации распада жиров. Этот комплекс очевидных позитивных эффектов позволяет рассматривать криотерапию в качестве эффективного метода патогенетического лечения больных гипертонической болезнью, повышения их умственной и физической работоспособности.

В работе [199] исследования проводились на базе Челябинского областного клинического терапевтического госпиталя для ветеранов войн. В исследование было включено 70 мужчин в возрасте от 30 до 55 лет с диагнозом - начальные проявления недостаточности кровоснабжения мозга, которые развивались у 63 человек на фоне артериальной гипертонии, у 7 человек на фоне атеросклероза. Длительность заболевания исследуемых колебалась от 1 до 5 лет. Средний возраст пациентов основной группы – $42 \pm 0,67$ лет. Все участники исследования на протяжении 3-х последних месяцев жаловались на типовые симптомы: на головную боль, головокружение, шум в ушах, снижение памяти и работоспособности. Головная боль и снижение работоспособности наблюдались более чем у 70% обследованных пациентов. Около 55% пациентов жаловались на расстройство сна в виде затрудненного засыпания, кошмарных сновидений, снижения длительности сна, приблизительно 40% жаловались на головокружение и снижение памяти, у 20% обследуемых были жалобы на шум в голове.

После проведенного курса АКТ пациенты отмечают значительное субъективное улучшение. С высокой степенью достоверности уменьшается частота жалоб на головные боли, головокружения, снижение трудоспособности, нарушение сна, снижение памяти ($p < 0,015$). Отмечено достоверное увеличение частоты выявления высоких и средних степеней активности, самочувствия и настроения при параллельном уменьшении частоты низких показателей. Количество сосудов с признаками гипоперфузии снизилось на 25%.

Учитывая особенности иммунных реакций организма на локальное деструктивное и общее экстремальное криовоздействие, обоснованным является их совместное использование в различных лечебных программах [200].

Основная цель совместных процедур – придать антигенные свойства патологической ткани. В этом случае АКТ в криокамере выступает в качестве фактора, активирующего общую активность иммунной системы организма. На первом этапе лечения авторы назначают 3 процедуры общей криотерапии (по 1 процедуре в день), вследствие чего формируется повышенная готовность иммунной системы к восприятию новой антигенной нагрузки и антителообразованию. Продлевая курс лечения в криосауне, авторы рекомендуют проводить криодеструкцию патологического очага (злокачественные опухоли, эрозии, папилломы, псориатические бляшки), после чего пациентам рекомендуется продолжать посещение криосауны 2-3 раза в неделю до отторжения крионекроза, а затем - 1 раз в месяц.

Изучалась сравнительная эффективность первичной профилактики поражений нижних конечностей при сахарном диабете общепринятой методикой и предложенного авторами комплекса первичной профилактики поражений нижних конечностей, состоящего из назначения общей АКТ при температуре в камере $-150\text{—}160\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 164 сек. Через 30-40 мин больным производили массаж нижних конечностей.

Лечение контрольной группы больных осуществлялось по общепринятой методике. Длительность заболевания сахарным диабетом II типа составляла от 3 до 9 лет. Всем больным были проведены лабораторные исследования уровня глюкозы, продуктов ПОЛ и активности антиоксидантной системы, состояние общего кровотока. Изучив изменения этих показателей в крови и скелетных мышцах, авторы пришли к выводу, что предложенный метод более эффективен, чем традиционный [197].

Поиск оптимальных методов лечения и предотвращения диабетической полиневропатии является актуальной задачей медицины. В работе [195] исследовали возможность применения АКТ в комплексном лечении сахарного диабета инсулинорезистентного I типа, осложненного диабетической полинейропатией. Лечение проведено 17 больным. Выраженность диабетической периферической нейропатии (ДПН) оценивали по степени проявления симп-

томов и клинического неврологического обследования и шкалы Нейропатического Дисфункционального Счета. Для каждого пациента, вида нарушений рассчитывалась средняя величина баллов; 1 балл свидетельствовал об отсутствии ДПН, от 2 до 4 – об умеренно выраженной полинейропатии, более 5 баллов – соответствовало выраженной ДПН. Сеансы криотерапии осуществляли в криотерапевтическом комплексе КАЭКТ-01-«Крион» с температурным режимом -150°C по 2,5 мин. Стандартное лечение диабета 2 типа включало применение препаратов по общепринятой схеме. В результате проведенного комплексного лечения в течение 2 недель с применением криотерапии при исследовании вибрационной, болевой, температурной, тактильной чувствительности отмечена положительная динамика. Более выраженная редукция симптоматики установлена у больных с более острыми проявлениями болезни, у которых уровень расстройств составлял 5 и более баллов. У обследуемых больных значительно уменьшался болевой синдром, который в ряде случаев исчезал после 5 дней от начала холодовых процедур. Значительно понижалось содержание сахара в крови – от 9,6 до 5,6 мм/л, положительная динамика оценивалась снижением до 1 балла при начальных 5 баллах.

Таким образом, анализ литературных данных свидетельствует о том, что холод по праву считается одним из древнейших медицинских методов оказания помощи при различных заболеваниях. Успешное использование в медицине различных форм искусственной гипотермии позволило раскрыть ряд особенностей возникновения и развития ответных реакций организма, возникающих при охлаждении. Благодаря глубоким фундаментальным исследованиям, выполненным в конце прошлого и начале текущего столетия, установлено, что положительными эффектами гипотермии на организм являются снижение интенсивности обменных процессов в органах и тканях, повышение их устойчивости к явлениям гипоксии, ишемии и другим видам патологий. В связи с этим, до настоящего времени продолжают поиски оптимальных способов охлаждения организма человека, выполняющих защитную функцию во многих опасных для жизни ситуациях, способных создать

наиболее щадящие условия для функционирования тех жизненно важных органов и тканей, которые менее устойчивы к недостатку кислорода (гипоксии).

Особенно важными являются исследования специфических реакций нейротрансмиттерных процессов (секреции, захвата, рецепции, содержания нейромедиаторов) при холодовых воздействиях. Установлено, что на начальном этапе КЦГ происходит снижение сродства адренорецепторов синаптических мембран коры и гипоталамуса к соответствующим медиаторам. Проявляется феномен десенсибилизации адренорецепторов гипоталамуса и сопряженной с ним аденилатциклазной системы. Так как гипоталамическая область участвует в мобилизации вегетативных и гуморально-гормональных механизмов в ответ на сигнализацию от разнообразных рецепторов, направленное температурное воздействие на эту область способствует включению соматических нервных механизмов при нарушении гомеостаза. Установлено, что в реакциях живых организмов на действие экстремальных факторов, в том числе холода, большое значение имеет ГЭБ, как один из основных звеньев в центральных механизмах гомеостаза.

В последующем были проведены исследования по оптимизации режимов холодового воздействия с целью достижения максимальных терапевтических эффектов при максимальном снижении негативных спонтанных стрессорных реакций. Одним из таких, впервые предлагаемых видов охлаждения, оказались РХВ, лечебные свойства которых при их применении могут особенно проявиться как вспомогательный фактор в общей стратегии лечения больных. Ритмические гипотермические холодовые воздействия, являясь сенсорным и систематически действующим раздражителем, обуславливают определенные сдвиги в терморегуляторных системах мозга. Выявлено, что РХВ влияют на проницаемость ГЭБ. Резонансное действие РХВ направлено на синхронизацию активности ряда функциональных систем, синергизм которых ведет к созданию определенного состояния мозга, в которое вносят вклад ГЭБ, нейромедиаторный пул и соответствующая организация нервных

центров, объединенных специфическими функциональными связями. Это состояние отражает активность сверхмедленной управляющей системы мозга, направленной, с одной стороны, на регуляцию терморегуляторных реакций, а с другой – на создание определенной функциональной системы, существующей какое-то время после окончания РХВ, ведущую роль в которой занимает ГЭБ, т.е. активный контроль состояния терморегуляторной памяти. Периодические холодовые воздействия вызывают периодические изменения функционального состояния ГЭБ, а, следовательно, мозга и отдельных его отделов.

Применяемые в медицинской практике методы фармакологической коррекции в ряде случаев мало эффективны. Использование гипотермии является единственным в некоторых ситуациях методом для коррекции опасных для жизни нарушений, позволяющим в условиях действия искусственного охлаждения проводить различные вмешательства с последующим более быстрым выздоровлением и улучшением «качества жизни».

Опыт применения пролонгированной гипотермии у больных с нарушениями функции сердечно-сосудистой системы, тяжелыми мозговыми осложнениями, показал, что охлаждение способствует существенному повышению устойчивости организма. Имеется мировой опыт, в соответствии с которым местная глубокая гипотермия для защиты миокарда от ишемии при хирургии врожденных пороков сердца обеспечивает адекватную защиту миокарда на период необходимой аноксии. Смертность от хирургического вмешательства в этом случае существенно сокращается.

В связи с вышеизложенным, существует необходимость более глубокого и комплексного исследования особенностей и механизмов действия холода на организм, выяснения возникающих при этом метаболических и патофизиологических процессов с целью выработки общих принципов и новых подходов для лечения ряда патологических состояний холодом.

Достижения науки в области криобиологии и криогеники создали предпосылки для возможного использования низких температур (-100°C - -160

°C) в практическом здравоохранении. Достигнутые успехи в лечении ревматоидных полиартритов японским врачом Т.Ямаучи способствовали развитию криогенных технологий, которые в конце прошлого столетия нашли применение в медицинской практике в Японии, Германии, Польше и России. Однако, отсутствие эффективной медицинской техники, ее дороговизна (стоимость японской системы охлаждения 2 млн. долларов, а германской установки – 200 тыс. долларов), значительно затормозило фундаментальные и прикладные исследования действия низких температур на гомеостаз живого организма. Вместе с тем, популяризация метода в научной прессе была, в большей степени, основана на субъективных выводах врачей, отсутствовали количественные мониторинговые показатели состояния организма больных, получавших АКТ, статистический научный материал имел неубедительную и неоднозначную информацию. Отсутствовали обоснованные четкие критерии показаний и противопоказаний к применению АКТ. Все это до настоящего времени замедлило применение уникального физиотерапевтического метода с его огромным потенциалом оздоровления, определило его статус как экзотического и нетрадиционного метода лечения. Интенсивно ведущиеся в последние годы исследования дают возможность предположить, что АКТ является мощным физиотерапевтическим методом, находящим все более широкое и обоснованное применение в медицине. При действии низких температур на поверхность тела организм активно реагирует системой терморегуляции и всеми функциональными механизмами, включая гипоталамо-гипофизарно-адреналовую, иммунную и эндокринную системы. Кратковременность процедуры (1-2 мин) не нарушает энергетического баланса организма, вызывает состояние «мягкого» стресса и подготавливает все физиологические резервы для поддержания, в случае необходимости, гомеостаза. Очевидно, необходимо обозначить направления научно-методических исследований, выделить наиболее обоснованные области и способы применения АКТ в практической медицине, подтвержденные клиническими наблюдениями. По данным многих ученых, возрастных противопоказаний для АКТ не

существует, реально проводить процедуры даже детям грудного возраста. Также, по их мнению, за редким исключением, не существует абсолютных противопоказаний к применению методики. Наиболее широко представлены в литературе данные по применению АКТ в дерматологии, вертебрологии, ревматологии, спортивной медицине, косметологии.

Практически полностью отсутствуют научные исследования, связанные с применением экстремально низких температур в медицине в Украине. Проводятся первые попытки создания охлаждающих устройств для АКТ Киевским ЗАТ «Холод» на базе использования германской технологии, создаваемых криокамер «Крио-Спейс» с температурой воздуха -110°C - -120°C . Ученые Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков) продолжили свои исследования по изучению действия экстремально низких температур на организм животных и человека.

Теоретически важной предпосылкой для этих исследований являются механизмы адаптации к периодическому действию низких температур, повышение устойчивости и стимуляция функциональной активности ГЭБ, «омоложение» нейрогуморальной регуляции ССС пожилого организма. Научных подходов к обоснованию применения РЭХВ для коррекции нарушенных функций гомеостаза у животных и людей, в том числе пожилого возраста в отечественной и мировой литературе мы не встречали.

РАЗДЕЛ 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Основной объем исследований по диссертационной работе выполнен на базе научных подразделений Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.

Исследования проводили на белых крысах-самцах линии Вистар двух возрастных групп. В первой группе - молодые половозрелые животные, возраст 6 месяцев (МЖ), вторая – старые, возраст 2-2,5 года (СЖ). Всего в экспериментальной работе были использованы 261 молодая и 223 старые крысы.

Эксперименты на животных проведены в соответствии с Общими принципами работы на животных, одобренными 1-м Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, Украина, 2001) и согласованными с положением Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, Франция, 1985).

2.1 Методики охлаждения и количество исследуемых животных

Каждая основная группа животных была разбита на четыре подгруппы: первая – интактные животные, вторая – крысы, которые получили три сеанса РЭХВ, третья – шесть РЭХВ, четвертая – девять. В каждой подгруппе содержалось по 7 животных (таблица 2.1).

В динамике охлаждения и в период наблюдения ни одно животное не погибло.

Охлаждение животных осуществляли в криокамере «Крио-спейс», выпускаемой в Германии, но конструктивно улучшенной фирмой ЗАТ «Холод», г. Киев, в результате чего добавлен отсек с температурой -60°C . Животные одновременно помещались в криокамеру и охлаждались по следующей программе:

Таблица 2.1 Распределение животных по сериям эксперимента

№ п/п	Характер эксперимента	Возраст жи- вотных	Количество животных
1.	Измерение изменения градиента температур в криокамере при помещении в нее животных.	молодые	10
2.	Изучение действия РЭХВ на структурно-функциональное состояние гипоталамуса.	молодые старые	28 28
3.	Сравнительная характеристика частоты сердечных сокращений у крыс при различных методах экстремального охлаждения.	молодые старые	20 20
4.	Ультраструктурные изменения миокарда после экстремального охлаждения.	молодые старые	35 35
5.	Ультраструктурные изменения миокарда у половозрелых крыс с алиментарным ожирением после РЭХВ.	молодые	28
6.	Влияние РЭХВ на состояние систем нейрогуморальной регуляции.	молодые старые	28 28
7.	Влияние РЭХВ на показатели спектрального анализа ВСР у крыс с алиментарным ожирением.	молодые	28
8.	Ультраструктурные изменения клеток надпочечников и щитовидной железы после РЭХВ.	старые	28
9.	Состояние гормональной функции после ритмических экстремальных холодовых воздействий.	молодые старые	28 28

10.	Изучение возрастных особенностей перекисного окисления липидов у крыс после действия РЭХВ.	молодые	28
		старые	28
11.	Содержание конечных продуктов обмена NO в тканях головного мозга, миокарда и сыворотке крови после РЭХВ.	молодые	28
		старые	28

В первой камере с температурой воздуха -10°C крысы находились 10 с, после чего через герметическую дверь помещались во вторую на 15 с с температурой воздуха -60°C , после чего животных быстро (1-3 с) помещали на 2 мин в третью камеру с сухим воздухом, охлажденным до -120°C . По истечении 2-х мин крыс вынимали из камеры и содержали при комнатной температуре ($+24^{\circ}\text{C}$) 5 мин, после процедуру охлаждения повторяли, согревали на протяжении 5 мин. при комнатной температуре, после чего по аналогичной программе проводили цикл охлаждения. Таким образом, в течение короткого периода времени животные получали три процедуры ритмических экстремальных холодовых воздействий. Через день РЭХВ повторяли, с последующим повторением процедуры охлаждения еще через день. Всего животные охлаждались 9 раз по 2 мин при температуре -120°C .

Две группы молодых и старых животных (по 7 животных в каждой) охлаждали по общепринятой методике в той же криокамере. Животные охлаждались каждый день по 2 мин. и получили 9 сеансов экстремальных криовоздействий.

До начала процедуры и в динамике охлаждения животным записывалась ЭКГ.

В процессе процедуры за животными осуществлялся постоянный визуальный контроль через специальное окно и компьютерную систему наблюдения.

При помощи платиновых, метрологически аттестованных термометров сопротивления производства фирмы «Гера» измеряли перепад температуры в криокамере.

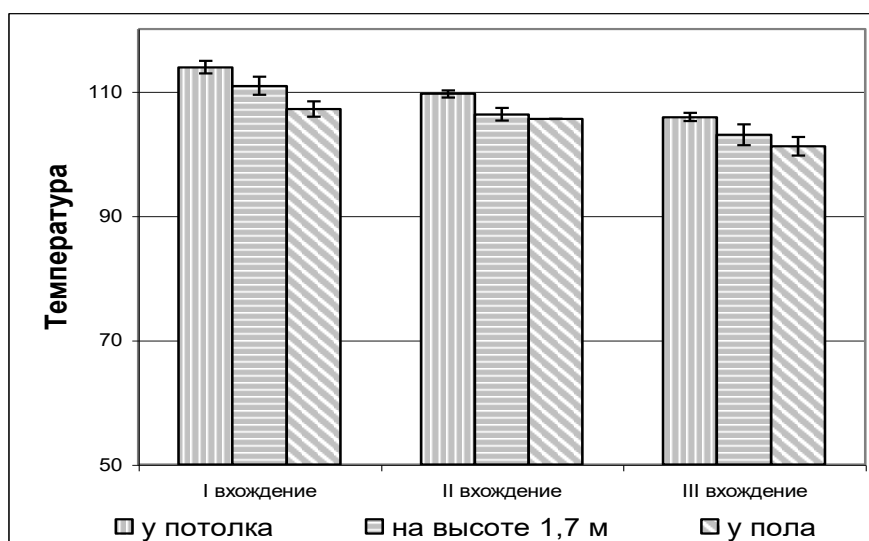


Рис. 2.1 Измерение градиента температур в камере

После выхода криокамеры на рабочий режим (-110 ; -115 °C) определяли в середине камеры место, куда помещали животных, и измеряли градиент температур по высоте камеры в следующих точках: у пола, на высоте 1,7 м, у потолка (рис. 2.1). Клетки с крысами помещали в 1-й шлюз (-10 °C), где их охлаждали 15 с, после чего клетки переносили во 2-й шлюз с температурой -60 °C. При этой температуре в криокамере крысы находились 20 с, после чего их перемещали в 3-й шлюз с температурой -110 ; -115 °C на 1,5-2 мин.

В этот момент измеряли градиент температур в указанных выше точках. После 2-х минут пребывания в криокамере клетки с крысами выносили и держали при комнатной температуре 5 мин, после чего процедуру охлаждения животных с измерением перепада температур в криокамере повторяли 2 раза. После третьей процедуры охлаждения крысам измеряли ректальную температуру, которая достоверно не менялась.

Таким образом, с учетом технических характеристик криокамеры, при открывании шлюзовой двери и перемещении крыс, из-за ударной тепловой

волны воздуха, температура внутри рабочей камеры повышалась в среднем на 3,5 °С. Время восстановления температуры в криокамере после закрытия шлюзовой двери до исходного уровня - в среднем 5 мин.

2.2 Методика моделирования алиментарного ожирения

Модель ожирения вызывали по методике В.Г.Баранова путем содержания животных на гиперкалорийном рационе [201].

Наличие ожирения у животных определяли по достоверному увеличению весо-ростового показателя – индекса Ли, который является точным математическим показателем степени ожирения у крыс и определяется по формуле:

$$\frac{\sqrt[3]{\text{вес тела (в г)}}}{\text{Длина от носа до анального отверстия, (в см)}} \times 1000$$

Величина индекса более 300 свидетельствует о наличии ожирения.

2.3 Электронно-микроскопические и гистохимические исследования

Образцы ткани для оптической микроскопии полутонких срезов и трансмиссионной микроскопии ультратонких срезов препарировали по общепринятым методам и рекомендациям. Ткани фиксировали 3% глутаральдегидом и 1% буферным раствором четырехокси осмия. Обезвоживание проводили в этаноле возрастающей концентрации и абсолютном ацетоне. Образцы заливали в смесь смол эпон-аралдит. Серийные полутонкие (0,5 мкм) срезы изготавливали на ультрамикротоме УМПТ-6, окрашивали толуидиновым и метиленовым синим и фотографировали на микроскопе МБР-3 с помощью видеокамеры Panasonic WV-CP 470. Ультратонкие срезы изготавливали на ультрамикротоме УМПТ-4, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, просмотр и фотографирование осуществляли в электронных микроскопах ПЭМ-125К и ЭВМ-100БР при ускоряющем напряжении 75 кВ [202].

В качестве маркерного фермента для изучения процессов проницаемости ГЭБ и эндотелиального транспорта веществ мы использовали пероксидазу хрена (молекулярная масса 44000). Для выявления пероксидазной активности был применен метод Грэхема-Карновского [203]. Пероксидаза хрена (Reanal, активность 350-500 ед. в 1 мг) вводили в виде 20% раствора (на физиологическом растворе NaCl) в хвостовую вену животным непосредственно перед забоем и за 10 мин - по 1 мл внутривенно. Одновременно контрольным животным вводили те же количества раствора пероксидазы хрена. Всех опытных и контрольных животных забивали декапитацией. Быстро извлеченный головной мозг помещался в 4% раствор глутаральдегида на 0,1М какодилатном буфере (pH 7,3). Кусочки ткани гипоталамуса фиксировались в течение 90 мин и изготавливались срезы толщиной 50-100 мкм, фиксация которых продолжалась в свежей порции в течение еще 30 мин. Срезы гипоталамуса, отмытые в какодилатном буфере (pH 7,4) при температуре +4 °C в течение ночи, подвергались быстрому промыванию 0,05М трис-HCl буфером. Затем следовала инкубация срезов 30 мин в среде без добавления перекиси водорода: 5 мг 3,3'-диаминобензидингидрохлорида (ДАВ, Sigma) в 10 мл 0,05 М трис-HCl буфера (pH 7,6). Инкубация в среде с добавлением 0,2 мл свежеприготовленного 1% раствора перекиси водорода - в течение 60 мин. Образцы ткани постфиксировались в 1% буферном растворе четырех окиси осмия 90 мин. Обезжизнение ткани производили в этаноле возрастающей концентрации и абсолютном ацетоне, заключение в смесь эпоксидных смол эпон-аралдит. Контролем служили образцы гипоталамуса от опытных и контрольных крыс, инкубированные в среде, не содержащей перекиси водорода. При просмотре срезов в электронном микроскопе продукт гистохимической реакции представляет собой гомогенный электронноплотный осадок.

Для выявления аденилатциклазы использовался гистохимический свинцовый метод [204]. Образцы фиксировали погружением в 1% глутаральдегид на 0,05 М какодилат-нитратном буфере (pH 7,4) с 4,5% декстрозой. Кусочки ткани толщиной 1мм промывались на протяжении ночи в бу-

ферном растворе и помещались в среду инкубации на 30 мин при температуре 30 °C. Среда состояла из 80 мМ малеатного трисбуфера (pH 7.4), 8% декстрозы, 2,0 мМ теофилина, 4,0 мМ сульфата магния, 0,3 мМ АТФ в 0,5 мл воды. Непосредственно перед употреблением прибавляли 4,8 мМ $Pb(NO_3)_2$. Для контроля проводились следующие опыты: инкубация в среде без субстрата и инкубация в среде с 0,0125 М NaF для устранения неспецифических реакций НТФ-азы и усиления активности аденилатциклазы. Ткань промывалась в забуференном растворе декстрозы и дополнительно фиксировалась в 1% OsO_4 на веронал-ацетатном буфере с 7,5% декстрозой. Обезвоживание проводили в этаноле возрастающей крепости и абсолютном ацетоне, образцы заключали в смесь эпон-аралдит. Ультратонкие срезы контрастировали 2% уранилацетатом на 50% этиловом спирте без контрастирования цитратом свинца. Электронно-плотный осадок пирофосфата свинца маркирует места локализации фермента.

При морфометрической обработке данных использовали и компьютерную систему анализа FRAM v.3.0 [205, 206]. Для фрактального анализа в среду FRAM переносили фрагменты цифровых изображений полутонких и ультратонких срезов ткани мозга. Реализуя известный математический аппарат [207] и принципы построения алгоритмов математических программ для анализа изображений из отечественных космических технологий, рассчитывали фрактальные размерности (D). Для этого методом перекрывающихся окон сканировали выбранный участок среза. В каждом окне случайным образом выбирались области, ограниченные прямоугольными рамками разного размера. Находилась логарифмическая зависимость количества пикселей заданной окраски изображения (например, мода 8-битных градаций серого) от площади рамки, в которую они попадают. В полученной прямой линейной аппроксимации рассчитанной зависимости: $y = ax - b$, угловой коэффициент «а» является хорошей оценкой D . В расчетах и интерпретации данных учитывались положения теории обобщенного броуновского движения, в которой фигурирует величина H , связанная с D простым соотношением: $H = \text{dir} - D$.

Считается, что при $H=1$ система линейна и детерминирована; при $H=0,5$ она случайна, как траектория классического броуновского движения, при $1>H>0,5$ система персистентна (самоподдерживающаяся, стабильная, положительно коррелированная), при $0<H<0,5$ – антиперсистентна (отрицательно коррелированная, имеет тенденцию к перестройкам).

2.4 Электрофизиологические методы исследования

Регистрацию ЭКГ осуществляли после 3-го, 6-го, 9-го сеанса, а также через неделю и месяц после последнего РЭХВ на электрокардиографе серии «Поли-Спектр» в 6-ти стандартных отведениях. Спектральный анализ вариабельности сердечного ритма (ВСР) проводили с помощью программы «Поли-Спектр-Ритм» [208, 209]. Спектральный анализ ВСР заключается в идентификации его волновой структуры.

Изменчивость периодических процессов кровообращения – результат интегративных нейрогуморальных влияний, в связи с чем показатели ее являются фундаментальными характеристиками регуляторных систем человека, а не кровообращения.

Эффекты нейрогуморальной регуляции реализуются разными путями. Наиболее развитый и быстрый – автономная нервная система (АНС). Она контролирует функции внутренних органов, кровеносных и лимфатических сосудов, гладких и, частично, поперечно-полосатых мышц. Имеет многоуровневую, иерархическую организацию с нелинейными многосторонними прямыми и обратными связями. Координируется с соматической нервной системой. Находится под контролем ЦНС.

Самый высокий уровень АНС – высшие вегетативные центры – находится в коре больших полушарий и осуществляет исключительно важную функцию вегетосоматической и вегетомотивационной интеграции.

Спектральный анализ ВСР позволяет обнаружить периодические составляющие в колебаниях сердечного ритма и оценить количественно их вклад в динамику ритма. Схематично процесс формирования спектрограммы можно

представить следующим образом: измерив длительность интервалов R-R и отложив величину этих интервалов в виде вертикальных столбиков, мы получаем кардиоритмограмму (КРГ), а проведя по верхушке КРГ огибающую кривую - функцию вариации ритма. Данную кривую можно разложить на составляющие подобно тому, как солнечный свет, проходя через призму, расщепляется на разнородные спектры. Такой математической «призмой» является преобразование Фурье, которое дает возможность получить спектры изменчивости интервалов R-R. Таким образом, последовательность интервалов R-R преобразуется в спектр мощности колебаний длительности R-R, представляющий собой последовательность частот (Гц), каждой из которых соответствует определенная амплитуда колебаний. Наиболее часто оценивается площадь под кривой спектра, соответствующая некоторому диапазону частот, мощность (в мс^2) в пределах определенного частотного диапазона. В норме у человека в спектре ритма сердца присутствуют три основных спектральных составляющих, или пика.

Высокочастотные (ВЧ) колебания (HF-компонент) сопряжены с дыханием и отражают модулирующее влияние парасимпатического отдела нервной системы на пейсмекерную активность синусового узла.

Низкочастотные (НЧ) колебания (LF-компонент) могут быть обусловлены как периодически возникающими вспышками симпатической вазомоторной активности (собственный ритм сосудодвигательного центра), так и колебаниями ритма АД, реализуемого через барорефлекторные механизмы. Участие иных механизмов в формировании волн низкой частоты требует дополнительных доказательств и не является принципиально важным в практической медицине.

Менее всего ясна физиологическая сущность очень низкочастотных (ОНЧ) колебаний (VLF-компонент). Более того, наличие специфического физиологического процесса, которому могут быть приписаны колебания в этом диапазоне, вообще спорно. Негармонический компонент, не имеющий когерентных свойств, который может быть выделен при применении алгоритмов

корректировки дрейфа нулевого уровня, составляет основную часть VLF-компонента.

Измерение мощности ОНЧ (VLF), НЧ (LF) и ВЧ (HF) колебаний обычно осуществляется в абсолютных единицах мощности (мс^2), но HF- и F-компоненты могут быть дополнительно выражены в нормализованных единицах, которые отражают относительный вклад каждого из компонентов в пропорции к общей мощности за вычетом VLF-компонента. Представление LF- и HF-компонентов в нормализованных единицах подчеркивает контролируемое и сбалансированное поведение двух звеньев автономной нервной системы. Кроме того, нормализация минимизирует влияние изменений общей мощности на уровень LF- и HF-компонентов.

При спектральном анализе парасимпатическая и симпатическая активность может быть оценена за короткие промежутки времени (2-5 минут).

С одной стороны это позволяет изучить влияние различных короткодействующих факторов или вмешательств на ВСР, а с другой – может помешать быстро воспроизвести результаты в случае отсутствия стандартных условий регистрации ЭКГ.

Таким образом, при спектральном анализе определяют следующие параметры:

1. ВЧ колебания (или HF – high frequency) – это колебания ЧСС при частоте 0,15-0,40 Гц. Мощность в этом диапазоне связана преимущественно с дыхательными движениями и отражает вагусный контроль сердечного ритма (колебания парасимпатического отдела вегетативной нервной системы).
2. НЧ колебания (или LF – low frequency) – это часть спектра в диапазоне частот 0,04-0,15 Гц. Она имеет смешанное происхождение. На мощность в этом диапазоне оказывают влияние изменения тонуса как симпатического (преимущественно), так и парасимпатического отдела ВНС.
3. ОНЧ колебания (или VLF very low frequency) – диапазон частот от 0,003 до 0,04 Гц, а при 24-часовой записи и сверхнизкочастотные колебания (ULF) - менее 0,003 Гц. Физиологические факторы, влияющие на них,

неясны (предположительно ренин-ангиотензин-альдостероновая система, концентрация катехоламинов в плазме, система терморегуляции и др.), церебральные эрготропные структуры, а также различные факторы, приводящие к нестационарности процесса записи.

4. Мощность в диапазоне высоких частот, выраженная в нормализованных единицах HFnu. Вычисляется по формуле:

$$\text{HFnu} = \text{HF}/(\text{Total-VLF}) \cdot 100$$

5. Мощность в диапазоне низких частот, выраженная в нормализованных единицах LFnu. Вычисляется по формуле:

$$\text{LFnu} = \text{LF}/(\text{Total-VLF}) \cdot 100.$$

6. LF/HF – этим значением характеризуется соотношение (баланс) симпатических и парасимпатических влияний. Измерение LF и HF проводится в относительных единицах, которые представляют процентный вклад каждой колебательной составляющей в общую мощность спектра, из которой вычитается мощность VLF-компонента, т.е. HFnu/LFnu. Характер симпатико-парасимпатического воздействия оценивается по соотношению процентных вкладов (LF/HF).

7. Общая мощность спектра (ОМС), или полный спектр частот, характеризующих ВСР (TP – Total power), - это мощность в диапазоне от 0,003 до 0,40 Гц. Она отражает суммарную активность нейрогуморальных влияний на сердечный ритм.

8. Результаты спектрального анализа обычно представляются в виде графика распределения частот, по которому легко можно судить о балансе пределов вегетативной нервной системы.

2.5 Биохимические методы исследования

2.5.1 Исследование параметров хемилюминесценции

Состояние процессов свободнорадикального перекисного окисления липидов и образования активных форм кислорода оценивали с помощью хемилюминесценции.

Исследования параметров хемилюминесценции (ХЛ) проводили через сутки после сеансов РЭХВ. Измерение параметров ХЛ осуществляли на хемилюминометре ХЛМЦ-01М в термостатируемых кюветах при температуре 37 °С в течение 180 секунд. Для описания экспериментальных кривых использовали параметры ХЛ: светосумма ХЛ за 180 секунд $S-(180)$, амплитуда первой вспышки $I_{\max 1}$, амплитуда второй вспышки $I_{\max 2}$, I_{180} -остаточная интенсивность (интенсивность ХЛ на 180-й секунде), время достижения второго максимума T [210, 211].

2.5.2 Определение базального уровня ТБК-активных продуктов.

Уровень ТБК-активных продуктов в сыворотке крови определяли по методу [212]. Метод основан на колориметрическом измерении интенсивности поглощения комплекса малонового диальдегида (МДА) с тиобарбитуровой кислотой (ТБК).

В процессе работы 0,3 мл сыворотки крови разводили в 3 мл 1,4 % ортофосфорной кислоты, затем приливали 1 мл 0,6 % ТБК. Пробы кипятили на водяной бане в пробирках с притертыми пробками в течение 45 мин. После охлаждения к пробам приливали 4 мл бутанола, тщательно перемешивали и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Бутанольную фракцию отбирали и спектрофотометрировали на “Cary-50” против холостой пробы 535 и 580 нм. Содержание ТБК-активных продуктов рассчитывали по следующей формуле:

$$C = (D_{535} - D_{580}) \cdot 13,3 / 0,156 \cdot 1,0,$$

Где D_{535} и D_{580} – интенсивности поглощения при соответствующих длинах волн;

13,3 – коэффициент разведения сыворотки;

0,156 – коэффициент молярной экстинкции; $\text{мкмоль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$;

1,0 – длина оптического пути, см.

Содержание ТБК-активных продуктов выражали в мкМ МДА/л сывотки.

Базальный уровень ТБК-активных продуктов в гомогенате сердца исследовали согласно методу, в модификации [213]. В пробу вносили 0,1 мл гомогената. Расчет содержания производили по следующей формуле:

$$C = (D_{535} - D_{580}) \cdot V / 0,156 \cdot P \cdot 1,0,$$

Где D_{535} и D_{580} - интенсивности поглощения при соответствующих длинах волн;

0,156 – коэффициент молярной экстинкции; $\text{мкМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$;

V – общий объем пробы, л;

P – содержание белка в пробе, мг;

1,0 – длина оптического пути, см.

Базальный уровень ТБК-активных продуктов в гомогенате миокарда выражали в пМ МДА/мг белка.

2.5.3 Определение интенсивности индуцированного перекисного окисления липидов

Интенсивность индуцированного ПОЛ определяли по методу [214]. Для этого 0,6 мл гомогената инкубировали 10 мин в среде содержащей 50 мМ tris-HCl, 50 мМ NaCl, 0,25 мМ аскорбата и 12 μM FeSO₄ при 37 °C. Отбор аликвот суспензии (0,5 мл) осуществляли в начале и в конце инкубации. К суспензии добавляли на льду 1 мл 30% трихлоруксусной кислоты и 0,5 мл дистиллированной воды, затем пробы центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин. К надосадочной жидкости приливали 0,1 мл N HCl и 1 мл 0,6 % ТБК и помещали на кипящую водяную баню на 15 мин. После охлаждения пробы спектрофотометрировали против буфера при 535 и 580 нм. Расчет скорости накопления ТБК-активных продуктов осуществляли по следующей формуле:

$$C = ((D_{535} - D_{580})_{10} - (D_{535} - D_{580})_0) \cdot V / 0,156 \cdot P \cdot N \cdot 1,0,$$

Где D_{535} и D_{580} - D_{535} и D_{580} - интенсивности поглощения при соответствующих длинах волн;

0 – в начале инкубации, 10 – в конце;

0,156 – коэффициент молярной экстинкции; $\text{мкМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$;

V – общий объем пробы, л;

P – содержание белка в пробе, мг;

T – время инкубации, мин;

1,0 – длина оптического пути, см.

Интенсивность индуцированного ПОЛ выражена в пМ МДА/мг белка за 1 мин.

2.5.4 Определение содержания восстановленного глутатиона

Принцип метода заключается в способности восстановленного глутатиона (GSH) образовывать комплекс с алоксаном и имеет максимум поглощения при длине волны 305 нм. Содержание этого соединения прямо пропорционально содержанию восстановленного глутатиона [215]. Расчет количества глутатиона в пробе производится при помощи калибровочной кривой, построенной по стандартным растворам глутатиона – 1,0 мл стандартного раствора содержит 100 мкг глутатиона

2.5.5 Определение активности каталазы

Каталазную активность в гомогенате сердца исследовали спектрофотометрически по убыли H_2O_2 при длине волны 240 нм [216]. Среда инкубации содержала 0,01 М K^+ -фосфатный буфер 0,5 mM ЭДТА и 15 mM H_2O_2 . Пробы инкубировали в термостатируемой кювете при 37 °C в течение 3 мин. Добавка гомогената осуществлялась из расчета 0,01-0,02 мг белка на пробу.

Активность каталазы рассчитывали по формуле:

$$A = \Delta \cdot V / 1,0 \cdot 0,0394 \cdot P,$$

где Δ - среднее изменение интенсивности поглощения пробы за 1 мин;

V – общий объем пробы, мл;

1,0 – длина оптического пути, см.

0,156 – коэффициент молярной экстинкции; $\text{мкМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$;

P – содержание белка в пробе, мг;

Каталазную активность выражали в $\text{мкМ H}_2\text{O}_2/\text{мг белка}$ за 1 мин.

2.5.6 Определение глутатионпероксидазной активности

Глутатионпероксидазная активность определяли спектрофотометрически на “Cary-50” по приросту содержания окисленного глутатиона, имеющего максимум поглощения при длине волны 260 нм [217]. Пробы инкубировали в термостатируемой кювете при 23 °C в течение 3 мин. Реакционная смесь постоянно перемешивалась.

Инкубационная среда содержала 0,3 М KH_2PO_4 (pH 7,0), 3 mM азид натрия (для ингибирования каталазной активности). В инкубационную среду вносили гомогенат (1-3 мг белка), затем добавляли 32,5 mM GSH. Реакцию инициировали внесением 7,5 mM H_2O_2 .

Глутатионпероксидазную активность рассчитывали по следующей формуле:

$$A = \Delta \cdot V / 1,0 \cdot 0,28 \cdot P,$$

где Δ - среднее изменение интенсивности поглощения пробы за 1 мин;

V – общий объем пробы, мл;

1,0 – длина оптического пути, см.

0,28 – коэффициент молярной экстинкции GSSG; $\text{мкМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$;

P – содержание белка в пробе, мг;

Активность глутатионпероксидазы выражали в $\text{мкМ GSSG}/\text{мг белка}$ за 1 мин.

2.5.7 Определение глутатионредуктазной активности

Определение глутатионредуктазы определялась спектрофотометрически [218] на “Cary-50” в термостатируемой кювете (23 °C) при 340 нм при убыли НАДФН относительно буферного раствора. Реакционная смесь постоянно

перемешивалась при помощи магнитной мешалки. Инкубационная среда 0,1 М $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 7,4 содержала 0,1 mM НАДФН и 0,5 mM ЭДТА, 1 mM GSSG. В кювету с буферным раствором добавлялся гомогенат (1-3 мг белка), затем НАДФН, реакция начиналась добавлением окисленного глутатиона. Проба инкубировалась в течение 3 мин.

Активность глутатионредуктазы рассчитывали по следующей формуле:

$$A = \Delta \cdot V / 1,0 \cdot 0,00622 \cdot P$$

где Δ - среднее изменение интенсивности поглощения пробы за 1 мин;

V – объем опытной пробы, взятой для измерения, мл;

1,0 – длина оптического пути, см.

0,00622 – коэффициент молярной экстинкции ; $\text{нм}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$;

P – содержание белка в пробе, мг;

Активность фермента выражали в нмоль НАДФН/мг белка за 1 мин.

2.6 Методики определения концентрации гормонов

2.6.1 Определение концентрации общего тироксина в сыворотке крови

Тироксин – тиреоидный гормон с молекулярной массой около 777 Да, синтезируемый щитовидной железой. В сыворотке крови тироксин находится в основном в комплексе с тироксин-связывающими белками, доля несвязанного – свободного гормона (T_4 св.) составляет примерно 0,03% от общей концентрации Т.

Количественное определение содержания T_4 общ. в сыворотке крови может быть использовано для оценки функционального состояния щитовидной железы.

Набор реагентов « T_4 общий – ИФА-БЕСТ» предназначен для количественного определения концентрации общего тироксина (T_4 общ) в сыворотке крови.

Метод определения основан на твердофазном конкурентном иммуноферментном анализе с применением моноклональных антител. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца и конъюгата, происходит

разрушение комплексов тироксин – транспортный белок и конкурентное связывание сывороточного тироксина и тироксина, конъюгированного с пероксидазой хрена, с моноклональными антителами к тироксину, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина, происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски обратно пропорциональна концентрации T_4 общ. в плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация T_4 общ. в анализируемых образцах.

Для построения калибровочного графика значение оптической плотности (ОП), соответствующее концентрации T_4 в каждом стандартном растворе, откладывали на миллиметровой бумаге. По полученным точкам проводили калибровочную кривую. Для определения концентрации T_4 в анализируемых пробах на оси ординат отметили значение ОП анализируемого образца. Проводили прямую до пересечения с калибровочной кривой, от полученной точки пересечения опускают перпендикуляр на ось абсцисс. Точка пересечения является искомым значением концентрации T_4 .

2.6.2 Определение концентрации 11-оксикортикостерона в сыворотке крови

11-оксикортикостерон (11-ОКС) – стероидный гормон, синтезируемый корой надпочечников.

Количественное определение уровня 11-ОКС в крови имеет значение при оценке функционирования гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы.

Метод определения основан на твердофазном конкурентном иммуноферментном анализе с применением моноклональных антител. В лунках планшета при добавлении исследуемого образца и конъюгата происходит конкурентное связывание сывороточного ксикортикостерона и оксикортикостерона, конъюгированного с пероксидазой, с моноклональными антителами

к оксикортикостерону, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина, происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски обратно пропорциональна концентрации 11-ОКС в анализируемых образцах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывали концентрацию 11-ОКС в анализируемых образцах.

В линейных координатах строили калибровочный график зависимости ОП (ед. ОП.) от концентрации 11-ОКС в стандартных калибровочных пробах (нМ/л).

Определяли содержание 11-ОКС в контрольном образце и в анализируемых пробах по калибровочному графику.

Контрольный образец служил для проверки точности и достоверности результатов. Если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации в контрольном образце попадает в пределы, указанные на этикетке, значит, полученные величины концентраций 11-ОКС в образцах можно считать достоверными.

2.6.3 Определение концентрации тестостерона в сыворотке крови

Тестостерон – стероидный гормон с молекулярным весом 288,4 Да, синтезируемый, главным образом, в семенниках и в значительно меньших количествах синтезируется яичниками и корой надпочечников.

Количественное определение уровня тестостерона в крови имеет диагностическое значение при оценке функционирования эндокринной системы. Для определения использовали набор реагентов «Тестостерон-ИФА-БЕСТ», предназначенный для количественного определения концентрации тестостерона в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

Метод определения основан на твердофазном конкурентном иммуноферментном анализе с применением моноклональных антител. В лунках планшета при добавлении исследуемого образца и конъюгата происходит

конкурентное связывание сывороточного тестостерона и тестостерона, конъюгированного с пероксидазой, с моноклональными антителами к тестостерону, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина, происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски обратно пропорциональна концентрации тестостерона в анализируемых образцах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывали концентрацию тестостерона в анализируемых образцах.

Результаты анализа регистрировали с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-650 нм. Допускается регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

Измерение проводили через 2-3 мин после остановки реакции. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не превышало 10 мин.

По результатам измерений вычисляли средние арифметические значения оптической плотности для дублей калибровочных проб и строили в линейных координатах калибровочный график зависимости ОП (ед. ОП) от концентрации тестостерона в стандартных калибровочных пробах (нМ/л).

Контрольный образец служил для проверки точности и достоверности результатов. Если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации в контрольном образце попадает в пределы, указанные на этикетке, значит, полученные величины концентраций тестостерона в образцах можно считать достоверными.

2.6.4 Определение концентрации эстрадиола в сыворотке крови

В соответствующие лунки контролей и сыворотки крови добавляли по 25 мкл экстрадиол-стандартов. В каждую лунку распределяли 200 мкл ферментного конъюгата.

Тщательно перемешивали в течение 10 секунд для полного смешивания реагентов.

Содержимое инкубировали 120 мин при комнатной температуре, не накрывая планшеты, удаляли содержимое лунок. 3 раза промывали лунки разведенным промывочным раствором (400 мкл на лунку) и вытряхивали на абсорбирующую бумагу оставшиеся в лунках водяные капли

Чувствительность и точность метода в высокой степени зависит от правильности процедуры промывки!

Добавляли 100 мл раствора субстрата в каждую лунку.

Инкубировали 15 мин при комнатной температуре.

Останавливали ферментативную реакцию добавлением 50 мл стоп-раствора в каждую лунку.

Считали ОП при длине волны 450 ± 10 нм на микропланшетном ридере не позднее, чем через 10 минут после остановки реакции.

Подсчитывали средние значения абсорбции для каждого набора стандартов, контролей и исследуемых образцов.

Строили стандартную кривую, отложив средние значения абсорбции каждого стандарта (на оси Y) напротив их концентрации (на оси X).

Используя среднее значение абсорбции каждого образца, определяли соответствующую концентрацию по стандартной кривой.

2.7 Исследование конечных продуктов обмена NO

Базальную секрецию стабильных метаболитов NO в сыворотке крови, тканях миокарда, коре головного мозга и гипоталамусе оценивали фотометрическим методом по реакции Грисса [219]. Для определения функциональной активности NOS применяли агонист L-аргинин в количестве 100 мг/100 г веса животных. Блокаду iNOS осуществляли с помощью внутрибрюшинного введения крысам Diethildithiocarbamic acid (диэтилдитиокарбаминовая кислота из расчета 50 мг/100 г веса, а cNOS с помощью блокатора N- ω -Nitro-L-Arginine Methyl Ester (N-омега-нитро-L-аргинин-метил-эстер) из расчета 5 мг/100 г

веса животного. Образцы тканей гомогенизировали в Na-фосфатном буфере, pH 7,4 при температуре 4-6 °C, после чего депротеинизировали 75 мМ/л $ZnSO_4$ и 55 мМ/л NaOH в соотношении 1:1:1,2 по объему соответственно, центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин на центрифуге PC-6. К 200 мкл супернатанта последовательно добавляли 20 мкл 1 % сульфонида и 20 мкл 0,1 % N-1-нафтилэтилендиаминдигидрохлорида в 5 % HCl. Оптическую плотность определяли через 20 мин при 540 нм с помощью многоканального микроспектрофотометра фирмы "Flow" (Великобритания). При проведении исследования использовали N-(1-нафтил)-этилендиаминдигидрохлорид, сульфонида фирмы ICN (США), остальные реагенты - отечественного производства.

РАЗДЕЛ 3

ВЛИЯНИЕ РИТМИЧЕСКИХ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ХОЛОДОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ (-120 °C) НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ГИПОТАЛАМУСА

В последние годы в рамках криобиологии и криомедицины получило дальнейшее развитие новое направление научных исследований – криобиология обновления, изучающая механизмы благоприятных изменений биологических структур и функций с помощью низких температур.

Существующие нейротрансмиттерные концепции центральной терморегуляции довольно убедительно объясняют сложные нейрофизиологические процессы, однако ни в одной из моделей охлаждения до последнего времени не учитывались активность и ультраструктурное состояние ГЭБ гипоталамуса. Возможно, именно поэтому до настоящего времени в нейромедиаторной организации температурного гомеостаза не объясняются некоторые специфические эффекты экстремальных температурных влияний. Функционирование ГЭБ стимулируется охлаждением, но не ограничивается влиянием на систему терморегуляции. Доказано, что ГЭБ вмешивается во многие адаптационные процессы, особенно скомпрометированные болезнью или возрастными расстройствами. Одной из задач криобиологии обновления является создание новых технологических процессов, способных перевести биологические объекты на качественно иной уровень гомеостаза.

В этой связи разрабатываются новые методы программного охлаждения организма [220-223], направленные на активацию регуляторных систем организма, механизмов саногенеза при различных патологиях центральной нервной и сердечно-сосудистой систем [224, 225]. Показано, что положительное действие новых лечебных режимов охлаждения, прежде всего, связано с повышением лабильности регуляторных процессов в ЦНС и ССС, стимуляцией прямых и обратных связей между этими системами (активация нейротрансмиттерных механизмов ГЭБ), «раскачкой» симпато-парасимпатических

переключений с дальнейшей оптимизацией центрального и периферического действия первичных (КА, АХ), вторичных (цАМФ, цГМФ) и ретроградных (NO, CO) мессенджеров, восстановлением фрактальных свойств биоритмов мозга и организма [226-228].

3.1 Ультраструктура гипоталамуса молодых контрольных крыс

Гипоталамус крысы обладает сложной микроскопической организацией [229] и представлен нервными и глиальными клетками с их многочисленными отростками, формирующими нейропиль, пронизанный сетью терминальных сосудов (рис. 3.1).

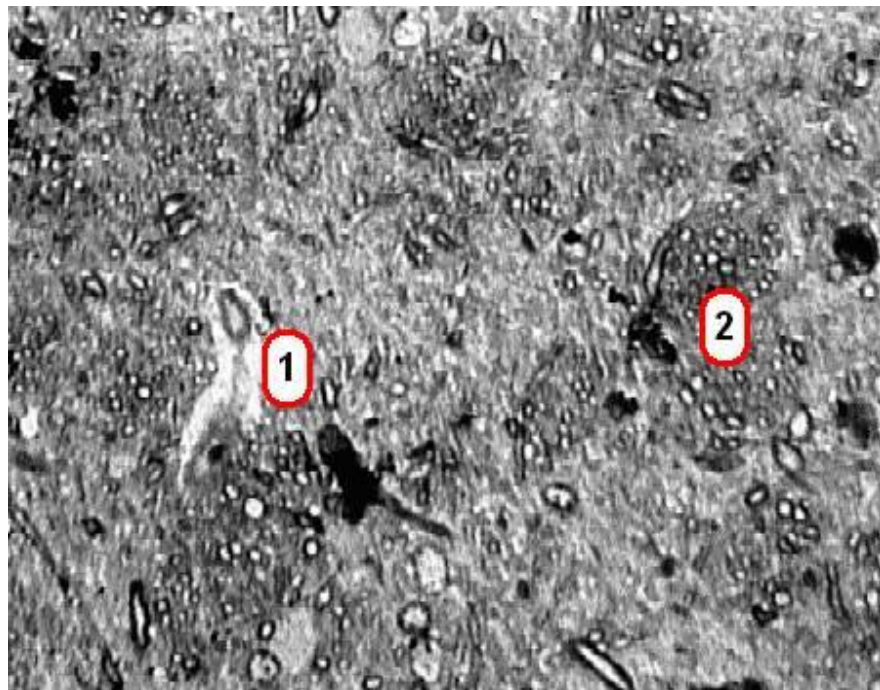


Рис. 3.1 Нейропиль гипоталамуса контрольной крысы. Полутонкий срез.

Окраска толуидиновым синим x 120.

1 – микрососуд; 2 – отростки нервных клеток

Как правило, нервные клетки исследованных нами областей гипоталамуса имеют диаметр 8-12 мкм, содержат крупное овальное ядро с равномерно распределенными гранулами хроматина. Плотное ядрышко обычно лока-

лизовано в центре или на периферии ядра. Слой цитоплазмы вокруг ядра невелик, наблюдаются короткие цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума, слабо развитый комплекс Гольджи, редкие рибосомы, митохондрии. Слабая насыщенность ядра и цитоплазмы нейрона обуславливает его низкую электронную плотность по сравнению с глиальными клетками и нейропилем.

Нейропил образован тонкими немиелинизированными терминалями аксонов и дендритов, многие из которых образуют между собой и с телом нейрона аксо-дендрические и аксо-соматические контакты. В нейропиле наблюдаются также отростки олиго- и астроглии, миелинизированные аксоны, тела клеток микроглии.

Глиальные клетки различаются как своими морфологическими характеристиками, так и локализацией относительно других клеточных элементов гипоталамуса. При этом клетки астроглии – астроциты равномерно распределены среди нервных элементов, образуя расширения, лежащие на поверхности кровеносных сосудов (так называемые "концевые ножки"). Астроциты имеют округлое или овальное ядро с кариоплазмой равномерной плотности. Ядерная оболочка иногда образует глубокие складки. Цитоплазма астроцитов относительно бедна органеллами, расположенными, в основном, в перикарионе. Свободных рибосом мало, эндоплазматический ретикулум (ЭПР) представлен короткими цистернами. Митохондрии весьма разнообразны по форме, в отростках клеток они вытянуты по длине. Отличительной чертой астроцитов является наличие в цитоплазме их тел и отростков большого количества фибрилл. Крупные отростки содержат те же органеллы, что и перикарион. В более тонких отростках большинство органелл отсутствуют, здесь можно наблюдать лишь единичные рибосомы, гранулы гликогена, микротрубочки, пучки фибрилл. Очень часто тончайшие отростки этих клеток приобретают форму пластинок, где расстояние между плазматическими мембранами составляет несколько сотен ангстрем. Довольно часто такие пластинчатые отростки лежат вокруг синапсов. Необходимо отметить очень важное свойство

отростков астроцитов формировать целый ряд специализированных контактов друг с другом. Это и точечные сращения, и плотные контакты. Вокруг кровеносных сосудов концевые ножки астроцитов образуют сравнительно полный слой, однако плотные контакты между астроцитами не являются сплошными.

Клетки микроглии, имеющие небольшие размеры (4-5 мкм), сосредоточены вокруг сосудов и нейронов и контактируют с ними [230, 231]. Электронноплотное ядро занимает почти весь объем этих клеток. Цитоплазма образует узкий слой вокруг ядра и содержит митохондрии, цистерны гранулярного ЭПР, рибосомы.

Нейропиль переднего и заднего отделов гипоталамуса пронизан сетью капилляров и мелких артериол. Их стенки выстилают плоские эндотелиальные клетки с немногочисленными органеллами и малым количеством микропиноцитозных пузырьков (рис. 3.2).

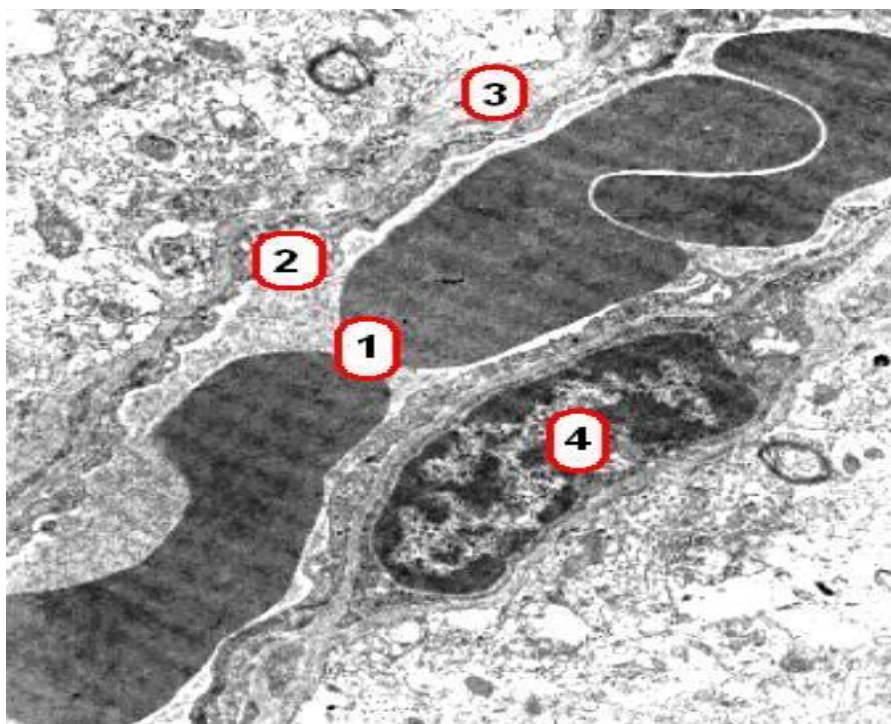


Рис. 3.2 Ультраструктура капилляра гипоталамуса контрольной крысы х 6000. 1 – эритроцит в просвете капилляра; 2 – эндотелиоцит; 3 – базальная мембрана; 4 – ядро перицита.

Эндотелиальные клетки не обладают ни порами, ни фенестрами. Сосед-

ние клетки часто черепицеобразно накладываются одна на другую. В области стыков обнаруживаются контакты типа десмосом и непрерывных соединений. Эндотелиоциты имеют постоянный, довольно ровный контур. Микроворсинки у них обнаруживаются редко, базальные выросты отсутствуют.

Базальная мембрана выражена хорошо, толщина ее равномерна (около 500 нм), она представлена осмиофобным матриксом с равномерно расположенными в нем осмиофильными фибриллами. В дубликатуру базальной мембраны заключены отростчатые перициты, которым приписываются функции продуцирования вещества базальной мембраны, механические, а также фагоцитарные функции.

Эндотелий вместе с базальной мембраной и перицитами, а также отростки астроглии, окружающей капилляр, составляют, по современным представлениям, морфологическую основу гематоэнцефалического барьера [232, 233]. В связи с этим в наших исследованиях мы обратили особое внимание на ультраструктурные перестройки именно в этих основных элементах ГЭБ при РЭХВ.

3.2 Влияние ритмических экстремальных холодовых воздействий (-120 °С) на структурно-функциональные особенности гипоталамуса молодых крыс

По морфологическим критериям можно условно выделить 3 этапа или стадии центрального действия периодического экстремального охлаждения, которые возможно отвечают разным уровням проницаемости ГЭБ.

После 3 сеансов РЭХВ в капиллярном эндотелии наблюдается усиление процессов неспецифического пиноцитоза всех известных видов и их комбинаций с соответствующими изменениями люминальной плазматической мембраны эндотелиоцитов (появляются микровилли, инвагинации, прикрепленные и свободные пиноцитозные везикулы и формирование мультивезикулярных комплексов) Процесс трансцитоза является энергозависимым, поэто-

му сопровождается активацией митохондрий [234]. Пероксидаза хрена, которая маркирует пиноцитоз, обнаруживается за базальной мембраной (рис. 3.3).

Неспецифический пиноцитоз протекает параллельно с рецептор-индуцированным трансцитозом, о чем свидетельствует увеличение количества «опушенных» везикул (рис. 3.4), что подтверждается данными [235].

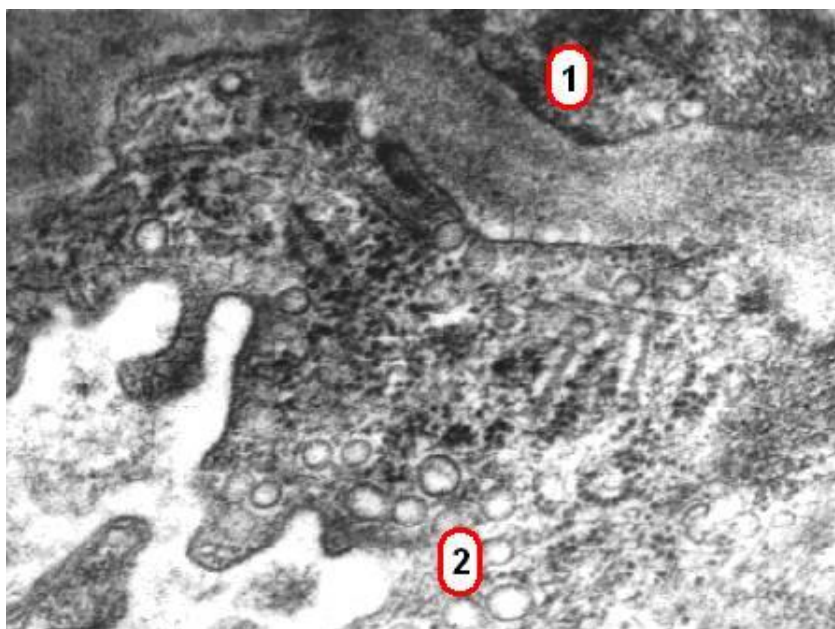


Рис. 3.3 Активация пиноцитоза в капиллярном эндотелии гипоталамуса молодой крысы x 30000. 1 – маркер пиноцитоза; 2 – пиноцитозные везикулы.

Активация трансцитоза приводит к повышению проницаемости ГЭБ [236].

После 6 сеансов РЭХВ отмечается дальнейшее усиление процессов пиноцитоза. Реактивность сосудистого эндотелия повышается за счет значительных перестроек цитоскелетно-мембранных взаимодействий, сопровождающихся образованием больших кольцевидных выростов плазмолеммы, которые захватывают агрегаты белков плазмы крови, а вместе с ними и вазоактивные вещества, которые могут связываться не только с мембранными, но и со свободными рецепторами плазмы.

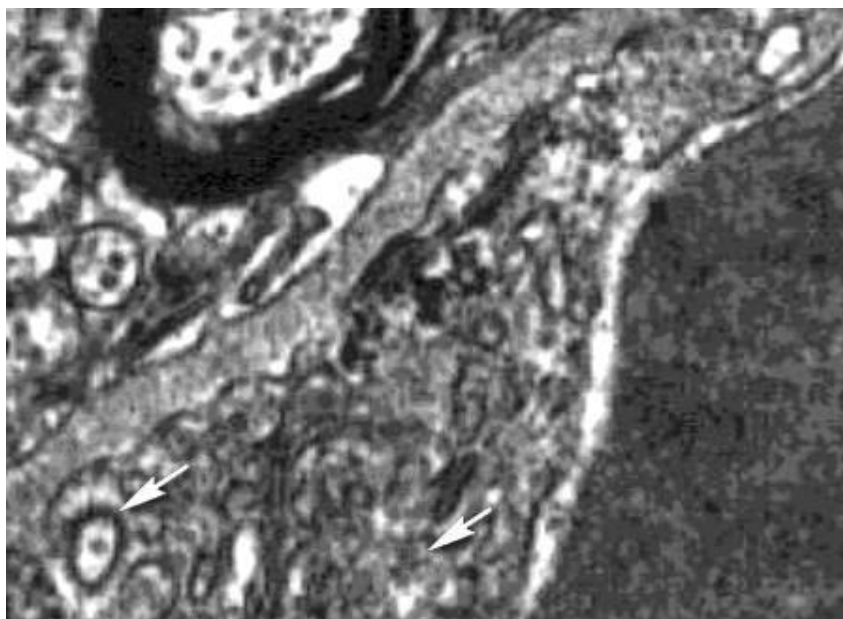


Рис. 3.4 Ультраструктура фрагмента цитоплазмы эндотелиоцита с опушенными эндоцитозными везикулами (стрелки) x 50000.

Наши данные подтверждают такую возможность, так как гистохимически аденилатциклазная активность была выявлена в кольцевидных выростах эндотелиоцитов (рис. 3.5), а системное введение норадреналина имело ярко выраженное центральное действие – отрицательный кардиотропный эффект, что выражалось в замедлении частоты сердечных сокращений.

Хорошо известно, что функциональная активность сосудистого эндотелия регулируется не только гуморальными факторами, но и нейротрансмиссивными механизмами [237]. Установлено, что уже после трёх сеансов РЭХВ у части нейронов синаптический аппарат находится в состоянии повышенного функционального напряжения, в постсинаптических областях наблюдается образование субповерхностных цистерн, характерных для явления долговременной потенциации (рис. 3.6).

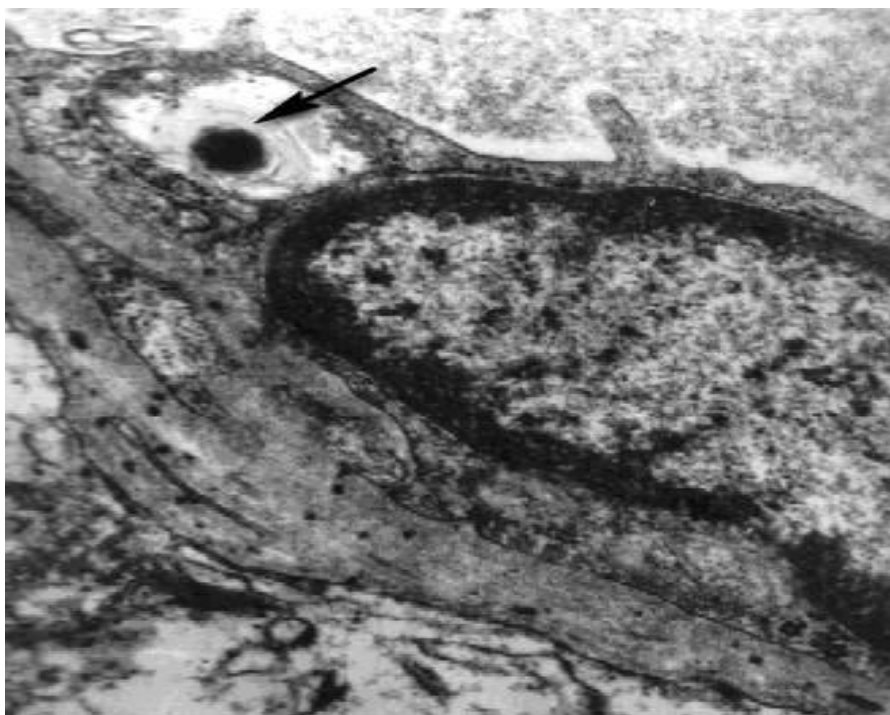


Рис. 3.5 Ультраструктура фрагмента капиллярной стенки гипоталамуса молодой крысы. Электронноплотный продукт гистохимической реакции на аденилатциклазу (стрелка) x 20000.

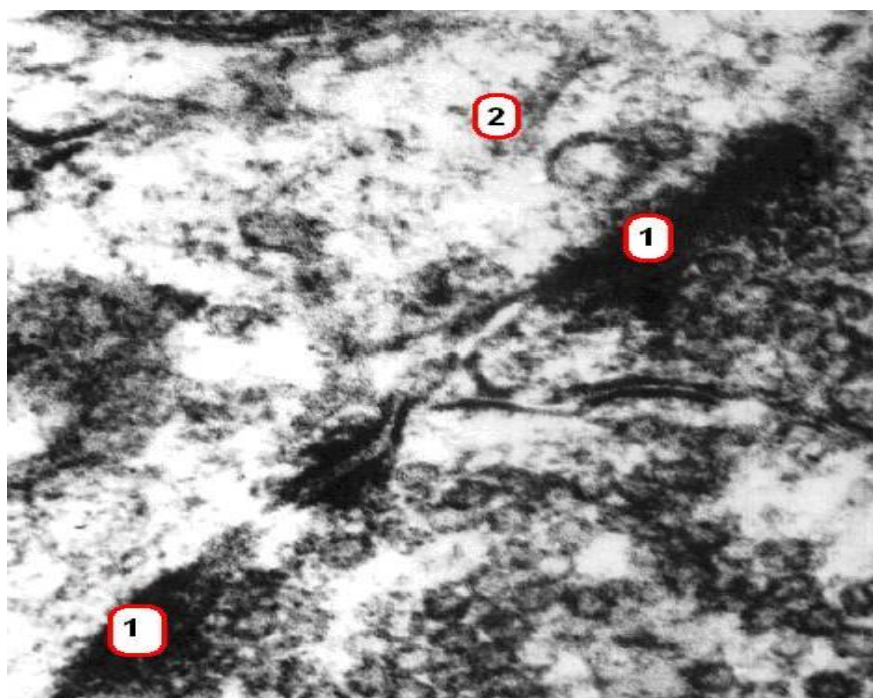


Рис. 3.6 Ультраструктура синапсов гипоталамуса молодой крысы после 3 сеансов РЭХВ. 1 – активная зона синапсов; 2 – субповерхностная цистерна.

Инициация процесса долговременной потенциации подтверждается и модельными электрофизиологическими исследованиями [238-240] по ритмическому холодовому раздражению периферического аппарата терморепрециции. В этих условиях, как и при РЭХВ, не происходит общего охлаждения организма.

Мы считаем, что лечебное действие экстремальной криотерапии в ряде случаев может быть связано с модификацией процессов физиологического действия монооксидов азота и углерода [241, 242]. Недостаточный синтез оксида азота приводит к свободно-радикальному повреждению мембран, избыточный синтез NO обуславливает апоптозную гибель клеток и лишь концентрация оксида азота, порядка нескольких наномолей, оказывается оптимальной для процессов жизнедеятельности. Снижение концентрации оксида азота является одним из механизмов старения организма, оно приводит к повышению риска развития артериальной гипертензии, атеросклероза, снижению противоопухолевой и противомикробной активности иммунной системы, к угнетению сексуальной функции. Возможные перспективы использования разных режимов экстремальной криотерапии в гериатрии определило цель и задачи следующей серии экспериментов.

3.3 Ультраструктура гипоталамуса контрольных старых крыс

Критериями старения собственно ткани мозга могут служить: динамика численности клеток; соотношение в их ультраструктуре деструктивных и адаптационных изменений; степень снижения количества и нарушения структуры синапсов; особенности нейрон-глия-сосудистых взаимоотношений и др. [244, 245].

Традиционно основные нарушения функционирования ЦНС при старении принято связывать с уменьшением числа нейронов, изменением глиального индекса и иных соотношений между количеством различных клеток ткани головного мозга. Исследования, выполненные на различном методиче-

ском уровне, в основном, подтверждают это положение, однако, полученные в последние годы данные опровергли его универсальность и однозначность [19, 246-248]. Тем не менее, для понимания структурных основ поддержания функций нервной ткани при старении большинством исследователей признается важное значение выяснения возрастных особенностей нейрон - глия - капиллярных взаимоотношений, некоторая оптимизация которых возможна при различных режимах холодовых воздействий на организм [236].

Учитывая данные [234, 249, 250], в наших морфологических исследованиях по влиянию экстремальной криотерапии на организм 24-мес крыс мы обратили особое внимание именно на состояние этого звена основных клеточных элементов ткани переднего и заднего отделов гипоталамуса и их количественные соотношения.

Так, у 24-мес крыс по сравнению с 6-мес животными наблюдается уменьшение числа нейронов. В заднем отделе гипоталамуса эти изменения выражены в большей степени, чем в переднем, при этом содержание олигодендроцитов, астроцитов и микроглии существенно не изменяется, как в переднем, так и в заднем отделах гипоталамуса (рис. 3.7, 3.8).

В изученных ядрах гипоталамуса число свободных глиоцитов уменьшается, а сателлитов – увеличивается. Нарастает число нейронов с сателлитами, а также число сателлитов вокруг одного нейрона. Увеличение количества глиоцитов наблюдается и в окружении кровеносных капилляров. По нашим данным достоверного изменения плотности капилляров в изученных областях гипоталамуса у 24-мес крыс не происходит. Однако в заднем отделе имеется тенденция к уменьшению количества эндотелиоцитов в расчете на единицу длины стенки капилляров.

Большое значение имеет исследование возрастных изменений структуры ядер клеток мозга, поскольку пусковые механизмы старения в значительной мере определены генетически. У 24-мес крыс наблюдаются изменения объема, формы и структуры ядер нейроглии (рис. 3.9), нейронов (рис. 3.10), эндотелиоцитов, перицитов гипоталамуса.

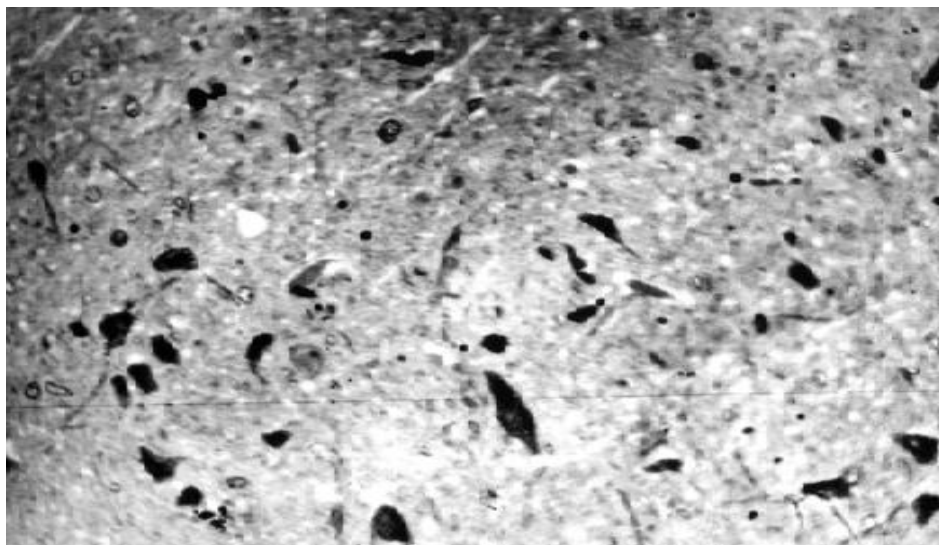


Рис. 3.7 Нервная ткань переднего отдела гипоталамуса 24-х месячной крысы. Полутонкий срез. Окраска толуидиновым синим x 120.



Рис. 3.8 Нервная ткань заднего отдела гипоталамуса 24-х месячной крысы. Полутонкий срез. Окраска толуидиновым синим x 120.

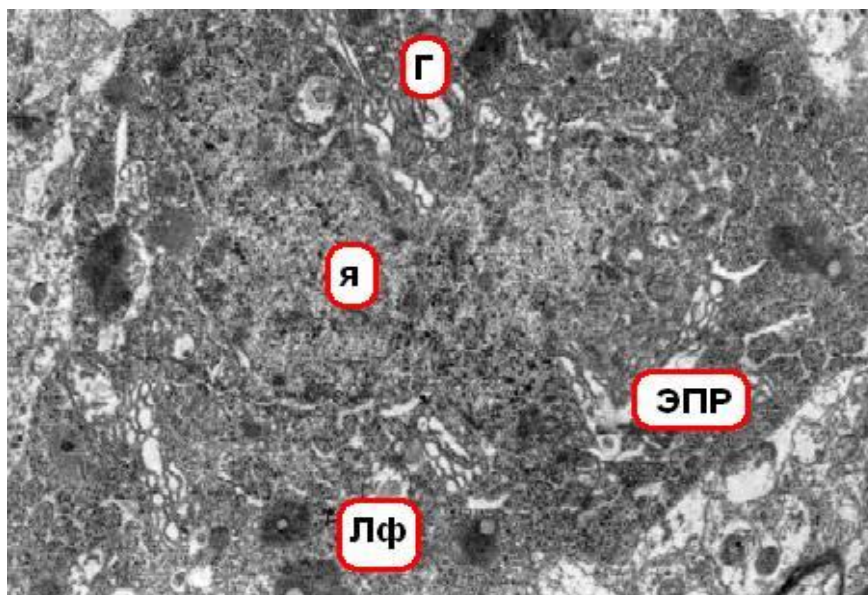


Рис. 3.9 Ультраструктура олигодендроцита из гипоталамуса 24-х месячной крысы. Я – ядро; Лф – липофусциновые включения; Г – комплекс Гольджи; М – митохондрии; ЭПР – эндоплазматический ретикулум x 8000.

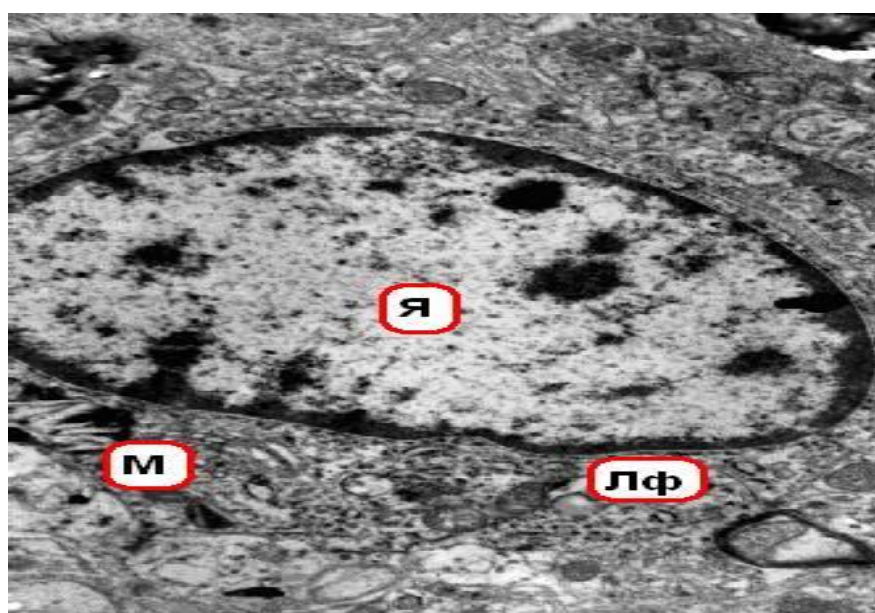


Рис. 3.10 Ультраструктура нейрона гипоталамуса 24-х месячной крысы. Я – ядро; Лф – липофусциновые включения; М – митохондрии. x 8000.

Отмечено уменьшение объема ядер нейронов особенно в заднем отделе гипоталамуса как за счет уменьшения относительного количества нейронов с

крупными ядрами, так и за счет увеличения числа нейронов с мелкими ядрами. Характерным признаком старения нейрон-глиально-эндотелиального ансамбля является увеличение складчатости их ядерной поверхности в связи с инвагинациями кариолеммы. При этом в инвагинированных участках цитоплазмы, обрамленных кариолеммой, иногда обнаруживаются митохондрии, а также множество рибосом и полисом.

На наружной ядерной мембране, связанной с гранулярным эндоплазматическим ретикулумом, как правило, много рибосом, что свидетельствует об усиленном синтезе белка в этих клетках. Такие изменения конфигурации ядер мы рассматриваем как проявление адаптационных реакций, которые приводят к увеличению площади контакта ядра и цитоплазмы для поддержания определенного уровня метаболизма и компенсации возрастных нарушений.

Возрастные нарушения белоксинтезирующей функции нейронов сопровождаются часто изменениями размеров ядрышек. В изученных нами областях мозга старых крыс наряду с уменьшенными в размерах ядрами отмечено и уменьшение ядрышек. Однако в переднем и заднем гипоталамусе этих животных иногда наблюдаются крупные клетки с гипертрофированными ядрами и ядрышками. Обычно гипертрофированные ядрышки располагались в ядрах нормального размера с множественными инвагинациями кариолеммы и занимали эксцентрическое положение в непосредственной близости от ядерной мембраны. Определялись также двуйдрышковые ядра. Гипертрофию ядер и ядрышек можно рассматривать как одно из проявлений адаптационных перестроек, направленных на поддержание синтеза белка.

Одним из ключевых факторов старения является гетерохроматизация ядер. В переднем и заднем гипоталамусе мы наблюдали нарастание доли гетерохроматина и снижение количества эухроматина, которое было неодинаково выражено в клетках разного типа.

Характерным ультраструктурным проявлением стареющего мозга считается появление внутриядерных включений, отличающихся морфологическим

разнообразием. Они локализуются практически во всех типах клеток нервной ткани: нейронах, глиоцитах, эндотелиоцитах и перицитах капилляров. В переднем и заднем гипоталамусе мы наблюдали внутриядерные включения фибриллярного строения, представляющие собой пучки филаментов, петлеобразные и жгутовидные структуры, а также вакуолеобразные включения различных размеров и липидные капли. В клетках гипоталамуса старых животных мы определяли также ложные внутриядерные включения, являющиеся в действительности глубокими инвагинациями в ядро участков цитоплазмы. Наблюдаемые разнообразные внутриядерные включения являются морфологически и функционально неоднозначными и могут являться структурными проявлениями как адаптационных перестроек стареющего мозга, так и проявлениями деструктивных процессов [19, 246, 247].

При старении происходят существенные изменения органоидов цитоплазмы, прежде всего в энергообеспечивающих и белоксинтезирующих структурах. На электронно-микроскопическом уровне в клетках переднего и заднего отделов гипоталамуса отмечаются редукция, расширение и фрагментация цистерн гранулярного ЭПР, уменьшение количества рибосом на его мембранах, а также свободных рибосом и полисом, что вместе с наблюдаемым расширением перинуклеарного пространства может свидетельствовать о снижении синтеза белка.

В гипоталамических нейронах мы не наблюдали значительных изменений гранулярного ЭПР и комплекса Гольджи. Иногда отмечалась некоторая фрагментация, расширение профилей цистерн, что может свидетельствовать о возрастных изменениях. Кроме того, у части нейронов заднего отдела гипоталамуса наблюдалась гипертрофия и гиперплазия мембранного и везикулярного компонентов комплекса Гольджи, что можно рассматривать как проявления адаптационных процессов.

Известно, что митохондрии являются наиболее лабильными органеллами клетки, первыми реагирующими на различные воздействия путем структурных перестроек и изменения метаболической активности. По нашим дан-

ным митохондрии нейронов, глиальных и др. клеток гипоталамуса сильно страдают при старении. При этом ультраструктурные изменения этих органелл отличаются полиморфизмом. У части митохондрий наблюдается незначительное просветление матрикса с сохранением четкости крист, что свидетельствует скорее о повышении их функциональной активности. Значительная часть митохондрий характеризуется резким набуханием и разрушением крист, образованием больших вакуолей, спирализацией внутренней митохондриальной мембраны, формированием миелиноподобных фигур. Наряду с этим обнаруживаются митохондрии с уплотненным матриксом и несколько расширенными кристами. Эти изменения следует отнести к деструктивным (рис. 3.11).

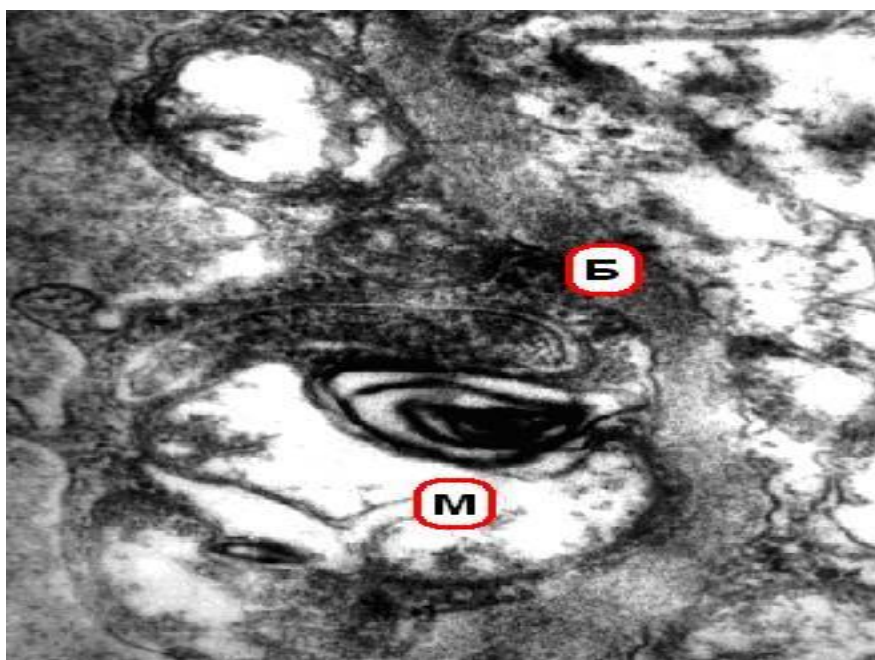


Рис. 3.11 Ультраструктура фрагмента эндотелиоцита капилляра гипоталамуса 24-х месячной крысы. М – митохондрии; Б – базальная мембрана. х 30000.

Однако в клетках исследуемых областей гипоталамуса достаточно хорошо выражены и компенсаторные изменения митохондрий, проявляющиеся в гиперплазии и гипертрофии этих органелл с сохранением наружной и внутренней мембран (рис. 3.12).

Деструкция митохондрий, мембран ЭПР и комплекса Гольджи сопровождается значительным накоплением в нейроглиальных комплексах липофуцина – конечного продукта перекисного окисления липидов, что можно считать наиболее характерным, постоянным и универсальным признаком старения нервной системы.

В отростках нейронов гипоталамуса и их специализированном аппарате, осуществляющем восприятие, передачу и трансформацию нейротрансмиттерных потоков в информационные взаимодействия, грубых ультраструктурных изменений у 24-х месячных крыс мы не обнаружили (рис. 3.13).

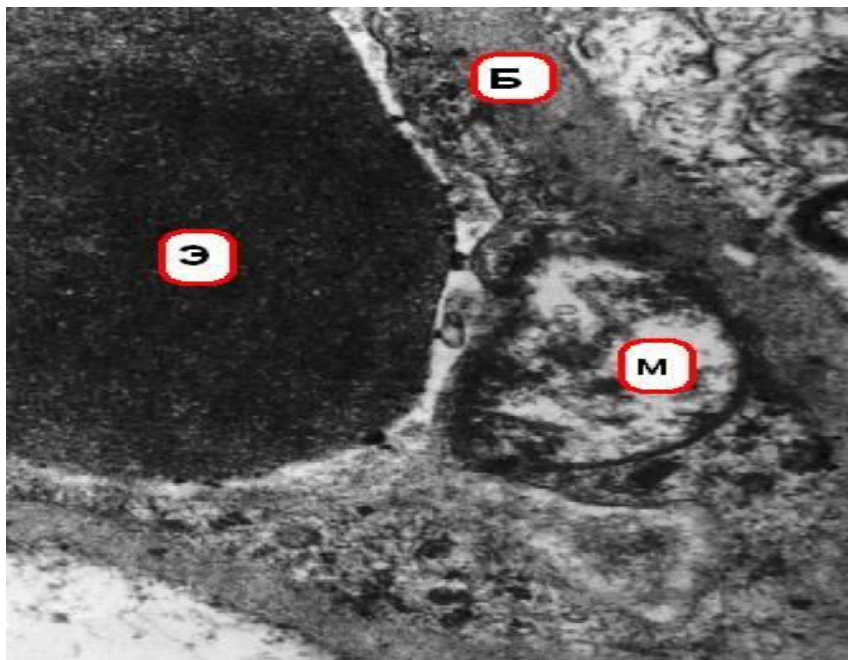


Рис. 3.12 Ультраструктура фрагмента эндотелиоцита капилляра гипоталамуса 24-х месячной крысы. М – митохондрия; Б – базальная мембрана; Э – эритроцит в просвете капилляра x 20000.

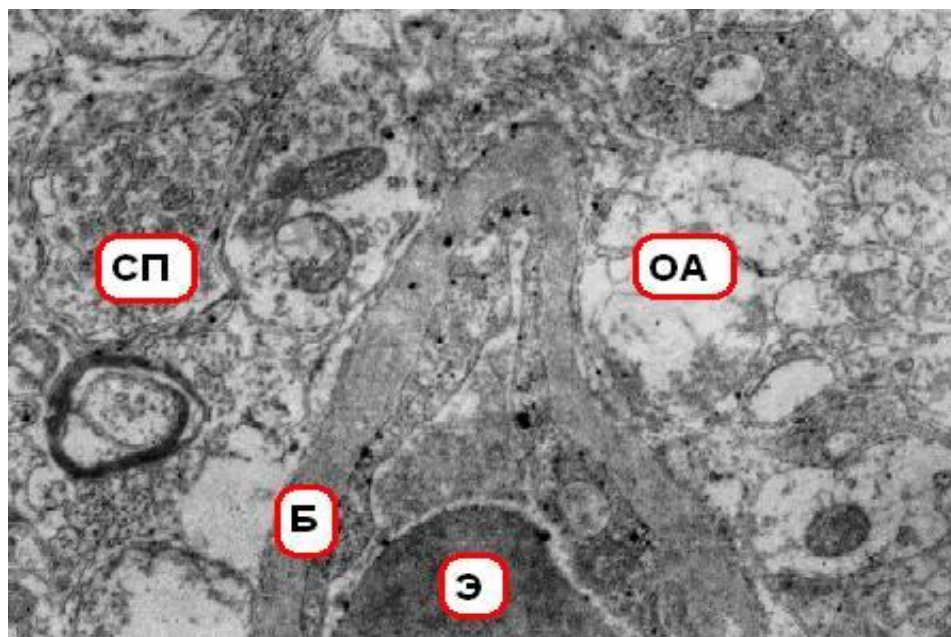


Рис. 3.13 Ультраструктура участка ткани гипоталамуса 24-х месячной крысы. Б – базальная мембрана; Э – эритроцит в просвете капилляра; СП – синаптические пузырьки; ОА – отростки астроцитов x 15000.

При этом необходимо отметить отсутствие выраженных изменений большинства аксонов наряду с большей ранимостью дендритов.

Изредка наблюдалось уменьшение числа нейрофиламентов и увеличение количества микротрубочек и их плотных скоплений. В миелиновых оболочках гипоталамуса происходило расслоение, появление мультивезикулярных телец и сфероидных структур.

Возрастные изменения миелинизированных аксонов могут приводить к изменению скорости и характера проведения нервных импульсов, к уменьшению скорости аксоплазматического переноса [19]. В качестве наиболее характерных возрастных изменений дендритов гипоталамуса 24-х месячных крыс можно отметить их вакуолизацию, набухание, появление миелиноподобных структур, нарушение ориентации микротрубочек и нейрофиламентов, фрагментацию или полное отсутствие нейрофиламентов. В набухших дендритах иногда обнаруживались аномальные включения в виде гомогенных, мембранных или миелиноподобных структур. Причем, более заметные

изменения характерны для крупных дендритов по сравнению с мелкими. Поскольку дендриты и их шипики представляют собой постсинаптические элементы синаптических терминалей, их возрастные изменения могут приводить к существенным нарушениям синаптического аппарата. Синаптические контакты являются очень динамичной и пластичной структурой, нейрохимические, физиологические и функциональные характеристики которой меняются на протяжении жизни и при различных воздействиях окружающей среды [251-254]. При старении крыс мы наблюдали уменьшение числа синапсов и общей протяженности зон синаптических контактов в большей степени в заднем отделе гипоталамуса. Наблюдались также увеличение количества включений (везикулярных и мембранных структур, плотных телец и липосом), увеличение количества уплощенных пузырьков и снижение общего числа синаптических везикул (рис. 3.14).

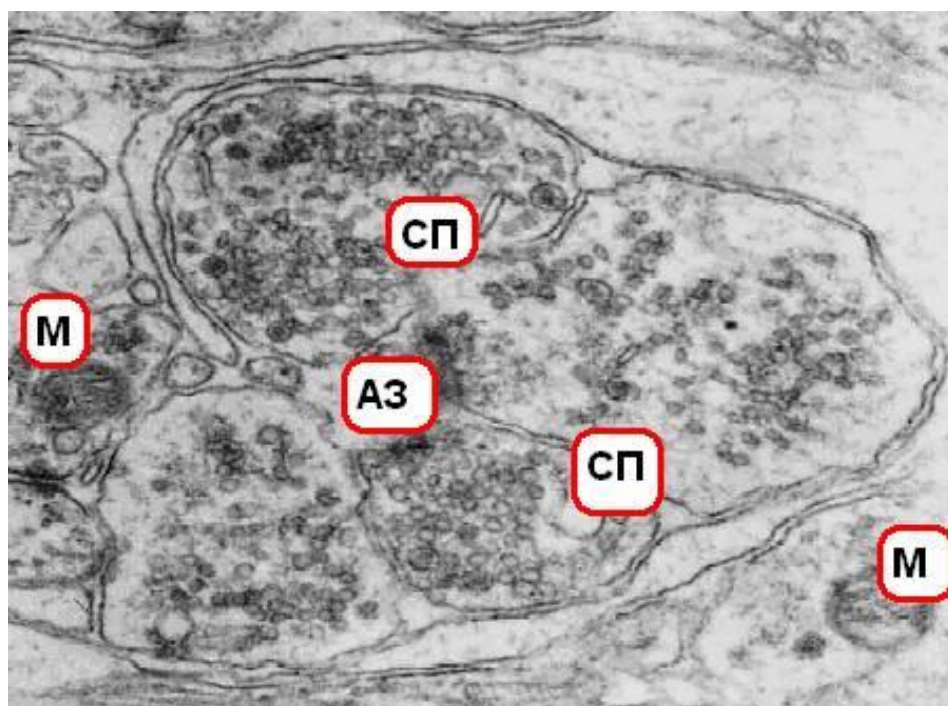


Рис. 3.14 Ультраструктура синаптического аппарата гипоталамуса 24-х месячной крысы. М – митохондрии; СП – синаптические пузырьки; АЗ – активная зона синаптического контакта x 20000.

В переднем отделе гипоталамуса в пресинаптических окончаниях иногда появляются сотоподобные структуры, свидетельствующие о перестройках деструктивного плана. Тем не менее, наши данные говорят о том, что общая синаптическая организация переднего и заднего отделов гипоталамуса 24-х месячных крыс не отличается от 6-ти месячных животных, что свидетельствует о сохранении достаточного уровня пластичности высших вегетативных центров организма при старении.

3.4 Влияние ритмических экстремальных холодовых воздействий (-120 °C) на структурно-функциональные особенности переднего и заднего отделов гипоталамуса старых крыс

Установлено, что уже после 3 сеансов РЭХВ у части нейронов, находящихся вблизи кровеносных сосудов, выявляются реактивные изменения: повышается насыщенность матрикса и многих органелл, наблюдается активация комплекса Гольджи, приводящая к образованию пузырьков и гранул, появляются лизосомы, часто неправильной формы, многочисленные митохондрии и рибосомы. Синаптический аппарат находится в состоянии повышенного функционального напряжения: везикулы сливаются между собой и с синаптической мембраной.

Возрастают протяженность и электронная плотность зон синаптических контактов, увеличивается средняя длина активной зоны (рис. 3.15).

Необходимо отметить, что обнаруженные изменения ультраструктуры нейронов наиболее выражены в переднем отделе гипоталамуса, в области которого, как известно, располагаются нервные клетки, активирующиеся при температурных воздействиях, поэтому показанные нами реактивные изменения части нейронов могут косвенно свидетельствовать об их принадлежности к пулу термокомпетентных клеток.

При РЭХВ наблюдаются изменения клеток микроглии, выражающиеся в активизации их органелл, вакуолизации аппарата Гольджи, образовании электронноплотных гранул в цитоплазме, вакуолей и лизосом.

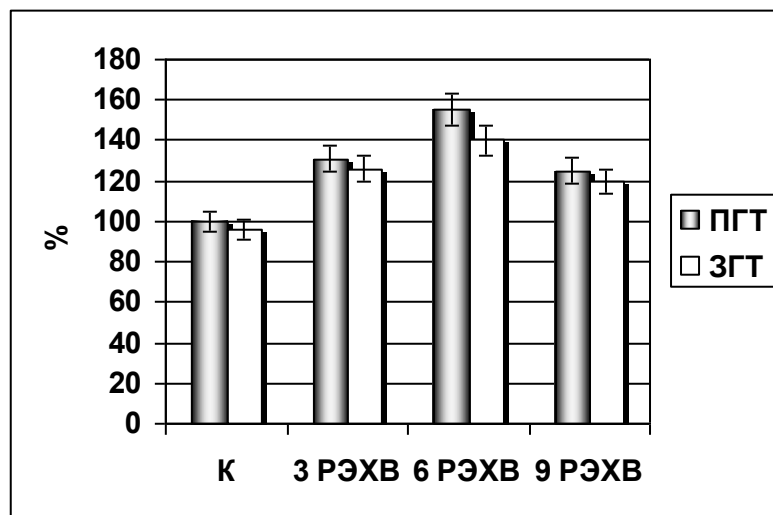


Рис. 3.15 Средняя длина активной зоны синаптического контакта в гипоталамусе 24-х месячных крыс в динамике РЭХВ

Здесь и далее: К – контроль; 3, 6, 9 РЭХВ – количество сеансов охлаждения. ПГТ – передний отдел гипоталамуса; ЗГТ – задний отдел гипоталамуса. Морфометрические показатели ПГТ в контроле приняты за 100%.

Примечание: все показатели после 3, 6, 9 РЭХВ достоверны ($p < 0,05$) по отношению к контролю.

Экстремально низкие температурные воздействия оказывают заметное влияние на ультраструктуру астроглии, особенно это касается отростков астроцитов, окружающих терминальные сосуды. После 3-6 сеансов РЭХВ отмечено снижение электронной плотности концевых ножек, напоминающее некоторые признаки отека, исчезающие после 9 сеанса РЭХВ (рис. 3.16).

Многие исследователи считают, что именно астроциты способствуют поддержанию в эндотелиальных клетках капилляров мозга особой ультраструктурной организации, обеспечивающей функционирование ГЭБ. Предполагают, что астроцитарная глия индуцирует формирование плотных контактов, специфических ферментов ГЭБ и подавляет пиноцитоз, формирование эндотелиальных каналов и фенестр [144]. Если это так, тогда отмеченные

реактивные изменения в астроцитах при РЭХВ должны привести к соответствующим перестройкам во всех основных ультраструктурных элементах ГЭБ.

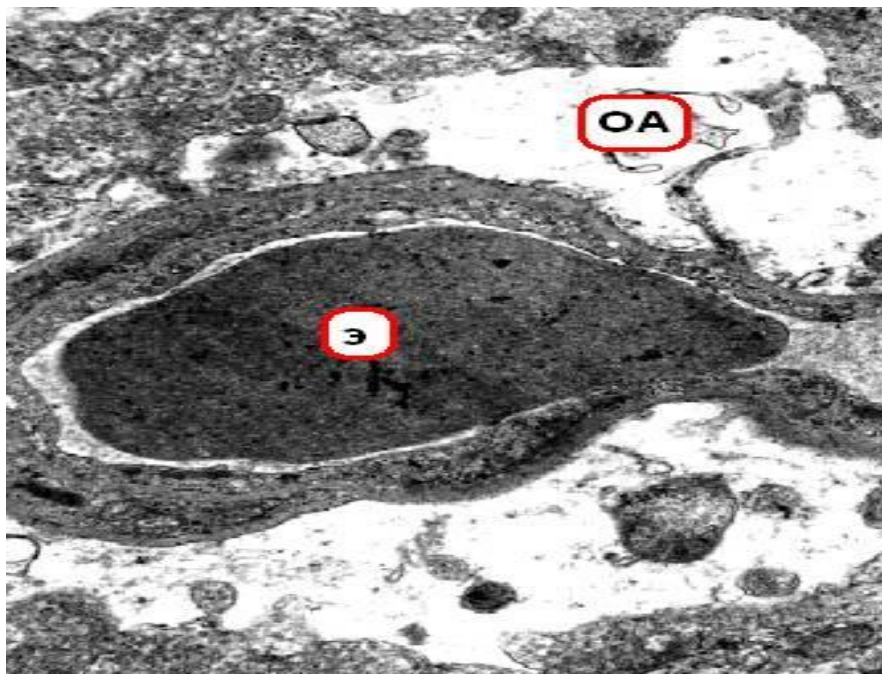


Рис. 3.16 Ультраструктура элементов ГЭБ гипоталамуса 24-х месячной крысы после 6 сеансов РЭХВ. Э – эритроцит в просвете капилляра; ОА – отростки астроцитов x 12000.

Действительно, наиболее существенные изменения отмечены нами в ультраструктуре эндотелиоцитов, их плотных контактов и окружающей сосуд базальной мемbrane.

После 3 сеансов РЭХВ происходит некоторое уменьшение толщины базальной мембраны. После 6 сеансов РЭХВ этот показатель увеличивается и после 9 сеансов РЭХВ на 30-40% превышает контрольные значения. Интересно отметить, что в капиллярах переднего отдела гипоталамуса толщина базальной мембраны увеличивается на 30-40% больше, чем в капиллярах заднего отдела (рис. 3.17).

Гель базальной мембраны, образованный гликозаминогликанами, созда-

ет молекулярный и электростатический фильтр, обеспечивающий селективную проницаемость мембраны для отрицательно заряженных молекул, кроме того, протеоглики обладают осмотической активностью, которая также регулирует проницаемость. Все это позволяет рассматривать базальную мембрану в качестве дополнительного регулятора функциональной активности ГЭБ [255]. Вариации площади базальной мембраны, по нашему мнению, могут отражать изменение степени полимеризации гликозаминогликанов и влиять на уровень проницаемости ГЭБ.

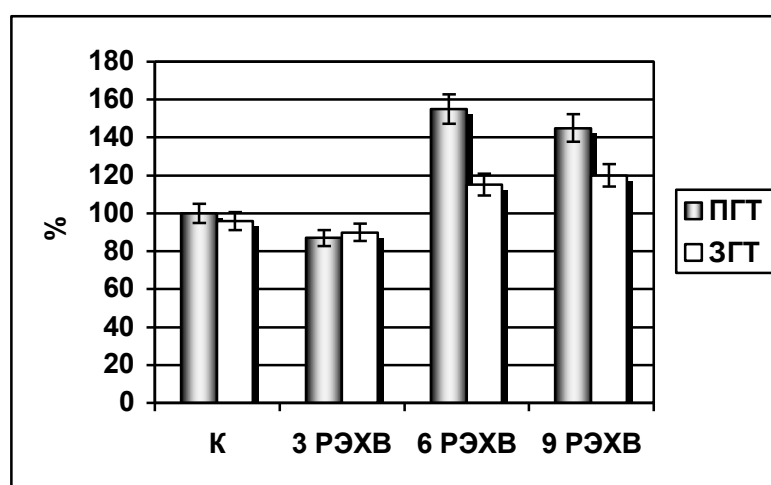


Рис. 3.17 Средняя толщина базальной мембраны капилляров гипоталамуса 24-х месячных крыс в динамике РЭХВ.

Примечание: показатели после 6, 9 РЭХВ достоверны ($p < 0,05$) по отношению к контролю.

При РЭХВ так же изменяется площадь эндотелиальной клетки. После первых сеансов РЭХВ относительная площадь эндотелиоцита увеличивается в 1,5 раза по сравнению с контролем (рис. 3.18). Это увеличение сохраняется в течение последующих сеансов охлаждения, возвращаясь к норме после 9 сеансов РЭХВ. Причем, в заднем отделе гипоталамуса отмечается более значительное увеличение относительной площади эндотелиоцита по сравнению с передним отделом (рис. 3.18).

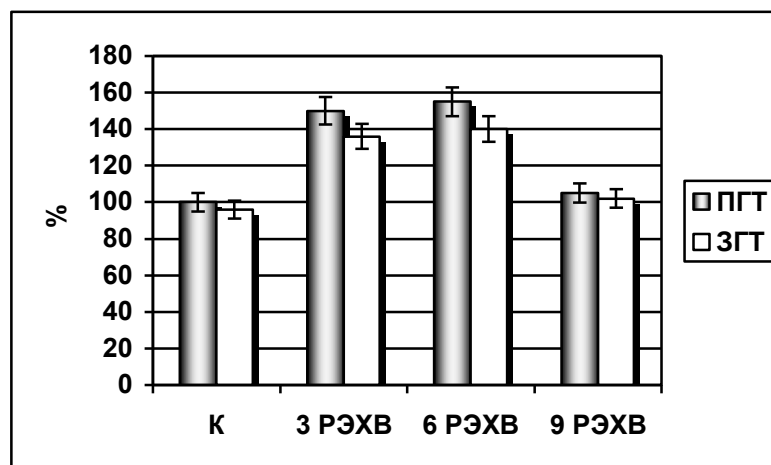


Рис. 3.18 Относительная площадь эндотелиоцитов капилляров гипоталамуса 24-х месячных крыс в динамике РЭХВ.

Примечание: показатели после 3, 6 РЭХВ достоверны ($p < 0,05$) по отношению к контролю.

Существенные изменения при РЭХВ обнаруживает и поверхность эндотелиоцита. На люминальном и аблюминальном контуре появляются многочисленные выпячивания (рис. 3.19). Необходимо отметить, что при РЭХВ увеличивается количество микровиллей на люминальной поверхности эндотелиоцита. В результате этого относительная длина люминальной мембраны на срезах капилляров значительно возрастает (рис. 3.20).

Ультраструктура ядра и цитоплазмы эндотелиальных клеток в условиях РЭХВ близка к нормальной. Отмечена активизация митохондрий, выражающаяся в просветлении матрикса и увеличении их площади.

Характерной особенностью является появление в капиллярном эндотелии переднего и заднего отделов гипоталамуса большого количества эндоцитозных везикул, количество которых возрастает в 2-3 раза по сравнению с контролем (рис. 3.21). Данные изменения возвращаются к норме после 9 сеанса РЭХВ.

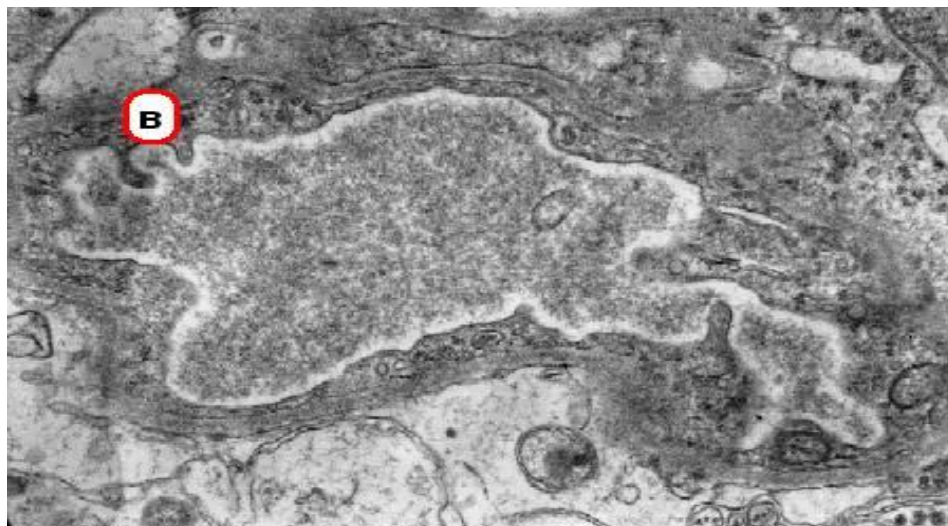


Рис. 3.19 Ультраструктура просвета капилляра гипоталамуса 24-х месячной крысы после 9 сеансов РЭХВ. В – микровилли. х 15000.

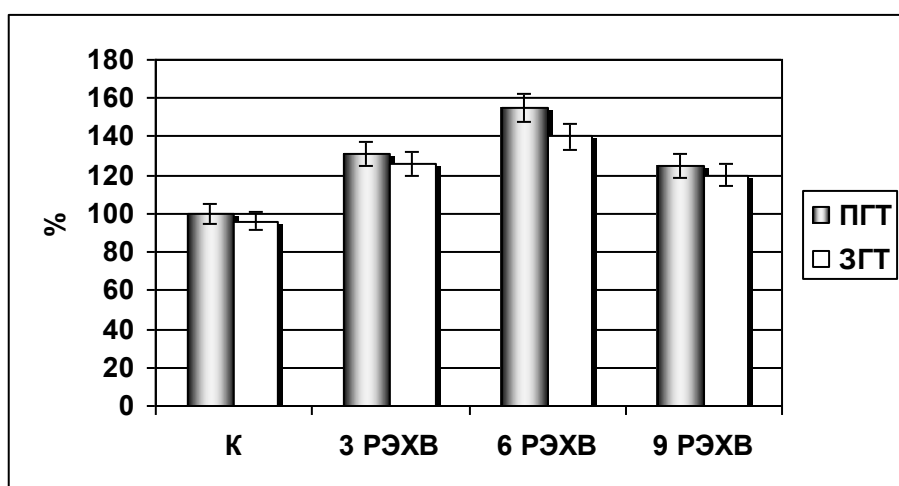


Рис. 3.20 Относительная длина люминальной мембраны эндотелиоцитов капилляров гипоталамуса 24-х месячных крыс в динамике РЭХВ.

Примечание: все показатели после 3, 6, 9 РЭХВ достоверны ($p < 0,05$) по отношению к контролю.

По нашему мнению, наблюдаемые изменения поверхности эндотелиоцитов вместе с увеличением количества и относительной площади эндоцитозных везикул свидетельствуют о развитии процессов пиноцитоза в эндотелиоцитах капилляров гипоталамуса.

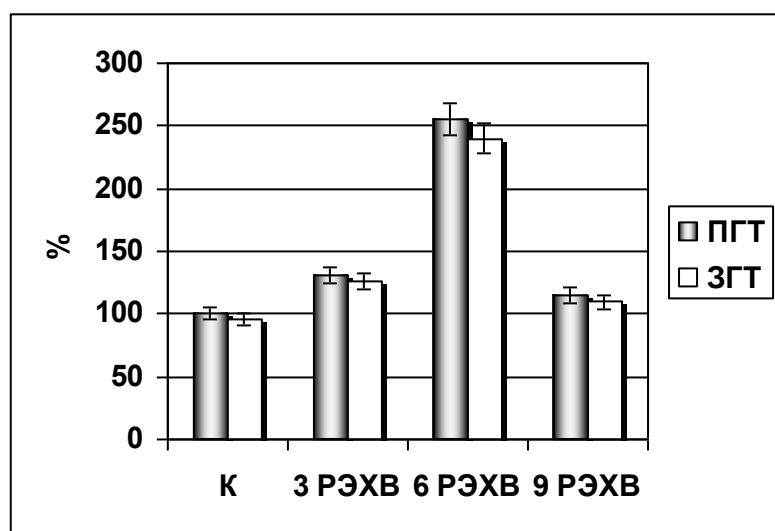


Рис. 3.21 Относительное количество эндоцитозных везикул в цитоплазме эндотелиоцитов капилляров гипоталамуса 24-х месячных крыс в динамике РЭХВ.

Примечание: показатели после 6 РЭХВ достоверны ($p < 0,05$) по отношению к контролю.

На электронных микрофотографиях мы наблюдали все этапы формирования пиноцитозных везикул начиная с инвагинации люминальной мембраны, образования открытой и затем замкнутой везикулы, прикрепленной к люминальной мембране, появление свободных пиноцитозных пузырьков, слияние их между собой, формирование каналов из слившихся везикул, и заканчивая прикреплением везикул к аблюминальной мембране или трансформацией везикул в системе ГЭРЛ (комплекс Гольджи, эндоплазматический ретикулум, лизосомы) с последующей рециклизацией мембраны (рис. 3.22).

Описанные выше изменения ультраструктуры элементов ГЭБ гипоталамуса должны приводить к повышению его проницаемости, причем отмеченные особенности структурных перестроек в переднем и заднем отделах гипоталамуса могут соответствовать различным уровням проницаемости ГЭБ.

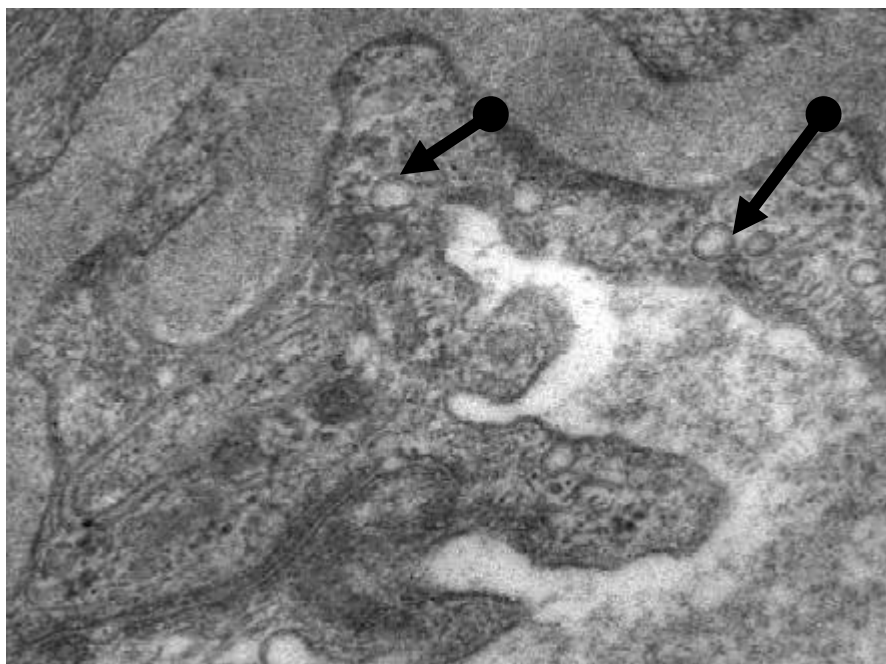


Рис. 3.22 Эндоцитозные везикулы в цитоплазме эндотелиоцита капилляра из гипоталамуса 24-х месячной крысы после 9 сеансов РЭХВ (стрелки) х 30000.

Для оценки изменения проницаемости ГЭБ при РЭХВ мы провели дополнительные серии экспериментов с использованием внутривенного введения пероксидазы хрена. Электронно-микроскопический анализ ультратонких срезов этих образцов гипоталамуса свидетельствует о том, что пероксидаза хрена, являясь маркером пиноцитоза, обнаруживалась в виде электронноплотных включений в составе везикул и в цитоплазматических каналах, образованных, возможно, слиянием таких везикул. Кроме того, отложение гомогенного электронноплотного осадка, образованного пероксидазой хрена, обнаруживалось фрагментарно за базальной мембраной, между концевыми ножками астроцитов, отмечалось увеличение электронной плотности базальной мембраны капилляров.

Необходимо отметить, что в 30% исследованных просветов капилляров мы наблюдали некоторое расхождение контактов между эндотелиальными клетками.

Таким образом, при РЭХВ возникают структурные перестройки во всех

основных звеньях ГЭБ гипоталамуса, приводящие к увеличению его проницаемости для использованного электронноплотного маркера. Однако, при РЭХВ, очевидно, не происходит "прорыв" ГЭБ, который должен был сопровождаться отложением электронноплотных маркеров по всему периметру базальной мембраны, а не фрагментарно, как в наших исследованиях. Отмеченные изменения функциональной активности ГЭБ, являясь физиологически значимыми для процессов центральной терморегуляции, возможно, стимулируют адаптационные механизмы.

По нашему мнению, при РЭХВ включаются нейротрансмиттерные механизмы, изменяющие проницаемость ГЭБ, что приводит к активизации гипоталамических центров терморегуляции.

В наших исследованиях показана активация синапсов S и в большей степени C типа уже после 3 сеансов РЭХВ. Синаптические окончания S типа содержат сферические везикулы низкой электронной плотности диаметром 500 А, медиатором в них, предположительно, является ацетилхолин. Синаптические окончания C типа, напротив, содержат сферические везикулы высокой электронной плотности, снижающейся при активации синапса. Предполагают, что медиаторами в таких синапсах выступают моноамины. К сожалению, идентификация адрен-, норадрен- и серотонергических синапсов по электронно-микроскопическим характеристикам на сегодняшний день затруднительна. Однако мы считаем, что при РЭХВ активируются именно норадренергические синапсы, так как адренергических синапсов в гипоталамусе крайне мало. Кроме того, наш опыт по изучению механизмов действия различных режимов гипотермии и данные литературы свидетельствуют, что при охлаждении существенно (в 2-3 раза) повышается секреция НА в переднем гипоталамусе, незначительно увеличиваясь в заднем отделе, секреция же СТ не изменяется. Сопоставив данные литературы с результатами ультраструктурного анализа о развитии процессов пиноцитоза в клетках капиллярного эндотелия гипоталамуса, можно предположить, что повышение проницаемости ГЭБ для НА обусловлено процессом высокоспецифического адсор-

бционного трансцитоза или рецептор-индуцируемого трансцитоза [16].

Первый этап специфического эндоцитоза представляет собой адсорбцию веществ на гликокаликсе плазмалеммы. На следующем этапе клетки захватывают молекулы лигандов при помощи соответствующих рецепторов плазмолеммы.

Связывание лиганда с рецептором вызывает инвагинации мембраны, которая углубляется, округляется, «слипается», так что НА оказывается в составе специфической эндосомы, называемой «одетой» (окаймленной, опущённой) везикулой. «Одетые» везикулы обнаруживаются в цитоплазме эндотелиоцитов после 3 сеансов РЭХВ, а после 6 сеансов они встречаются в 70% исследованных просветов капилляров, причем в переднем отделе гипоталамуса их в 2,5 раза больше, чем в заднем (рис. 3.23).

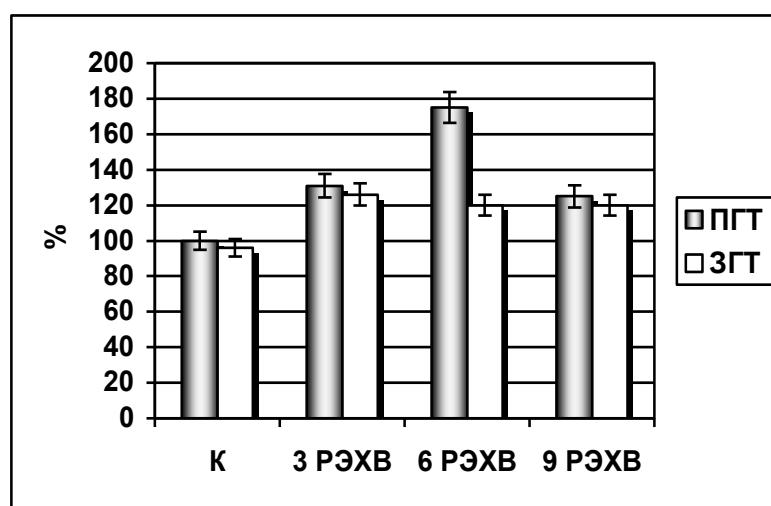


Рис. 3.23 Относительное количество «одетых» эндоцитозных везикул в цитоплазме эндотелиоцитов капилляров гипоталамуса 24-х месячных крыс в динамике РЭХВ.

Примечание: все показатели после 3, 6, 9 РЭХВ достоверны ($p < 0,05$) по отношению к контролю.

Как известно, одетые везикулы на внешней поверхности содержат клатриновую «шубу», представляющую собой корзинчатые структуры с пента- и гексагональными ячейками, образованными в результате полимеризации клатрина. Эти органеллы вариабельны по своим размерам в одной и той же

клетке 650-250 нм в диаметре (рис. 3.24). Считается, что клатриновая «шуба» способствует предохранению содержимого везикулы от лизиса и необходима для обеспечения контакта этих органелл с цитоскелетом и последующего их транспорта в клетку. Анализ ультратонких срезов гипоталамуса выявил большинство этапов образования, трансформации и транспортировки «одетых» везикул в клетках эндотелия (рис. 3.24).

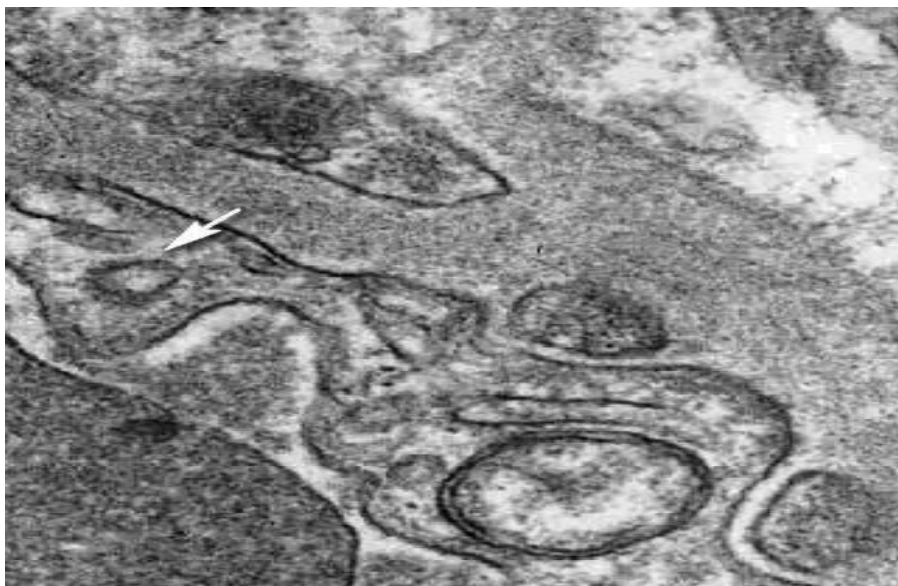


Рис. 3.24 Ультраструктура фрагмента капиллярной стенки из гипоталамуса 24-х месячной крысы после 6 сеансов РЭХВ. «Одетая» везикула (стрелка) х 30000.

По мере проникновения в цитоплазму «одетые» везикулы теряют клатриновую оболочку и сливаются друг с другом или с микропиноцитозными везикулами (в экспериментах с электронноплотными маркерами захватывается пероксидаза хрена). Образуются более крупные пузырьки с гладкой поверхностью, гладкоконтурные везикулы передвигаются в толще цитоплазмы вдоль элементов цитоскелета, в частности, микротрубочек и переносят нейромедиатор к аблюминальной поверхности эндотелиоцита.

Процесс рецептор-индуцированного трансцитоза приводит к повышению проницаемости ГЭБ для нейротрансмиттеров центральной терморегуля-

ции.

Комплекс возрастных изменений нейрогуморальной регуляции не может быть уложен в одну какую-либо схему. Однако обращает на себя внимание сходство многих проявлений старения и стресса [19, 247], когда высказывается предположение, что жизнь следует рассматривать как смену фаз общего адаптационного синдрома. Можно выделить стресс-возраст-синдром, развивающийся при старении. Одни из его компонентов имеют адаптивное, другие – дезадаптивное влияние на организм, способствуя развитию возрастной патологии. В конечном итоге возрастные изменения нейрогуморальной регуляции сокращают надежность гомеостаза. В этих условиях стрессовые ситуации приводят к срыву гомеостаза, к развитию возрастной патологии.

Нарушения гомеостаза во многом возникают из-за «дезинформации» нервных центров о состоянии на периферии, из-за неравномерного изменения различных каналов обратной связи. Основная функция системы нервной регуляции – восприятие, переработка и передача информации. Основной закономерностью старения нервной системы на всех ее уровнях является снижение информационной способности, объективно выявляемое в виде падения лабильности. По мнению ученых киевской научной школы геронтологии, при старении все звенья нервной системы переходят на более низкий уровень лабильности. Закономерность эта настолько общая, что проявляется и на примере сложной интегративной деятельности человека (снижение подвижности процессов, связанных с памятью, эмоциями, поведением), и на примере других функций (замедление автоматизма синусного узла сердца, спонтанной активности сосудов, длительности митотического цикла и числа митозов в единицу времени и др.).

В последние годы в биологии формируется новое научное направление, позволяющее количественно оценивать наиболее общий уровень стабильности, упорядоченности или хаотичности, по сути лабильности функциональных систем организма по показателям мультифрактальной размерности. Для оце-

нки уровня морфофункциональной лабильности ЦНС мы использовали метод фрактальной морфометрии [206].

Расчёт размерности препаратов нейропиля гипоталамуса 6-ти месячных крыс, показал, что в широком масштабе величин (увеличение 120-12000) геометрия мозга имеет фрактальные свойства, характеризуется определённым уровнем хаотичности с персистентной (самоподдерживающейся) динамикой (рис. 3.25).

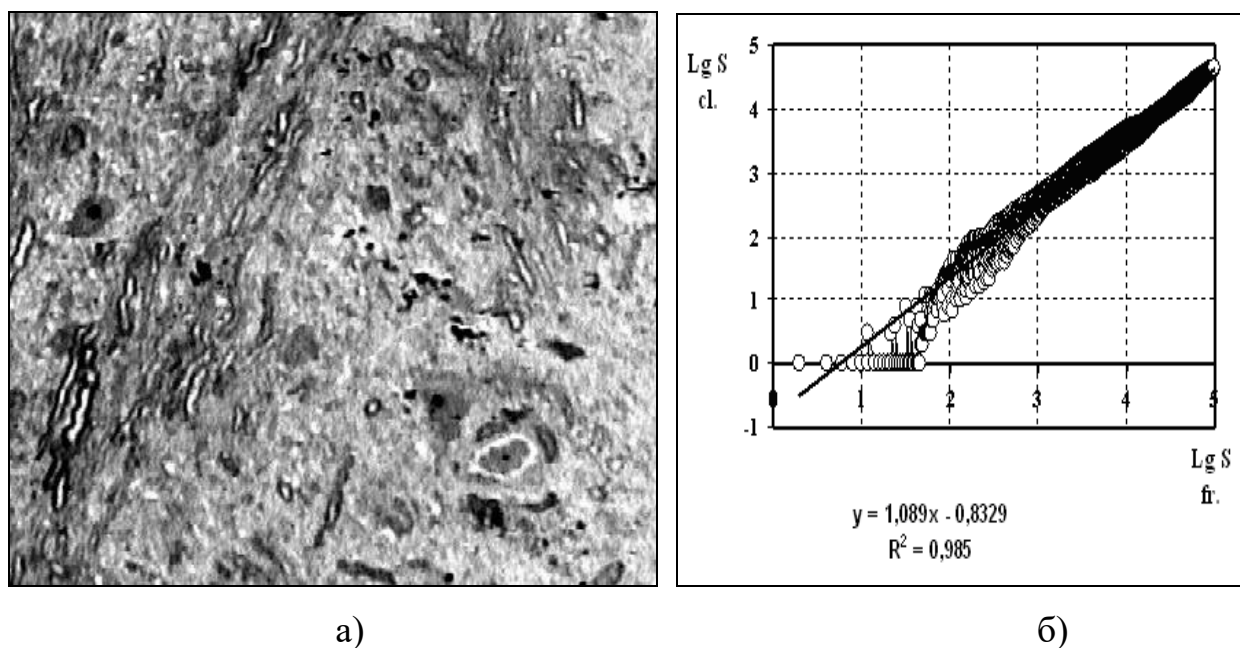


Рис. 3.25 Нейропиль гипоталамуса 6-ти месячной крысы. Полутонкий срез (а). Расчёт фрактальной размерности (б). Окраска толуидиновым синим х 120.

Примечательно, что уже после 3-х сеансов РЭХВ хаотичность архитектуры гипоталамуса повышается, оставаясь, согласно теории обобщенного броуновского движения, в персистентном диапазоне (рис. 3.26). По современным представлениям, в структурно-функциональной организации мозга при определённых условиях могут формироваться морфо-физиологические фрактальные системы. Благодаря избыточной робастности фрактальное функционирование повышает адаптационные возможности системы.

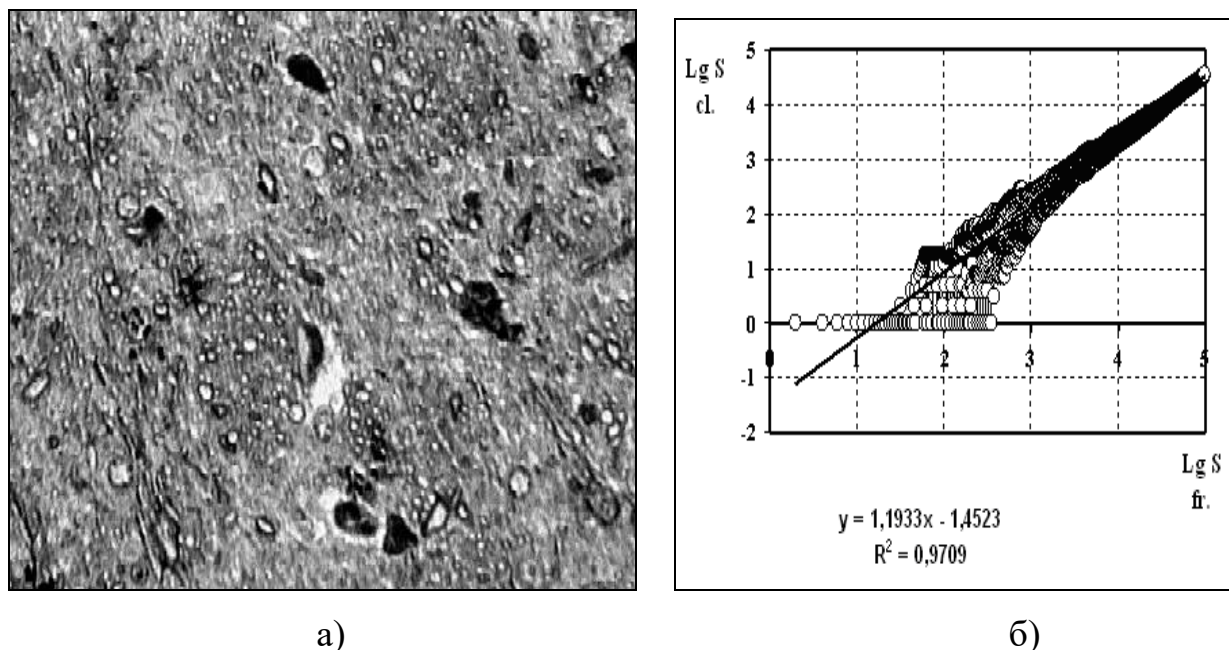
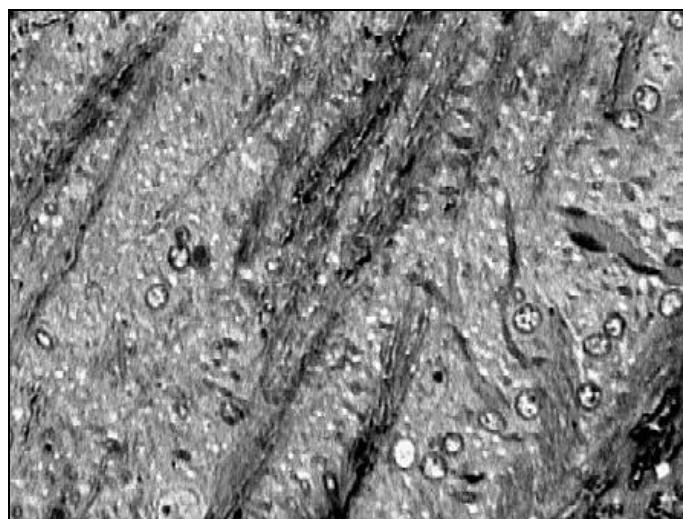


Рис. 3.26 Нейропиль гипоталамуса 6-ти месячной крысы после РЭХВ. Полутонкий срез (а). Расчёт фрактальной размерности (б). Окраска толуидиновым синим х 120.

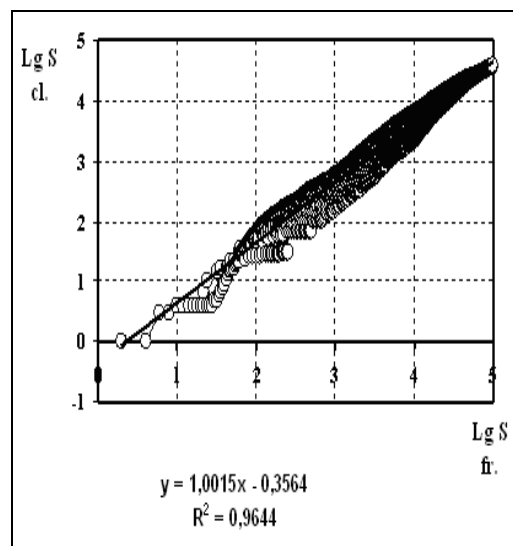
Результаты нелинейной морфометрии препаратов гипоталамуса 24-х месячных крыс показали жесткую детерминированность структурной организации гипоталамуса (рис. 3.27).

С точностью до ошибки метода в архитектонике стареющего мозга отсутствует хаотическая составляющая. По нашему мнению, размерность, лишь в третьем знаке после запятой отличающаяся от эвклидовой, количественно характеризует крайне низкую лабильность структурно-функциональных систем мозга 24-х месячных животных.

Обращает на себя внимание обнаруженный нами интересный феномен восстановления фрактальной («молодой») геометрии мозга после 9 сеансов РЭХВ (рис. 3.28).

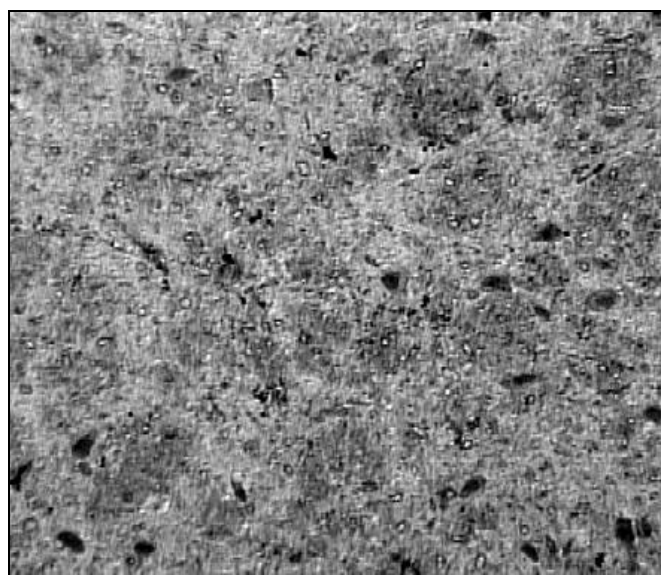


a)

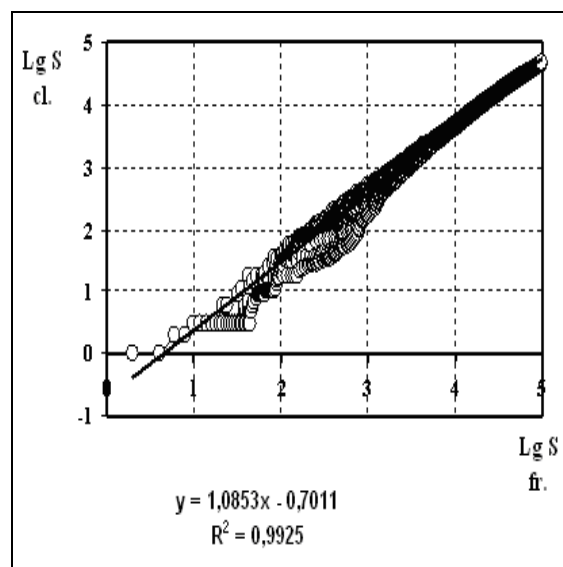


б)

Рис. 3.27 Нейропиль гипоталамуса 24-х месячной крысы. Полутонкий срез (а). Расчёт фрактальной размерности (б). Окраска толуидиновым синим х 120.



a)



б)

Рис. 3.28 Нейропиль гипоталамуса 24-х месячной крысы после РЭХВ. Полутонкий срез (а). Расчёт фрактальной размерности (б). Окраска толуидиновым синим х 120.

Повышение активности норадренергической функциональной системы гипоталамуса в ответ на экстремальное ритмическое охлаждение через систему вторичных и ретроградных мессенжеров инициирует процесс рецептор-индуцированного транцитоза, увеличивающий проницаемость ГЭБ, что час-

тично восстанавливает эффективность функционирования системы обратных связей, разрывается так называемый порочный круг стареющего мозга [19, 247].

Действительно, вслед за возрастной гибелью нейронов остатки последних фагоцитируются клетками глии, что на фоне снижения активности лизосомальных ферментов приводит к накоплению в телах глиоцитов крупных вторичных лизосом и липофусциновых включений. В дальнейшем глиальные макрофаги мигрируют к кровеносным сосудам, у стенок которых располагаются отростки и тела глиоцитов, нагруженные шлаками [19], в результате этого затрудняется обмен между кровью и тканью мозга, что в свою очередь приводит к дальнейшему углублению деструктивных изменений в нейронах, т.е. замыкается патофизиологический круг.

В ответ на затруднение транспорта, вследствие удлинения пути от крови к ткани (утолщение базального слоя капилляров, отек перикапиллярных отростков астроцитов, скопление вокруг обменных сосудов глиальных макрофагов), а также деструктивных процессов, в эндотелиальных клетках происходят перестройки во взаимоотношениях элементов гематоэнцефалического барьера, облегчающие транскапиллярный обмен.

Прежние представления о постепенной гибели сформировавшегося мозга в настоящее время уступают место взглядам, рассматривающим различные возможности поддержания и восстановления нормального функционирования мозга.

Взрослый мозг содержит стволовые клетки, источники предшественников всех основных клеточных элементов – нейронов, астроцитов и олигодендроцитов. Эти пролиферирующие клетки могут заменять гибнущие элементы во взрослом и даже стареющем мозге. Изменения афферентных входов нейронов при РЭХВ приводят к различным типам быстрых компенсаторных морфологических и функциональных перестроек на разных уровнях.

Дозированное экстремальное охлаждение является мощным средством стимуляции функциональной активности ГЭБ. На разных этапах РЭХВ про-

исходят быстрые адаптационные преобразования как на субклеточном уровне в эндотелии капилляров (везикулизация, трансцитоз) так и в нейрон-глия-капиллярных взаимоотношениях (активация базального слоя, разветвление и увеличение обменной поверхности мембран капилляров).

Таким образом, периодические экстремальные криовоздействия приводят к периодическому изменению структурно-функциональной активности ГЭБ, долгосрочной активации синаптического аппарата нейронов гипоталамуса, оптимизации содержания ретроградных мессенджеров, действие которых интегрируется на уровне цитолеммы и рецепторно-цитоскелетного комплекса эндотелиоцитов. Синхронизируется фрактальная организация ультраструктуры и биоритмики мозга, что способствует повышению адаптационных возможностей организма.

3.5 Сравнительная характеристика частоты сердечных сокращений у молодых и старых крыс при различных методах экстремального охлаждения

Считается, что катехоламины не проходят через ГЭБ в связи с особенностями их полярной структуры, малой растворимостью в липидах и наличием ферментного барьера [256, 257]. Однако высокая избирательность ГЭБ для нейромедиаторов не постоянна и в определенной степени зависит от функционального состояния организма.

Введение А или НА в область гипоталамуса вызывает реакции, противоположные их введению в сосудистое русло или внутрибрюшинно, что подтверждается снижением ЧСС, в отличие от учащения ЧСС при введении в кровеносное русло. Это позволило сделать предположение об участии ГЭБ в нейрогуморальной регуляции ряда вегетативных функций [144, 145] и их влиянии на состояние ГЭБ. Следовательно, РЭХВ способны изменять проницаемость ГЭБ, что важно в условиях адаптации в рамках физиологических процессов.

Исходя из этих предпосылок, у молодых и старых крыс изучали эффект действия норадреналина на ЧСС при его внутрибрюшинном введении на фоне различных способов охлаждения.

Установлено, что ЧСС у молодых животных выше, чем у старых. Внутрибрюшинное введение НА достоверно увеличивало ЧСС как у молодых, так и у старых контрольных крыс (рис. 3.29).

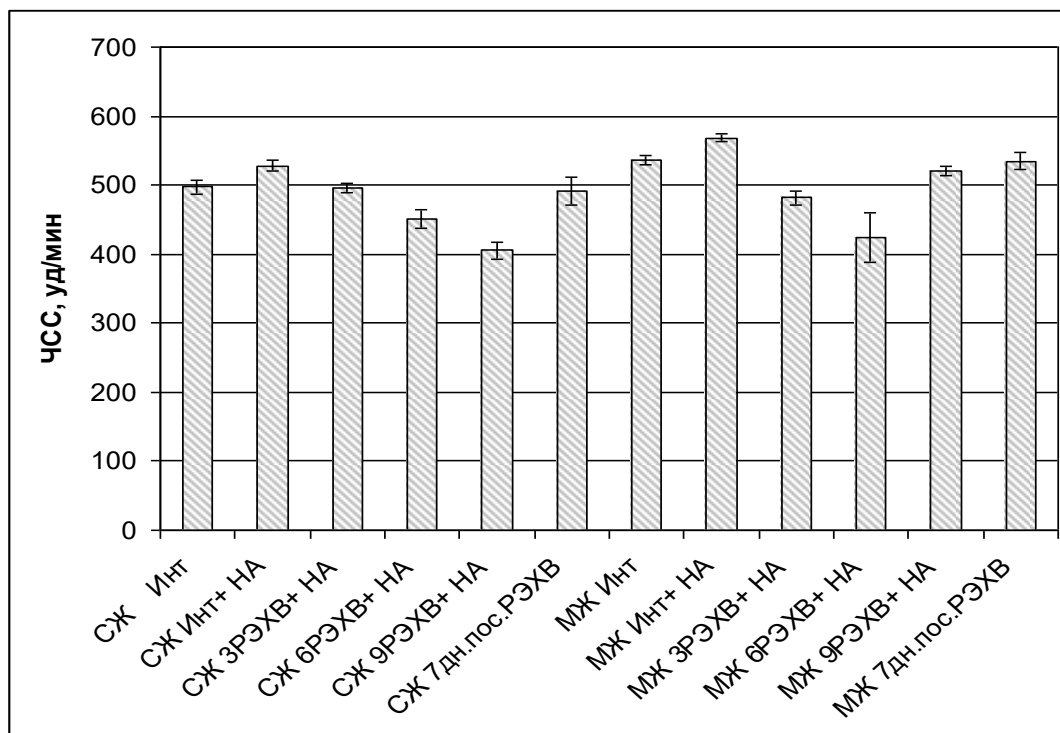


Рис. 3.29 Частота сердечных сокращений у старых и молодых животных после РЭХВ: СЖ – старые животные; МЖ – молодые животные; НА – норадреналин; 7дн НА – семь дней после 9-го сеанса РЭХВ

При охлаждении животных в криокамере по предложенной нами методике центральный эффект действия внутрибрюшинно введенного НА обнаружен после 6 и 9-й процедур охлаждения у старых крыс и после 3, 6 - у молодых. Спустя 7 дней после РЭХВ у старых крыс ЧСС была на уровне ЧСС контрольных крыс и практически достоверно не отличалась от ЧСС животных, которым вводили НА без РЭХВ. У молодых животных после 9-го РЭХВ

частота сердечных сокращений существенно повышалась по сравнению с 3-й и 6-й холодовыми процедурами и приближалась к показателям у контрольных крыс (рис. 3.29).

Подобные явления по механизму действия РЭХВ на ЧСС можно объяснить с позиций высокой резистентности ГЭБ к транспорту к нервным клеткам нейромедиаторов, катехоламинов, белков плазмы, гормонов [18, 257-260]. Высокая чувствительность ГЭБ для этих веществ, особенно нейромедиаторов, не постоянна и во многом зависит от функционального состояния организма. Вероятно, РЭХВ приводят к повышению проницаемости ГЭБ для нейромедиаторов и таким образом стимулируют функцию вегетативной системы и ее главный интегратор – гипоталамус, что косвенно подтверждает снижение ЧСС у крыс.

В аналогичных группах животных в те же сроки наблюдений вместо РЭХВ проводили охлаждение по традиционной методике. Установлено, что после внутрибрюшинного введения НА крысам двух возрастных групп наблюдалось достоверное увеличение ЧСС (рис. 3.30). Снижение ЧСС у животных, которых охлаждали по традиционной методике, отмечено лишь после 9-го сеанса воздействия холодом, в то время как при РЭХВ снижение ЧСС отмечено после 3-го сеанса.

Таким образом, установлен феномен «запаздывания» возникновения отрицательного хронотропного эффекта после внутрибрюшинного введения НА на ЧСС у животных, которых охлаждали по традиционному методу.

Очевидно, РЭХВ в отличие от традиционной экстремальной криотерапии способны в более короткие сроки оптимизировать центральные механизмы вегетативной регуляции сердечным ритмом.

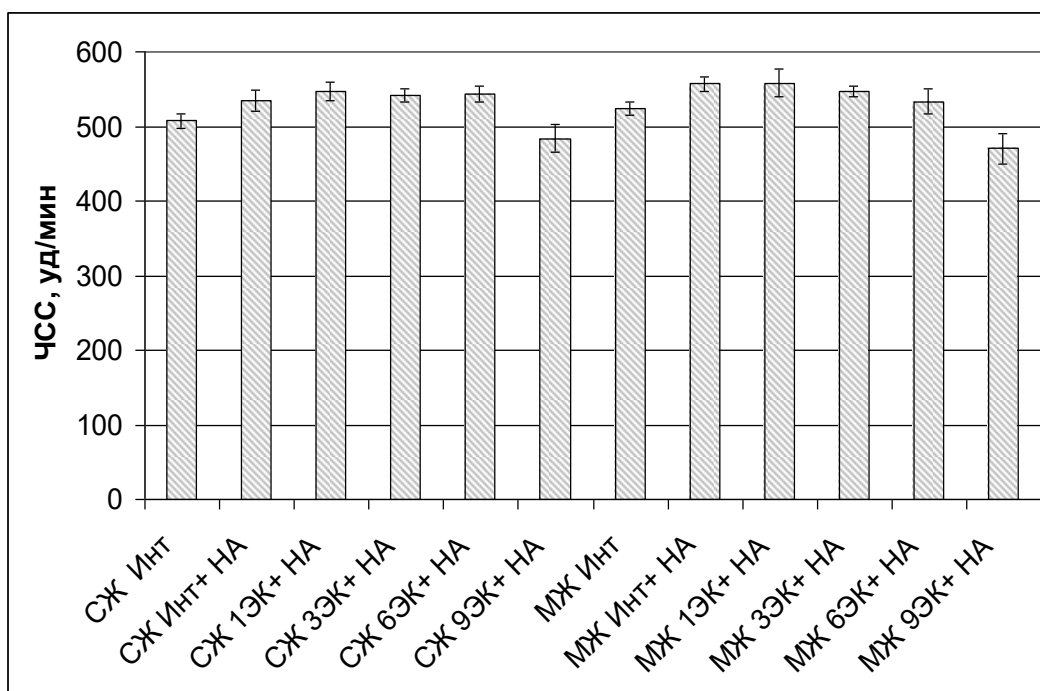


Рис. 3.30 Частота сердечных сокращений у старых и молодых животных, охлажденных по традиционному методу: СЖ – старые животные; МЖ – молодые животные; НА – норадреналин.

По результатам данного исследования опубликованы следующие работы:

1. Структурно-функциональные механизмы действия экстремального охлаждения на терморегуляторные центры гипоталамуса / В.Г.Бабийчук, В.С.Марченко, Г.А.Бабийчук, и др. // Проблемы криобиологии. – 2004. – № 2. – С. 62-70.
2. Бабийчук В.Г. Влияние экстремальной криотерапии на морфофункциональное состояние центральной нервной и сердечно-сосудистой систем / В.Г.Бабийчук // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т. 15, № 3. – С. 458-464.
3. Бабийчук В.Г. Структурно-функциональное состояние гематоэнцефалического барьера гипоталамуса старых крыс при действии экстремального охлаждения / В.Г.Бабийчук, В.С.Марченко // Світ медицини та біології. – 2005 – № 3. – С. 91-94.

4. Бабийчук В.Г. Сравнительная характеристика частоты сердечных сокращений у крыс при различных методах холодовых воздействий / В.Г.Бабийчук //Проблемы криобиологии. – 2007. – Т. 17, № 3. – С. 229-236.

5. Бабійчук В.Г. Структурно-функціональний стан гематоенцефалічного бар'єра при ритмічній дії позитивних (12 °С) і екстремально низьких (-120 °С) температур / В.Г.Бабійчук, В.С.Марченко, Л.М.Марченко // Нейронауки: теоретичні та клінічні аспекти. – 2008. – Т. 4, № 1. – С. 68-74.

РАЗДЕЛ 4

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИОКАРДА КРЫС ПОСЛЕ РИТМИЧЕСКИХ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ХОЛОДОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

4.1 Ультраструктура миокарда молодых контрольных крыс

Ядра кардиомиоцитов имели вытянутую форму и гладкую ядерную мембрану. Ядерный хроматин более или менее равномерно распределен по площади среза ядра. Вместе с тем, довольно часто встречались ядра, мембрана которых образовывала довольно глубокие инвагинации. Ядерная мембрана имела четкую контурированную структуру.

В околоядерной зоне кардиомиоцитов располагались цистерны саркоплазматического ретикулума, заполненные нежнотоволокнистой субстанцией средней электронной плотности. Сократительный аппарат кардиомиоцитов представлен в виде пучков миофибрилл. Параллельно им локализовались рядами митохондрии (рис. 4.1).

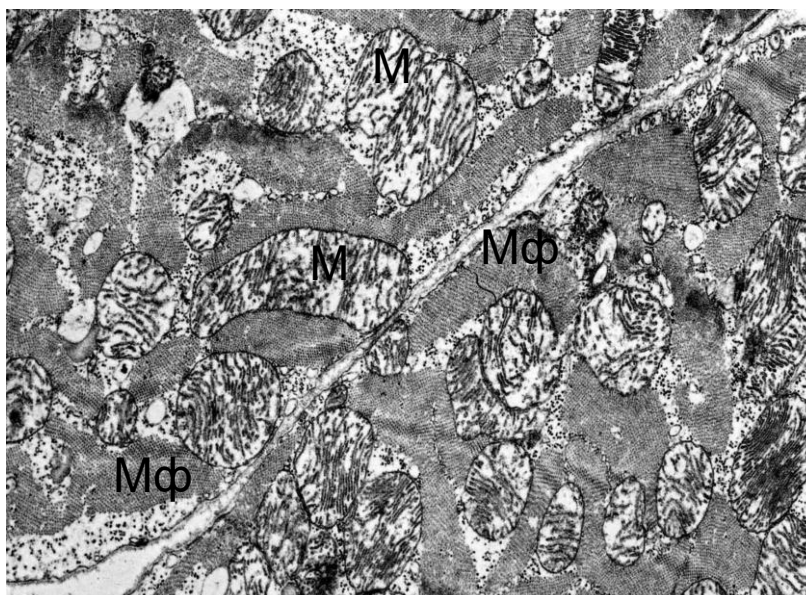


Рис. 4.1 Ультраструктура кардиомиоцитов молодых контрольных крыс. х 24 000. М - митохондрии; Мф - миофибриллы. Контрастировано цитратом свинца.

Наблюдается полиморфизм форм и размеров митохондрий: одни митохондрии содержат электронно-плотный матрикс, другие электронно-прозрачный. Митохондрии, имеющие плотный матрикс, как правило, содержат большее количество крист, чем обладающие просветлённым матриксом. Очень редко в кардиомицитах молодых животных присутствовали мелкие включения липидов.

В околоядерной зоне локализуется пластинчатый цитоплазматический комплекс Гольджи, представляющий собой стопки параллельно ориентированных гладких мембран, окруженных уплощёнными электронно-прозрачными везикулами.

Кровеносные капилляры располагаются в непосредственной близости к кардиомиоцитам. Эндотелиальные клетки имеют обычное строение. Ядра эндотелиоцитов обладают сильно исчерченной ядерной мембраной. Хроматин находился в конденсированном состоянии. Вблизи ядра, в цитоплазме располагались митохондрии, цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума, пластинчатый комплекс Гольджи и многочисленные рибосомы. Деструктивных нарушений этих органелл не выявлено.

Обращает на себя внимание наличие большого количества микропиноцитозных пузырьков в цитоплазме отростков эндотелиоцитов. Цитоплазматическая мембрана, обращенная к току крови, имеет структуру, присущую элементарной мембране (рис. 4.2).

4.2. Ультраструктура кардиомиоцитов молодых крыс после охлаждения по стандартной методике

После стандартного охлаждения молодых крыс в субмикроскопической архитектонике кардиомиоцитов наблюдаются изменения, характерные для развития дистрофического процесса.

Матрикс ядер кардиомиоцитов (рис. 4.3) приобретает низкую электронную плотность. Гранулы конденсированного хроматина концентрируются преимущественно в области, прилежащей к ядерной мембране.

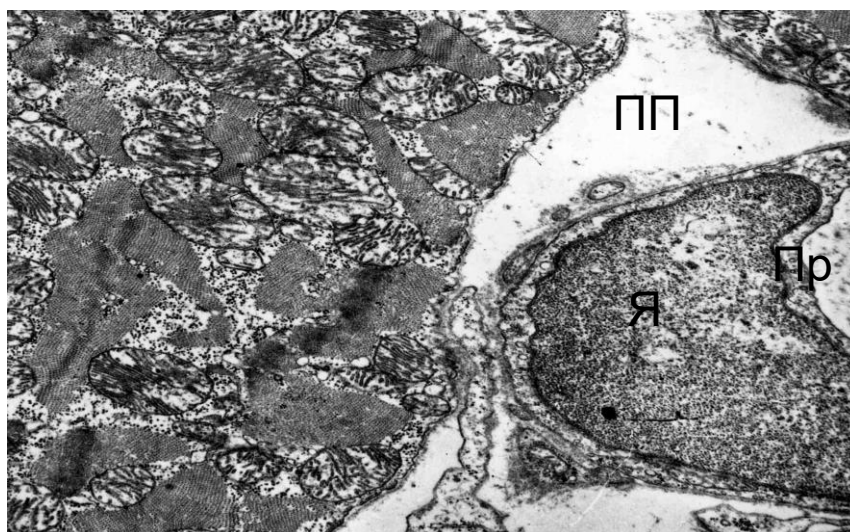


Рис. 4.2 Ультраструктура кровеносного капилляра миокарда молодых контрольных крыс x 36 000. Контрастировано цитратом свинца. Я - ядро эндотелиоцита; Пр - просвет капилляра; ПП - перикапиллярное пространство.

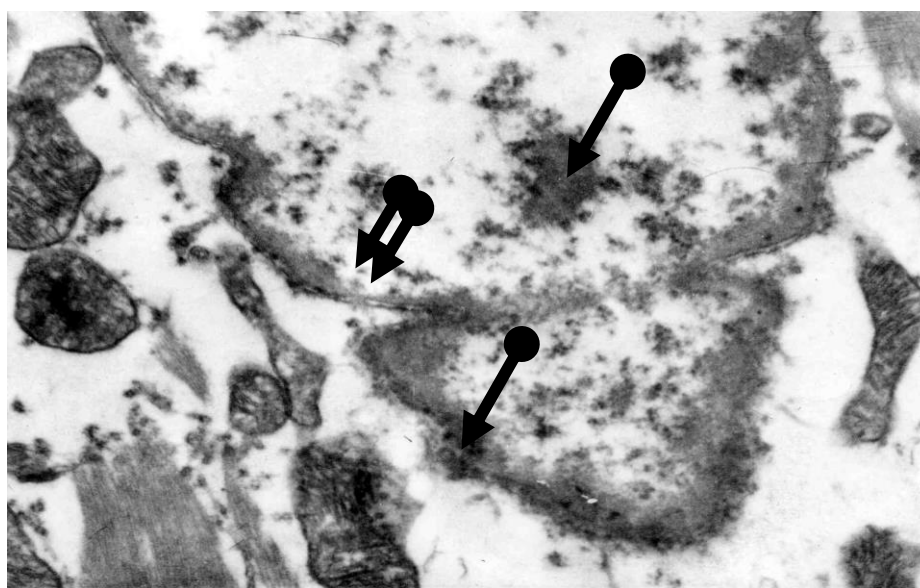


Рис. 4.3 Ультраструктура кардиомиоцитов молодых крыс после стандартного охлаждения. Конденсация хроматина (стрелка), очаговый лизис ядерной мембраны (2 стрелки) x 38 000. Контрастировано цитратом свинца

Центральная часть матрикса ядра практически не содержит гранул хроматина. Ядерная мембрана образует глубокие инвагинации, она сильно раз-

рыхлена. Встречаются очаги деструкции цитоплазматической мембраны. Перинуклеарные пространства расширены незначительно. В области, прилежащей к ядру, саркоплазма содержала небольшое количество органелл, рибосом, гранул гликогена и обладала низкой электронной плотностью.

Изменения митохондрий носили полиморфный характер. Большая часть митохондрий имела типичную структуру с множеством параллельно ориентированных крист и чётко контурируемую наружную мембрану. Вместе с тем, нередко присутствовали митохондрии с частично лизированными наружными мембранами и кристами (рис. 4.4).

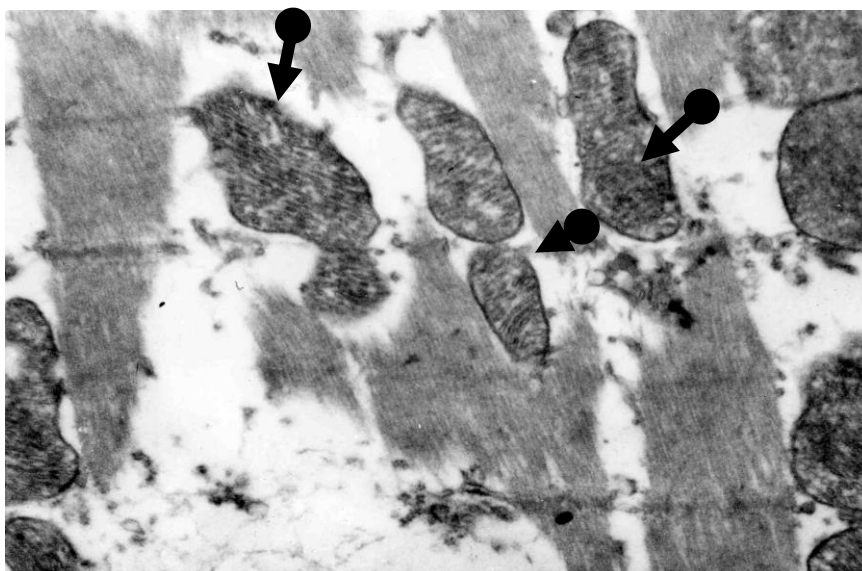


Рис. 4.4 Ультраструктура кардиомиоцитов молодых крыс после стандартного охлаждения. Лизис наружных мембран и крист митохондрий $\times 40\,000$. Контрастировано цитратом свинца

В отдельных митохондриях обнаруживается нарушение типичной ориентации крист. В матриксе митохондрий присутствуют значительные по величине области дегенеративных изменений наружной мембраны (рис. 4.5).

Значительному просветлению подвергается и саркоплазма кардиомиоцитов, которая выглядит электронно-прозрачной. В саркоплазме иногда выявлялись включения, имеющие слоистую структуру (рис. 4.6).

Пучки миофибрилл сохраняют параллельную ориентацию и поперечную исчерченность. У значительного количества кардиомиоцитов наблюдается их истончение.

Капилляры миокарда резко сужены. Ядра эндотелиальных клеток (рис. 4.7) имеют неправильную форму и глубокие инвагинации ядерной мембраны. Хроматин ядра концентрировался преимущественно вдоль ядерной оболочки. В центральной области ядерного матрикса образовывалась электронно-прозрачная зона, содержащая единичные гранулы деконденсированного хроматина. Ядерная мембрана имела обширные очаги деструкции. Цитоплазматическая мембрана сохраняла целостность.

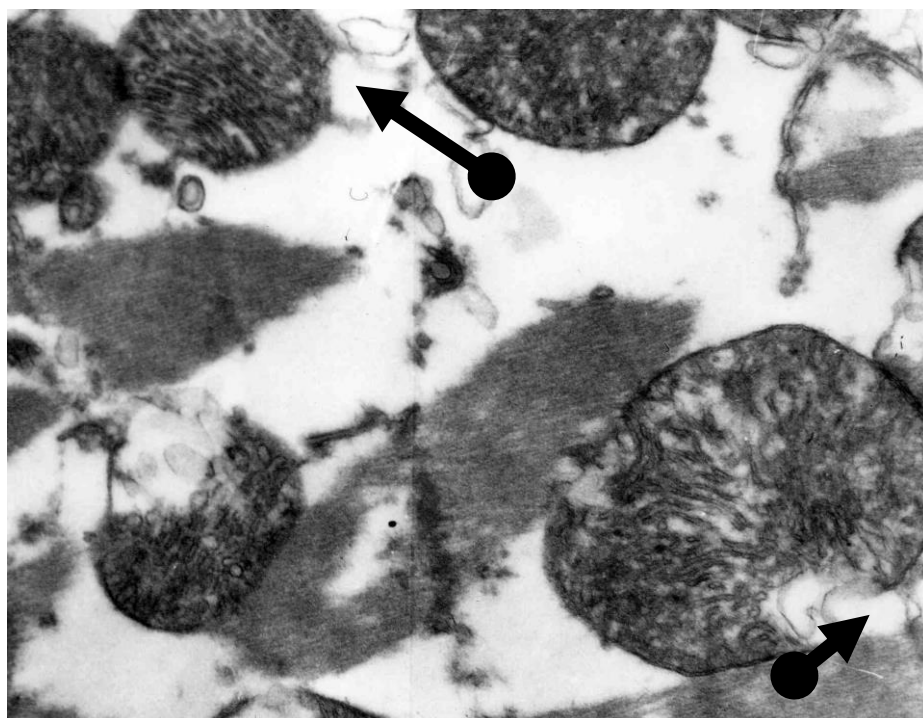


Рис. 4.5 Ультраструктура кардиомиоцитов молодых крыс после стандартного охлаждения. Дегенеративные изменения наружной мембраны митохондрий х 37 000. Контрастировано цитратом свинца.

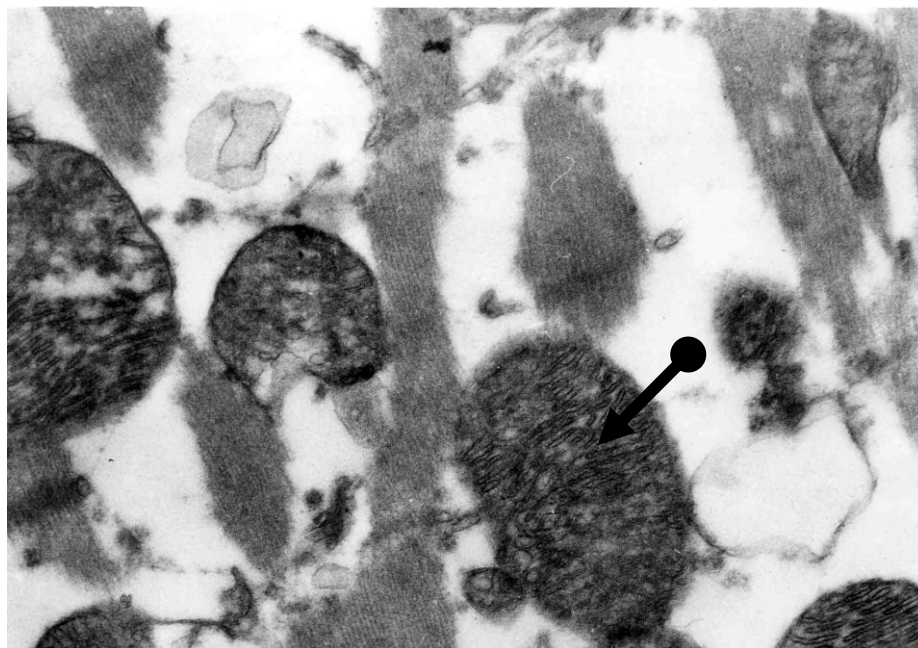


Рис. 4.6 Ультраструктура кардиомиоцитов молодых крыс после стандартного охлаждения. Включения слоистого строения в саркоплазме x 38 000. Контрастировано цитратом свинца.

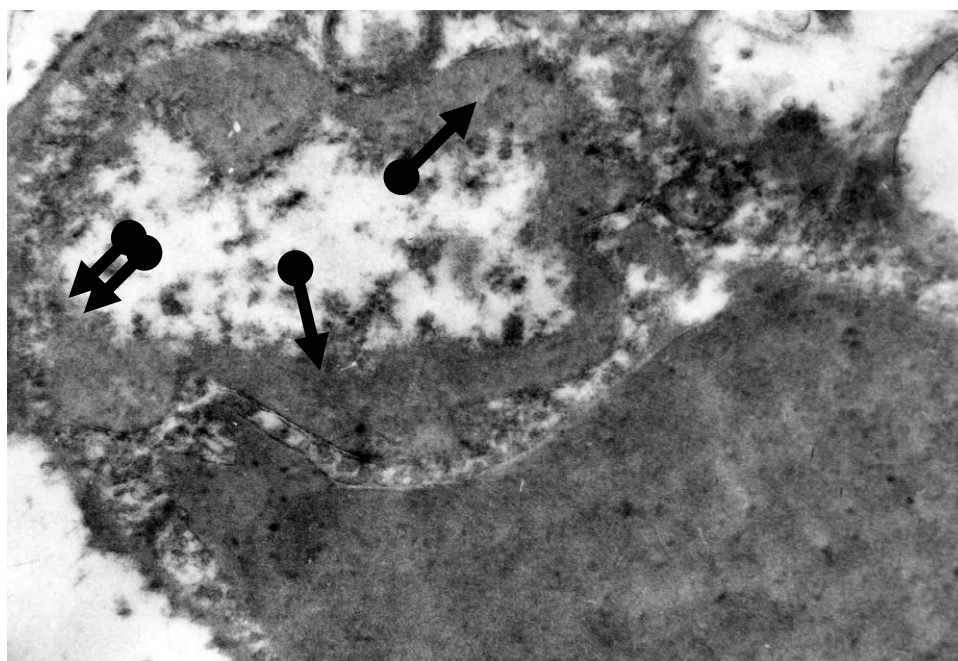


Рис. 4.7 Ультраструктура эндотелиоцитов капилляров молодых крыс после стандартного охлаждения. Конденсация хроматина ядра (стрелка) и очаговый лизис ядерной мембраны (2 стрелки) x 46 000. Контрастировано цитратом свинца.

В цитоплазме отростков эндотелиоцитов существенно уменьшается количество микропиноцитозных пузырьков по сравнению с группой контрольных животных (рис. 4.8). Митохондрии эндотелиоцитов кровеносных капилляров сильно набухшие с просветлённым матриксом. Количество крист существенно уменьшается, относительно группы интактных животных. Цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума сильно расширены, а их содержимое электронно-прозрачно.

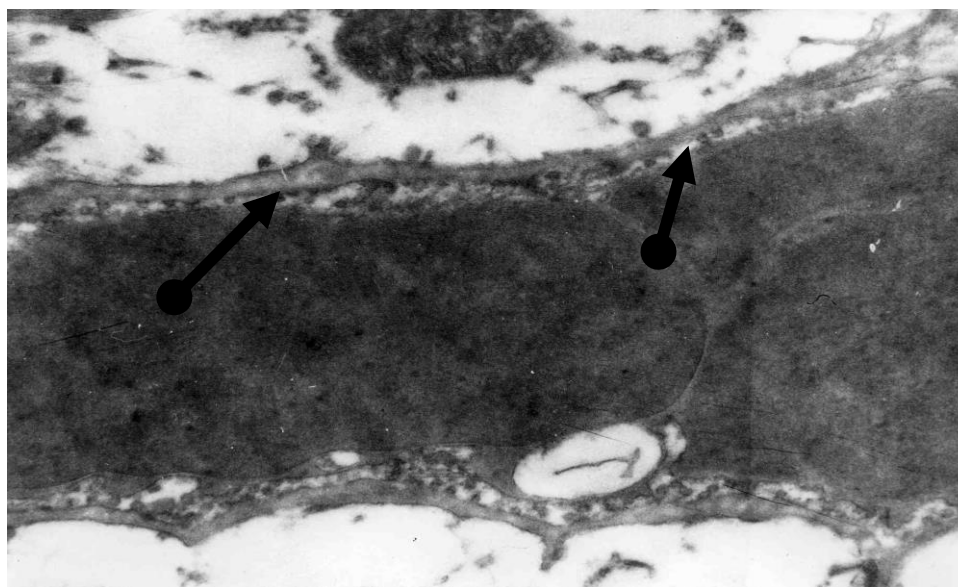


Рис. 4.8 Ультраструктура эндотелиоцитов капилляров молодых крыс после стандартного охлаждения. Уменьшение количества микропиноцитозных пузырьков в цитоплазме (стрелка). $\times 49\,000$. Контрастировано цитратом свинца.

На мембранах эндоплазматической сети выявляются единичные рибосомы. Существенно снижается и количество свободно лежащих в цитоплазме рибосом и полисом. Цитоплазматическая мембрана, обращенная в просвет капилляра, разрыхлена и очагово деструктурирована. Пластинчатый комплекс Гольджи редуцирован. Отдельные эндотелиоциты содержали вторичные лизосомы, располагающиеся вблизи пластинчатого комплекса Гольджи.

4.3 Изменения субмикроскопической структуры кардиомиоцитов молодых крыс после ритмических экстремальных холодовых воздействий

В группе экспериментальных животных, которые получили 3 сеанса РЭХВ при температуре (-120 °С), ядра кардиомиоцитов (рис. 4.9) имели удлинённую округлую форму и содержали существенно просветлённый матрикс. Хроматин ядра концентрировался преимущественно вдоль ядерной мембраны, имел кольцевидную форму.



Рис. 4.9 Ультраструктура кардиомиоцитов молодых крыс после 3 сеансов РЭХВ. Просветление матрикса ядра (Я), конденсация хроматина (стрелка), разрыхление ядерной мембраны (2 стрелки) x 45 000. Контрастировано цитратом свинца.

Ядерная мембрана была сильно разрыхлена и теряла четко контурированную структуру. Перинуклеарные пространства не расширены. В ядре увеличивается количество ядрышек. В околядерной области наблюдается уменьшение количества органелл.

Саркоплазма приобрела электронно-прозрачный вид. Пучки миофибрилл располагались параллельными рядами с четкой поперечной исчерченностью (рис. 4.10). Иногда встречались кардиомиоциты, миофибриллы которых расщеплялись (рис. 4.11). Митохондрии кардиомиоцитов располагались между пучками миофибрилл.

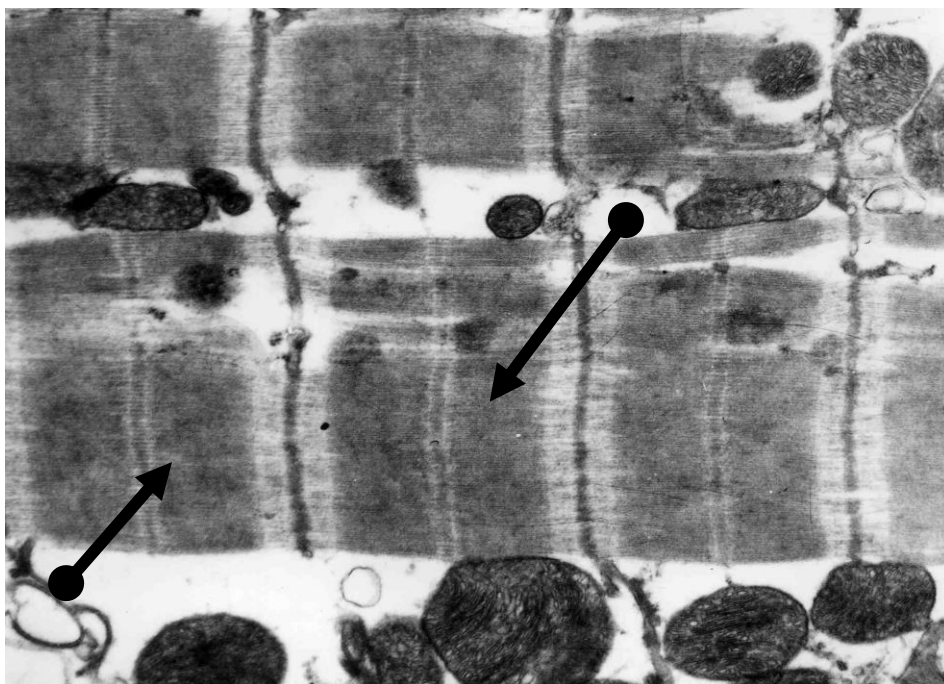


Рис. 4.10 Ультраструктура кардиомиоцитов молодых крыс после 3 сеансов РЭХВ. Пучки параллельно ориентированных миофибрилл x 60 000. Контрастировано цитратом свинца.

Матрикс их содержал мелкогранулярную субстанцию и большое количество параллельно ориентированных коротких крист. В саркоплазме присутствовали, рибосомы, полисомы, гранулы гликогена, а также вакуоли саркоплазматического ретикулума и Т-системы.

Ядра эндотелиальных клеток имели неправильную форму и содержали преимущественно конденсированный хроматин. Митохондрии эндотелиоцитов сильно набухшие с просветлённым матриксом. Гранулярный эндоплазматический ретикулум развит хорошо. В цитоплазме содержались многочисленные рибосомы. В отдельных митохондриях присутствовали слоистые структуры (рис. 4.12).

В цитоплазме отростков эндотелиоцитов выявлялись многочисленные электроннопрозрачные микропиноцитозные пузырьки (рис. 4.13).

В группе крыс, получивших 6 сеансов РЭХВ, ядра кардиомиоцитов (рис. 4.14) приобретали четко контурируемую ядерную мембрану. Перинуклеарные пространства имели равномерную ширину.

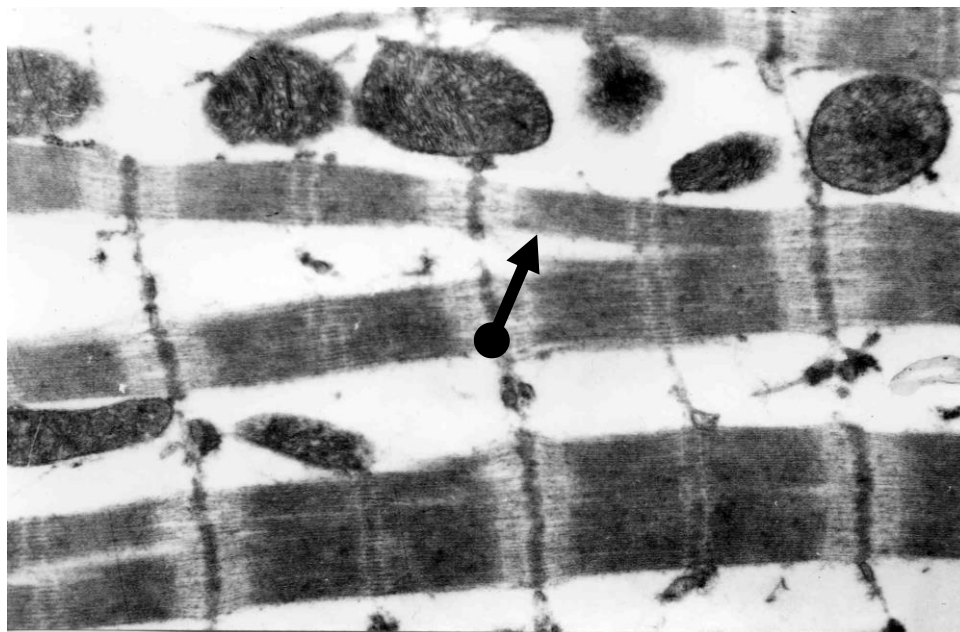


Рис. 4.11 Ультраструктура кардиомиоцитов молодых крыс после 3 сеансов РЭХВ. Расщепление миофибрилл x 40 000. Контрастировано цитратом свинца.

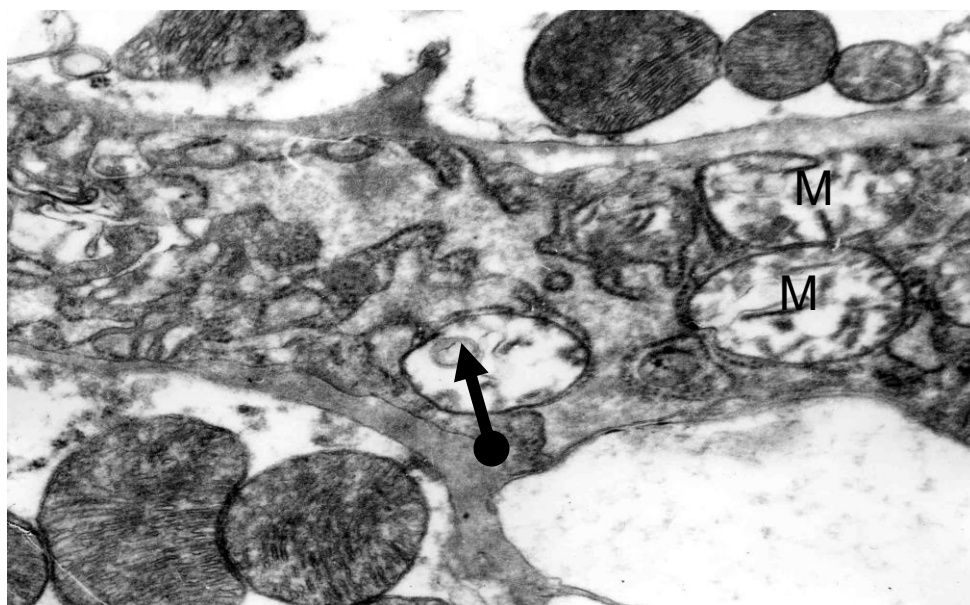


Рис. 4.12 Ультраструктура эндотелиальных клеток капилляров миокарда молодых крыс после 3 сеансов РЭХВ. Набухание митохондрий (М); слоистые тельца в матриксе митохондрий (стрелка) x 43 000. Контрастировано цитратом свинца.

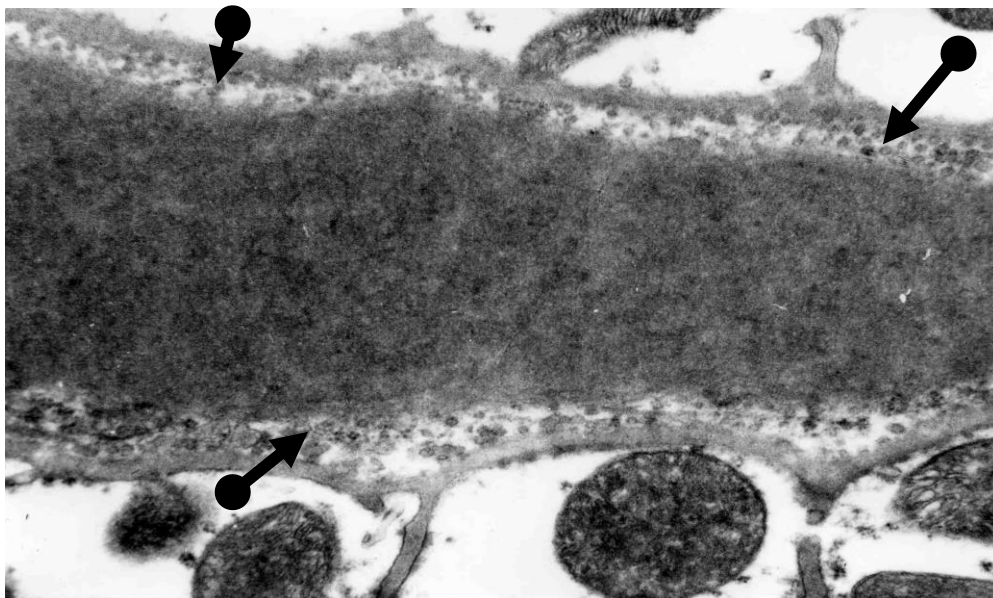


Рис. 4.13 Ультраструктура эндотелиоцитов капилляров миокарда молодых крыс после 3 сеансов РЭХВ. Скопление микропиноцитозных пузырьков в цитоплазме x 65 000. Контрастировано цитратом свинца.

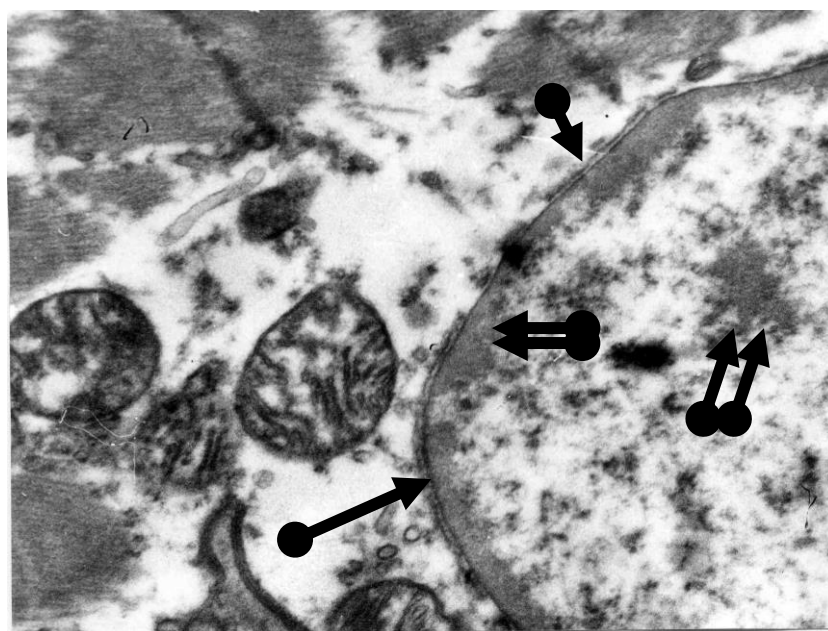


Рис. 4.14 Ультраструктура кардиомиоцитов молодых крыс после 6 сеансов РЭХВ. Четко контурируемая ядерная мембрана (стрелка), конденсация хроматина (2 стрелки) x 48 000. Контрастировано цитратом свинца.

Отмечается конденсация хроматина на ядерной мембране. Матрикс ядра имел электронно–прозрачный вид. В перинуклеарной области саркоплазмы увеличивается количество саркоплазматических органелл.

Существенно уменьшилась степень просветления саркоплазмы, уменьшается количество электронно-прозрачных зон, разделяющих пучки миофибрилл. Возрастает количество митохондрий и крист в них. Матрикс митохондрий приобретает мелкогранулярное строение и среднюю электронную плотность. В меньшей степени выражено набухание митохондрий, их наружные мембраны и кристы четкие.

Достаточно редко встречаются очаги расплавления наружной мембраны митохондрий (рис. 4.15). В саркоплазме увеличивается количество свободных рибосом и гранул гликогена. В перинуклеарной области саркоплазмы располагается гипертрофированный пластинчатый комплекс Гольджи, стопки гладких мембран которого окружены многочисленными мелкими везикулами. Цистерны саркоплазматического ретикулума остаются расширенными, а содержимое их электронно–прозрачно.

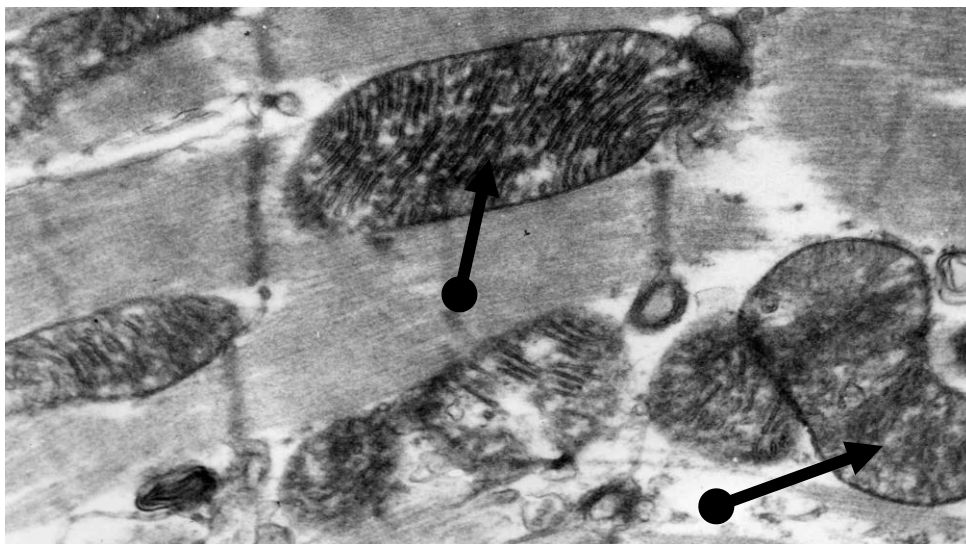


Рис. 4.15 Ультраструктура кардиомиоцитов молодых крыс после 6 сеансов РЭХВ. Увеличение числа крист в митохондриях $\times 38\,000$. Контрастировано цитратом свинца.

В саркоплазме кардиомиоцитов встречаются миелиноподобные структуры, имеющие различную электронную плотность (рис. 4.16).

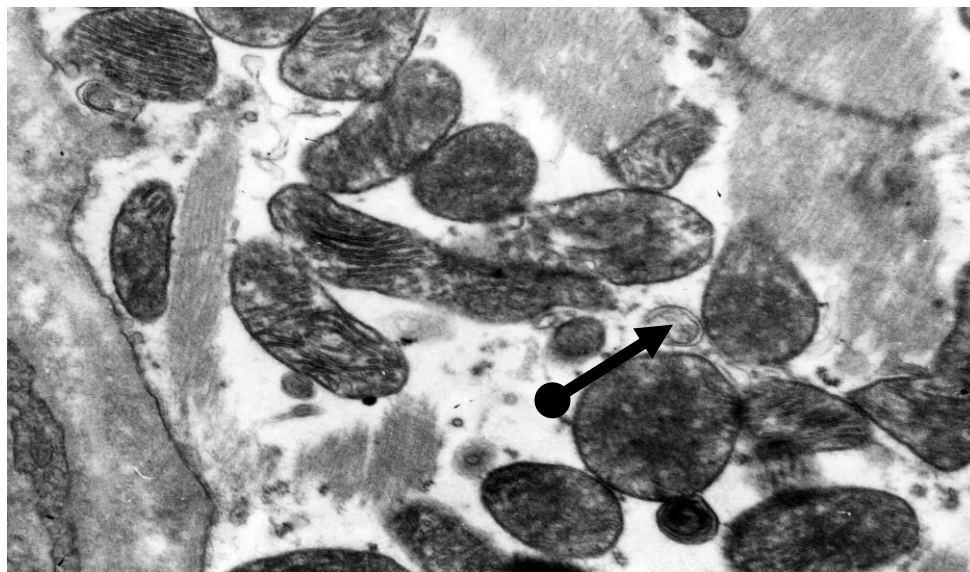


Рис. 4.16 Ультраструктура кардиомиоцитов молодых крыс после 6 сеансов РЭХВ. Миелиноподобные структуры в саркоплазме. $\times 37\,000$. Контрастировано цитратом свинца.

Значительное количество кардиомиоцитов содержат митохондрии с очень утолщенной и осмофильной наружной мембраной (рис. 4.17).

Ультраструктурная организация эндотелиоцитов кровеносных капилляров не подвергалась существенным изменениям. Дистрофических и деструктивных изменений субмикроскопической архитектоники эндотелиальной выстилки кровеносных капилляров не выявлено.

Ядра эндотелиоцитов соответствовали типичной ультраструктурной организации, их матрикс оставался электронно-плотным. Перинуклеарные пространства сохраняли постоянную ширину на всем протяжении среза. Кариолема имела четкую структуру, присущую элементарной мембране.

Митохондрии обладали четко контурируемой наружной мембраной и кристами. Гранулярный эндоплазматический ретикулум умеренно развит, на его мембранах присутствовали многочисленные рибосомы, а цистерны были

умеренно расширенными. В цитоплазме отростков эндотелиоцитов присутствовали многочисленные микропиноцитозные пузырьки (рис. 4.18).

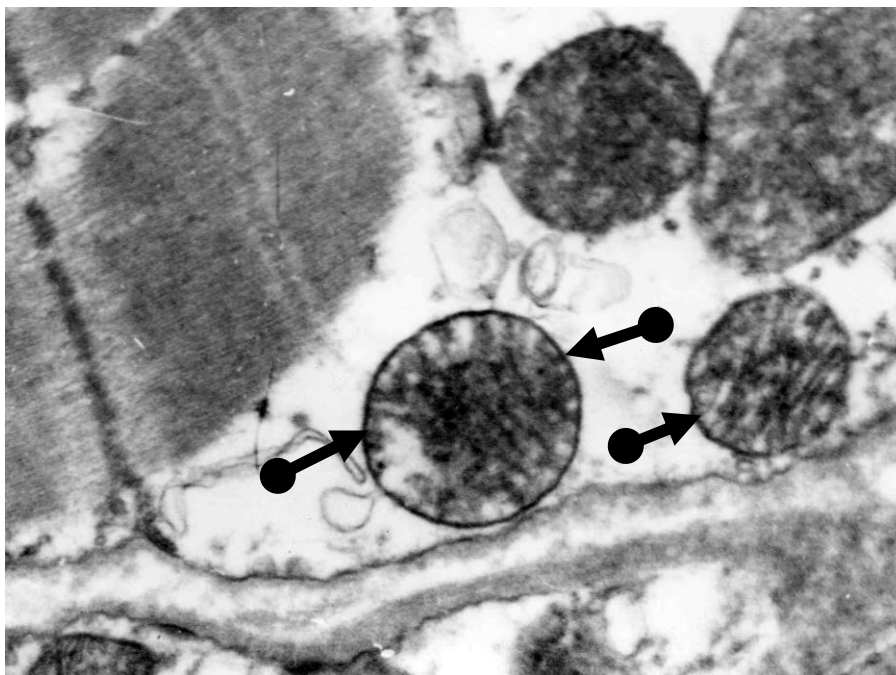


Рис. 4.17 Ультраструктура кардиомиоцитов молодых крыс после 6 сеансов РЭХВ. Повышение осмофильности наружной мембраны митохондрий х 42 000. Контрастировано цитратом свинца.

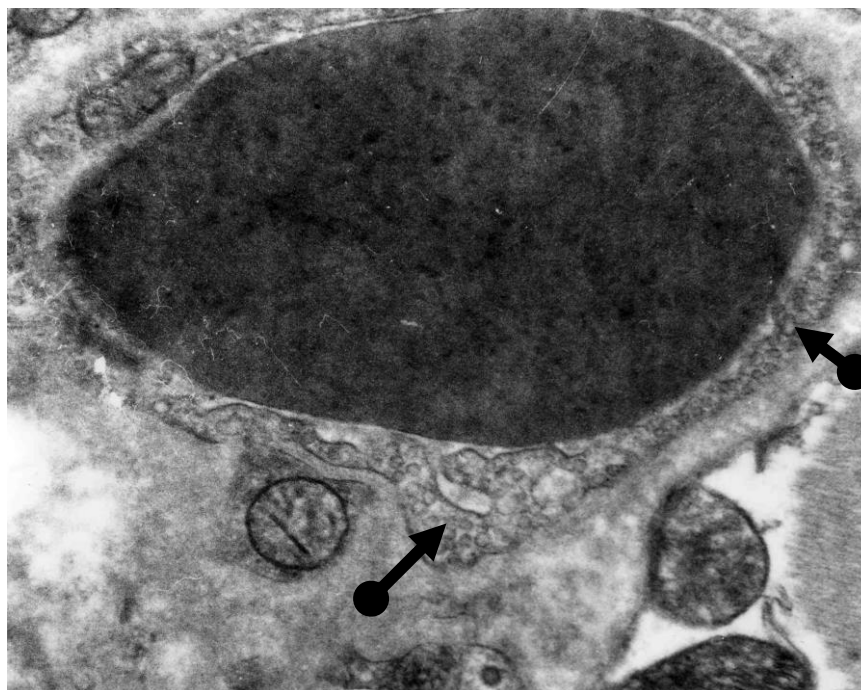


Рис. 4.18 Ультраструктура эндотелиоцитов молодых крыс после 6 сеансов РЭХВ. Увеличение количества микропиноцитозных пузырьков в цитоплазме отростков эндотелиоцитов х 65 000. Контрастировано цитратом свинца.

В группе экспериментальных животных, которые получили 9 сеансов РЭХВ, наблюдались изменения характерные для активации внутриклеточных метаболических процессов.

Ядра кардиомиоцитов содержали в основном деконденсированный хроматин, гранулы которого равномерно распределялись по площади среза. Ядерная мембрана приобретала чётко контурированную структуру, присущую элементарной мембране. Перинуклеарные пространства не расширены и сохраняли постоянную ширину на всем протяжении среза. Матрикс ядра значительно просветлен и электронно прозрачен (рис. 4.19).

В саркоплазме иногда обнаруживались миелиноподобные структуры (рис. 4.20). Митохондрии имели большое количество крист. Матрикс митохондрий обладал умеренной электронной плотностью и мелкозернистой структурой. Наружные мембраны митохондрий четкие, без очагов деструкции (рис. 4.21).

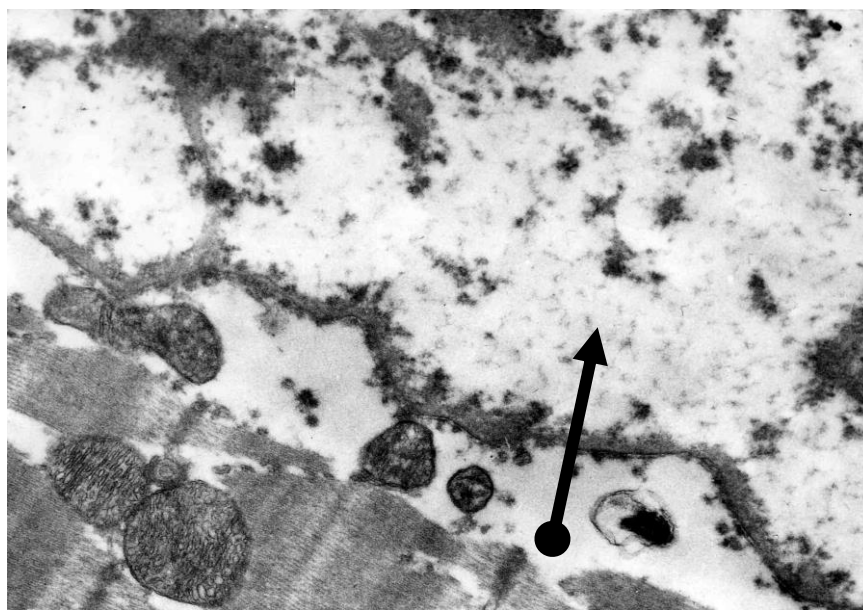


Рис. 4.19 Ультраструктура кардиомиоцитов молодых крыс после 9 сеансов РЭХВ. Просветление матрикса ядра $\times 39\,000$. Контрастировано цитратом свинца.

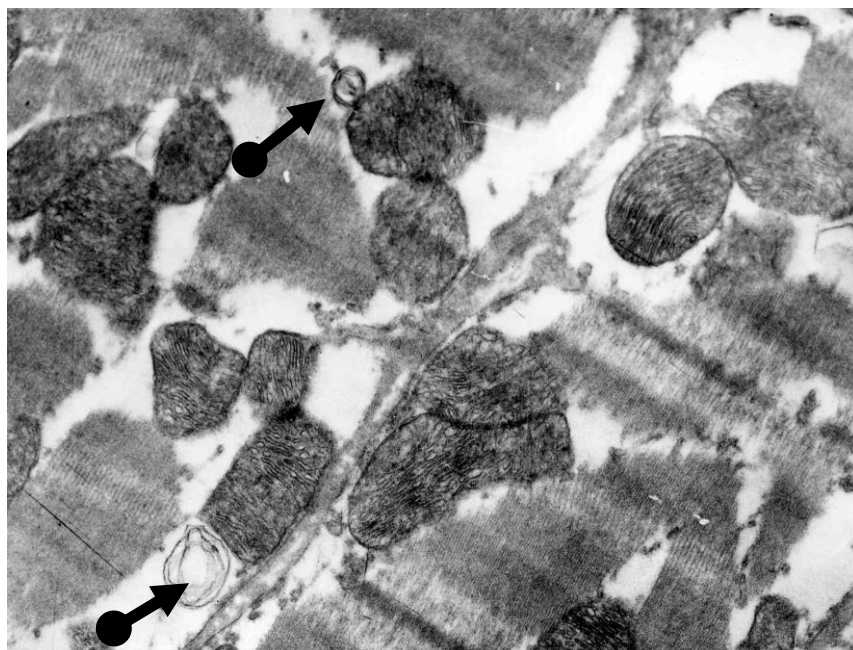


Рис. 4.20 Ультраструктура кардиомиоцитов молодых крыс после 9 сеансов РЭХВ. Миелиноподобные структуры в саркоплазме x 40 000. Контрастировано цитратом свинца.

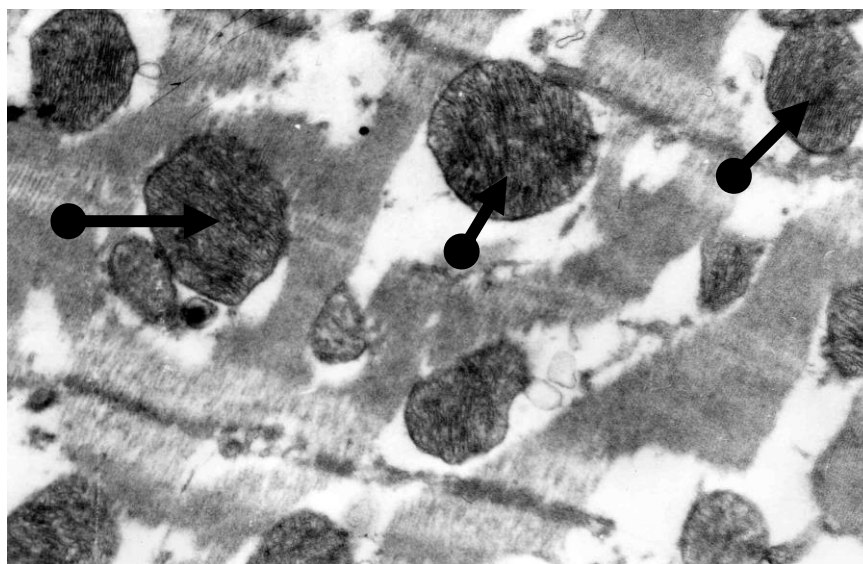


Рис. 4.21 Ультраструктура кардиомиоцитов молодых крыс после 9 сеансов РЭХВ. Митохондрии с большим количеством крист и мелкогранулярным матриксом x 42 000. Контрастировано цитратом свинца.

Сохраняется умеренное просветление саркоплазмы. Значительное количество митохондрий, располагались в виде скоплений и имели завихрённые кристы (рис. 4.22).

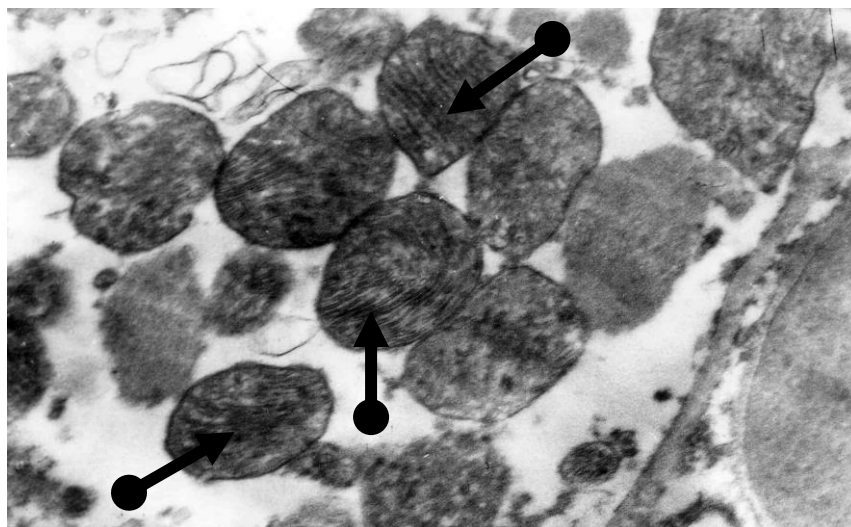


Рис. 4.22 Ультраструктура кардиомиоцитов молодых крыс после 9 сеансов РЭХВ. Скопление митохондрий с завихрёнными кристами $\times 45\,000$. Контрастировано цитратом свинца.

Саркоплазматический ретикулум развит хорошо. Пучки миофибрилл в кардиомиоцитах располагались параллельными рядами. В саркоплазме присутствовали гранулы гликогена, рибосомы и полисомы. Пластинчатый комплекс Гольджи гипертрофирован, его гладкие мембраны параллельно ориентированы.

Ядра эндотелиоцитов капилляров миокарда молодых крыс, после 9 сеансов РЭХВ имели вытянутую форму. Ядерная мембрана четкая, без очагов деструкции. Перинуклеарные пространства не расширены, сохраняют постоянную ширину на всем протяжении. В центральной области ядра имелись участки, обладающие очень низкой электронной плотностью. Гранулы конденсированного хроматина плотным кольцом располагались в непосредственной близости от ядерной мембраны. В ядре присутствовали 1-2 осмофильных ядрышка (рис. 4.23).



Рис. 4.23 Ультраструктура эндотелиоцитов капилляров миокарда молодых крыс после 9 сеансов РЭХВ. Конденсация хроматина ядра $\times 65\,000$. Контрастировано цитратом свинца.

Митохондрии эндотелиоцитов, также как и гранулярный эндоплазматический ретикулум приобретали типичное для данных клеток строение. Узкая полоска отростков эндотелиоцитов кровеносных капилляров была заполнена множеством микропиноцитозных пузырьков (рис. 4.24). Цитоплазматическая мембрана не имела очагов деструкции.



Рис. 4.24 Ультраструктура эндотелиоцитов капилляров миокарда молодых крыс после 9 сеансов РЭХВ. Микропиноцитозные пузырьки в цитоплазме отростков эндотелиоцитов $\times 68\,000$. Контрастировано цитратом свинца.

4.4 Ультраструктура миокарда контрольных старых крыс

Ядра кардиомиоцитов (рис. 4.25) имели округлую, слегка вытянутую форму. Ядерный хроматин находился в частично конденсированном состоянии; его глыбки более или менее равномерно распределялись по площади среза ядра. Ядерная мембрана четкая, без видимых очагов деструкции. В матриксе ядра располагалось, как правило, одно маленькое осмофильное ядрышко. В перинуклеарной зоне саркоплазмы обнаруживался существенно редуцированный пластинчатый комплекс Гольджи, состоящий из нескольких параллельно ориентированных гладких мембран, окружённых мелкими электронно-прозрачными везикулами. Между пучками миофибрилл располагались расширенные цистерны саркоплазматического ретикулума, заполненные электронно-прозрачной субстанцией (рис. 4.26).



Рис. 4.25 Ультраструктура кардиомиоцитов контрольных старых крыс. Локальные расширения перинуклеарных пространств ядра (стрелка); редукция пластинчатого комплекса Гольджи x 46 000. Контрастировано цитратом свинца.

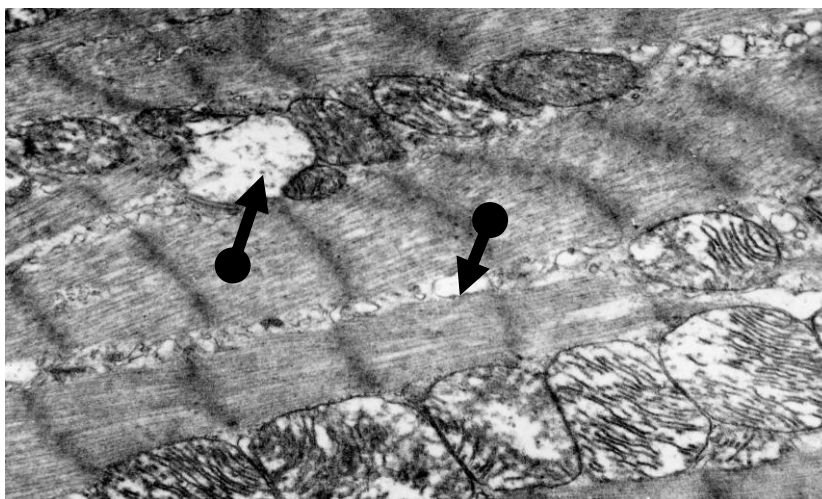


Рис. 4.26 Ультраструктура кардиомиоцитов контрольных старых крыс. Расширение цистерн саркоплазматического ретикулума $\times 48\,000$. Контрастировано цитратом свинца.

Наиболее ярким многообразием отличались митохондрии. В одном и том же кардиомиоците находились различные по структуре митохондрии. Встречались митохондрии с просветлённым, почти электронно-прозрачным матриксом, содержащим довольно многочисленные кристы. Матрикс контрастирован не равномерно, в его структуре присутствовали небольшие области полной электронной прозрачности.

Отдельные митохондрии содержали в матриксе миелиноподобные структуры. Наружная мембрана митохондрий четкая без признаков деструкции (рис. 4.27).

В саркоплазме кардиомиоцитов обнаруживались группы митохондрий, обладающих осмиофильной наружной мембраной без очагов лизиса и более плотным мелкогранулярным матриксом. Часть таких митохондрий была заполнена кристами, имеющими типичное строение. Другая часть митохондрий содержала лизированные кристы (рис. 4.28).

Значительное количество митохондрий были подвержены локальным процессам дегенерации. В их матриксе образовывались электронно-прозрачные полости, окруженные элементарной мембраной (рис. 4.29).

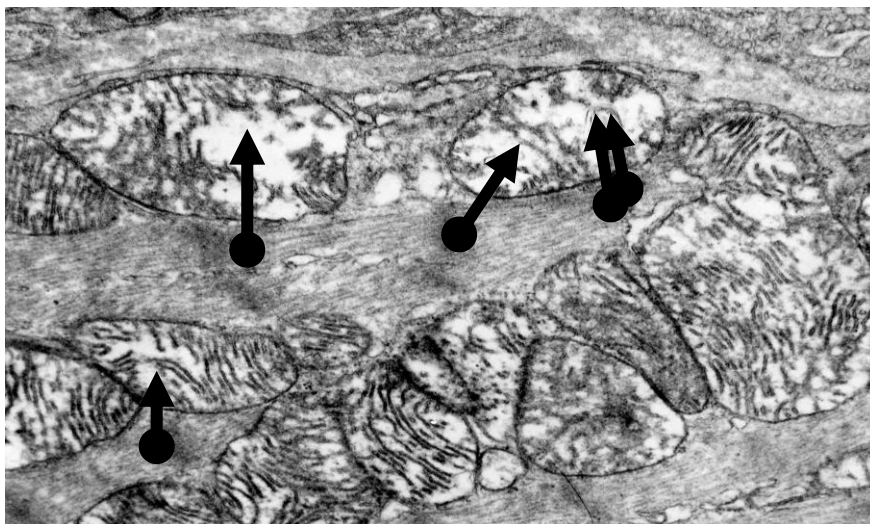


Рис. 4.27 Ультраструктура кардиомиоцитов контрольных старых крыс. Просветление матрикса митохондрий (стрелка); миелинообразные структуры в матриксе митохондрий (2 стрелки) x 48 000. Контрастировано цитратом свинца.

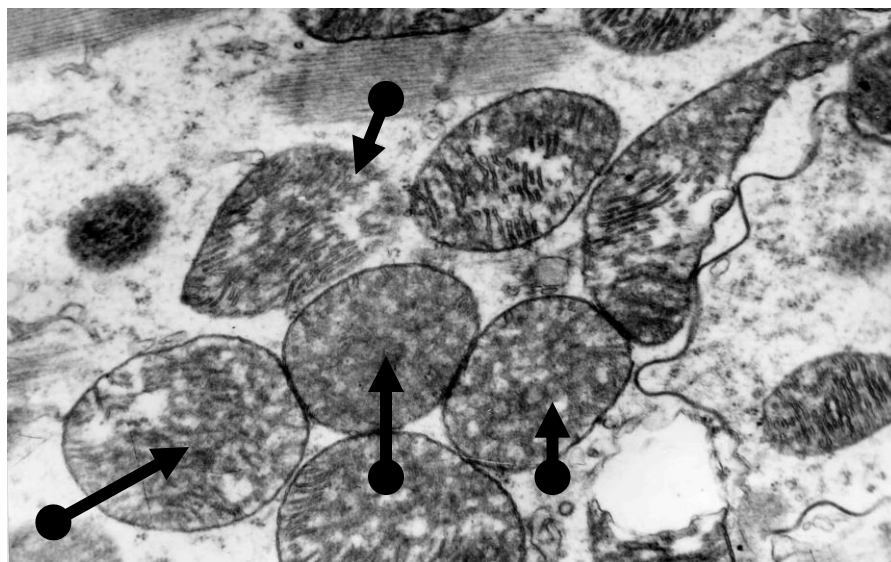


Рис. 4.28 Ультраструктура кардиомиоцитов контрольных старых крыс. Тотальный лизис крист митохондрий x 52 000. Контрастировано цитратом свинца.

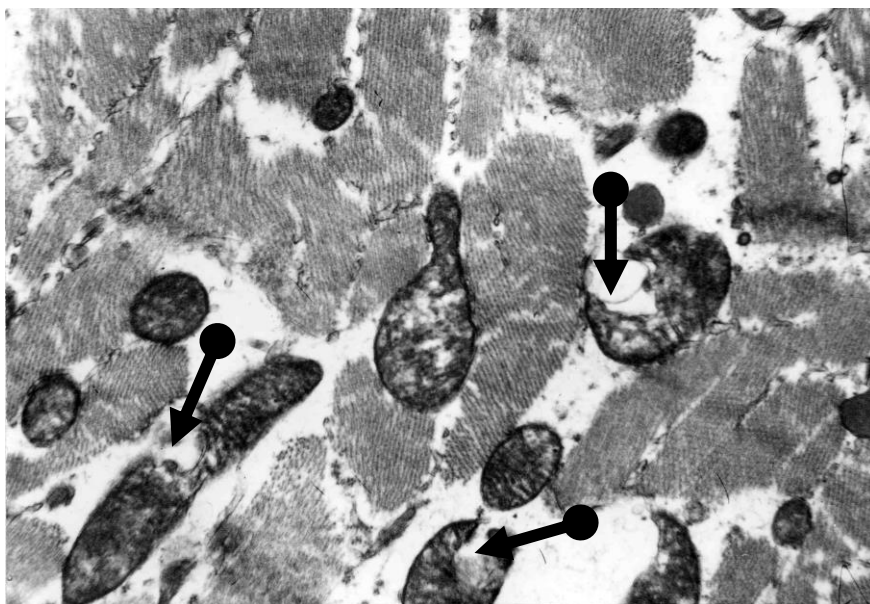


Рис. 4.29 Ультраструктура кардиомиоцитов контрольных старых крыс. Локальные очаги дегенераций митохондрий $\times 40\ 000$. Контрастировано цитратом свинца.

В скоплениях митохондрий, кроме органелл с дегенеративными изменениями, сравнительно часто обнаруживались митохондрии с завихрёнными кристами и осмиофильным матриксом (рис. 4.30).

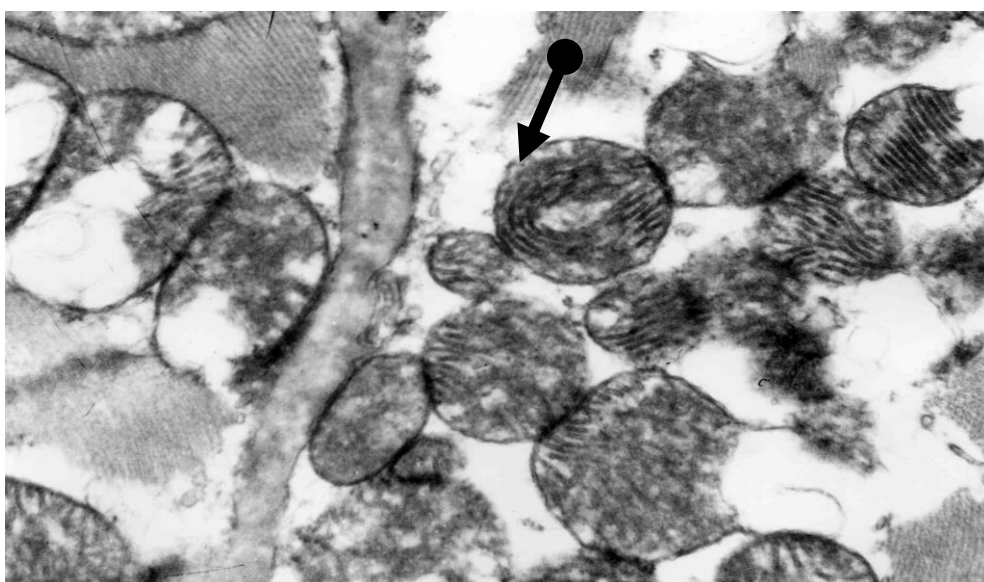


Рис. 4.30 Ультраструктура кардиомиоцитов контрольных старых крыс. Митохондрии с завихрёнными кристами $\times 40\ 000$. Контрастировано цитратом свинца.

В саркоплазме кардиомиоцитов присутствовали липидные включения и вторичные лизосомы, заполненные электронно-плотным липофусцином (рис. 4.31). Сократительные элементы кардиомиоцитов располагались параллельными пучками. Саркоплазма существенно просветлена и содержит небольшое количество рибосом и гранул гликогена. Саркоплазматическая мембрана утолщена, умеренно разрыхлена, но без очагов деструкции.

Ультраструктура эндотелиоцитов кровеносных капилляров без существенных изменений. Отмечается некоторое снижение количества микропиноцитозных пузырьков в цитоплазме, относительно группы молодых экспериментальных животных.

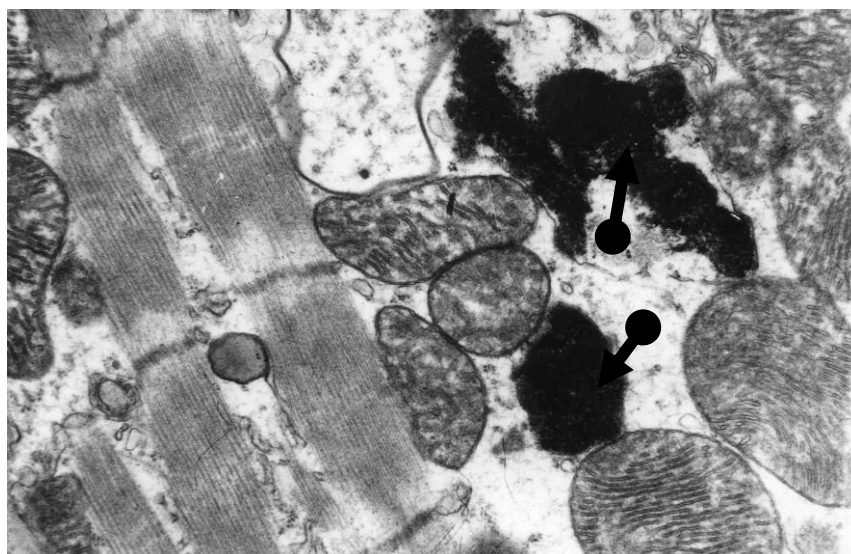


Рис. 4.31 Ультраструктура кардиомиоцитов контрольных старых крыс. Включения липидов и липофусцина в саркоплазме $\times 45\,000$. Контрастировано цитратом свинца.

4.5 Ультраструктура миокарда старых крыс после стандартного охлаждения

Ультраструктурная организация кардиомиоцитов в этой группе животных претерпевала достаточно глубокие изменения дистрофического и деструктивного характера.

Ядерная мембрана значительного количества кардиомиоцитов имела большие участки лизиса (рис. 4.32).

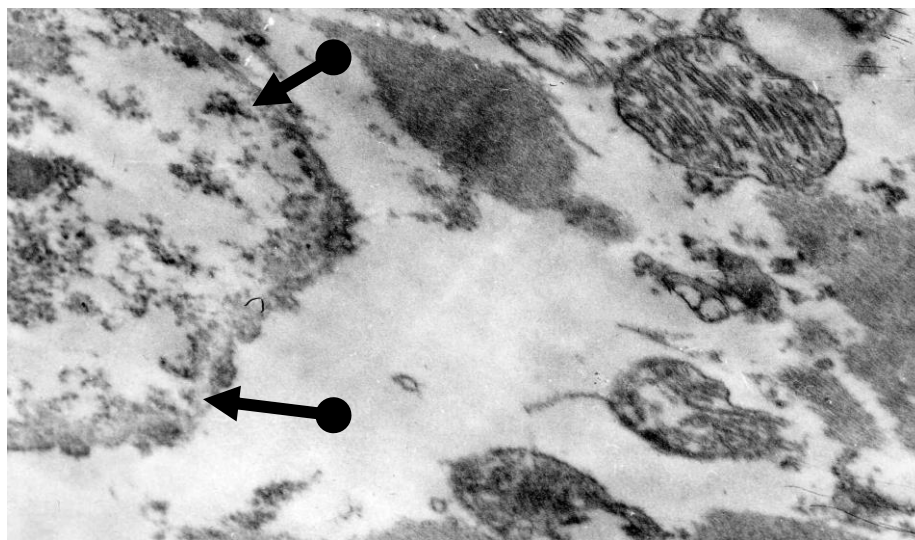


Рис. 4.32. Ультраструктура кардиомиоцитов старых крыс после стандартного охлаждения. Лизис ядерной мембраны $\times 44\,000$. Контрастировано цитратом свинца.

Матрикс ядра становился электронно-прозрачным. Конденсированный хроматин ядра собран в виде глыбок, которые диффузно распределялись по матриксу. В перинуклеарной области саркоплазмы практически полностью отсутствовали саркоплазматические органеллы и мембранные комплексы.

В саркоплазме сохранялось многообразие митохондрий, описанных в предыдущей группе. Следует отметить, что количество очагов деструкции и дегенеративно измененных митохондрий в этой группе больше, чем в предыдущей. Саркоплазматическая мембрана умеренно разрыхлена и имела достаточно высокую электронную плотность.

Существенно возрастает количество включений липидов, липофусцина и уменьшается число рибосом и гранул гликогена.

Эндотелиоциты кровеносных капилляров (рис. 4.33) имели ядра, содержащие преимущественно конденсированный хроматин.

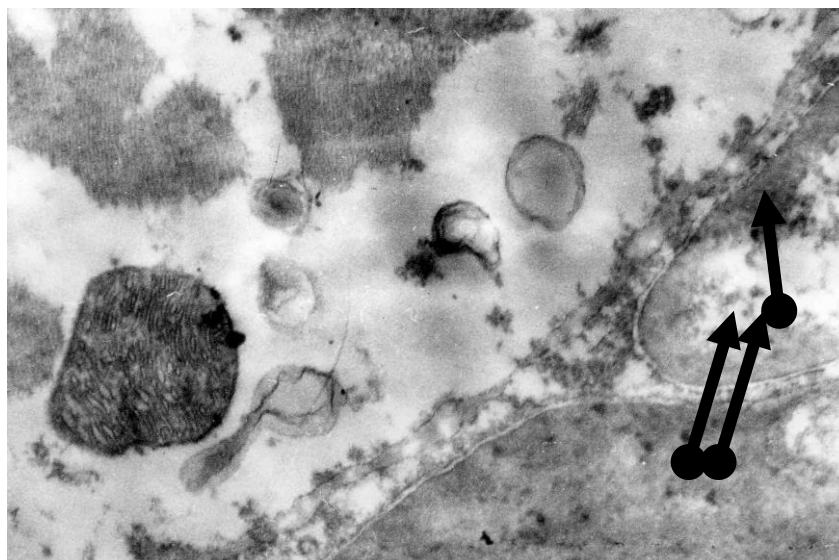


Рис. 4.33 Ультраструктура эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда старых крыс после стандартного охлаждения. Конденсация хроматина ядра (стрелка), просветление матрикса в центре ядра (2 стрелки) x 48 000. Контрастировано цитратом свинца.

В центральной части матрикса ядра всегда присутствовала электронно-прозрачная область. Митохондрии, сильно набухшие и зачастую, имели очаги деструкции наружных мембран и крист. Цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума сильно расширены и содержимое их электронно-прозрачно. В цитоплазме отростков эндотелиоцитов выявлялось небольшое количество микропиноцитозных пузырьков. Гиалоплазма имела низкую электронную плотность.

4.6 Ультраструктурные перестройки органелл кардиомиоцитов и эндотелиоцитов миокарда старых крыс после ритмических экстремальных холодовых воздействий

После 3 сеансов РЭХВ у старых крыс ультраструктурная архитектура кардиомиоцитов в общих чертах оставалась такой же, как и в группе контрольных животных.

Ядра кардиомиоцитов имели вытянутую форму. Ядерная мембрана четкая. Перинуклеарные пространства неравномерно расширены. Хроматин, в основном, находился в деконденсированном состоянии. Матрикс ядра был умеренно просветлен (рис. 4.34).

Увеличивается количество крист в митохондриях и уменьшается число очагов дегенерации и включений липофусцина (рис. 4.35).

Митохондрии кардиомиоцитов обладают высокой степенью полиморфизма. Основная часть митохондрий имеет мелко-гранулярный матрикс и большое количество укороченных и дезорганизованных крист. Матрикс митохондрий мелкозернистый и обладает средней электронной плотностью. В саркоплазме присутствует небольшое количество гранул гликогена, рибосом и полисом. Гиалоплазма имеет низкую электронную плотность.

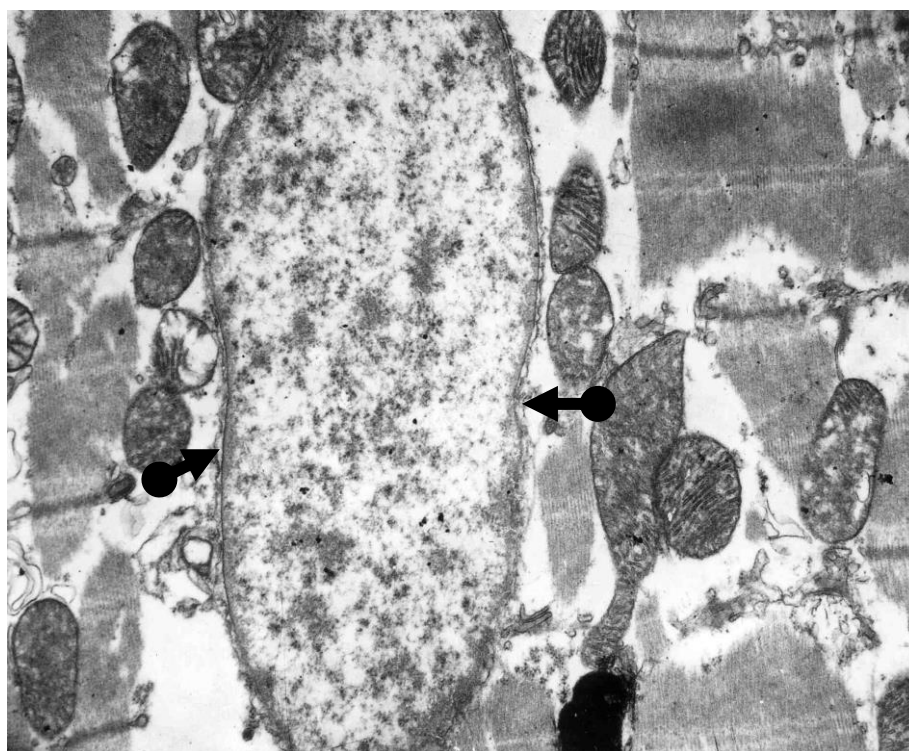


Рис. 4.34 Ультраструктура кардиомиоцитов старых крыс после 3 сеансов РЭХВ. Очаговое расширение перинуклеарного пространства $\times 39\,000$. Кон-трастировано цитратом свинца.

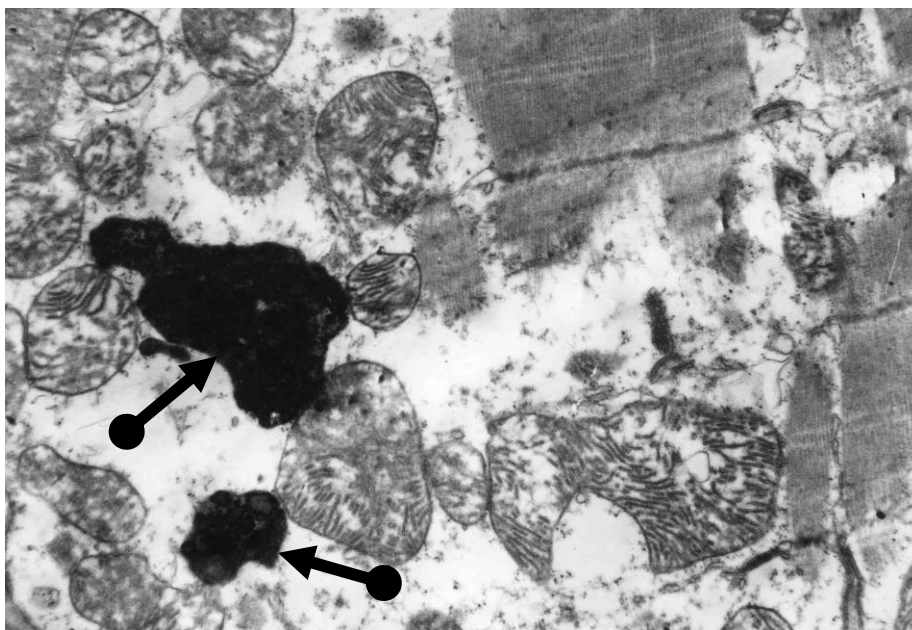


Рис. 4.35. Ультраструктура кардиомиоцитов старых крыс после 3 сеансов РЭХВ. Включения липофусцина в саркоплазме $\times 40\,000$. Контрастировано цитратом свинца.

Эндотелиоциты кровеносных капилляров содержали ядра неправильной формы с четко контурируемой ядерной мембраной и мелкозернистым матриксом. Значительная часть хроматина находилась в конденсированном состоянии. В цитоплазме увеличивается количество микропиноцитозных пузырьков (рис. 4.36). Существенных изменений мембран и других органелл в эндотелиоцитах не выявлено.

После 6 сеансов РЭХВ у старых крыс субмикроскопическое строение кардиомиоцитов характеризуется развитием компенсаторно-адаптационных процессов.

Митохондрии в кардиомиоцитах (рис. 4.37) располагались равномерными рядами вдоль миофибрилл. Наружные мембраны их содержали единичные очаги деструкции. Цистерны саркоплазматического ретикулума становятся менее расширенными. В саркоплазме выявляются многочисленные рибосомы, полисомы и гранулы гликогена. Саркоплазма остается существенно

просветленной. Саркоплазматическая мембрана без существенных изменений.

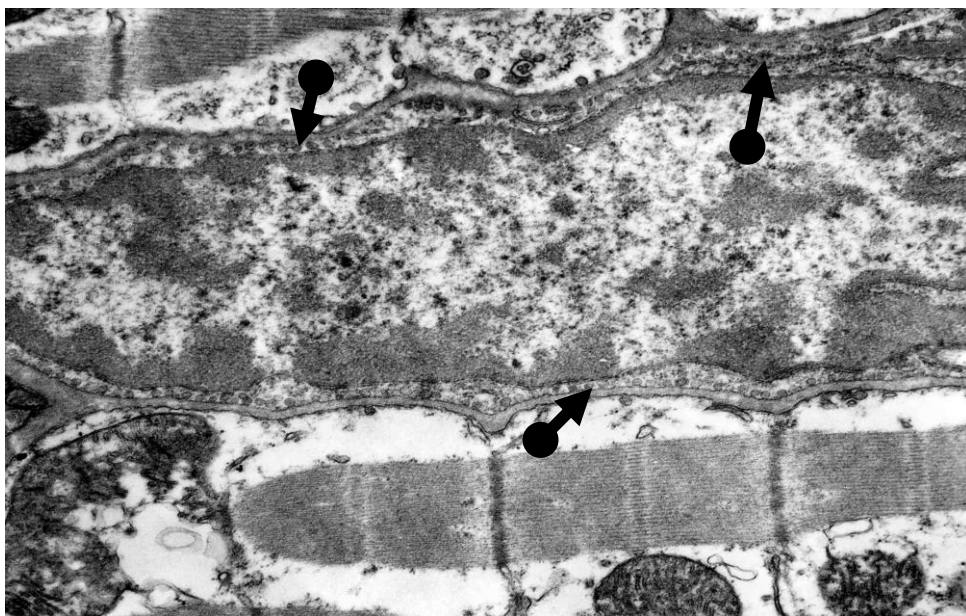


Рис. 4.36 Ультраструктура эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда старых крыс после 3 сеансов РЭХВ. Увеличение количества микропиноцитозных пузырьков $\times 60\,000$. Контрастировано цитратом свинца.

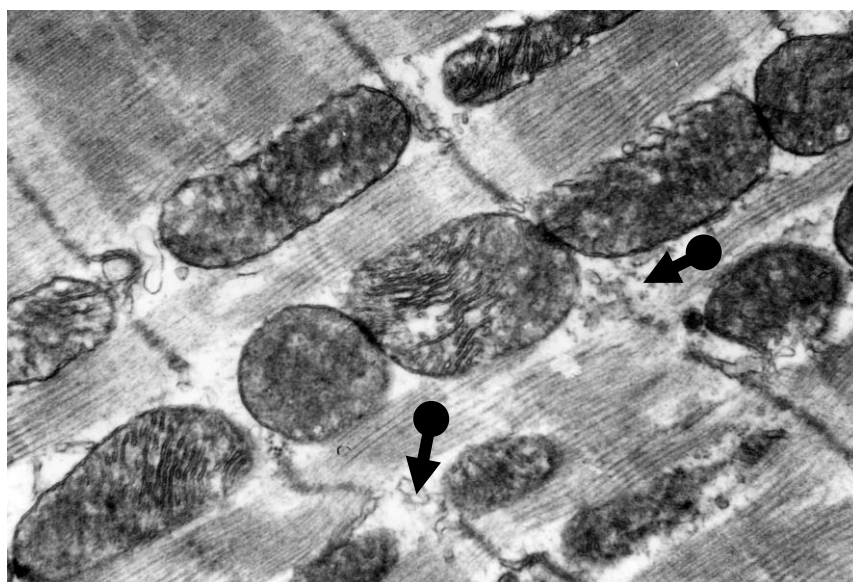


Рис. 4.37 Ультраструктура кардиомиоцитов старых крыс после 6 сеансов РЭХВ. Рибосомы и полисомы в цитоплазме $\times 45\,000$. Контрастировано цитратом свинца.

Компенсаторно–адаптационные реакции наблюдаются и в ультраструктурной перестройке эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда. Гипоплазма их приобретает мелкозернистое строение и среднюю электронную плотность.

Ядра эндотелиальных клеток содержали преимущественно деконденсированный хроматин, гранулы которого диффузно распределялись по матриксу ядра. Ядерная мембрана образовывала довольно глубокие инвагинации. В матриксе ядра иногда обнаруживались миелиноподобные структуры (рис. 4.38). Митохондрии имели умеренно просветленный, мелкозернистый матрикс и неизменённые кристы. Эндоплазматический ретикулум развит хорошо.

Обращает на себя внимание резкое увеличение числа рибосом, как связанных с мембранами эндоплазматического ретикулума, так и свободно лежащих в цитоплазме. Резко увеличивается концентрация микропиноцитозных пузырьков, локализующихся вдоль цитоплазматической мембраны.

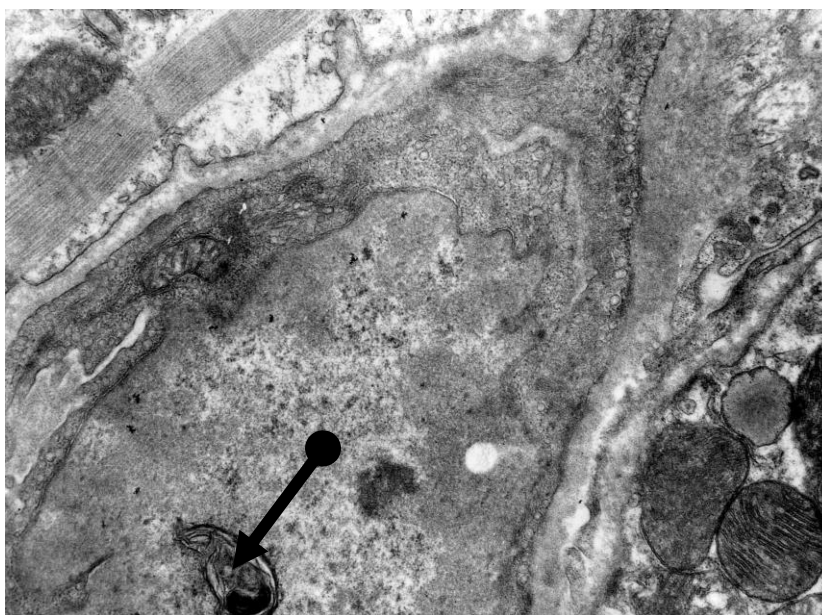


Рис. 4.38 Ультраструктура эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда старых крыс после 6 сеансов РЭХВ. Миелиноподобные структуры в ядре, увеличение числа рибосом и микропиноцитозных пузырьков х 65 000. Контрастировано цитратом свинца.

После 9 сеансов РЭХВ у старых крыс наряду с дистрофическими процессами, характерными для стареющего организма, развиваются адаптивно-компенсаторные и репаративные процессы.

Ядра кардиомиоцитов приобретают неправильную форму. Ядерная мембрана образует глубокие инвагинации (рис. 4.39). Отмечается конденсация ядерного хроматина. В перинуклеарной области саркоплазмы появляются многочисленные органеллы и мембраны саркоплазматического ретикулума.

Митохондрии (рис. 4.40) обладали мелко гранулярным матриксом, средней электронной плотностью и достаточно большим количеством крист. Следует особо подчеркнуть, что в этой группе животных появляются митохондрии с перетяжками и имеющие «гантелевидную форму».

Вместе с тем, отдельные митохондрии (рис. 4.41) сохраняли черты дегенеративных изменений.

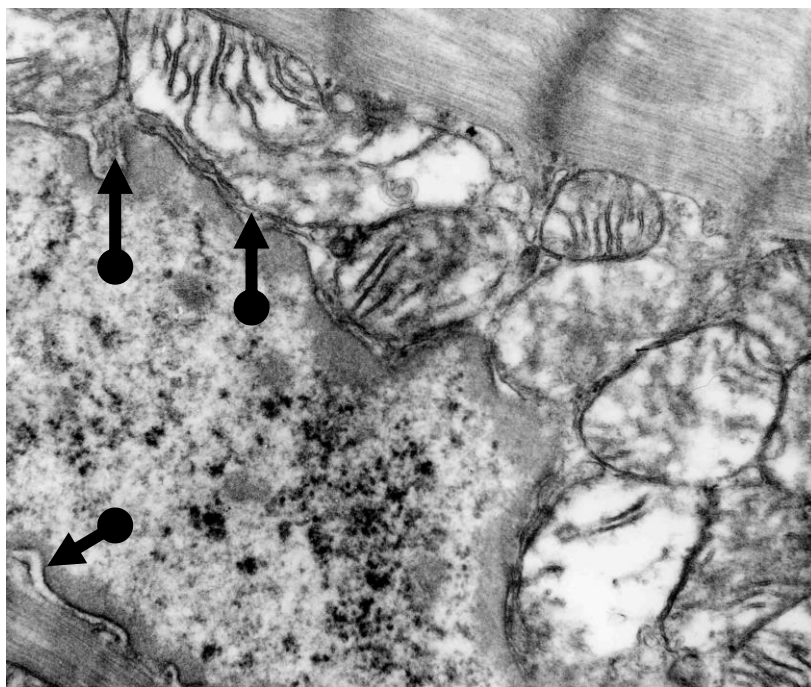


Рис. 4.39 Ультраструктура кардиомиоцитов старых крыс после 9 сеансов РЭХВ. Инвагинации ядерной мембраны $\times 60\,000$. Контрастировано цитратом свинца.



Рис. 4.40 Ультраструктура кардиомиоцитов старых крыс после 9 сеансов РЭХВ. Митохондрии с перетяжками и мелкозернистым матриксом x 55 000. Контрастировано цитратом свинца.

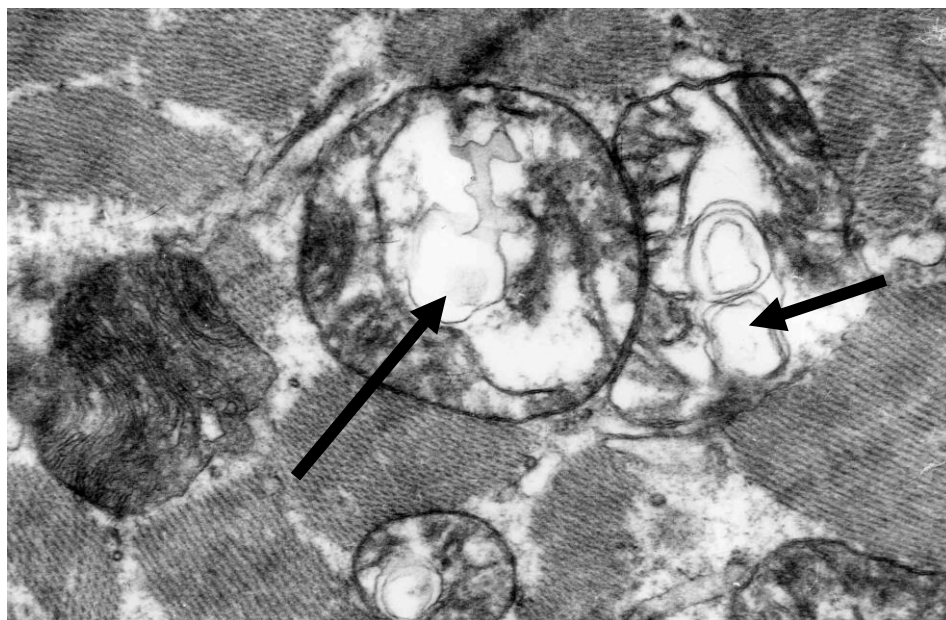


Рис. 4.41. Ультраструктура кардиомиоцитов старых крыс после 9 сеансов РЭХВ. Дегенеративные изменения митохондрий x 50 000. Контрастировано цитратом свинца.

В целом количество деструкций мембранных внутриклеточных комплексов и органелл кардиомиоцитов и эндотелиоцитов кровеносных капилляров в этой группе животных существенно меньше, чем в группе интактных старых крыс.

Нарастание активности компенсаторных внутриклеточных процессов наблюдаются и в эндотелиальных клетках кровеносных капилляров миокарда. Структурным выражением этих реакций является увеличение количества крист в митохондриях, гипертрофия пластинчатого комплекса Гольджи, деконденсация ядерного хроматина, а также резкое увеличение числа рибосом, полисом и микропиноцитозных пузырьков. Цитоплазматическая мембрана эндотелиоцитов приобретает типичное строение.

Анализ полученных данных позволяет констатировать, что в группе молодых экспериментальных животных, подвергавшихся стандартному охлаждению, изменения ультраструктурной архитектоники органелл кардиомиоцитов свидетельствуют о начальной фазе развития дистрофического процесса. У части кардиомиоцитов дистрофические нарушения в виде набухания митохондрий, просветления матрикса ядра и саркоплазмы перерастали в очаговую деструкцию саркоплазматических мембран. Выявленные ультраструктурные перестройки кардиомиоцитов являются следствием развития митохондриальной дисфункции, которая существенным образом способствует ослаблению сократительной способности миокарда. Нарушение окислительно-восстановительных реакций влечет за собой снижение активности репаративных процессов, что структурно выражается уменьшением количества рибосом и гранул гликогена в саркоплазме. Стандартное охлаждение приводит к умеренно выраженному отеку кардиомиоцитов миокарда, что структурно подтверждается снижением электронной плотности саркоплазмы. Описанные субмикроскопические перестройки находятся в пределах физиологической компенсации и являются обратимыми. В эндотелиоцитах кровеносных капилляров миокарда наряду с дистрофическими процессами наблюдалось резкое снижение активности трансцеллюлярного транспорта веществ,

что структурно проявлялось в уменьшении количества микропиноцитозных пузырьков цитоплазме.

Небольшое снижение метаболической активности внутриклеточных процессов подтверждается умеренным уменьшением числа рибосом и полисом в цитоплазме эндотелиоцитов, а также мелко очаговыми деструкциями наружных мембран и крист митохондрий.

Анализ динамики изменений субмикроскопической архитектоники кардиомиоцитов и эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда молодых крыс в зависимости от кратности помещения их в криокамеру с температурой -120°C показал, что в клетках миокарда протекают иные, нежели при стандартном охлаждении, процессы. После 3 сеансов РЭХВ ультраструктура капилляров и кардиомиоцитов практически не претерпевала каких-либо существенных изменений и оставалась такой же, как в группе интактных молодых крыс.

С увеличением количества сеансов криовоздействия наблюдается активация метаболических внутриклеточных процессов, что структурно выражается в уменьшении степени просветления саркоплазмы, увеличении числа крист в митохондриях, увеличении количества деконденсированного ядерного хроматина, возрастании числа гранул гликогена, рибосом и полисом, а также количества ядрышек в матриксе ядра.

К концу эксперимента в цитоплазме эндотелиоцитов кровеносных капилляров молодых крыс обнаруживаются многочисленные микропиноцитозные пузырьки, что указывает на активацию трансцеллюлярного транспорта веществ, воды и электролитов через стенку капилляра.

Исследования кардиомиоцитов и эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда интактных старых животных показало наличие дистрофических и деструктивных нарушений органелл, характерных для стареющего организма. Большим полиморфизмом отличались митохондрии кардиомиоцитов. Часть митохондрий была сильно набухшей с просветленным

матриксом и расширением межкristных пространств. Встречались митохондрии, находящиеся на различных стадиях дегенерации, сопровождающейся лизисом крист и формированием миелиноподобных структур. В кардиомиоцитах наблюдается довольно высокая активность катаболических процессов, что структурно подтверждается наличием в саркоплазме включений липидов и липофусцина. В саркоплазме обнаруживается небольшое количество рибосом и гранул гликогена. Выявленные изменения субмикроскопической архитектоники свидетельствуют о низкой сократительной способности кардиомиоцитов, связанной с деструктивно–дистрофическими перестройками митохондрий.

Аналогичным изменениям подвержены и эндотелиоциты кровеносных капилляров миокарда. Характерным является значительное уменьшение количества микропиноцитозных пузырьков в цитоплазме отростков эндотелиоцитов, что, несомненно, указывает на нарушение трансцеллюлярного транспорта веществ через стенку капилляра.

После стандартного охлаждения у старых крыс сохранялись такая же ультраструктурная организация эндотелиоцитов, как и у интактных животных. Несколько увеличивается количество очагов деструкции мембран митохондрий и содержание в саркоплазме включений липидов и липофусцина. Следует отметить практически полное отсутствие в саркоплазме рибосом, полисом и гликогена. Все эти нарушения позволяют констатировать, что стандартное охлаждение не влечет за собой стимуляции внутриклеточного метаболизма.

Электронно–микроскопическое исследование кардиомиоцитов и эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда старых крыс, подвергшихся сеансам РЭХВ, показало, что такое воздействие благотворно влияет на метаболическую активность и сократительную способность сердечной мышцы.

В ультраструктурной архитектонике кардиомиоцитов наблюдаются перестройки компенсаторного типа, такие как увеличение количества митохон-

дрий и крист в них, уменьшение количества очагов деструкций и дегенеративно измененных митохондрий.

Активируются процессы пролиферации митохондрий, что структурно выражается в появлении органелл имеющих «гантелевидную» форму, что свидетельствует о процессе их деления.

В саркоплазме появляются рибосомы, полисомы и гранулы гликогена, что также указывает на повышение метаболической активности кардиомиоцитов.

Вместе с тем в саркоплазме кардиомиоцитов старых крыс сохраняется довольно большое количество включений липофусцина и митохондрий с деструкциями наружных мембран и крист.

Изменения ультраструктурной организации эндотелиоцитов кровеносных капилляров свидетельствуют об активации компенсаторно-регенераторных процессов, что структурно подтверждается увеличением количества мембран гранулярной эндоплазматической сети и рибосом.

Возрастает активность трансцеллюлярного обмена веществ, что косвенно подтверждается увеличением числа микропиноцитозных пузырьков в цитоплазме эндотелиоцитов.

Таким образом, помещение как молодых, так и старых крыс в криокамеру с температурой -120°C является методом повышения сократительной способности миокарда за счет нормализации внутриклеточной биоэнергетики, тесно связанной с митохондриями.

По результатам данного исследования опубликованы следующие работы:

1. Бабийчук В.Г. Ультраструктурные изменения миокарда молодых крыс после криовоздействия / В.Г.Бабийчук, В.П.Невзоров // Харківська хірургічна школа. – 2005. – № 1. – С. 57-60.

2. Бабийчук В.Г. Ультраструктурные изменения миокарда старых крыс после проведения криотерапии / В.Г.Бабийчук, В.П.Невзоров // Харківська хірургічна школа. – 2005. – Т. 16, № 2. – С. 67-70.

3. Бабийчук В.Г. Ультраструктурные перестройки миокарда молодых и старых крыс после экстремальной криотерапии / В.Г.Бабийчук // Проблемы криобиологии. – 2006. – Т. 16, № 3. – С. 292-302.

4. Бабийчук В.Г. Функциональные изменения миокарда у крыс под влиянием ритмических холодовых воздействий / В.Г.Бабийчук, В.И.Грищенко // Експериментальна і клінічна медицина. – 2008. – № 2 – С. 8-12.

РАЗДЕЛ 5

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИОКАРДА У ПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС С АЛИМЕНТАРНЫМ ОЖИРЕНИЕМ ПОСЛЕ РИТМИЧЕСКИХ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ХОЛОДОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

5.1 Ультраструктура миокарда крыс с моделированным алиментарным ожирением

В группе экспериментальных животных, которые содержались на пищевом рационе повышенной калорийности, в ультраструктурной организации кардиомиоцитов развивались дистрофические изменения, свидетельствующие о развитии митохондриальной деструкции.

Ядра кардиомиоцитов (рис. 5.1) содержали в основном конденсированный хроматин. Его гранулы в виде осмиофильных глыбок концентрировались преимущественно вдоль ядерной мембраны. Отдельные глыбки хроматина диффузно распределялись по матриксу ядра. Одновременно с этим матрикс ядра терял электронную плотность.

Ядерная мембрана теряла четко контурированную структуру. Перинуклеарные пространства не выявлялись. Ядерная мембрана на значительном протяжении среза была лизирована.

Обращает на себя внимание полиморфизм митохондрий. Часть митохондрий имели очагово просветленный матрикс, содержащий частично лизированные кристы (рис. 5.2). Эти митохондрии имели осмиофильную наружную мембрану.

Отдельные кардиомиоциты содержали электронно-прозрачную саркоплазму, в которой располагались отдельно лежащие митохондрии с вакуолизированными кристами (рис. 5.3), часть крист была подвержена лизису. Матрикс митохондрий обладал средней электронной плотностью. Наружная мембрана митохондрий имела участки лизиса. Значительное количество митохондрий вступали в контакт с липидными включениями.

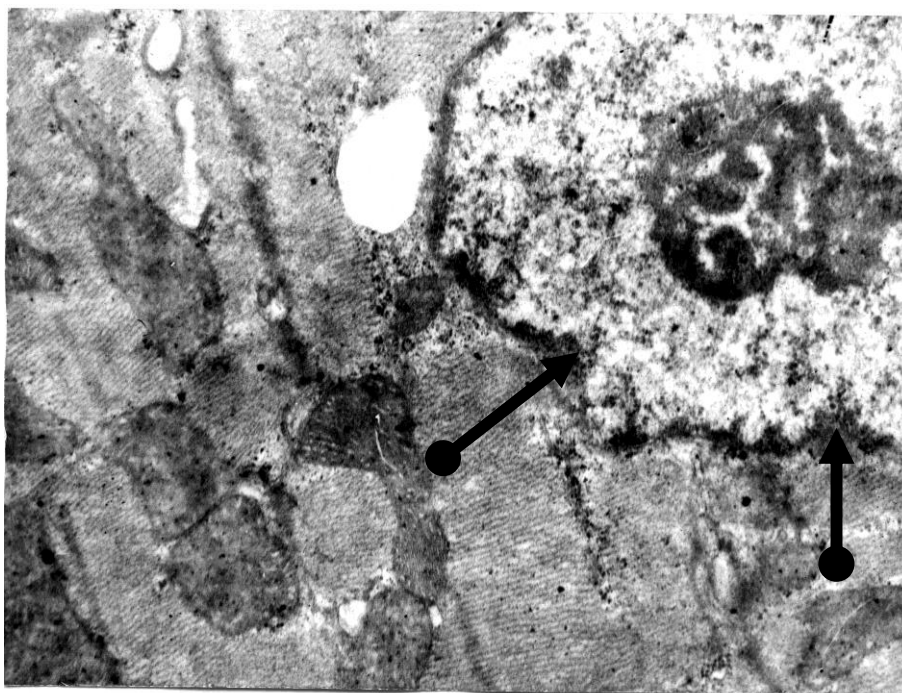


Рис. 5.1 Ультраструктура кардиомиоцитов миокарда крыс, содержащихся на высококалорийной диете. Конденсация хроматина, разрыхление ядерной мембраны x 36000.

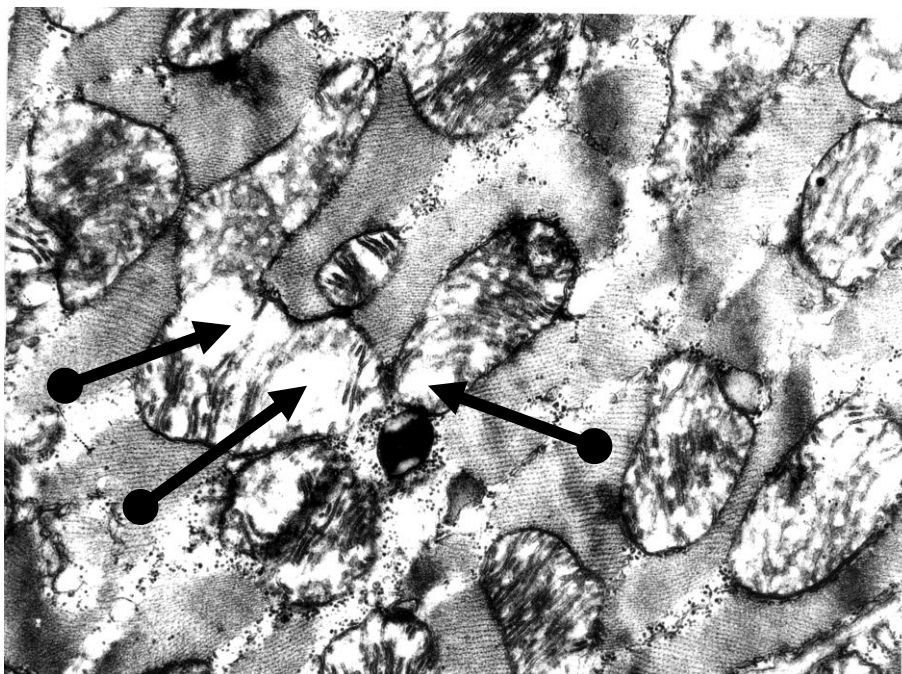


Рис. 5.2 Ультраструктура кардиомиоцитов миокарда крыс, содержащихся на высококалорийной диете. Очаговое просветление матрикса митохондрий x 31000.

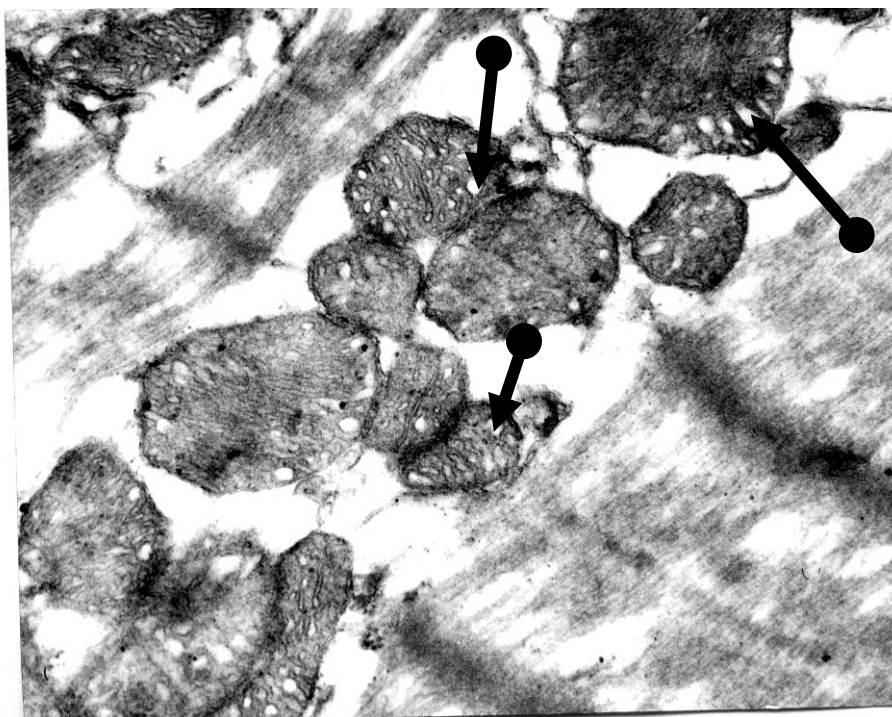


Рис. 5.3 Ультраструктура кардиомиоцитов миокарда крыс, содержащихся на высококалорийной диете. Вакуолизация крист митохондрий $\times 33000$.

Наружная мембрана митохондрий в месте контакта с включениями липидов подвергалась лизису (рис. 5.4).

В саркоплазме подавляющего количества кардиомиоцитов обнаруживались липидные капельки, обладающие различной электронной плотностью. Включения липидов вступали в контакт с пучками миофибрилл и наружными мембранами митохондрий (рис. 5.5).

Наблюдается расслоение пучков миофибрилл. В участках расслоения обнаруживается субстанция очень низкой электронной плотности (рис. 5.6).

Саркоплазма кардиомиоцитов отечна, имеет низкую электронную плотность. Канальцы саркоплазматического ретикулума и цистерны Т-системы сильно расширены и электронно-прозрачны.

В просвете капилляров определяются эритроциты, цитоплазма которых обладала неравномерной электронной плотностью. Цитоплазматическая мембрана эритроцитов существенно разрыхлена, особенно в области ее контакта с плазматической мембраной эндотелиальных клеток (рис. 5.7).

В цитоплазме кровеносных капилляров определяется большое количество электронно-прозрачных микропиноцитозных пузырьков.

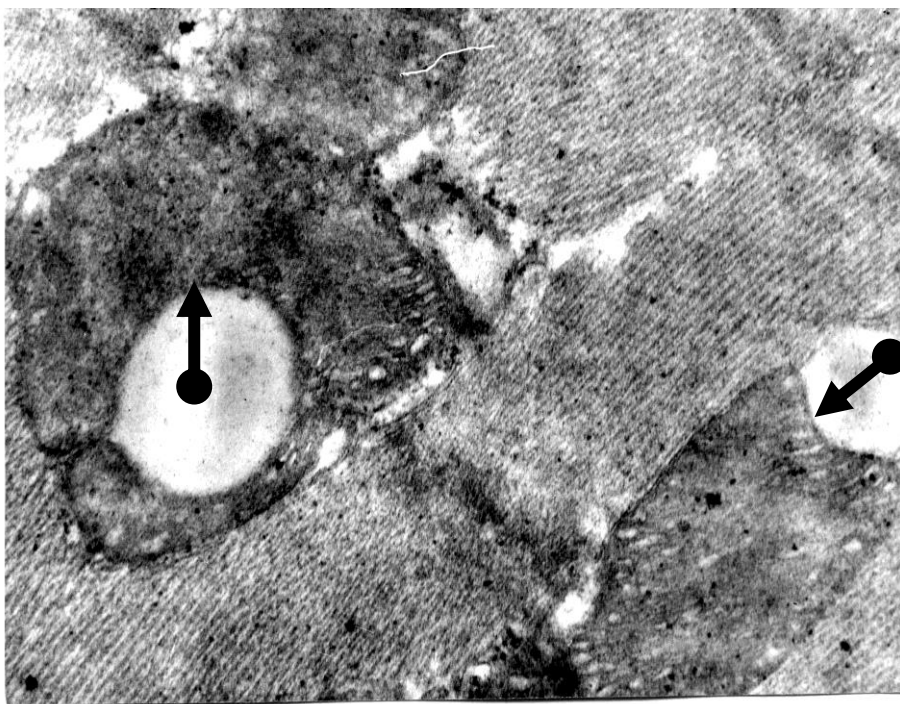


Рис. 5.4 Ультраструктура кардиомиоцитов миокарда крыс, содержащихся на высококалорийной диете. Лизис наружной мембраны митохондрий в области контакта с липидной каплейкой $\times 37000$.

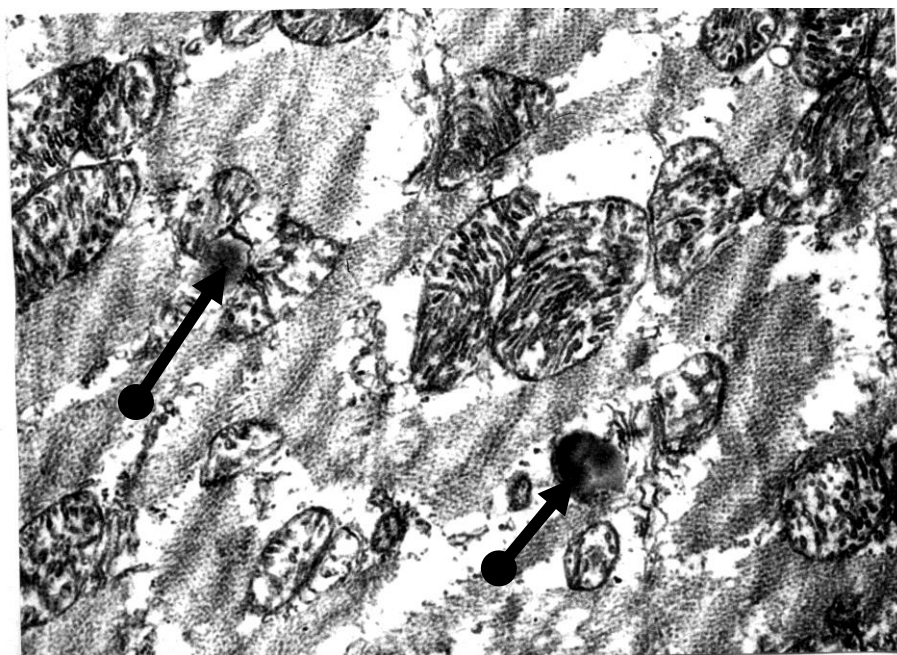


Рис. 5.5 Ультраструктура кардиомиоцитов миокарда крыс, содержащихся на высококалорийной диете. Включения липидов в саркоплазме $\times 32000$.

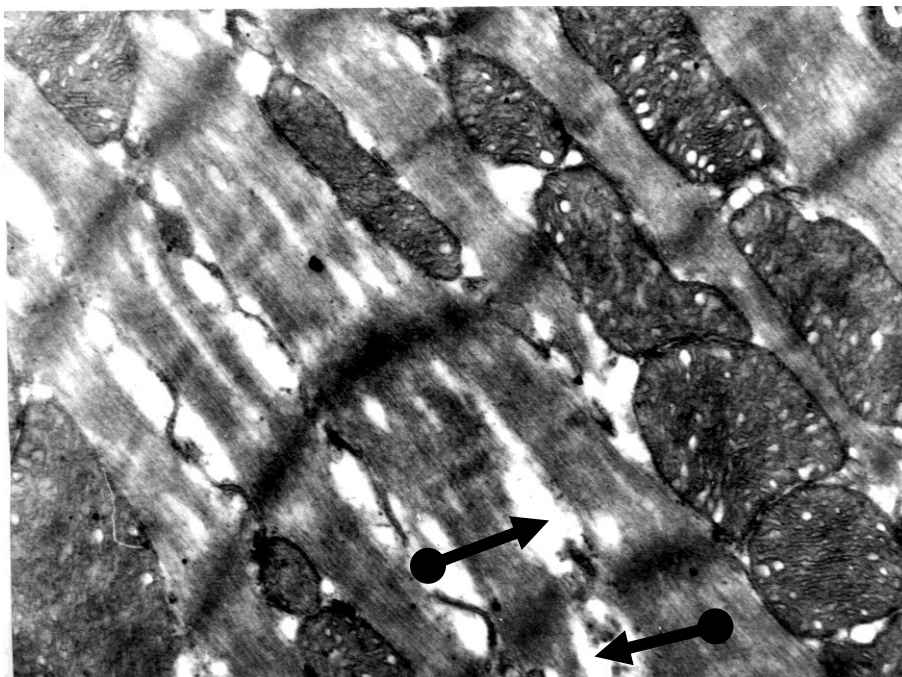


Рис. 5.6 Ультраструктура кардиомиоцитов миокарда крыс, содержащихся на высококалорийной диете. Расслоение пучков миофибрилл x 34000.

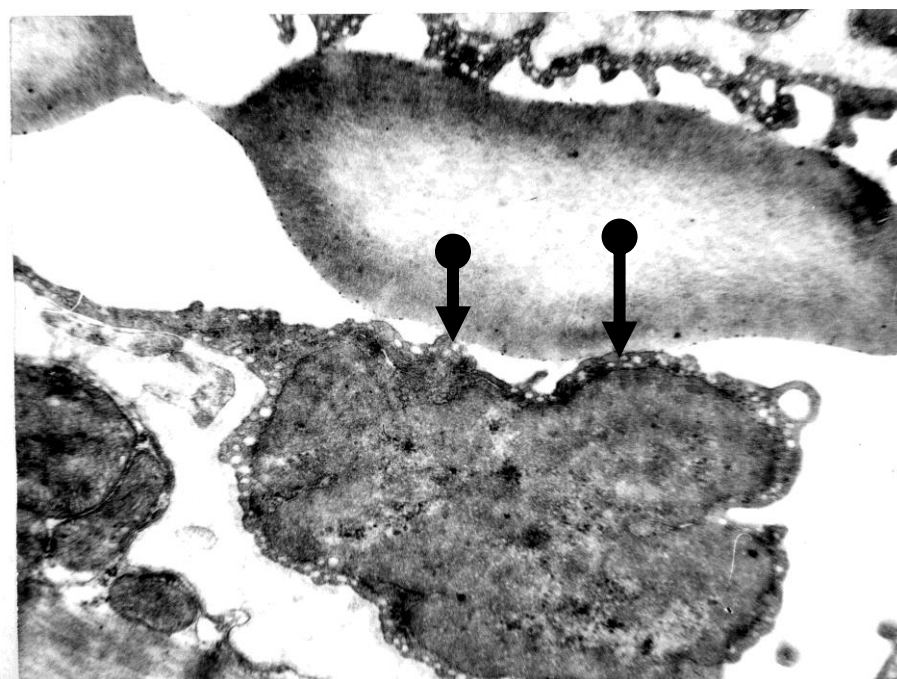


Рис. 5.7 Ультраструктура кровеносных капилляров миокарда крыс, содержащихся на высококалорийной диете. Разрыхление мембран эритроцитов и эндотелиоцитов в области их контакта x 45000.

5.2 Ультраструктура кардиомиоцитов крыс с моделированным алиментарным ожирением после ритмических экстремальных холодовых воздействий

В группе крыс, которые, наряду с высококалорийной диетой, подвергались сеансам РЭХВ, ядра кардиомиоцитов содержали в основном деконденсированный хроматин, гранулы которого более или менее равномерно распределялись по площади среза ядра. Ядерная мембрана четко контурирована и не имела очагов деструкции. Перинуклеарные пространства сохраняли постоянную ширину.

Сохранялся полиморфизм митохондрий. Следует отметить увеличение количества крист. Однако часть митохондрий содержала вакуолизированные кристы и частично разрыхленные наружные мембраны (рис. 5.8).

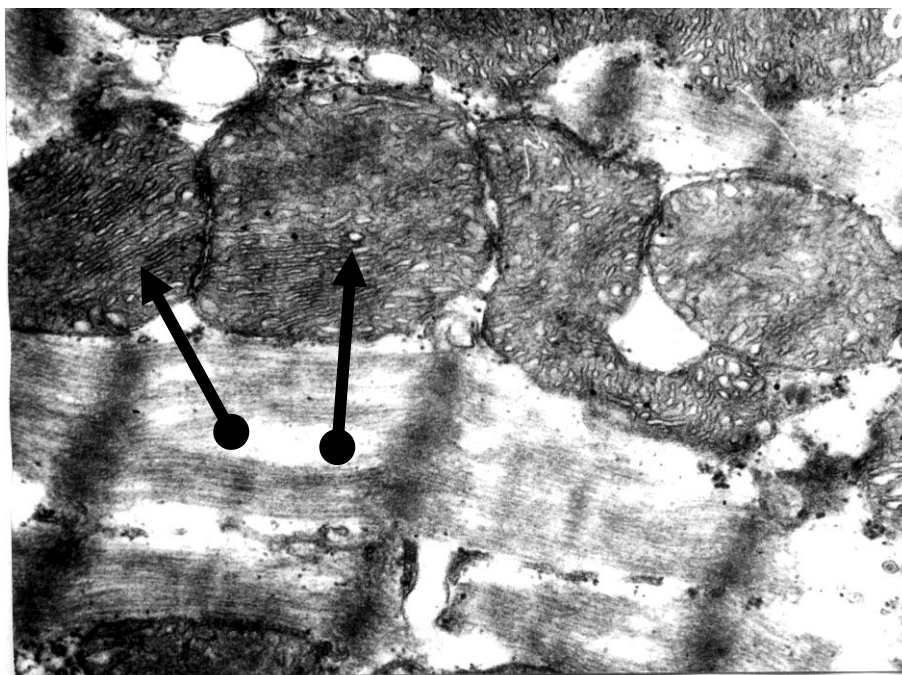


Рис. 5.8 Ультраструктура кардиомиоцитов миокарда крыс, содержащихся на высококалорийной диете в сочетании с РЭХВ. Увеличение количества крист митохондрий $\times 40000$.

Наряду с этим значительная часть кардиомиоцитов содержала митохондрии с большим количеством плотно упакованных крист и четко контурированной наружной мембраной. Матрикс этих митохондрий имел среднюю электронную плотность и мелко гранулярную структуру (рис. 5.9).

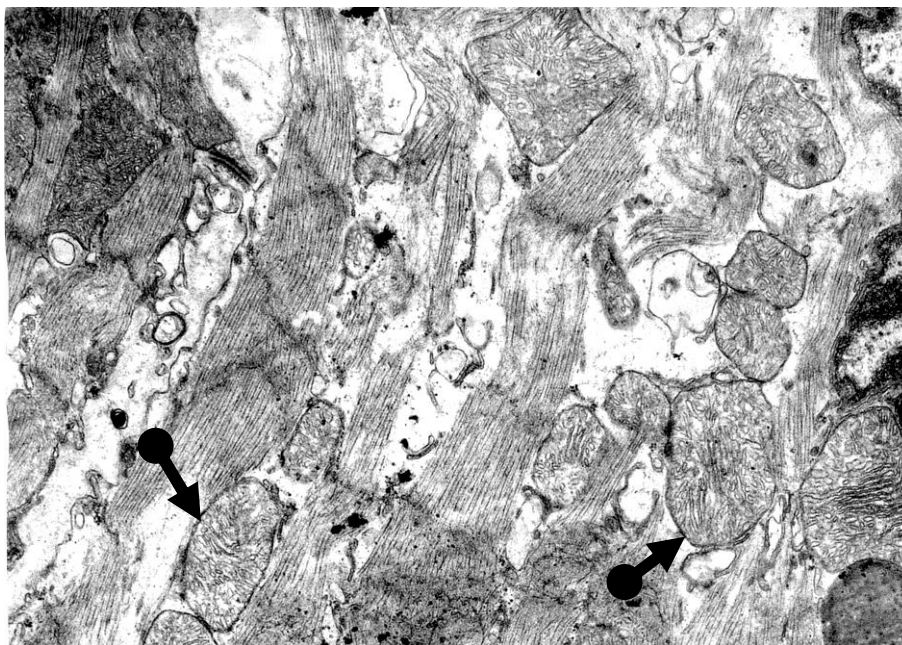


Рис. 5.9 Ультраструктура кардиомиоцитов миокарда крыс, содержащихся на высококалорийной диете в сочетании с РЭХВ. Четко контурированная наружная мембрана митохондрий x 35000.

В отличие от предыдущей группы животных, расслоения пучков миофибрилл в кардиомиоцитах не наблюдается. Цистерны саркоплазматического ретикулума и Т-системы остаются расширенными (рис. 5.10). Уменьшается количество включений липидов в саркоплазме кардиомиоцитов.

В просвете капилляров обнаруживаются группы эритроцитов, обладающих четкой наружной мембраной. В зоне контакта эритроцита и цитоплазматической мембраны наблюдается разрыхление их мембран. В цитоплазме эндотелиоцитов кровеносных капилляров присутствуют многочисленные микропиноцитозные пузырьки (рис. 5.11).

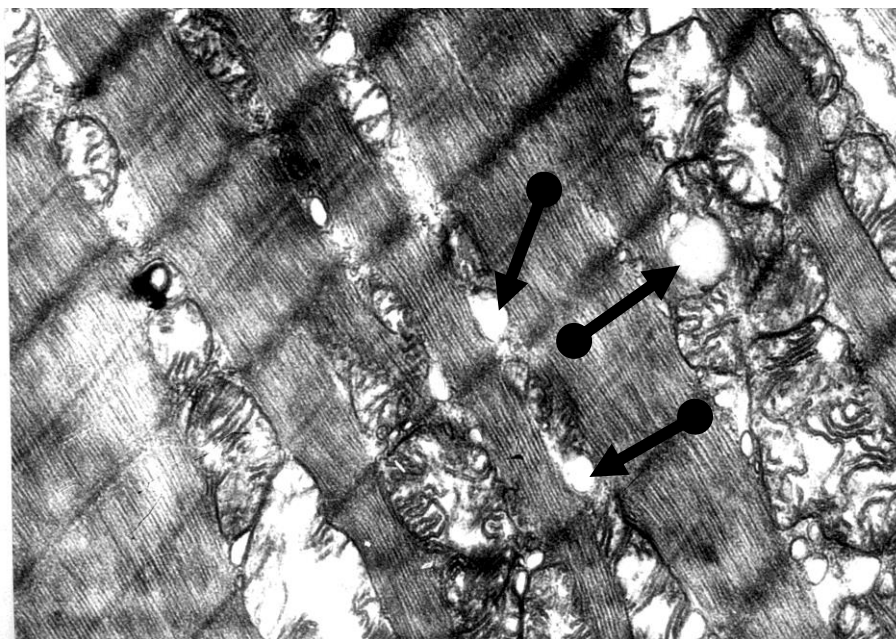


Рис. 5.10 Ультраструктура кардиомиоцитов миокарда крыс, содержащихся на высококалорийной диете в сочетании с РЭХВ. Расширение цистерн саркоплазматической сети и Т-системы x 38000.



Рис. 5.11 Ультраструктура кардиомиоцитов кровеносных капилляров миокарда крыс, содержащихся на высококалорийной диете в сочетании с РЭХВ. Микропиноцитозные пузырьки в саркоплазме x 40000.

Проведенное электронно-микроскопическое исследование кардиомиоцитов и эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда крыс с моделированным алиментарным ожирением показало наличие дистрофических и деструктивных изменений субмикроскопической архитектоники этих клеток. В основе этих изменений лежат нарушения биоэнергетики, связанные с митохондриями. Обнаруженные деструкции наружных мембран и крист митохондрий свидетельствуют о снижении активности окислительно-восстановительных процессов, протекающих на внутриклеточном уровне. Наряду с этим наблюдаемые в саркоплазме включения липидов указывают на нарушение и липидного обмена.

Описанные изменения органелл эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда (очаговые деструкции мембран митохондрий и эндоплазматического ретикулума, а также резкое снижение количества микропиноцитозных пузырьков) являются структурным подтверждением нарушения трансцеллюлярного транспорта веществ, воды и электролитов через капиллярную стенку.

Следует подчеркнуть, что обнаруженные дистрофические изменения органелл кардиомиоцитов и эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда с моделированным алиментарным ожирением находятся в пределах физиологической компенсации и являются обратимыми после снятия негативного фактора.

В группе крыс с алиментарным ожирением, подвергавшихся ритмическому экстремальному охлаждению, в ультраструктурной организации кардиомиоцитов и эндотелиоцитов кровеносных капилляров наблюдалась активация репаративных и синтетических процессов, протекающих на субклеточном уровне. Структурным подтверждением этого являются увеличение количества крист в митохондриях, уменьшение количества включений липидов и очагов лизиса внутриклеточных мембран, а также возрастание числа микропиноцитозных пузырьков в цитоплазме эндотелиоцитов.

Таким образом, алиментарное ожирение вызывает дистрофические и деструктивные изменения в ультраструктурной организации кардиомиоцитов, сопровождающиеся накоплением в саркоплазме липидных включений и развитием митохондриальной дисфункции с элементами дегенеративных изменений митохондрий. Резкое уменьшение количества микропиноцитозных пузырьков в цитоплазме эндотелиальных клеток кровеносных капилляров свидетельствует о снижении активности трансцеллюлярного транспорта веществ и электролитов через стенку капилляров.

РЭХВ вызывает активацию биоэнергетических внутриклеточных процессов, что структурно выражается в увеличении количества крист в митохондриях. Существенно уменьшается содержание включений липидов в саркоплазме кардиомиоцитов и активируется процесс трансцеллюлярного транспорта веществ.

По результатам данного исследования опубликованы следующие работы:

1. Кузбеков Р.С. Электронно-микроскопические изменения миокарда крыс с моделированным алиментарным ожирением после экстремальной криотерапии / Р.С.Кузбеков, В.Г.Бабийчук, В.П.Невзоров, А.В.Гаевой // Харківська хірургічна школа. – 2006. – Т. 23, № 4. – С. 49-52.

РАЗДЕЛ 6

ВЛИЯНИЕ РИТМИЧЕСКИХ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ХОЛОДОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ СИСТЕМ НЕЙРОГУМОРАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ У МОЛОДЫХ И СТАРЫХ КРЫС

Целостный организм является сложной совокупностью физиологических систем и органов, обладающих важнейшими свойствами самоконтроля, саморегуляции и самоуправления. Поддержание равновесия организма со средой требует постоянной перенастройки внутренних связей между различными физиологическими системами, изменения уровня их активности, регулирования и функционирования. Поддержание гомеостаза и обеспечение адаптационно-приспособительной деятельности – вот два конечных результата, которые организуют соответствующие системы. Механизмы адаптации регулируются несколькими взаимодействующими между собой управляющими системами. Так, структурно-функциональная организация ВНС определяет процесс интегрирования ряда функций организма, обеспечивая приспособительные реакции, направленные на повышение жизнеспособности. Ей принадлежит и важная роль контролировать возрастные изменения, в том числе и в ЦНС, которые становятся ведущим фактором в старении организма. Не вызывает сомнения тот факт, что с возрастом происходит количественное и качественное изменение целостности системы за счет перестройки внутренней ее структуры. Результатом этого есть качественно иная реакция стареющего организма на множество внешних и внутренних воздействий. В таких условиях организм теряет способность противостоять действию неблагоприятных факторов. Нарастают изменения в нейрогуморальной регуляции гемодинамики, наблюдается угасание обмена веществ, а также дезинтеграция центров регуляции гомеостаза. Эти изменения могут стать пусковым механизмом для развития различных заболеваний. Сердечно-сосудистая система с ее многоуровневой регуляцией представляет собой функциональную систему, конечным итогом деятельности которой является обеспечение необходи-

мого уровня функционирования целостного организма. Обладая сложными нервно-рефлекторными и нейрогуморальными механизмами, система кровообращения обеспечивает адекватное кровоснабжение соответствующих структур. В практической медицине ССС отводится одна из ведущих ролей так как, ее патология занимает ведущее место среди заболеваний и отклонений в состоянии здоровья. Реакция этой системы для врача является важнейшим показателем общей реакции организма. Кроме того, тактика лечения больного, прогноз течения заболевания, оценка риска развития осложнений не всегда зависят только от местных нарушений в органах и системах, а часто и от общего функционального состояния организма. Методы исследования сердечно-сосудистой системы в настоящее время относятся к числу наиболее разработанных и распространенных.

Уже несколько десятилетий как обнаружена взаимосвязь между вегетативной нервной системой и смертностью от сердечно-сосудистых заболеваний, включая внезапную смерть. Полученные экспериментальные подтверждения [208, 251-263] связи между предрасположенностью к летальным аритмиям и признаками повышенной симпатической или пониженной вагусной активности предопределили значительный прогресс в области исследований количественных показателей вегетативной активности. Известно, что в стрессорных условиях усиливается активность как симпатических, так и парасимпатических звеньев вегетативной регуляции [264-267].

При физиологическом старении и заболеваниях на фоне старения возникают выраженные изменения ВСР, связанные с нарушениями вегетативной регуляции ССС. При старении наблюдаются изменения биологических ритмов ССС, снижается ВСР в большей степени в области колебаний низкой и высокой частоты, а вегетативный баланс смещается в сторону преобладания симпатического отдела ВНС. Установлено, что при ишемической болезни сердца у пациентов пожилого возраста необходима коррекция суточных ритмов ССС и вегетативной регуляции ритма сердца [227, 268].

Появление современных методов анализа волновой структуры сердечного ритма дало возможность по данным ВСП оценивать текущее общее функциональное состояние организма, более точно прогнозировать вероятность благоприятного или, напротив, неблагоприятного исхода заболевания, дать количественную оценку адаптационных резервов организма. Важно, что задача оценки функционального состояния человека возникает не только при наличии различного рода заболеваний, но и в тех случаях, когда ставится вопрос о профессиональной пригодности здорового человека, тренированности, работоспособности. Исследование ВСП выходит за пределы чисто клинической практики и находит широкое применение при «оценке» качества здоровья здорового человека, контроле состояния здоровья и тренированности людей, ведущих активный образ жизни. Сравнительно несложная модификация метода популяризовала его применение. Вариабельность сердечного ритма - это изменчивость продолжительности R-R интервалов последовательных циклов сердечных сокращений за определенные промежутки времени. Метод ВСП приобрел весомую значимость среди других неинвазивных функциональных методов исследования ССС, утвержден в форме международного стандарта [262, 266].

В настоящее время определение показателей ВСП признано наиболее информативным методом количественной оценки вегетативной регуляции сердечного ритма. Считается, что снижение показателей ВСП свидетельствует о нарушении вегетативного контроля сердечной деятельности и неблагоприятно для прогноза. Самые высокие показатели ВСП регистрируются у здоровых лиц молодого возраста, спортсменов, низкие - у больных с различными органическими заболеваниями сердца. Активное изучение ВСП кардиологами всего мира показало необходимость стандартизации терминологии, выработки оптимальных методов измерения ВСП, а также описания показателей ВСП и их характеристик в норме и при патологических состояниях. Ритм сердца является ответом организма на действие различных раздражителей внешней и внутренней среды. ЧСС является интегрированным показате-

лем взаимодействия 3-х регулирующих сердечный ритм факторов: рефлекторного симпатического, рефлекторного парасимпатического и гуморально-метаболического.

Установлено, что одним из основных методов оценки текущего функционального состояния организма человека является спектральный анализ ВСР, который позволяет обнаружить периодические составляющие в колебаниях сердечного ритма и оценить их количественный вклад в динамику ритма. Частотный спектр, получаемый при анализе кратковременных записей ЭКГ [266-268, 270-273], разбит на 3 диапазона:

Высокочастотные колебания (HF-компонент) сопряжены с актом дыхания и отражают модулирующее влияние парасимпатического отдела ВНС на пейсмекерную активность синусового узла.

Низкочастотные колебания (LF-компонент) обусловлены вспышками симпатической вазомоторной активности.

Мощность очень низкочастотных колебаний (VLF – компонент) предположительно связана с системой терморегуляции и гуморальными системами.

Спектральный анализ ВСР подразумевает способ разбивки какой либо исходной кривой на набор кривых, каждая из которых находится в своём частотном диапазоне [274]. Иначе говоря, спектральный анализ ритма сердца заключался в идентификации его волновой структуры.

Согласно основной системе анализа волновой структуры сердечного ритма, нами были выделены и проанализированы следующие показатели:

- $TP, (mc^2)$ –полная мощность спектра колебаний кардиоритма;
- $HF(mc^2)$ – высокочастотные колебания (0,15-0,4Гц);
- $LF(mc^2)$ – низкочастотные колебания (0,04-0,015Гц);
- $VLF(mc^2)$ – мощность спектра кардиоритма в области очень низких частот (0,003-0,04Гц)

Следует отметить, что каждый из выделенных частотных диапазонов отображает влияние различных систем регуляции на ВСР. Не вызывает сом-

нения тот факт, что высокочастотные колебания связаны с актом дыхания, значит формирование их обусловлено связью блуждающего нерва с синусовым узлом. Таким образом, значения спектральной мощности в этом диапазоне свидетельствует об активности парасимпатического отдела ВНС. В свою очередь волновые колебания сердечного ритма в низкочастотном диапазоне спектра обусловлены вспышками симпатической вазомоторной активности, т.е. наличие низкочастотных волн свидетельствует об активности симпатического отдела ВНС. Формирование волн в очень низкочастотном диапазоне спектра предположительно обусловлено влиянием несегментарных отделов ВНС, эндокринных или гуморальных факторов на синусовый узел, ренин-ангiotензин-альдостероновую систему, концентрацию катехоламинов в плазме, систему терморегуляции и т.д. Физиологическая сущность волн этого периода менее всего понятна. Одним из наиболее важных показателей спектрального анализа ВСР является общая мощность спектра, которая вычисляется как площадь под кривой, которую образуют выше описанные волновые пики.

Все 6-ти месячные животные были разбиты на 4 группы (по 7 крыс в каждой группе):

- 1 группа - контроль;
- 2 группа – животные, получившие 3 сеанса РЭХВ;
- 3 группа – животные, получившие 6 сеансов РЭХВ;
- 4 группа – животные, получившие 9 сеансов РЭХВ.

Анализ волновой структуры сердечного ритма у молодых крыс до РЭХВ показал преобладание быстрой (рефлекторной) системы регуляции ритма сердца за счет симпатического отдела ВНС (LF-волны). Кроме того, значительный вклад в структуру спектральной мощности вносят гуморально-метаболические влияния (VLF-волны). Баланс отделов ВНС смещен в сторону преобладания симпатико-адреналовой системы. Состояние нейрогуморальной регуляции характеризуется низким уровнем вагальных влияний в модуляции сердечного ритма.

Как видно из рис. 6.1 уже после третьего сеанса РЭХВ общая мощность спектра нейрогуморальной регуляции незначительно возрастает в сравнении с контролем, отмечается снижение удельного веса волн очень медленного периода (VLF) и наряду с этим возрастает удельный вес низкочастотных (LF) и в меньшей степени высокочастотных волн (HF). Полученные данные дают возможность предположить, что после 3-х сеансов РЭХВ вегетативное обеспечение сердечной деятельности характеризуется адекватной активацией симпатического отдела ВНС в ответ на действие «мягкого» холодового стресса.

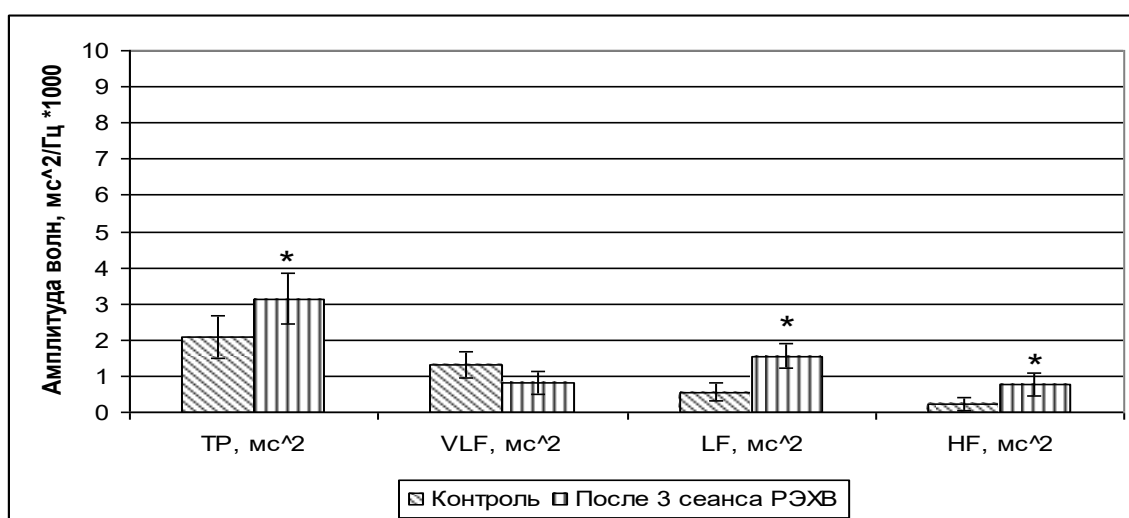


Рис. 6.1 Показатели спектрального анализа ВСР у молодых крыс после 3-го сеанса РЭХВ.

Примечание: * – достоверно ($p < 0,05$) по отношению к контролю.

После 6-го сеанса РЭХВ значительных изменений (по сравнению 3-мя сеансами РЭХВ) в удельном весе волн очень медленного и высокого периода (VLF и HF) обнаружено не было, в то время как значения общей мощности спектра (TP) уменьшались за счет снижения активности симпатико-адреналовой системы, что может свидетельствовать об эмоциональной адаптации животных к действию сверхнизких температур (рис. 6.2).

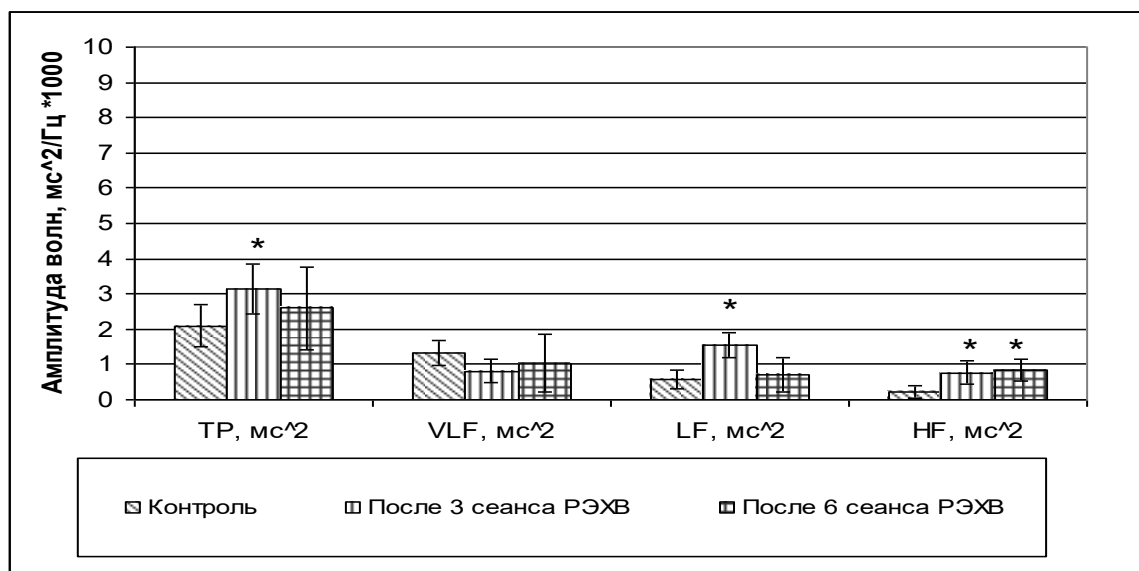


Рис. 6.2 Показатели спектрального анализа ВСР у молодых крыс после 3-го, 6-го сеанса РЭХВ.

Примечание: * – достоверно ($p < 0,05$) по отношению к контролю.

После 9-ти сеансов РЭХВ значение общей спектральной мощности значительно увеличивается. Повышается тонус симпатического и парасимпатического отделов ВНС, что проявляется увеличением удельного веса низкочастотных и высокочастотных волн, однако преобладает всё же влияние симпатико-адреналовой системы. Увеличение компонентов волн очень низкой частоты можно предположительно объяснить гормональными влияниями на миокард, влияниями эндокринных или гуморальных факторов на синусовый узел, а также связью волн этой частоты с ритмами терморегуляции (рис. 6.3).

Прослеживалась необходимость оценить показатели спектрального анализа ВСР у молодых животных через неделю, а также через месяц после РЭХВ, по результатам которого можно опосредованно судить о состоянии регуляторных систем.

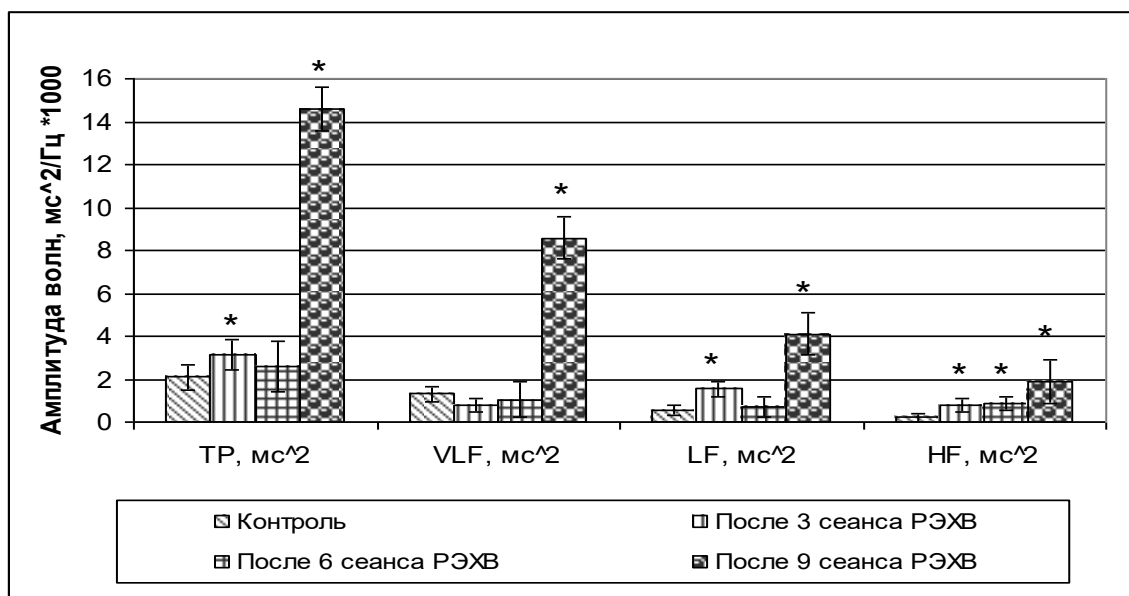


Рис. 6.3 Показатели спектрального анализа ВСР у молодых крыс после 3-го, 6-го, 9-го сеанса РЭХВ.

Примечание: * – достоверно ($p < 0,05$) по отношению к контролю.

Проведенный нами спектральный анализ ВСР через неделю и месяц после экстремального охлаждения (рис. 6.4) продемонстрировал снижение значений общей спектральной мощности в сравнении с таковыми после 3-го, 6-го, 9-го воздействия, однако, ее рост на фоне исходных значений, до РЭХВ.

Положительным моментом, по нашему мнению, является тот факт, что подъем спектральной мощности был результатом активации деятельности, как вегетативных центров (повышение тонуса симпатического и парасимпатического отделов ВНС), так и гуморального звена регуляции. Полученные данные, такие как высокий уровень вагальных, симпатических влияний в модуляции сердечного ритма, свидетельствуют о наличии у молодых крыс развитой сбалансированной вегетативной регуляции.

Установлено [274-275], что возраст вносит значительные изменения в вариабельность кровообращения. Проявлением этого является снижение общей спектральной мощности нейрогуморальной регуляции, в результате уменьшения удельного веса низко и высокочастотных волн. Падение двух

последних компонентов имеет синхронный характер и поэтому соотношение активности симпатического и парасимпатического отделов ВНС меняется незначительно.

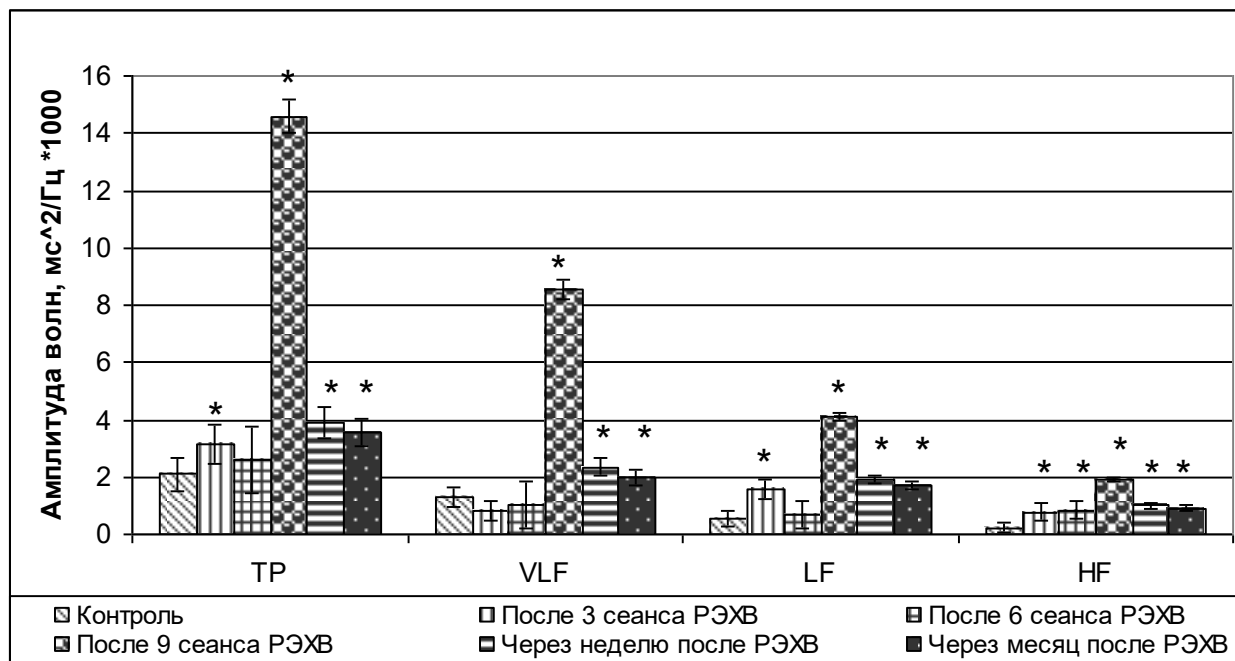


Рис. 6.4 Показатели спектрального анализа ВСР у молодых крыс после 3-го, 6-го, 9-го воздействия, а также через неделю и месяц после сеанса РЭХВ.

Примечание: * – достоверно ($p < 0,05$) по отношению к контролю.

Учитывая вышеизложенное, нами были выполнены эксперименты на старых 24-месячных крысах. Все 24-месячные животные были разбиты на 4 группы (по 7 крыс в каждой группе):

- 1 группа - контроль;
- 2 группа – животные, получившие 3 сеанса РЭХВ;
- 3 группа – животные, получившие 6 сеансов РЭХВ;
- 4 группа – животные, получившие 9 сеансов РЭХВ.

Оценивая показатели спектрального анализа ВСР у старых крыс до РЭХВ можно четко отследить характерный для данного возрастного периода переход процесса управления ритма сердца посредством нервных структур с

быстрого вегетативного уровня регуляции на менее специфичный и избирательный гуморально-метаболический. Основными критериями вышеизложенного (рис. 6.5) является снижение общей спектральной мощности нейрогуморальной регуляции (TP), за счет уменьшения активности симпатического и парасимпатического отделов ВНС, т.е. снижение удельного веса высокочастотных и низкочастотных колебаний (HF и LF – компонент), а также преобладание в структуре ВСР волн очень медленного периода (VLF-компонент).

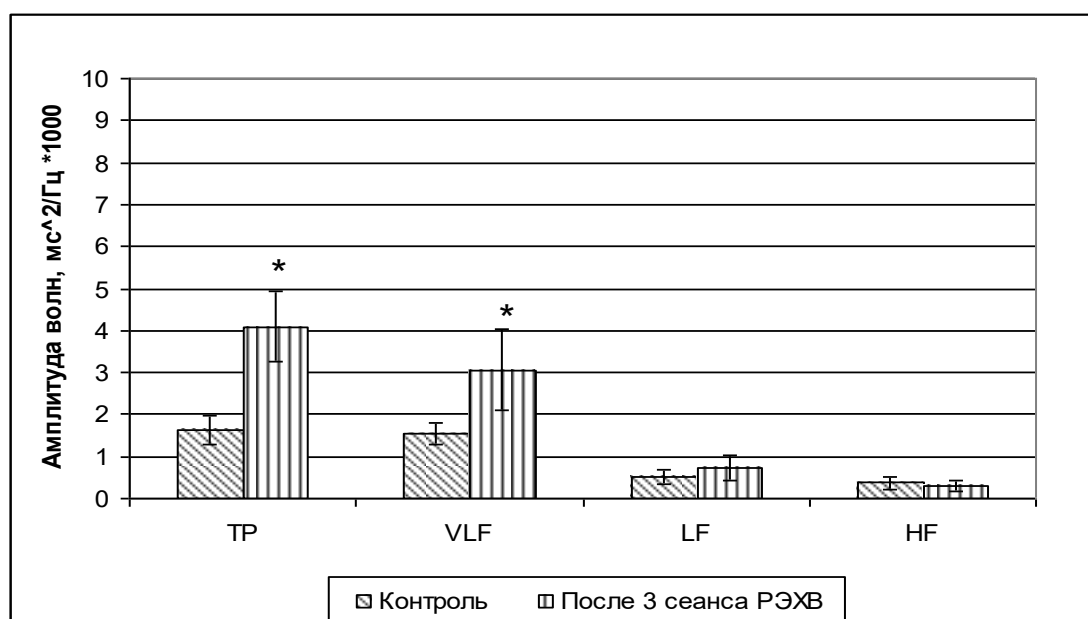


Рис. 6.5 Показатели спектрального анализа ВСР у старых крыс после 3-го сеанса РЭХВ.

Примечание: * – достоверно ($p < 0,05$) по отношению к контролю.

Баланс отделов ВНС характеризуется преобладанием симпатико-адреналовой системы. После 3-го сеанса РЭХВ (рис. 6.5) у старых животных отмечается значительный подъем общей спектральной мощности за счет активации гуморального звена регуляции (VLF компонент), в то время как, активность симпатического и парасимпатического отдела ВНС практически не менялась (LF и HF компонент). Полученные результаты подтверждаются литературными данными [264], которые свидетельствуют о том, что в пожилом организме процесс модулирования ритма сердца с помощью нервных струк-

тур заменяется менее специфическим и избирательным гуморальным регулированием, то есть происходит переход с быстрого вегетативного или рефлекторного уровня регуляции на более медленный – гуморально-метаболический.

У животных, которые получили 6 сеансов РЭХВ (рис. 6.6), значительных изменений (в сравнении с 3-мя сеансами) в удельном весе низкочастотных и высокочастотных волн не отмечалось, то есть активность симпатического и парасимпатического отделов ВНС оставалась неизменной. В то же время наблюдался еще более значительный подъем общей спектральной мощности (TP) за счет гуморального звена регуляции (VLF компонент).

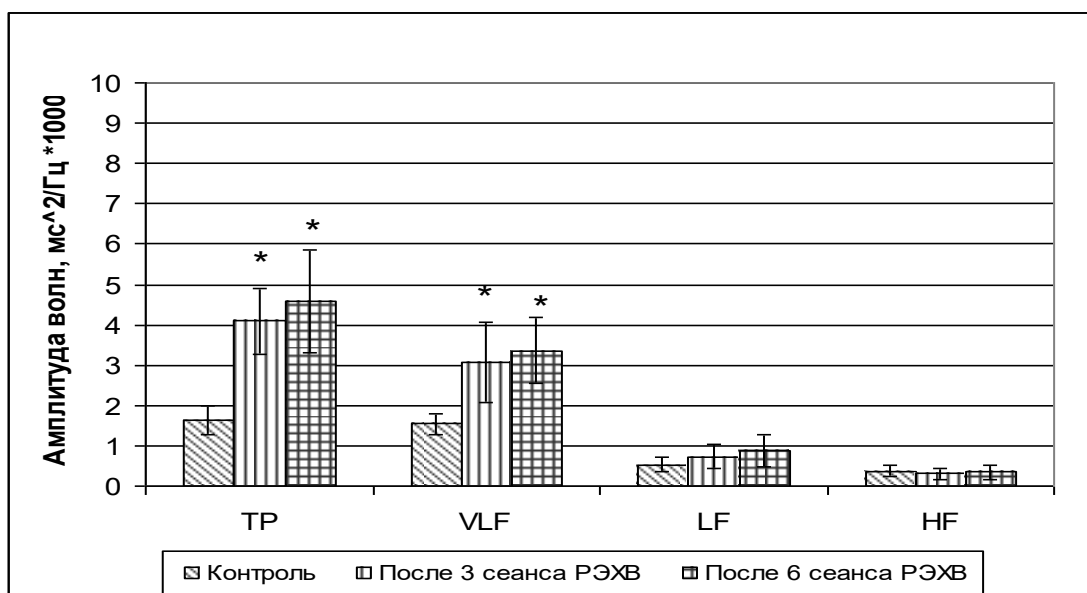


Рис. 6.6 Показатели спектрального анализа ВСР у старых крыс после 3-го, 6-го сеанса РЭХВ.

Примечание: * – достоверно ($p < 0,05$) по отношению к контролю.

Интересно, что после 9-го сеанса РЭХВ (рис. 6.7) рост спектральной мощности (по сравнению с 3-м и 6-м сеансом) был результатом активации не только гуморального звена регуляции, но и симпатического и парасимпатического отделов ВНС, соответственно.

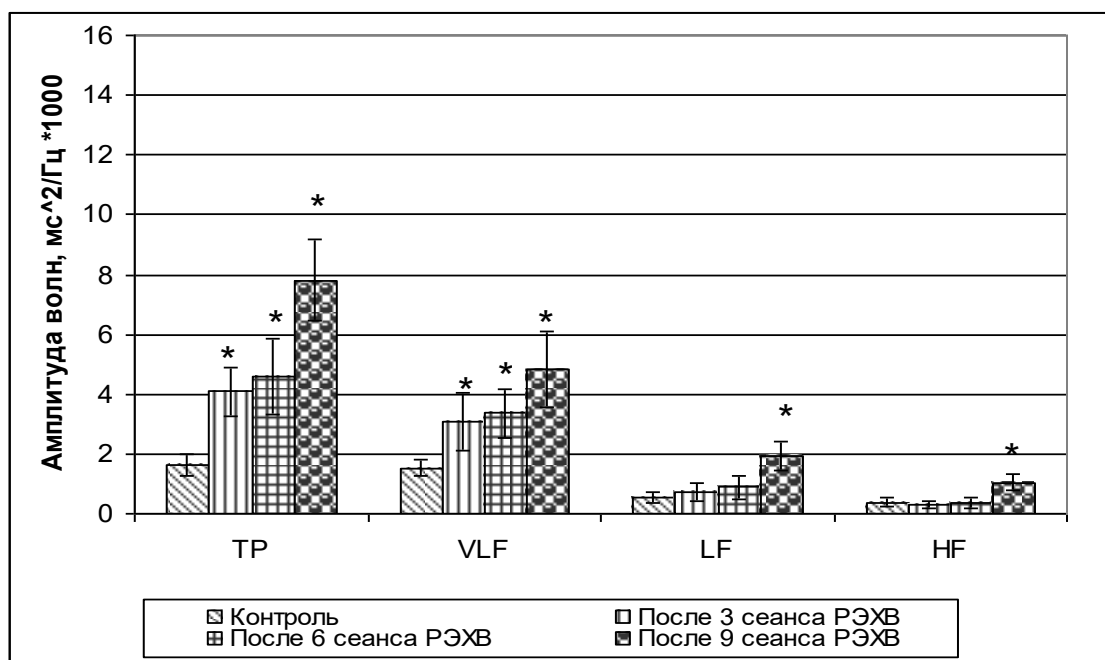


Рис. 6.7 Показатели спектрального анализа ВСР у старых крыс после 3-го, 6-го, 9-го сеанса РЭХВ.

Примечание: * – достоверно ($p < 0,05$) по отношению к контролю.

Этот факт дает возможность предположить, что РЭХВ, являясь звеном стресса, активирует вегетативные центры, которые представляют самый высокий уровень автономной нервной системы, а она является наиболее развитым и быстрым путем реализации эффектов нейрогуморальной регуляции. Кроме того, вегетативные центры выполняют важную функцию вегетосоматической и вегетомотивационной интеграции.

Как показали наблюдения, в отдаленный срок после РЭХВ (через неделю и через месяц после последнего сеанса РЭХВ) отмечается снижение общей спектральной мощности (ТР) в сравнении с 3-м, 6-м, 9-м воздействиями, однако ее значения остаются все-таки выше, чем у контрольных животных (рис. 6.8). Сравнивая баланс регуляторных систем у контрольных и экспериментальных животных, а именно гуморального, симпатического и парасимпатического звеньев, можно четко отследить тенденцию к повышению тонуса парасимпатического отдела ВНС и снижение активности гуморального звена регуляции.

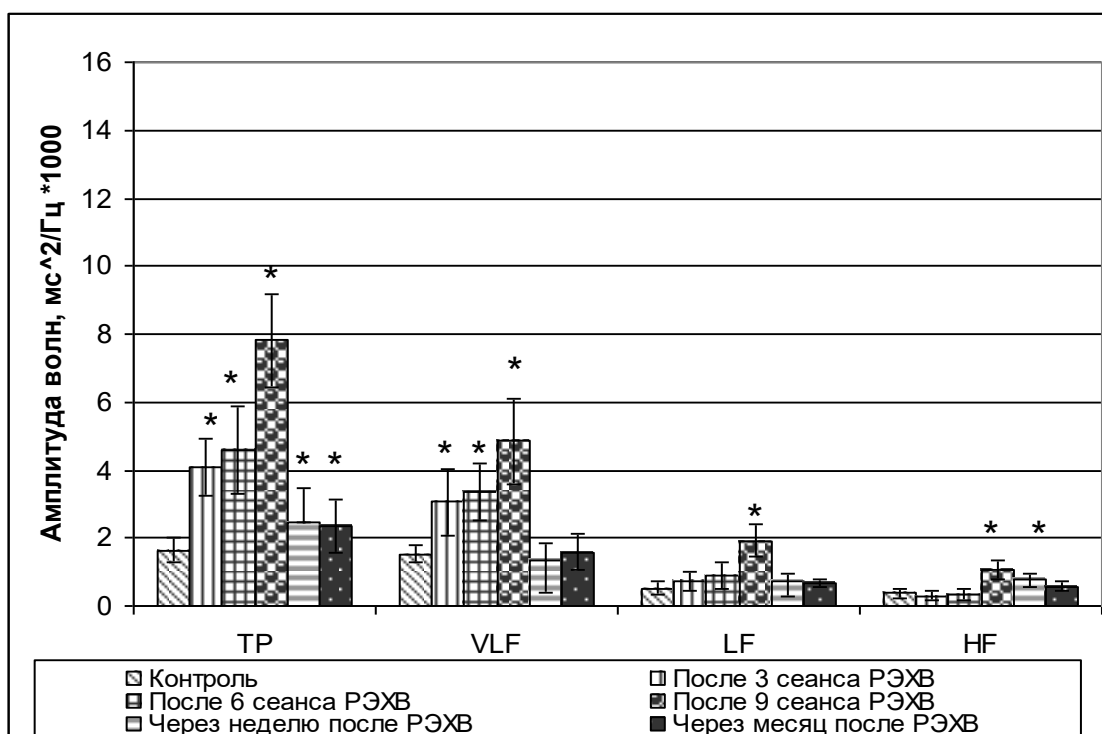


Рис. 6.8 Показатели спектрального анализа ВСР у старых крыс после 3-го, 6-го, 9-го воздействия, а также через неделю и месяц после сеанса РЭХВ.

Примечание: * – достоверно ($p < 0,05$) по отношению к контролю.

Увеличение общей спектральной мощности за счет активации как парасимпатического, так и симпатического отделов ВНС у старых животных после РЭХВ может свидетельствовать о переходе процесса управления сердечного ритма с медленного гуморально-метаболического уровня регуляции на быстрый вегетативный уровень, не присущий пожилому организму.

Экспериментальные данные, полученные нами при исследовании ВСР у крыс двух возрастных групп на фоне РЭХВ, дают возможность предположить, что РЭХВ являются мощной физиотерапевтической процедурой, которая способна значительно повышать адаптационные возможности организма независимо от возраста. Данный физиотерапевтический метод воздействия, по нашему мнению, направлен, прежде всего, на активацию собственных гомеостатических регуляторных систем, степень «изношенности» которых определяется возрастными особенностями. Подтверждением этому являются данные спектрального анализа ВСР у молодых крыс, которые свидетельствуют о подъеме общей спектральной мощности не только за счет активации

одного звена регуляции, а благодаря сбалансированному повышению активности всех звеньев регуляции. Как показано, у старых крыс на фоне РЭХВ процесс управления ритма сердца переходит с медленного гуморально-метаболического уровня регуляции, на быстрый вегетативный уровень, не присущий стареющему организму. Таким образом, лечебные эффекты, которые наблюдаются при РЭХВ, могут быть связаны с тем, что организм реагирует на влияние холода не только системой терморегуляции, но и всеми возможными адаптационными механизмами, включая гипоталамо-гипофизарно-адреналовую, иммунную и эндокринную системы.

По результатам данного исследования опубликованы следующие работы:

1. Бабийчук В.Г. Влияние экстремальной криотерапии на морфофункциональное состояние центральной нервной и сердечно-сосудистой систем / В.Г.Бабийчук // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т. 15, № 3. – С. 458-464.
2. Бабійчук В.Г. Вплив екстремальної кріотерапії на функціональний стан систем нейрогуморальної регуляції старих щурів / В.Г.Бабийчук // Науковий вісник НМУ ім. О.О. Богомольця. – 2007. – № 1. – С. 60-62.
3. Бабійчук В.Г. Вплив екстремального охолодження на показники вегетативної регуляції серцевого ритму у щурів різних вікових груп / В.Г.Бабійчук, О.В.Козлов // Проблемы криобиологии. – 2008. – № 3 – С. 374-378.

РАЗДЕЛ 7

ВЛИЯНИЕ РИТМИЧЕСКИХ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ХОЛОДОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ НА ПОКАЗАТЕЛИ СПЕКТРАЛЬНОГО АНАЛИЗА ВАРИАбельНОСТИ СЕРДЕЧНОГО РИТМА У КРЫС С АЛИМЕНТАРНЫМ ОЖИРЕНИЕМ

Факторами риска развития различного рода заболеваний внутренних органов у людей как молодого, так и пожилого возраста являются нерациональное питание, алкоголизм, курение.

В настоящее время насчитывается 1,5 миллиарда больных с ожирением, что составляет 31% всего взрослого населения планеты. У людей с ожирением, по сравнению с людьми с нормальной массой тела, в 2,9 раза чаще встречается заболевания ССС. Растущая распространенность, значительный риск для здоровья отрицательное влияние на ожидаемую продолжительность жизни определяют приоритетность проблемы ожирения, и разработку оптимальных методов профилактики и лечения. В основе развития данной нозологии лежит энергетический дисбаланс, заключающийся в несоответствии между количеством калорий, поступающих с пищей, и энергетическими затратами организма. Ожирение является следствием неадекватного взаимодействия многих эндо- и экзогенных факторов, влияние которых реализуется через нервную и эндокринную системы. Гипоталамус является центром энергетического баланса в организме человека, управляющим расходом энергии через ВНС, гипоталамо-гипофизарно-адреналовую и др. системы.

Исследуя патофизиологические механизмы у животных, нам удалось установить, что у крыс реакции организма на старение находятся в неразрывной связи с их структурой, а скорость и направленность реакций гомеостаза обеспечивает устранение и максимальное действие патологических факторов. Это предположение оправдывается при сравнительном анализе действия РЭХВ на состояние систем нейрогуморальной регуляции и ультраструктурных изменений миокарда.

Для определения неспецифичности влияния РЭХВ у животных нами для сравнения была выбрана модель алиментарного ожирения, как часто встречающегося состояния у людей, связанного с нарушением жирового и углеводного обмена.

Как видно на рис. 7.1 у контрольных животных с моделью алиментарного ожирения отмечается значительное снижение общей мощности спектра нейрогуморальной регуляции, в сравнении с контрольной группой животных без ожирения. Состояние нейрогуморальной регуляции этих животных характеризуется низким уровнем как вагальных (парасимпатических) так и симпатических влияний в модуляции сердечного ритма.

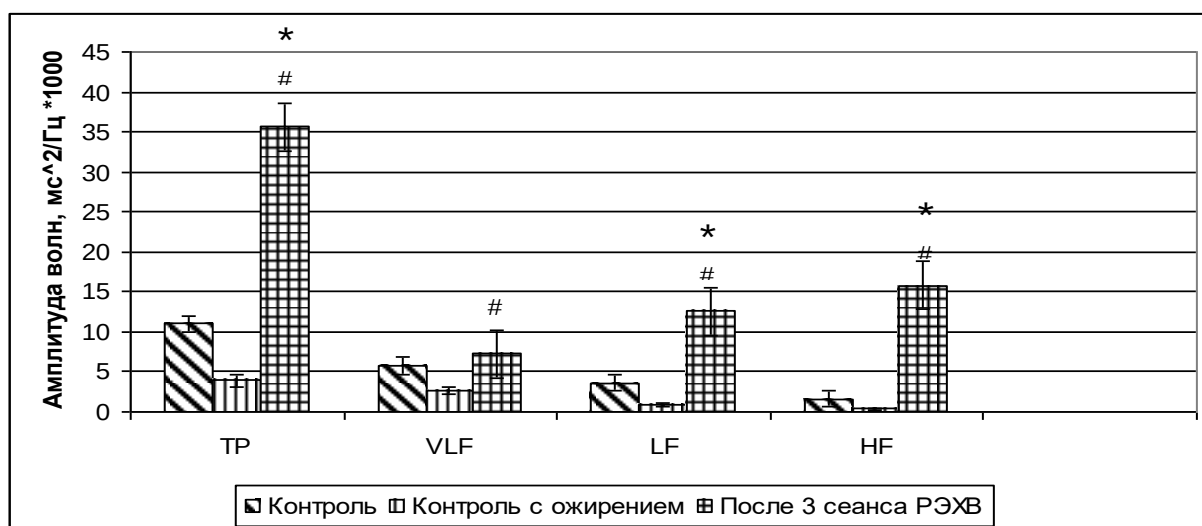


Рис. 7.1 Показатели спектрального анализа ВСР у молодых крыс с ожирением после 3-го сеанса РЭХВ.

Примечание: *, # – достоверно ($p < 0,05$) по отношению к контролю и контролю с ожирением, соответственно.

Следует отметить, что у крыс этой группы отмечается относительное сохранение мощности в диапазоне очень медленных колебаний (т.е. VLF компонент доминирует над высоко и низкочастотными колебаниями LF и HF), что предположительно может быть связано с влиянием эндокринных факторов на синусовый узел.

Однако у экспериментальных животных после 3 сеансов РЭХВ общая спектральная мощность возрастает (по сравнению с 1 и 2 контрольной группой) за счёт значительного увеличения удельного веса высокочастотных и низкочастотных волн и незначительного увеличения удельного веса в диапазоне очень медленных (VLF) колебаний.

Таким образом, уже после 3 сеансов РЭХВ значительно повышается активность как симпатического, так и парасимпатического отделов ВНС в регуляции сердечного ритма в ответ на действие холода, причём парасимпатический отдел ВНС незначительно превалирует над симпатическим.

У животных, получивших 6 сеансов РЭХВ (рис. 7.2), по сравнению с животными, получившими 3 сеанса РЭХВ, состояние нейрогуморальной регуляции характеризуется снижением уровня, как вагальных, так и симпатических влияний на сердечный ритм, а также уменьшается активность гуморального звена регуляции. Соответственно снижается общая мощность спектра нейрогуморальной регуляции. Сравнивая показатели спектрального анализа ВСР крыс этой экспериментальной группы (животные, получившие 6 сеансов РЭХВ) с аналогичными показателями контрольной группы животных с ожирением, можно проследить, что общее функциональное состояние организма крыс после 6 сеансов РЭХВ значительно изменилось за счёт роста общей мощности спектра нейрогуморальной регуляции, активации симпатических и парасимпатических влияний на ритм сердца. Однако величина показателей спектрального анализа ВСР в группе интактных животных (TP, VLF, LF, HF), а, соответственно, и функциональные резервы организма оставались всё же выше, чем у крыс с ожирением, получивших 6 сеансов РЭХВ.

Интересно, что показатели спектрального анализа ВСР у животных с ожирением, получивших 9 сеансов РЭХВ (рис. 7.3), достоверно не отличались от таковых в группе контроля (без ожирения).

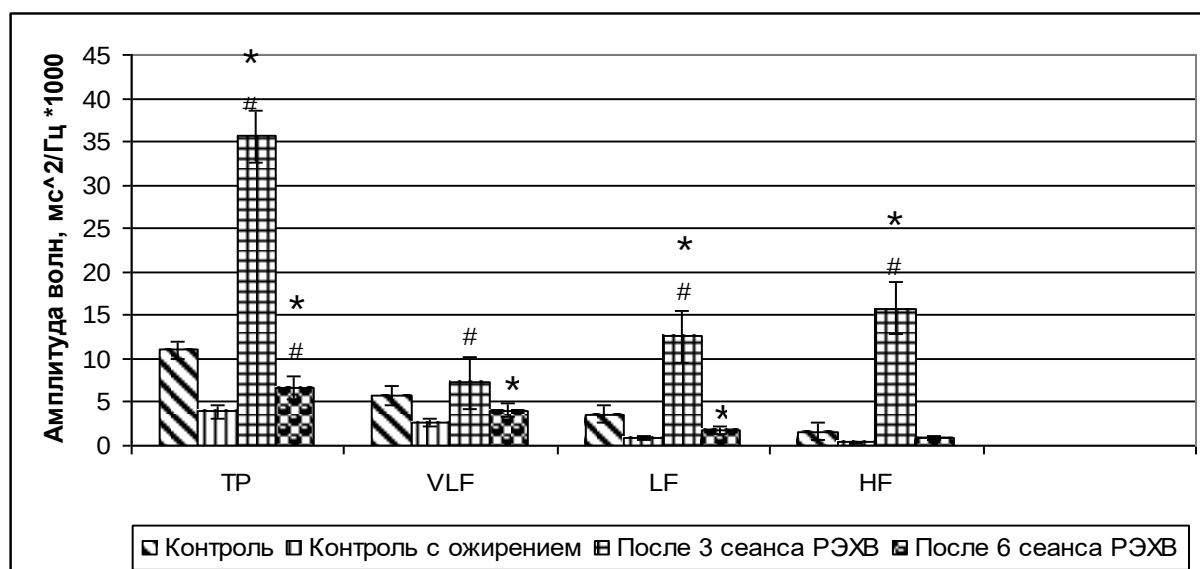


Рис. 7.2 Показатели спектрального анализа ВСР у молодых крыс с ожирением после 3-го и 6-го сеанса РЭХВ.

Примечание: *, # – достоверно ($p < 0,05$) по отношению к контролю и контролю с ожирением, соответственно.

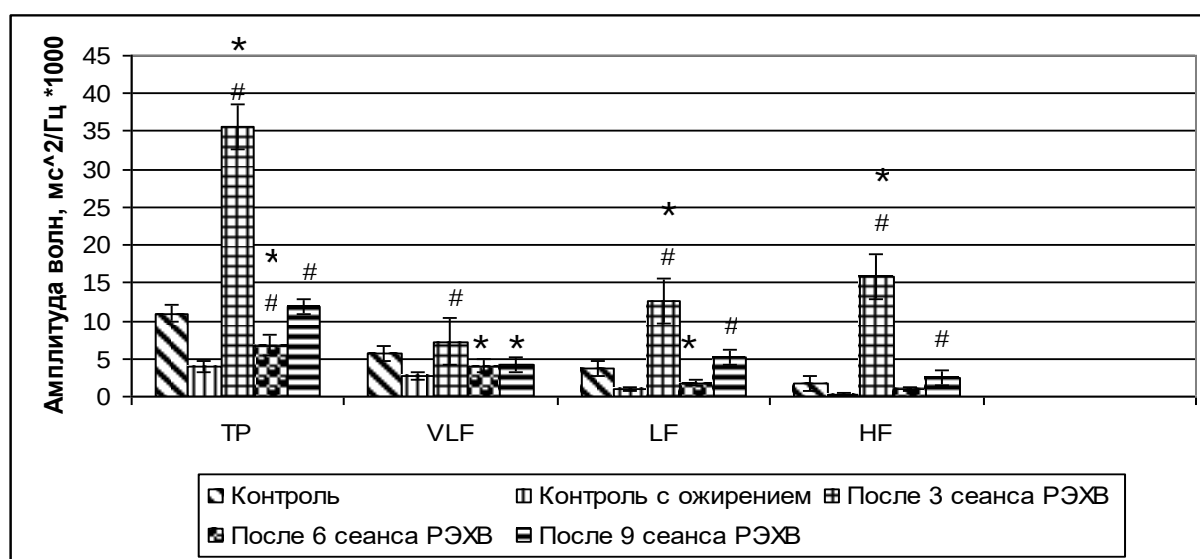


Рис. 7.3 Показатели спектрального анализа ВСР у молодых крыс с ожирением после 3-го, 6-го, 9-го сеанса РЭХВ.

Примечание: *, # – достоверно ($p < 0,05$) по отношению к контролю и контролю с ожирением, соответственно.

Значения общей спектральной мощности увеличиваются, возрастает активность как симпатического, так и парасимпатического отделов ВНС. Увеличение удельного веса волн очень низкой частоты, вероятно, обусловлено

связью очень низкочастотных волн с ритмами терморегуляции, подконтрольных гипоталамусу, и, в первую очередь, активацией медленной управляющей системы, основным звеном которой является ГЭБ.

Проведенный анализ экспериментальных данных по влиянию РЭХВ на функциональное состояние систем нейрогуморальной регуляции крыс с моделью алиментарного ожирения через неделю и месяц после охлаждения продемонстрировал значительный рост общей спектральной мощности на фоне контрольных значений (рис. 7.4).

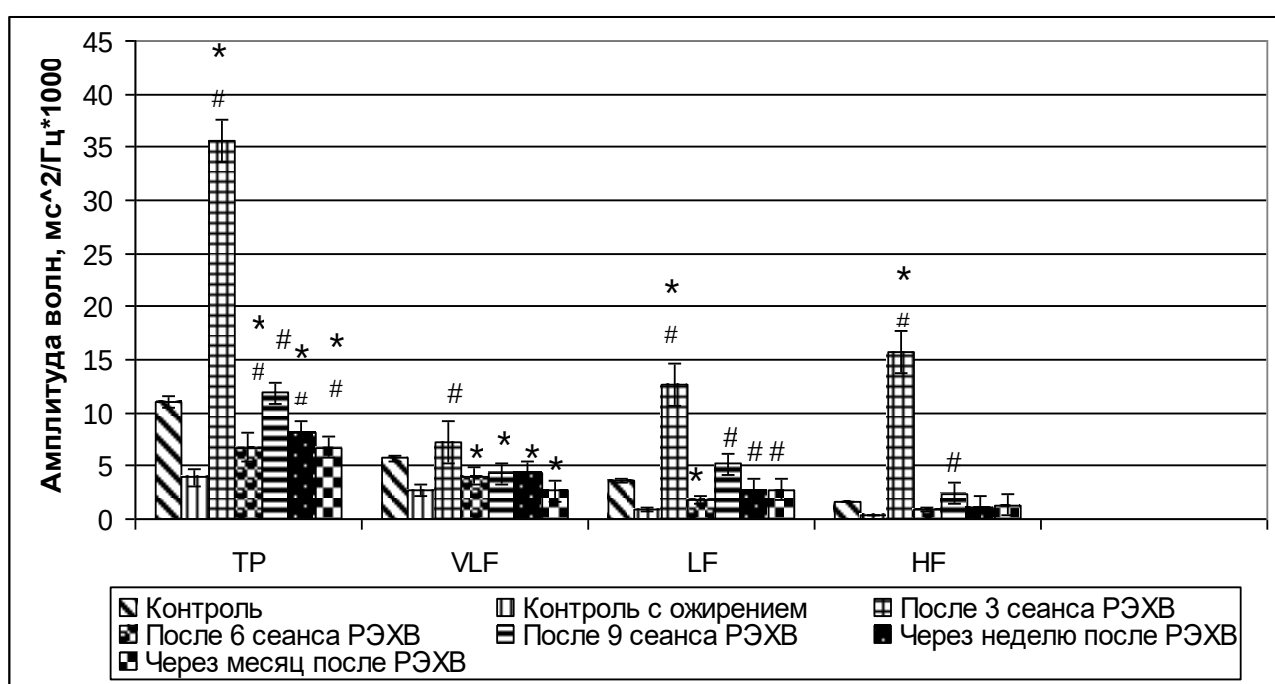


Рис. 7.4 Показатели спектрального анализа ВСР у молодых крыс с ожирением после 3-го, 6-го, 9-го воздействия, а также через неделю и месяц после сеанса РЭХВ.

Примечание: *, # – достоверно ($p < 0,05$) по отношению к контролю и контролю с ожирением, соответственно.

Активность симпатического и парасимпатического отделов ВНС практически соответствуют аналогичным показателям в группе чистого контроля. Этот факт дает возможность предположить, что РЭХВ способствуют восста-

новлению функциональных резервов организма животных с моделью алиментарного ожирения.

Представленные результаты динамического исследования ВСР у молодых крыс с ожирением позволяют сделать вывод, что непродолжительное действие экстремально низких температур не только не опустошает функциональные резервы организма, а значительно повышает физиологические резервы организма, благодаря генерализованному специфическому воздействию на гомеостатические регуляторные системы.

По результатам данного исследования опубликованы следующие работы:

1. Кузбеков Р.С. Влияние экстремальной криотерапии на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы у крыс с моделью алиментарного ожирения / Р.С.Кузбеков, А.В.Гаевой, В.Г.Бабийчук // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т. 15, № 3. – С. 483-486.

РАЗДЕЛ 8

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОК НАДПОЧЕЧНИКОВ И ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ СТАРЫХ КРЫС ПОСЛЕ РИТМИЧЕСКИХ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ХОЛОДОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

Проведенные ранее исследования по изучению действия низких температур на организм животных позволили объяснить сложные нейрофизиологические процессы в ЦНС системе и роль ГЭБ, как структурной основы медленной управляющей системы, в механизмах ответной реакции на экстремальное криовоздействие.

Результаты наших исследований показали, что при интенсивной криотерапии происходит существенное повышение проницаемости ГЭБ для биологически активных веществ и, в частности, нейромедиаторов [276].

Функциональная система ГЭБ играет важную роль во многих адаптационных процессах, связанных с повышением их лабильности, «раскачкой» симпато-парасимпатических эффектов и оптимизацией структурно-функционального состояния.

Кратковременные ритмические экстремальные криовоздействия на организм вызывают, прежде всего, изменения активности ЦНС, поэтому было важно исследовать реакцию некоторых периферических звеньев симпато-адреналовой системы и, в частности, структурно-функциональных изменений некоторых эндокринных органов.

Учитывая то, что начальные изменения возникают на субклеточном уровне и для визуализации их на ранних стадиях, когда еще отсутствуют клинические проявления, нами выбран метод электронно-микроскопического исследования. Изучалось влияние РЭХВ на ультраструктурную организацию клеток надпочечников и щитовидной железы старых крыс. Контролем служили биоптаты этих желез интактных экспериментальных животных. Электронно-микроскопическое исследование клеток надпочечников контрольных старых крыс показало адекватность применяе-

мой гистологической обработки ткани, так как ультраструктурная организация их соответствовала современным представлениям.

В первой группе экспериментальных животных, получивших 3 сеанса РЭХВ, выявлены изменения адренокортикоцитов пучковой зоны надпочечников, характерные для стрессорной реакции. Адренокортикоциты имели бокаловидную форму с эксцентрически расположенным ядром. Ядерная мембрана гладкая с четко контурированной структурой. В матриксе ядра содержался деконденсированный хроматин. Митохондрии адренокортикоцитов имели округлую форму и содержали везикулярные кристы. Наблюдалось умеренно выраженное набухание митохондрий с просветлением матрикса (рис. 8.1).

После 6-ти сеансов РЭХВ ядра адренокортикоцитов пучковой зоны коры надпочечников содержали преимущественно деконденсированный хроматин, гранулы которого диффузно располагались в матриксе. Ядерная мембрана была четко контурирована, без очагов деструкции. Она образовывала довольно глубокие инвагинации. Перинуклеарные пространства не расширены и сохраняли постоянную ширину на всем протяжении среза.

Митохондрии имели преимущественно округлую форму. Наружная мембрана и кристы не разрыхлены. Тубулярные кристы локализовались группами в матриксе митохондрий. Следует отметить, что матрикс митохондрий был в основном электронно-прозрачным.

Отдельные митохондрии содержали кристаллоидные включения. Пластинчатый цитоплазматический комплекс Гольджи сильно гипертрофирован, его гладкие мембраны окружены крупными электронно-прозрачными вакуолями. Цитоплазма адренокортикоцитов обладала низкой электронной плотностью и содержала многочисленные рибосомы, полисомы и липосомы. Цистерны ЭПР сильно расширены (рис. 8.2).

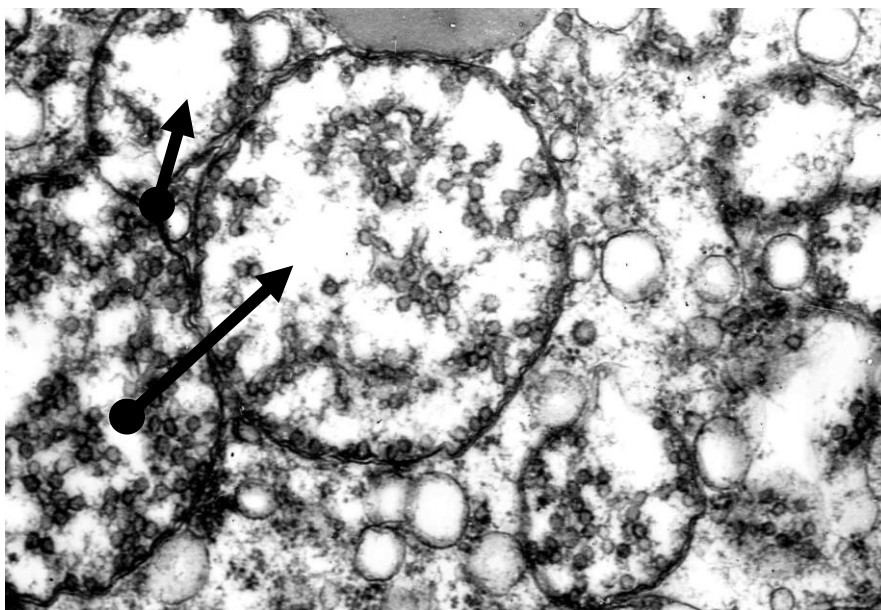


Рис. 8.1 Ультраструктура адренокортикоцитов пучковой зоны коры надпочечников старых крыс после 3 сеансов РЭХВ. Набухание митохондрий и просветление матрикса $\times 42\,000$. Контрастировано цитратом свинца.

После 9 сеансов РЭХВ адренокортикоциты из пучковой зоны коры надпочечников обладали осмиофильной ядерной мембраной. Ядерный хроматин находился в конденсированном состоянии и его глыбки локализовались по периферии матрикса ядра. Перинуклеарные пространства были сильно расширены.

Эндоплазматический ретикулум представлен крупными и мелкими электронно-прозрачными вакуолями. В цитоплазме резко увеличивается количество рибосом, полисом и липосом (рис. 8.3).

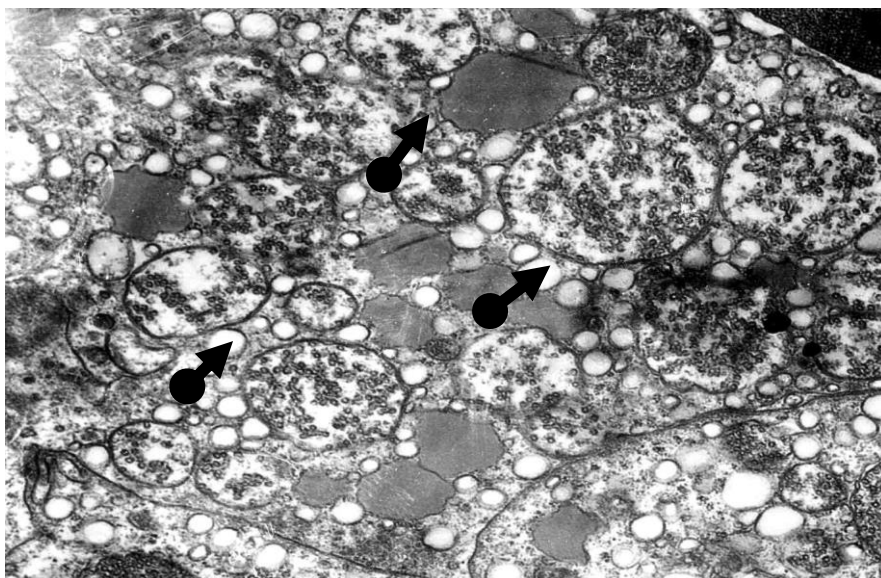


Рис. 8.2 Ультраструктура адренокортикоцитов пучковой зоны коры надпочечников старых крыс после 6 сеансов РЭХВ. Расширение цистерн эндоплазматического ретикулаума $\times 30\,000$. Контрастировано цитратом свинца.

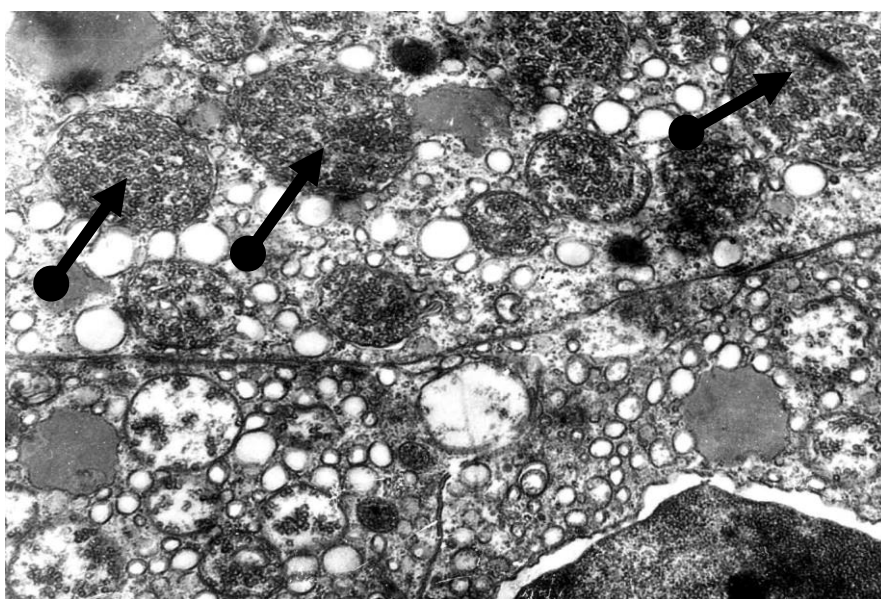


Рис. 8.3 Ультраструктура адренокортикоцитов пучковой зоны коры надпочечников старых крыс после 9 сеансов РЭХВ. Скопления тубулярных крист в митохондриях $\times 32\,000$. Контрастировано цитратом свинца.

Митохондрии адренокортикоцитов приобретали мелкозернистый матрикс и среднюю электронную плотность. В них выявлялись многочисленные тубулярные кристы, плотно упакованные в матриксе. Цитоплазматическая мембрана приобретала четко контурированную структуру.

Итак, проведенное электронно-микроскопическое исследование состояния субмикроскопической организации адренокортикоцитов пучковой зоны надпочечников старых крыс, подвергшихся РЭХВ, выявило различные изменения в зависимости от количества сеансов охлаждения.

После первых 3-6 сеансов РЭХВ ультраструктурная организация адренокортикоцитов соответствовала перестройкам, характерным для адаптационно-компенсаторных реакций. Наблюдались изменения, свидетельствующие о повышении активности внутриклеточных метаболических процессов, структурным выражением которых являлось набухание митохондрий, расширение цистерн эндоплазматической сети и гипертрофия пластинчатого цитоплазматического комплекса Гольджи.

В дальнейшем активность репаративных процессов нарастала, что структурно проявлялось в резком увеличении количества тубулярных крист в митохондриях, увеличении количества рибосом, полисом и липосом в цитоплазме, а также в гипертрофии пластинчатого комплекса Гольджи.

Таким образом, с увеличением количества сеансов РЭХВ на организм крыс интенсивность репаративных и метаболических процессов нарастала, что свидетельствует о благоприятном влиянии экстремального низкотемпературного воздействия на организм.

Девятикратное РЭХВ способствовало усилению активности окислительно-восстановительных реакций, связанных с митохондриями, количество которых в цитоплазме адренокортикоцитов увеличивалось. Возрастала активность репаративных внутриклеточных процессов, что подтверждается увеличением количества рибосом, полисом и липосом в цитоплазме адренокортикоцитов.

При исследовании состояния щитовидной железы в группе экспериментальных животных, которые получили 3 сеанса РЭХВ, в ультраструктурной организации тиреоцитов обнаруживались умеренно выраженные компенсаторные изменения органелл.

Ядра тиреоцитов теряли правильную форму. Хроматин находился в конденсированном состоянии и его глыбки локализовались в виде узкой осмиофильной полосы вдоль ядерной мембраны. В центральной области матрикса ядра хроматин был сильно разрежен. Ядерная мембрана теряла четко контурированную структуру, разрыхлялась и образовывала множественные инвагинации (рис. 8.4).

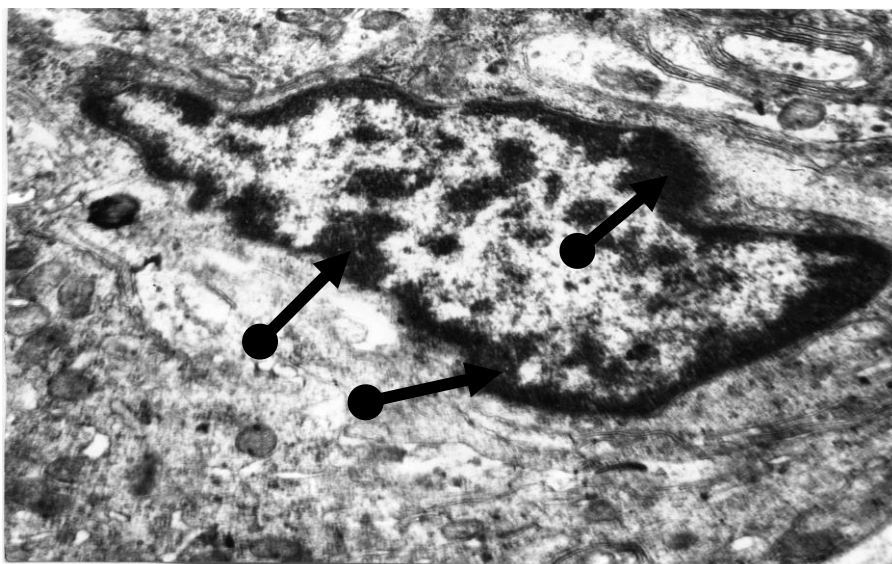


Рис. 8.4 Ультраструктура тиреоцитов щитовидной железы старых крыс после 3 сеансов РЭХВ. Конденсация хроматина ядра. $\times 28000$. Контрастировано цитратом свинца.

Митохондрии существенно набухали, матрикс их становился электронно-прозрачным и содержал небольшое количество крист (рис. 8.5).

Цистерны ЭПР были сильно расширены и содержали электронно-прозрачную субстанцию. На мембранах выявились многочисленные рибосомы. Много свободно лежащих в цитоплазме рибосом и полисом.

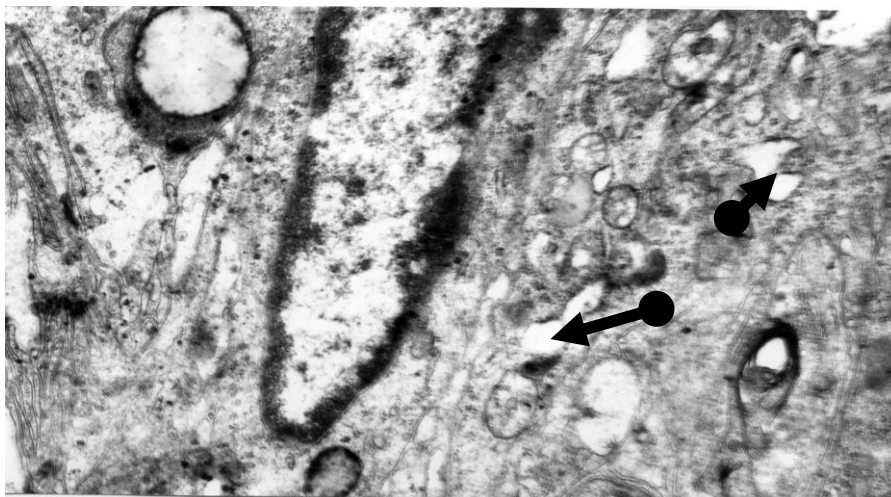


Рис. 8.5 Ультраструктура тиреоцитов щитовидной железы старых крыс после 3 сеансов РЭХВ. Набухание митохондрий, расширение цистерн эндоплазматического ретикулума $\times 29000$. Контрастировано цитратом свинца.

Иногда в цитоплазме появлялись кристаллоидные включения, окруженные элементарной мембраной. Пластинчатый цитоплазматический комплекс Гольджи умеренно гипертрофирован и на срезах имел подковообразную форму. Стопки параллельно ориентированных гладких мембран были окружены множеством мелких электронно-прозрачных везикул. После 6 сеансов РЭХВ ультраструктурная организация тиреоцитов в основном приобретала типичное строение.

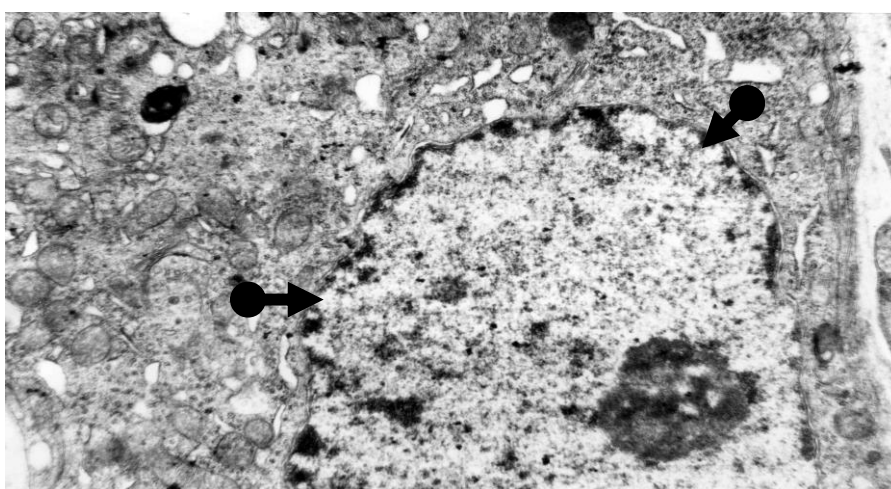


Рис. 8.6 Ультраструктура тиреоцитов щитовидной железы старых крыс после 6 сеансов РЭХВ. Равномерная ширина перинуклеарного пространства $\times 24000$. Контрастировано цитратом свинца.

Ядерная мембрана обладала четко контурированной структурой и имела небольшое количество неглубоких инвагинаций. Существенно уменьшается степень конденсации хроматина, его гранулы более равномерно распределялись по матриксу ядра. Перинуклеарные пространства сохраняли постоянную ширину (рис. 8.6). В цитоплазме существенно увеличивается количество рибосом и полисом. Цистерны гранулярного ЭПР умеренно расширены, на его мембранах присутствуют многочисленные рибосомы (рис. 8.7).

Увеличивается количество митохондрий. Они содержали мелкозернистый матрикс средней электронной плотности и довольно многочисленные кристы. Пластинчатый цитоплазматический комплекс Гольджи был умеренно гипертрофирован.

После 9 сеансов РЭХВ у старых крыс отмечаются существенные изменения в ультраструктурной организации тиреоцитов щитовидной железы. Ядра тиреоцитов сохраняли обычную форму. Ядерная мембрана гладкая, четко контурируема. Хроматин ядра находился преимущественно в деконденсированном состоянии, имел мелкогранулярную структуру и среднюю электронную плотность.

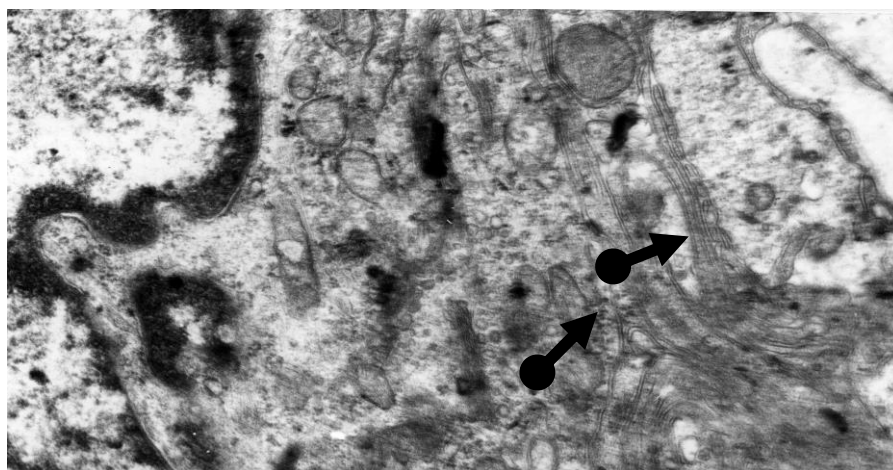


Рис. 8.7 Ультраструктура тиреоцитов щитовидной железы старых крыс после 6 сеансов РЭХВ. Увеличение числа рибосом на мембранах гранулярного

эндоплазматического ретикулума $\times 23000$. Контрастировано цитратом свинца.

Характерным для этой группы животных является наличие гиперплазии мембран гранулярной эндоплазматической сети. Количество мембран резко возрастает относительно группы контрольных животных.

Цистерны эндоплазматического ретикулума уплощены и заполнены мелко-гранулярной субстанцией средней электронной плотности. На мембранах эндоплазматической сети выявляются многочисленные рибосомы (рис. 8.8).

Цитоплазматическая мембрана базального отдела тиреоцитов образовывала глубокие складки.

Пластинчатый цитоплазматический комплекс Гольджи представлял собой группу параллельно ориентированных гладких мембран и скопления мелких электронно-прозрачных вакуолей. В области его локализации обнаруживались первичные лизосомы (рис. 8.9).

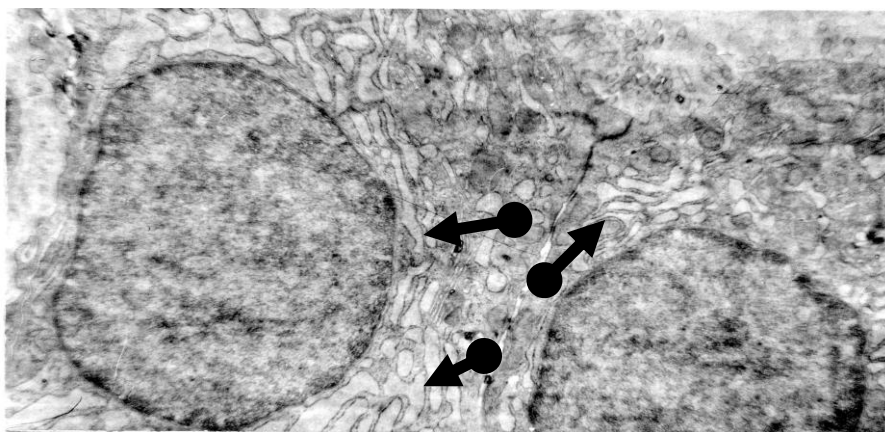


Рис. 8.8 Ультраструктура тиреоцитов щитовидной железы старых крыс, после 9 сеансов РЭХВ. Уплотнение цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума $\times 22000$. Контрастировано цитратом свинца.

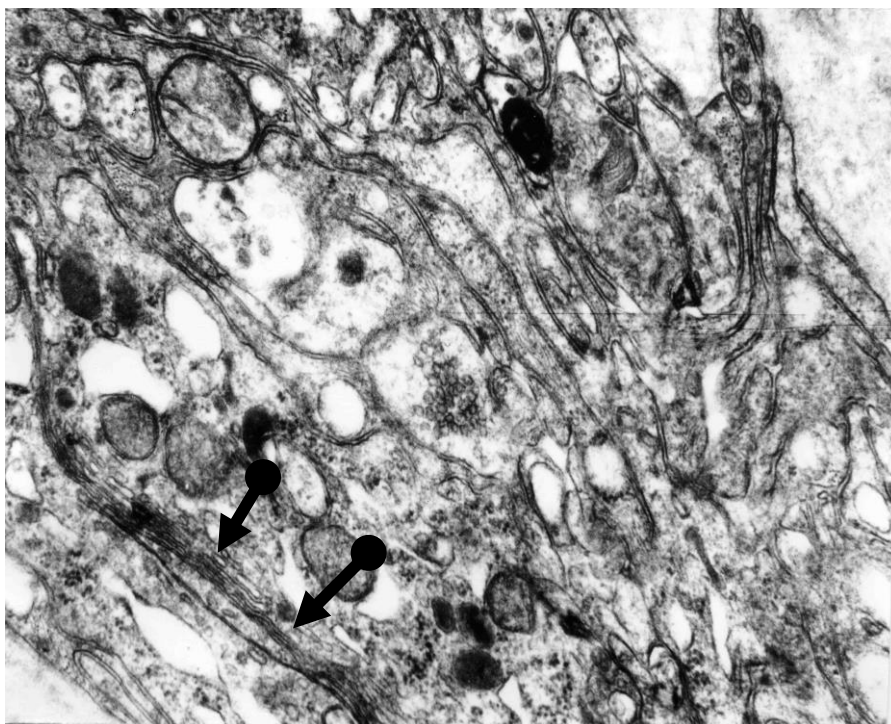


Рис. 8.9 Ультраструктура тиреоцитов щитовидной железы старых крыс после 9 сеансов РЭХВ. Гипертрофия комплекса Гольджи $\times 32000$. Контрастировано цитратом свинца.

Существенные изменения претерпевали митохондрии. Количество их в цитоплазме тиреоцитов существенно возрастало. Они варьировали по величине и форме. Матрикс ядра имел мелкогранулярное строение и содержал многочисленные кристы (рис. 8.10). Деструкций наружных мембран и крист митохондрий в этой группе животных не выявлено.

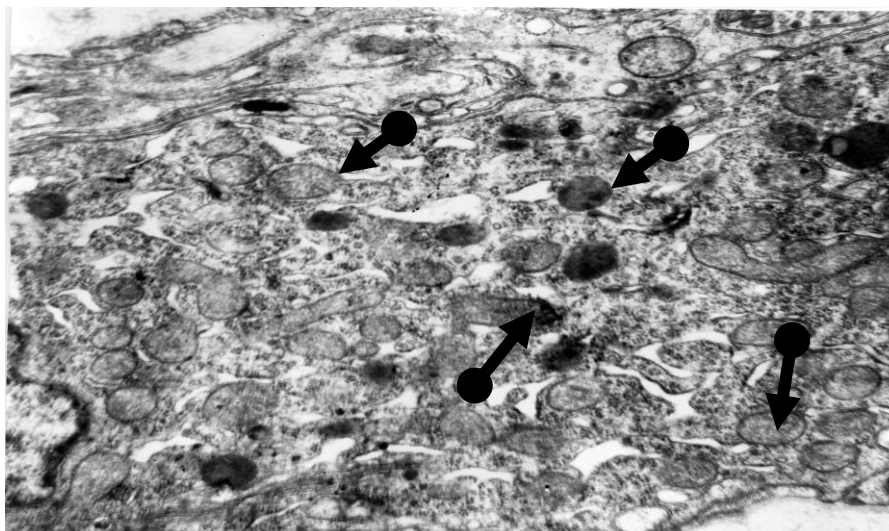


Рис. 8.10 Ультраструктура тиреоцитов щитовидной железы старых крыс после 9 сеансов РЭХВ. Полиморфизм митохондрий. Контрастировано цитратом свинца.

Следует особо отметить наличие перестроек в субмикроскопической организации эндотелиальных клеток капилляров щитовидной железы в зависимости от количества сеансов экстремального охлаждения.

После 3 сеансов РЭХВ наблюдается резкое расширение кровеносных капилляров. Цитоплазматическая мембрана эндотелиоцитов, обращенная в просвет капилляра, существенно разрыхлялась (рис. 8.11).

Ядра эндотелиоцитов приобретали неправильную форму и содержали глыбки конденсированного хроматина. Существенных изменений со стороны митохондрий, гранулярного эндоплазматического ретикулума, пластинчатого цитоплазматического комплекса Гольджи и других органелл эндотелиоцитов не выявлено.

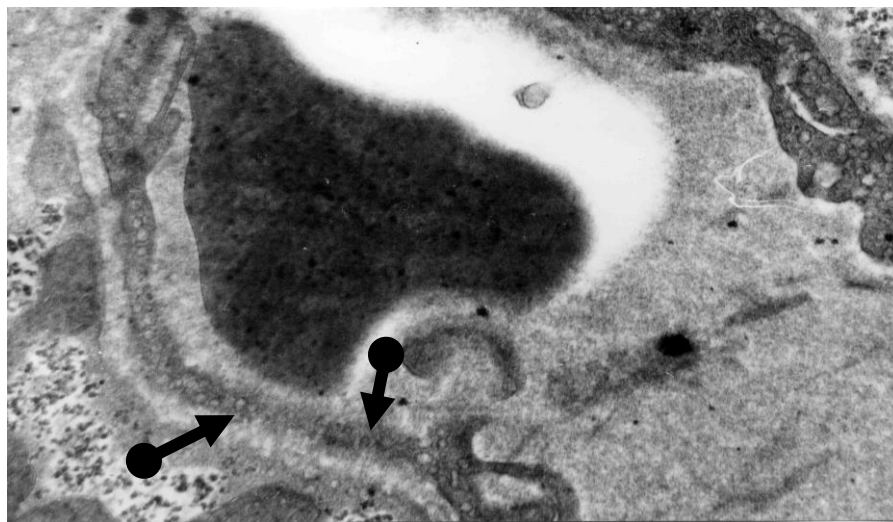


Рис. 8.11 Ультраструктура эндотелиальных клеток капилляров щитовидной железы старых крыс после 9 сеансов РЭХВ. Разрыхление цитоплазматической мембраны $\times 47000$. Контрастировано цитратом свинца.

Дальнейшее увеличение количества сеансов охлаждения приводит к полному восстановлению типичного субмикроскопического строения кровеносных капилляров. Характерным для эндотелиоцитов этой группы крыс является резкое увеличение числа микропиноцитозных пузырьков в цитоплазме. Просвет капилляра заполнен нежнотоволокнистой субстанцией (рис. 8.12).

В отдельных эндотелиоцитах наблюдалось увеличение количества выпячиваний цитоплазматической мембраны, обращенной в просвет капилляра (рис. 8.13).

Таким образом, проведенное электронно-микроскопическое исследование тиреоцитов щитовидной железы, а также эндотелиоцитов кровеносных капилляров, выявило различные ультраструктурные изменения органелл, зависящие от количества сеансов РЭХВ.

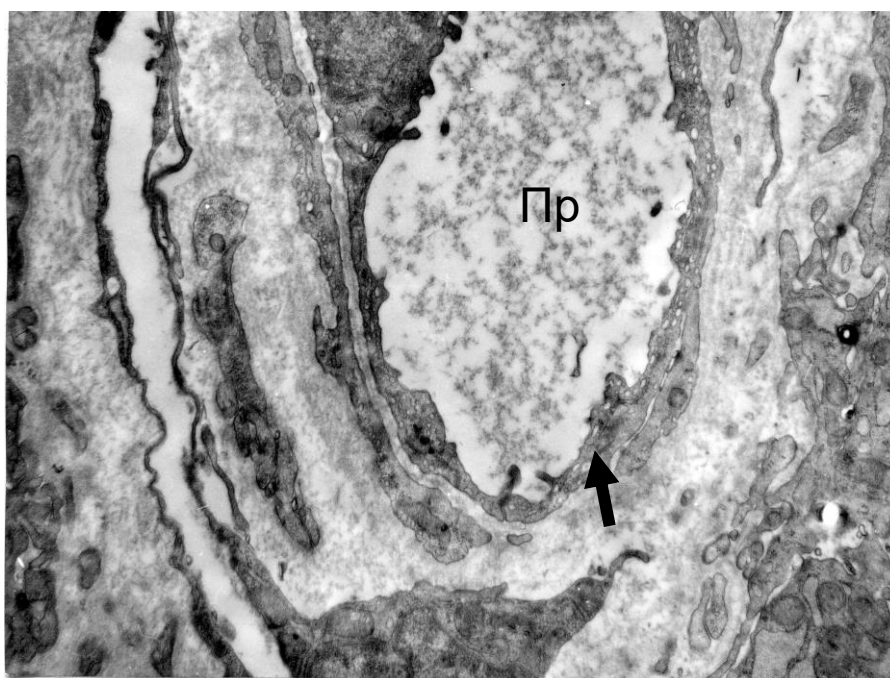


Рис. 8.12 Ультраструктура кровеносных капилляров щитовидной железы старых крыс после 9 сеансов РЭХВ. Увеличение количества микропиноцитозных пузырьков в цитоплазме (стрелка), нежноволокнистая субстанция в просвете капилляра. Пр - просвет капилляра $\times 42000$. Контрастировано цитратом свинца.

Дальнейшее увеличение числа сеансов РЭХВ приводило к ультраструктурным перестройкам тиреоцитов и эндотелиоцитов кровеносных капилляров, свидетельствующим об усилении репаративной внутриклеточной активности, что структурно подтверждается гиперплазией мембран гранулярного ЭПР и увеличением числа рибосом и полисом в цитоплазме.

Высокая метаболическая активность тиреоцитов косвенно подтверждается наблюдаемой гипертрофией пластинчатого цитоплазматического комплекса Гольджи и увеличением числа мелких везикул вблизи стопок параллельно ориентированных гладких мембран.

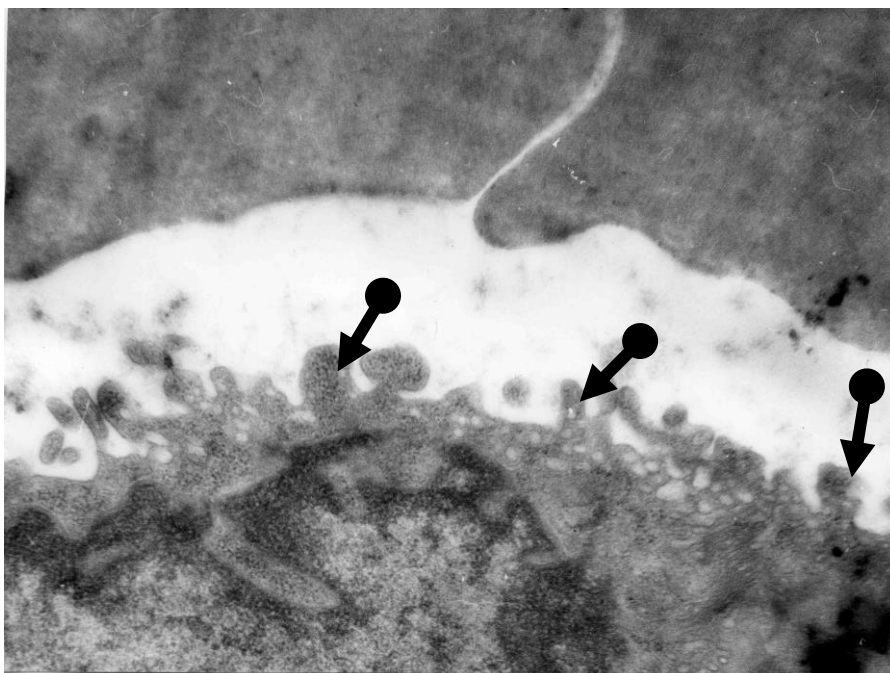


Рис. 8.13 Ультраструктура кровеносных капилляров щитовидной железы старых крыс после 9 сеансов РЭХВ. Увеличение количества выростов цитоплазматической мембраны $\times 48000$. Контрастировано цитратом свинца.

Эндотелиоциты кровеносных капилляров щитовидной железы после многократных сеансов РЭХВ активизируются, в них увеличивается количество микропиноцитозных пузырьков, что является показателем усиления активности трансцеллюлярного транспорта веществ через стенку капилляра.

По результатам данного исследования опубликованы следующие работы:

1. Бабийчук В.Г. Ультраструктура клеток надпочечников крыс, подвергшихся экстремальному воздействию / В.Г.Бабийчук, В.П.Невзоров, А.В.Гаевой // Харківська хірургічна школа. – 2005. – Т. 19, № 4. – С. 59-61.

2. Бабийчук В.Г. Ультраструктурные изменения щитовидной железы крыс после нескольких сеансов нахождения в камере при температуре -120 °С. / В.Г.Бабийчук, В.П.Невзоров, А.В.Гаевой // Харківська хірургічна школа. – 2006. – № 1. – С. 176-178.

РАЗДЕЛ 9

СОСТОЯНИЕ ГОРМОНАЛЬНОЙ ФУНКЦИИ МОЛОДЫХ И СТАРЫХ ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ РИТМИЧЕСКИХ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ХОЛОДОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

Одной из важнейших функций эндокринной системы является повышение уровня сопротивляемости организма к действию различных факторов. Вырабатываемые в эндокринных железах гормоны осуществляют регуляторные процессы, направленные на поддержание гомеостаза. Степень функциональной активности эндокринных желез находится в равновесии с концентрацией гормонов в циркулирующей крови, вместе с тем секреция эндокринных желез существенно изменяется с возрастом.

Изменение продукции гормонов или ослабление их эффектов свидетельствуют о нарушении процессов гормонообразования и гормоновыделения, ведущих к нарушению эндокринного равновесия, которое распространяется, как правило, на все звенья эндокринной системы.

Реакции организма на охлаждение протекают при участии гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС), которая раньше других реагирует на холодовый «стресс», так как является важнейшим звеном в восстановлении нарушенного гомеостаза, нормализации структурно-энергетических процессов, регуляции вегетативных функций. Столь сложная и многогранная роль ГГНС в устойчивости организма к стрессу обеспечивается наличием связи со всеми отделами нервной системы, участием эндокринной деятельности, осуществляемой через гипофиз и адреналовую систему. Характерные многочисленные морфофункциональные и нейрогормональные взаимоотношения ГГНС, составляющей единую функциональную систему, определяют значение, место и выраженность адаптации при нарушениях гомеостаза. Из этого следует, что роль эндокринной системы в организме направлена на обеспечение регуляции и координации функций организма и сохранение его равновесия. Известно, что у людей пожилого возраста существ-

венно падает гормональная функция многих эндокринных желез (щитовидной, половых, коры надпочечников), что может быть связано с ослаблением функции гипофиза. Это проявляется как изменением уровня отдельных гормонов, так и чувствительности органов–мишеней к их регуляторному действию. Нарушается взаимодействие между эндокринными железами, что осложняет перестройку работы эндокринной системы в целом. Изменяется взаимосвязь в системе гипофиз–надпочечники, уменьшается чувствительность надпочечниковых желез к тропным гормонам гипофиза и влияние последнего на уровень кортикостероидов в крови. Вследствие угнетения тиреотропной функции гипофиза ослабляется деятельность щитовидной железы, в том числе снижается тиреоидная регуляция обменных процессов.

Часть гормонов оказывает свое действие непосредственно на основные функции организма, к числу которых следует отнести гормоны щитовидной железы T_4 и T_3 . От уровня тиреоидных гормонов зависит реактивность деятельности гипоталамуса, а, следовательно, тонус вегетативных отделов нервной системы.

Гормоны щитовидной железы влияют на широкий спектр физиологических процессов, усиливая при необходимости белковый, липидный и углеводный обмен. Они стимулируют процессы роста и энергообразования, участвуют в обеспечении нормального ритма сердечных сокращений, оказывают гомеостатическое действие на температуру тела за счет усиления теплопродукции и повышения возбудимости симпатического отдела ВНС при различных стрессовых ситуациях. Столь выраженные многочисленные эффекты влияния гормонов щитовидной железы связаны с тем, что рецепторы к тиреоидным гормонам обнаруживаются практически во всех внутренних органах, а их стимуляция изменяет экспрессию генов и, как следствие, стимулирует основной обмен. Из этого следует, что снижение функциональной активности щитовидной железы сопровождается, как правило, серьезными метаболическими нарушениями в организме. Основное биологически активное вещество, вырабатываемое щитовидной железой – тироксин,

который под действием ферментов дейодиназ метаболизируется в трийодтиронин, обладающий максимальной биологической активностью. Активность дейодиназы в свою очередь регулируется тиреоидными гормонами, тестостероном, а ингибирование синтеза этих ферментов осуществляется при действии глюкокортикоидов и эстрогенов. В тоже время при гипотиреозе инъекции T_3 и T_4 крысам ингибируют фермент на разных этапах синтеза.

Как следует из проведенных нами экспериментов содержание T_3 в сыворотке крови у контрольных молодых животных было выше, чем у старых (рис. 9.1, 9.2).

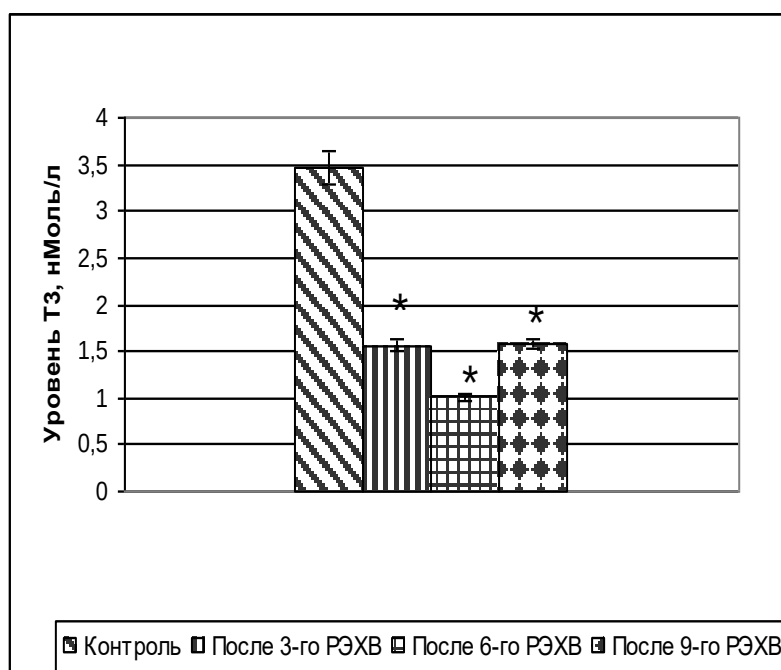


Рис. 9.1 Содержание T_3 в сыворотке крови молодых крыс после РЭХВ.

Примечание: * – достоверно ($p < 0,05$) по отношению к контролю.

После 3 сеанса РЭХВ уровень T_3 в сыворотке крови у старых животных существенно не изменялся. Наиболее значительное увеличение содержания гормона отмечено нами после 6-го холодового воздействия. Последующие сеансы РЭХВ несколько понизили уровень T_3 , однако как после 6-го, так и после 9-го холодового воздействия содержание трийодтиронина было выше, чем в аналогичные сроки наблюдения у молодых крыс.

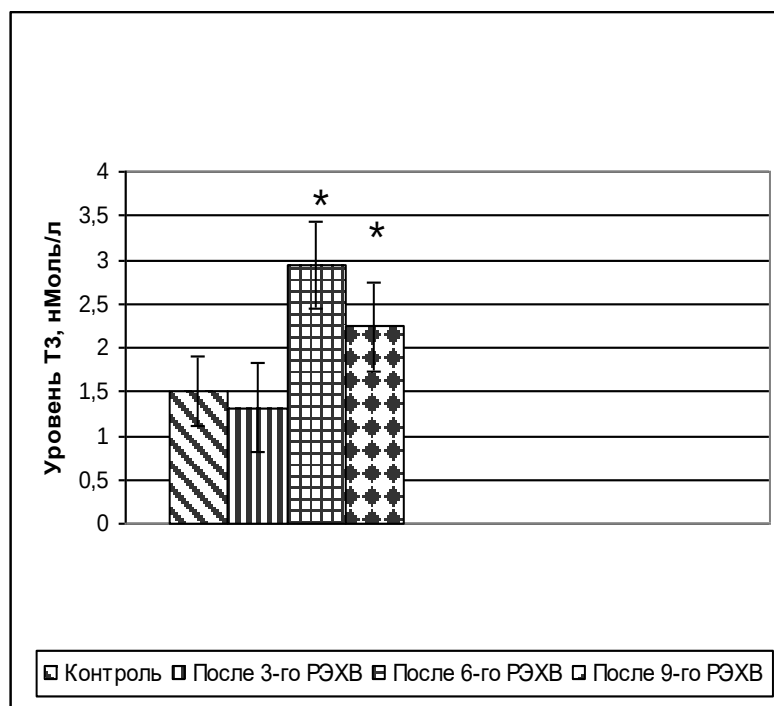


Рис. 9.2 Содержание Т₃ в сыворотке крови старых крыс после РЭХВ.

Примечание: * – достоверно ($p < 0,05$) по отношению к контролю.

Очевидно, повышение концентрации Т₃ в сыворотке крови старых крыс лимитируется необходимостью увеличения его синтеза и расхода для обеспечения органов и тканей адекватным количеством кислорода с целью более интенсивного образования энергии в клетках, как ответной реакции на действие холода, что является, по нашему мнению, важным механизмом, направленным на поддержание нормального уровня Т₃. В этих процессах важная роль отводится гипоталамусу, который принимает непосредственное участие в регуляции функции щитовидной железы. Установлено, что у старых животных нейрорегуляторные процессы функций ряда систем организма, которые координирует гипоталамус, существенно снижены. Применение РЭХВ усиливает нейромедиаторную функцию стареющего организма, повышает компенсаторные реакции систем, осуществляющих гомеостаз. Очевидно, РЭХВ улучшают адаптивные процессы у старых крыс, активируя для этих целей не только нейрогуморальную, но и эндокринную системы, в частности, улучшая функцию щитовидной железы.

Как известно, тироксин (T_4) является основным гормоном щитовидной железы и его нормальная деятельность зависит от достаточного снабжения йодом щитовидной железы.

Как и T_3 , тироксин оказывает влияние на белковый, углеводный, жировой, минеральный, водный, витаминный обмен.

В наших экспериментах (рис. 9.3, 9.4) содержание T_4 в сыворотке крови контрольных молодых животных было существенно выше, чем у старых. У старых животных прослеживается тенденция к уменьшению содержания тироксина после 3-й голодовой процедуры по отношению к контролю и аналогичным показателям у молодых крыс. После 6-го и 9-го сеанса РЭХВ определяется существенное увеличение концентрации T_4 в сыворотке крови старых крыс, которое сопоставимо с изменениями, которые наблюдаются у молодых крыс после 6 и 9-й голодовых процедур.

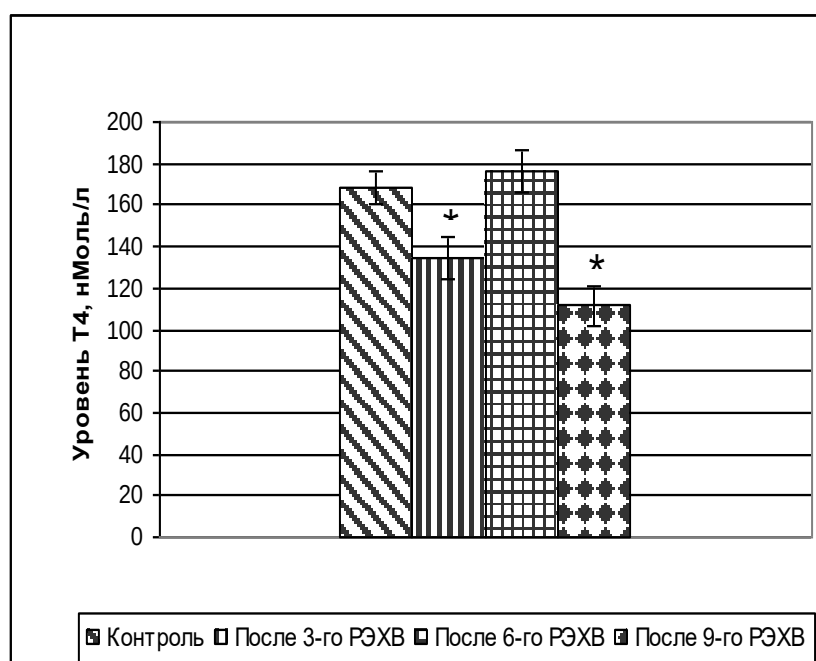


Рис. 9.3 Содержание T_4 в сыворотке крови молодых крыс после РЭХВ.

Примечание: * – достоверно ($p < 0,05$) по отношению к контролю.

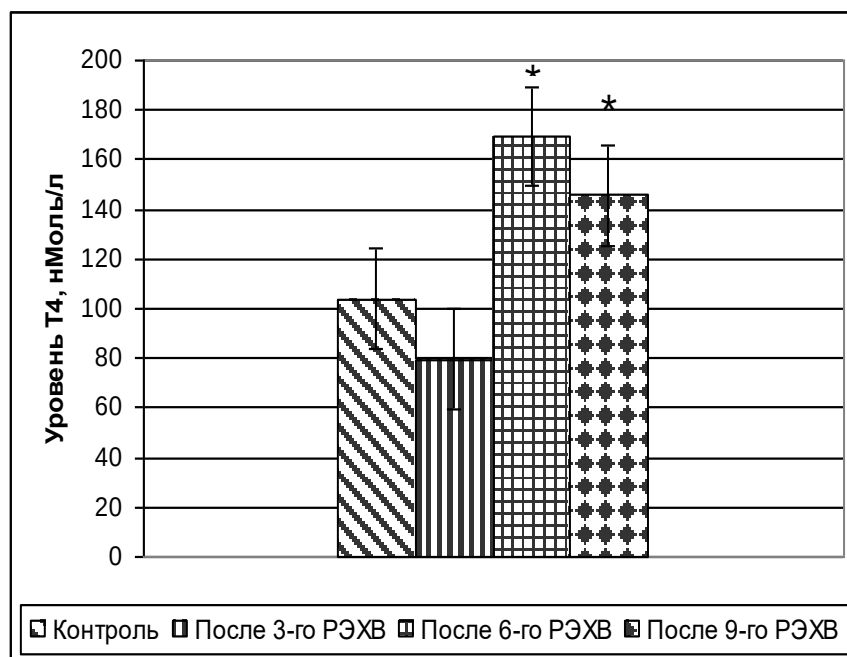


Рис. 9.4 Содержание Т₄ в сыворотке крови старых крыс после РЭХВ.

Примечание: * – достоверно ($p < 0,05$) по отношению к контролю.

Наблюдаемые изменения в содержании Т₃ и Т₄ в процессе охлаждения у старых крыс имеют сходную тенденцию, а увеличение содержания гормонов, очевидно, сопряжено с особенностями их синтеза и секреции в старом организме в ответ на РЭХВ.

Анализ содержания тиреоидных гормонов в сыворотке крови старых животных показывает повышение их концентрации, что, очевидно, связано с увеличением функциональной активности щитовидной железы, как ответной реакции на РЭХВ. Эти данные хорошо согласуются с результатами анализа ультраструктурных изменений щитовидной железы у старых животных. Вероятно, это свидетельствует об улучшении ферментативной деятельности щитовидной железы, что способствует нормальному метаболическому процессу трансформации тироксина в более активный гормон трийодтиронин.

Очевидно, полученные нами экспериментальные данные, особенно с учетом ультраструктурных изменений тканей щитовидной железы, могут свидетельствовать о повышении регенерационной способности железы после РЭХВ.

Известно, что функция надпочечников и щитовидной железы взаимосвязаны и тиреоидные гормоны оказывают влияние на функцию надпочечников. Они могут стимулировать секрецию глюкокортикоидов, одновременно усиливая их распад в печени, превращая кортизол в кортизон.

При недостаточности функции T_3 - T_4 процессы деградации кортикостероидов ослабевают.

Исходное содержание 11-оксикортикостерона в сыворотке крови молодых и старых крыс существенно не отличалось (рис. 9.5, 9.6).

Отмечено достоверное снижение 11-ОКС в крови молодых крыс после 3-го РЭХВ с последующим возвращением к исходным величинам после 6-го холодового воздействия, а также незначительным понижением его содержания в сыворотке крови после 9-го РЭХВ.

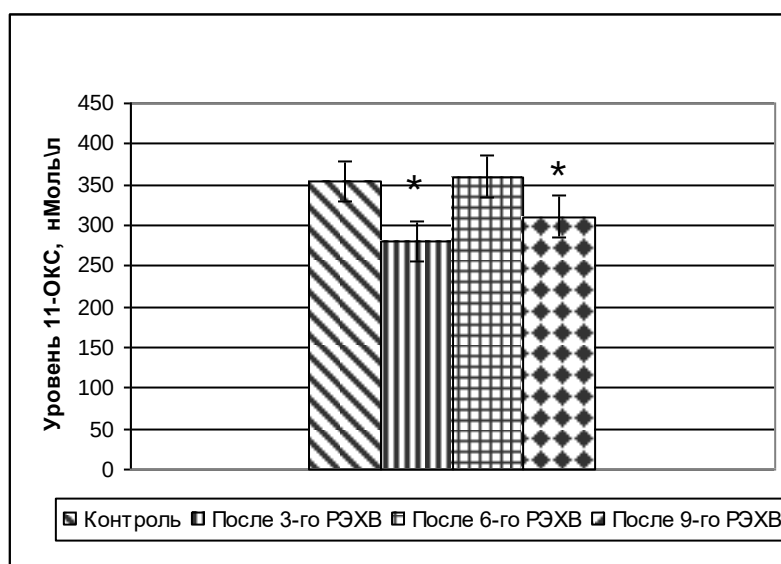


Рис. 9.5 Содержание 11-ОКС в сыворотке крови молодых крыс после РЭХВ.

Примечание: * – достоверно ($p < 0,05$) по отношению к контролю.

У старых животных нами отмечена динамика нарастания содержания 11-ОКС после 6-го сеанса РЭХВ, а после 9-го холодового воздействия отмечена тенденция к его понижению. Как видно из полученных результатов, во все сроки экспериментов содержание 11-ОКС в сыворотке крови старых крыс было выше, чем у молодых. Необходимо учитывать, что 11-ОКС обладает

высокой физиологической активностью и постоянно определяется в крови, оттекающей из надпочечников.

Органами мишенями для 11-ОКС являются печень, лимфоидная ткань, мышцы, миокард, почки, соединительная ткань, которые участвуют в регуляции реакций организма на действие стресс-факторов. Присутствие кортизола в крови у людей и животных делает возможным воздействие катехоламинов на сосудистую стенку и миокард и при повышении его уровня может возникнуть артериальная гипертензия.

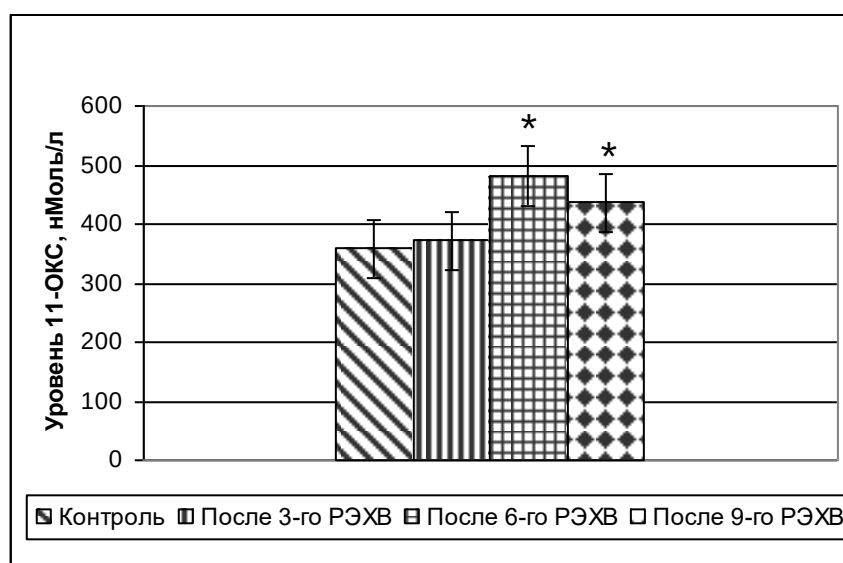


Рис. 9.6 Содержание 11- ОКС в сыворотке крови старых крыс после РЭХВ.

Примечание: * – достоверно ($p < 0,05$) по отношению к контролю.

Создавая свою теорию стресса, Селье пришел к выводу, что при стрессе выделяется адренокортикотропный гормон, который стимулирует секрецию гормонов коры надпочечников, обеспечивающих резистентность организма к действию неблагоприятных факторов. Существует определенный параллелизм между способностью организма к адаптации и его жизнеспособностью, которая в динамике старения теряет свою пластичность. Очевидно, как следует из наших экспериментов, кратковременный «мягкий» холодовой стресс не приводит к существенному изменению в содержании 11-ОКС у молодых животных. Повышенное содержание его у старых животных диктуется

необходимостью создания предпосылок для дальнейшего повышения активности специализированных механизмов дифференцированно, реагирующих на поддержание адаптации пожилого организма.

Известно, что число крыс при длительном их содержании в экстремальных условиях линейно уменьшается с возрастом. После достижения определенного критического возраста способность к адаптации снижается настолько значительно, что организм неминуемо погибает и в этом процессе важнейшим звеном является снижение функции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы и, в частности, кортикостероидов. В динамике старения нарушается взаимосвязь в системе гипофиз–надпочечники, уменьшается ответ надпочечников на действие тропных гормонов гипофиза. Этими явлениями в значительной мере можно объяснить снижение сопротивляемости организма в старости к различным видам стресса. Очевидно, РЭХВ прерывают цепочку описанных событий, а увеличение выброса в кровь у крыс гормона 11-ОКС надпочечниками является благоприятным фактором для стареющего организма, так как способствует улучшению деятельности функциональных систем, ответственных за гомеостаз.

Установлено, что тестостерон вырабатывается в семенниках и является главным андрогенным гормоном. Тестостерон может образовываться в коре надпочечников, печени, предстательной железе, скелетных мышцах. Поступая в плазму крови, тестостерон связывается с белками, которые способствуют его транспортировке в органы и ткани. Большая часть эстрогенов в тканях образуется из тестостерона и андростендиона. Содержание тестостерона с возрастом в плазме крови существенно не изменяется и сохраняется в норме даже после 60 лет. Известно, что рост организма в период полового созревания во многом зависит от андрогенов, их взаимодействия с соматотропным гормоном, тиреоидными и другими гормонами.

Тестостерон усиливает развитие первичных и вторичных половых признаков, он оказывает существенное влияние на психику, повышает активность, в ряде случаев агрессивность, либидо и половую потенцию.

Кроме того, андрогены и эстрогены обладают выраженным анаболическим эффектом воздействия на генетический аппарат клетки, усиливают в ней биосинтез белков, влияют на обмен липидов, азотистый баланс, повышают потребление кислорода в присутствии тиреоидных гормонов.

Особая роль половых гормонов заключается в их действии на сперматогенный эпителий и, таким образом, в поддержании сперматогенеза. Все функции андрогенов и эстрогенов регулируются гипофизом и подконтрольны гипоталамусу.

Анализ полученных нами экспериментальных данных (рис. 9.7, 9.8) свидетельствует о том, что содержание тестостерона в крови молодых крыс как до, так и после процедур РЭХВ существенно не отличалось. У старых контрольных животных уровень гормона был ниже, чем у молодых. После 6-го и 9-го холодового воздействия содержание тестостерона в крови старых животных значительно увеличилось и приближалось к показателям его содержания у молодых животных. Очевидно, РЭХВ не влияют существенно на синтез и выделение тестостерона у половозрелых крыс, однако линейно повышают его содержание у старых крыс до контрольных показателей у молодых животных. Возможно, изменения в уровне гормонов в какой-то степени касаются и изменений чувствительности органов-мишеней к их регуляторному действию, касающиеся, в частности, повышения репродуктивной функции. Повышение содержания тестостерона в крови старых крыс является значимым, так как пониженный его уровень в значительной степени определяет нарушение взаимосвязи в системе гипоталамус-гипофиз-надпочечники.

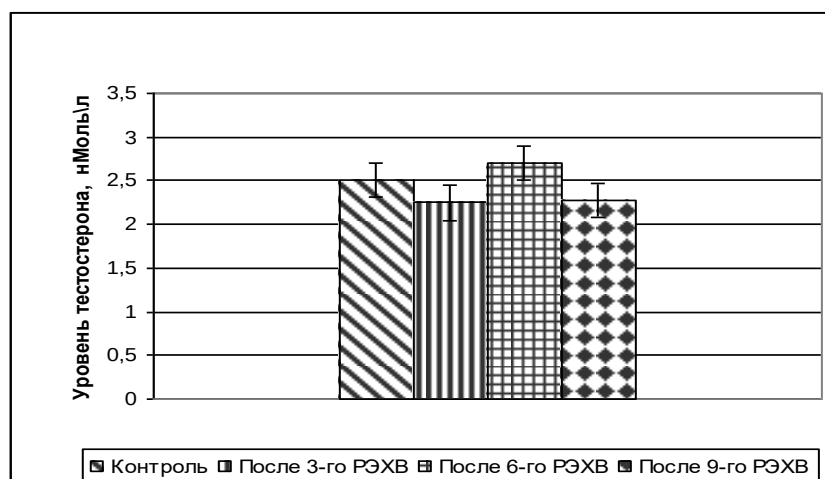


Рис. 9.7 Содержание тестостерона в сыворотке крови молодых крыс после РЭХВ.

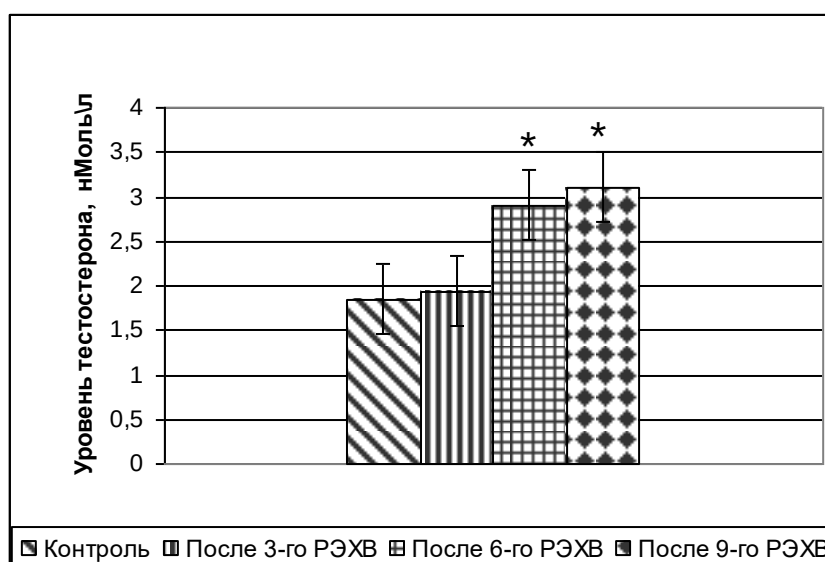


Рис. 9.8 Содержание тестостерона в сыворотке крови старых крыс после РЭХВ.

Примечание: * – достоверно ($p < 0,05$) по отношению к контролю.

Содержание эстрадиола в сыворотке крови (рис. 9.9, 9.10) у контрольных старых крыс отличалось незначительно, однако после третьей и девятой процедуры РЭХВ наблюдалось достоверное снижение уровня гормона в сыворо-

тке крови молодых крыс, в то время как у старых отмечена динамика увеличения.

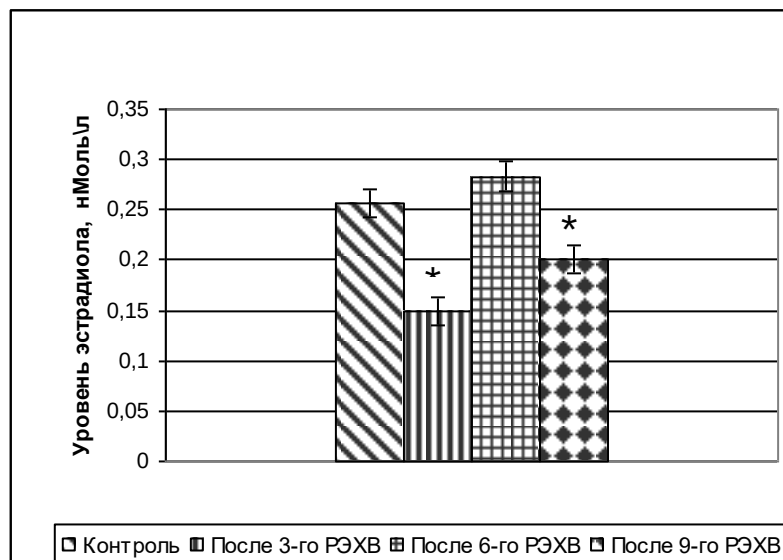


Рис. 9.9 Содержание эстрадиола в сыворотке крови молодых крыс после РЭХВ.

Примечание: * – достоверно ($p < 0,05$) по отношению к контролю.

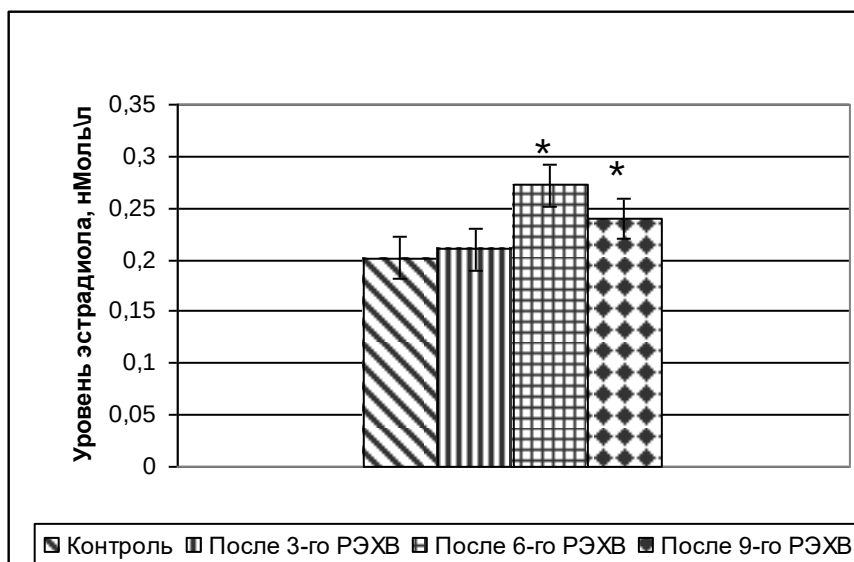


Рис. 9.10 Содержание эстрадиола в сыворотке крови старых крыс после РЭХВ.

Примечание: * – достоверно ($p < 0,05$) по отношению к контролю.

Можно считать доказанным, что стресс возникает благодаря сложному взаимодействию нейроэндокринной системы. В наших экспериментах благодаря кратковременному воздействию низких температур на кожные покровы возбуждаются центры терморегуляции, располагающиеся в гипоталамусе, который осуществляет координирующую и регулирующие функции центров ВНС и посредством релизинг-факторов оказывает влияние на важное звено эндокринной системы – гипофиз. Гипофиз синтезирует целый ряд гормонов, которые оказывают влияние на деятельность других эндокринных желез. В частности, АКТГ воздействует на кору надпочечников, щитовидную железу, половые гормоны. В случае действия РЭХВ в организме реализуется механизм неспецифического и специфического адаптационного синдрома.

Однако, при РЭХВ мы не отметили признаков влияния холодового стимула на организм как угрожающего фактора, вследствие чего, в зависимости от преобладания симпатического или парасимпатического состояния организма, активировались задние отделы гипоталамуса (в случае симпатической активации) или передние отделы гипоталамуса (при парасимпатической активации). По нашему мнению, «мягкий» стресс, вызванный у старых животных РЭХВ, через систему регуляторных механизмов осуществляет мобилизацию источников энергии, тем самым приспособляя организм комплексом нервных, эндокринных, гиподинамических и обменных процессов к адекватному физиологическому ответу для оптимизации гомеостаза.

При кратковременных РЭХВ «мягкий» стресс является биологически обоснованным и необходимым явлением, так как позволяет организму повысить приспособление к условиям существования. В наших экспериментах температурный гомеостаз сопровождается не только специфическими реакциями, но в большей степени зависит от специфических эффектов, влияющих на многие адаптационные процессы.

РАЗДЕЛ 10

ОСОБЕННОСТИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ У КРЫС РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП ПОСЛЕ РИТМИЧЕ- СКИХ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ХОЛОДОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

Гомеостаз означает постоянство различных физиологических констант организма. Он включает механизмы адаптации и координации физиологических процессов, обеспечивающих единство организма не только в норме, но и при изменившихся условиях его существования. Эта стабильная система осуществляет активный поиск наиболее устойчивого и оптимального состояния, что выражается в адаптации, которая может регулироваться несколькими взаимодействующими между собой управляющими системами.

Начало нового этапа в этих научных исследованиях связывают с открытием феномена свободно радикального окисления, сопровождающегося образованием активных форм кислорода, ненасыщенных жирных кислот, гидропероксидов, альдегидов и кетонов [277, 278].

Было установлено, что в живых системах постоянно протекают процессы неферментативного ПОЛ биомембран, а повышенное количество активных форм кислорода ведет к патофизиологическим механизмам деструкции клеточных мембран и гибели клеток [276-283].

Обоснована концепция участия продуктов активации ПОЛ в механизмах развития стресса, которые являются общим неспецифическим звеном запуска стресс-реакции в ответ на действие разнообразных неблагоприятных факторов. Эта концепция подтверждается получением выраженного антистрессового эффекта в случае применения антиоксидантов, способствующих подавлению выработки первичного медиатора стресса и ослаблению реакции стресс-реализующих систем. Специальные регуляторные системы, контролирующие свободнорадикальные реакции ПОЛ на низком стационарном уровне, обеспечивают нормальные метаболические процессы и регулируют функцию клеток.

ПОЛ в ряде случаев выступает как универсальный модификатор свойств мембран и как важный физиологический регулятор их структуры и функции.

Очевидно, ПОЛ присутствует в любых живых системах, а интенсивность и степень выраженности процесса зависит от необходимости включения механизмов гомеостаза в общий синдром адаптации в качестве первичного и вторичного «медиатора» стресса [279-284].

Следовательно, ускоряя или замедляя ПОЛ, можно влиять на состав клеточных мембран и структурно-функциональную организацию клетки в целом, так как ПОЛ может служить механизмом уничтожения избыточных внутриклеточных структур и обновления биомембран [285].

Необходимо иметь в виду, что клетки организма располагают эффективным набором разнообразных защитных механизмов, противодействующих активации ПОЛ. В состоянии, когда механизмы антиоксидантной системы эффективно функционируют, показателем степени выраженности ПОЛ является скорость расходования антиоксидантных резервов. Следовательно, определять степень тяжести и выраженности стресса, нарушения жизнедеятельности можно с помощью учета компонентов окислительного гомеостаза в их взаимодействии – состояние оксидантно-антиоксидантного равновесия.

Если рассматривать стресс как необходимое звено неспецифической реактивности организма, как этап в комплексе адаптации и фактор гомеостаза, составляющий необходимый компонент нормальной жизнедеятельности, то, очевидно, существует эволюционно детерминированная и генетически закрепленная программа запуска реакций приспособления к экстремальным ситуациям в центрах ЦНС, в частности гипоталамусе, где формируется сложный координированный ответ организма, осуществляющийся путем координации функций ВНС.

Подавление интенсивности ПОЛ следует квалифицировать как возникновение состояния повышенной резистентности организма к действию экстремальных факторов, которое сохраняется длительное время, что, в свою очередь, ведет к интенсивному расходованию энергетических запасов, анти-

оксидантных резервов, после чего может наступить истощение организма, выраженное замедлением стресс-ингибирующих систем. Интерес к процессам ПОЛ и систем, его контролирующих, обусловлен одной из существующих теорий старения организма, согласно которой усиление свободнорадикального окисления является причиной "изнашивания" клеток. Изменение функциональных свойств клеток является одной из причин возникновения различных заболеваний.

В стареющем организме, как правило, подавление интенсивности ПОЛ лимитируется снижением активности центральных стресс-систем, к которым относится ГАМКергическая тормозная система, обладающая как пре-, так и постсинаптическим тормозным действием. Метаболит этой системы – гамма-оксимасляная кислота - в нормальных условиях, воздействуя на центры регуляции вегетативной нервной и эндокринной систем, способна существенно ограничивать продукцию стресс-реализующих систем. Учитывая способность ГАМК проникать через ГЭБ, ее свойства можно использовать для уменьшения активации ПОЛ [286] и, таким образом, уменьшить степень опасности повреждения органов и гибели клеток, в конечном счете, увеличить возможности выживания организма в условиях истощения.

В последние годы успешно развиваются новые неинвазивные методы лечения и воздействия на организм, направленные на активацию собственных защитных систем организма [13, 15, 287-289]. Высказываются мнения об определяющей роли резонансных взаимодействий в процессах регуляции состояния различных систем организма [18, 236, 290, 291], особенно ЦНС.

В этой связи перспективным путем для нормализации функционального состояния организма представляется применение РЭХВ с учетом индивидуальных особенностей секундной БЭА головного мозга.

Такой подход представляется чрезвычайно актуальным для коррекции нарушений функциональных систем пожилого организма, когда собственные регуляторные системы теряют пластичность, а уровень компенсаторных реакций становится весьма индивидуальным.

РЭХВ могут индуцировать в организме систему ПОЛ, изменяя соотношение прооксидантно-антиоксидантного равновесия, увеличивая количество активных продуктов ПОЛ, которые, выступая как фактор неблагополучия, с другой стороны, запускают цепь реакций в организме, формирующих общую адаптационную реакцию. В ответ на стресс активируются нервная, эндокринная, иммунная системы, возрастает антиоксидантный потенциал, в результате чего угнетается ПОЛ, что как нельзя более соответствует решению жизненно важной задачи – преодоления стрессовой ситуации.

Особый интерес представляют краткосрочные, периодические действия экстремально низких температур ($-120\text{ }^{\circ}\text{C}$) на деятельность вегетативных центров и систем нейро-эндокринной регуляции, которые непосредственно оказывают влияние на интенсивность реакций ПОЛ. Непродолжительное действие экстремально низких температур не опустошает энергетические и другие функциональные резервы организма, а наоборот, активно влияет на ВНС, повышая её резистентность.

Низкие температуры способствуют повышению проницаемости ГЭБ для ряда биологически активных веществ, что благоприятно влияет на многие адаптационные процессы, особенно, скомпрометированные болезнью.

Удалось показать [292], что усиление противофазных колебаний проницаемости ГЭБ для симпато- и парасимпатомиметиков в случае применения охлаждения может восстановить «молодую» физиологическую ритмику функционирования ГЭБ, оптимизировать нарушенные взаимодействия функциональных систем стареющего организма.

Одним из методов, позволяющих получить объективную информацию о состоянии в организме двух взаимосвязанных процессов свободнорадикального ПОЛ и образования активных форм кислорода, является хемилюминесценция биологических объектов [210].

Существует ряд работ, посвященных изучению индуцированной перекисью водорода ХЛ [293, 294], в которых наблюдаются два максимума значений кривых ХЛ, предложены параметры оценки кинетических кривых, про-

слежена связь этих параметров с параметрами ПОЛ. Следовательно, регистрация ХЛ позволяет получить объективную картину свободнорадикального окисления при метаболических нарушениях любой этиологии, характеризовать и прогнозировать выраженность адаптивных реакций в ответ на действие факторов стресса и, в частности, на холодовые воздействия.

В наших исследованиях была использована ХЛ, индуцированная перекисью водорода, с целью изучения направленности пероксидных процессов в сыворотке крови крыс после РЭХВ.

Сравнивая особенности кинетических кривых хемилюминисценции сыворотки крови у молодых и старых животных (рис. 10.1, 10.2), было отмечено, что они характеризуются двумя максимумами ХЛ, возникающими в ответ на введение H_2O_2 . Этот факт позволил нам воспользоваться критериями анализа динамических кривых ХЛ и связью этих параметров с особенностями протекания ПОЛ в сыворотке крови после РЭХВ.

При проведении анализа динамических кривых ХЛ мы учитывали, что величина светосуммы ХЛ $S(180)$ пропорциональна общей активности свободнорадикальных процессов, интенсивность первой вспышки ХЛ сыворотки крови (I_{max1}), возникающей при введении в реакционную среду H_2O_2 , обусловлена разложением перекиси ионами железа по реакции аналогичной реакции Фентона и пропорциональна их количеству.

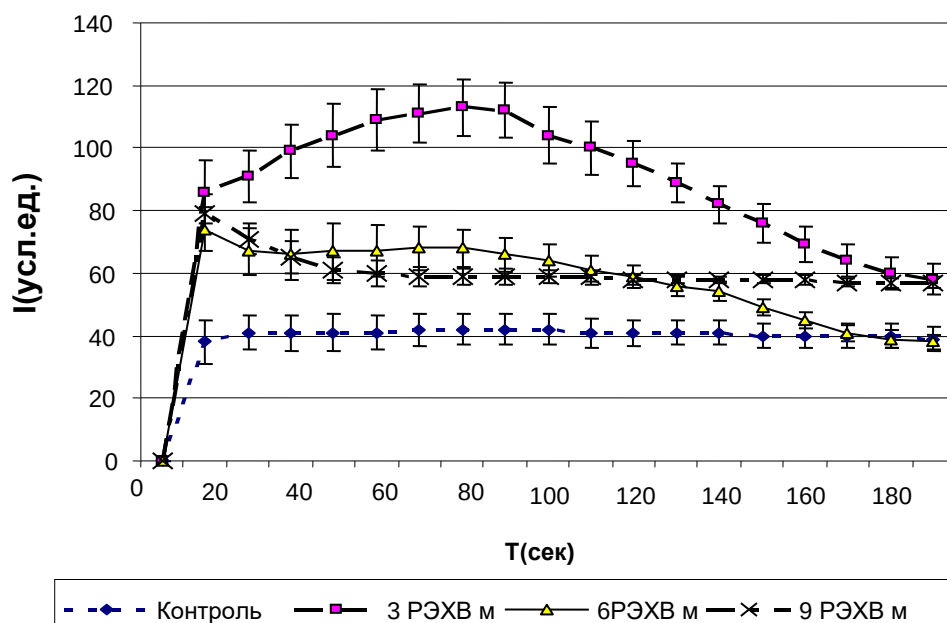


Рис. 10.1 Кинетические кривые индуцированной H_2O_2 хемилюминесценции сыворотки крови молодых крыс после РЭХВ

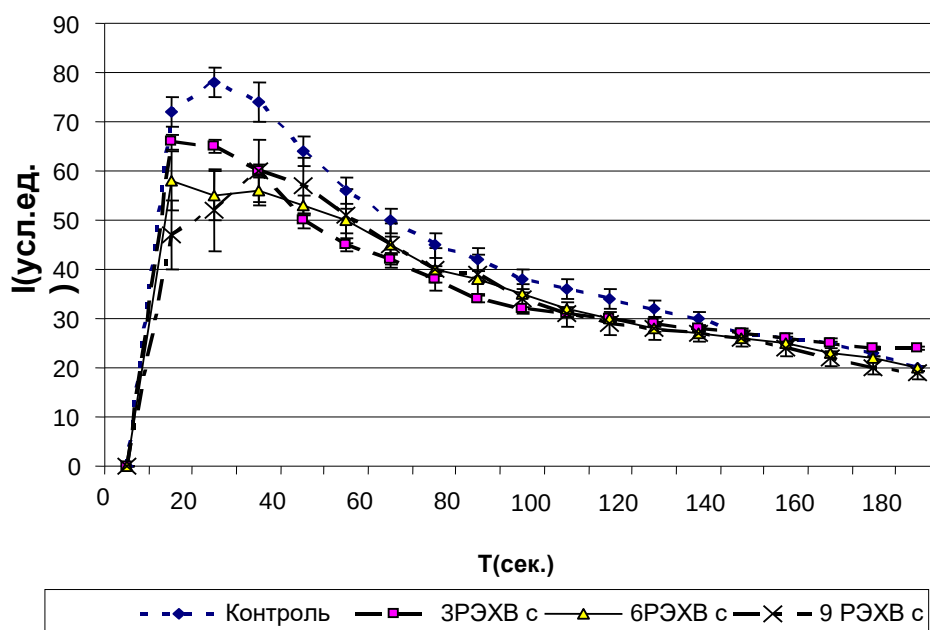


Рис. 10.2 Кинетические кривые индуцированной H_2O_2 хемилюминесценции сыворотки крови старых крыс после РЭХВ

Время достижения второго максимума $I_{\max 2}$ коррелирует с содержанием антиоксидантов в исследуемой пробе, а параметр I_{180} характеризует остаточную антиоксидантную емкость системы. Оценка этих параметров дает возможность оценить активность свободнорадикального окисления исследуемых объектов.

Сравнивая параметры динамических кривых ХЛ у контрольных групп старых и молодых животных можно видеть, что интенсивность S_{180} достоверно не отличаются, при этом $I_{\max 1}$, $I_{\max 2}$ у молодых животных почти в два раза ниже, чем у старых. Время наступления второго максимума T в сыворотке молодых крыс равно 75 сек., в то время как в сыворотке крови старых равно 20-35 сек. Исходя из этого, можно предположить, что общая свободнорадикальная активность в сыворотке крови у контрольных групп животных разного возраста достоверно не отличается.

При анализе влияния низкотемпературных воздействий по результатам, представленным в табл. 10.1, рис. 10.1 и рис. 10.2, видно, что РЭХВ по-разному влияют на кинетические параметры ХЛ в группах молодых и старых животных.

У молодых 3-кратное РЭХВ ведет к резкому увеличению параметра S_{180} , который снижается с увеличением кратности воздействия, оставаясь достоверно выше, чем в контроле, а у старых каждое РЭХВ снижает S_{180} относительно контрольных значений пропорционально кратности воздействия. Как известно, процессы индукции, ускорения или замедления реакций ПОЛ реализуются в присутствии ионов железа.

Ионы железа могут активировать или, наоборот, взаимодействуя с радикалами, обрывать цепь реакций. В случае низких концентраций гидроперекисей и высоких железа последние могут выступать, как антиоксиданты, а в случае равных или близких концентраций радикалов и железа, ионы железа выступают в роли сильного катализатора процессов ПОЛ. Кинетический параметр $I_{\max 1}$ уменьшается подобно параметру S_{180} . Во время второй вспышки ХЛ происходит накопление гидроперекисей липидов, которые при-

нято считать первичными продуктами свободнорадикального окисления липидов, и вторая вспышка ответственна за окисление липидов, вызванное введением H_2O_2 .

Таблица 10.1 Параметры ХЛ в сыворотке крови крыс различных возрастных групп после РЭХВ

Воздействие	Параметры ХЛ				
	S180 (имп./сек.)	I _{max} 1 (усл.ед.)	I _{max} 2 (усл.ед.)	I180 (усл.ед.)	T (сек)
Молодые животные					
Контроль	30132±7974	38±2,3	42±2,9	39±1,6	75
3 РЭХВ м	58788±3094*	86±5,5*	113±8,6*	58±2,1*	75
6 РЭХВ м	41507±2175*^	74±3,5*^	68±6,1*^	38±1,1^	75
9 РЭХВ м	39179±2175*^	79±4,7*	65,1±4,2*^	59±0,8*#	75
Старые животные					
Контроль	29871±2094	78±4,2	79±3,7	20±0,6	25
3 РЭХВ с	28886±1259	66±6,4	64±4,5*	24±0,5*	20
6 РЭХВ с	21321±736*^	51±2,1*^	60,3±5,1*	20±0,7^	35
9 РЭХВ с	26343±1495#	47±1,6*^	57,2±2,3*	19±0,3^	35

* – $p \leq 0,05$ достоверно по сравнению с контролем по t-критерию Стьюдента;

^ – $p \leq 0,05$ достоверно по сравнению с 3РЭХВ по t-критерию Стьюдента;

– $p \leq 0,05$ достоверно по сравнению с 6РЭХВ по t-критерию Стьюдента.

Поэтому, исходя из вышесказанного и результатов, представленных в табл. 10.1, мы предполагаем, что 3-кратное РЭХВ в группе молодых живот-

ных проявляет прооксидантное действие, т.к. не только параметры S_{180} , $I_{\max 1}$, но и $I_{\max 2}$ принимают наибольшее значение. Если учесть, что время достижения второго максимума прямо пропорционально концентрации антиоксидантов в исследуемой пробе, а в нашем случае РЭХВ не влияют на этот параметр, то интенсификация ПОЛ в сыворотке крови у молодых крыс после 3-х кратного воздействия осуществляется за счет накопления пероксидов липидов без значительного изменения антиоксидантных резервов. После 6-кратного РЭХВ $I_{\max 2}$ уменьшается по сравнению с 3-кратным РЭХВ, а параметр T остается неизменным.

Форма кинетической кривой ХЛ сыворотки крови у молодых крыс после 9-кратного РЭХВ не имеет выраженного второго максимума, но, аппроксимируя механизмы влияния 3- и 6-кратного РЭХВ на АОС, учитывая тенденцию изменения формы кривой при увеличении кратности РЭХВ, а также то, что I_{180} (остаточная интенсивность), которую связывают с резервной емкостью АОС [293], имеет наибольшее значение, возникает предположение, что 9-кратное РЭХВ не только интенсифицирует активность антиоксидантов, но и увеличивает их количество.

В сыворотке крови старых животных изменение кинетических параметров ХЛ после РЭХВ менее выражено, чем у молодых. Только 6 сеансов РЭХВ приводят к достоверному уменьшению параметров $S(180)$, $I_{\max 1}$, $I_{\max 2}$ относительно контрольных значений, а 9 сеансов РЭХВ незначительно увеличивает $S(180)$, но продолжает снижать $I_{\max 1}$ и $I_{\max 2}$, параметр I_{180} при этом не изменяется. У старых животных 3 сеанса РЭХВ незначительно уменьшают T , а 6 и 9 сеансов РЭХВ увеличивают T , проявляя антиоксидантное действие. Анализ кинетических параметров ХЛ показывает, что РЭХВ оказывают различное влияние на реакции ПОЛ сыворотки крови молодых и старых животных.

Полученные экспериментальные данные по определению кинетических параметров ХЛ как у молодых, так и у старых крыс могут характеризовать состояние регуляторной функции ПОЛ, как необходимого звена запуска пос-

ледующих реакций, направленных на повышение устойчивости организма к стрессу.

В отличие от параметров хемилюминисценции малоновый диальдегид в реакции с тиобарбитуровой кислотой дает возможность изучать вторичные продукты ПОЛ, характеризуя изменения прооксидантного статуса организма в динамике наблюдения.

Установлено, что уровень ТБК-активных продуктов в сыворотке крови контрольных молодых животных был значительно ниже, чем у контрольных старых (рис. 10.3).

У молодых крыс после 6 РЭХВ уровень ТБК-активных продуктов достоверно повышался по отношению к контролю. После девятого – имел тенденцию к снижению, а через 3 недели наблюдения был ниже исходного в 1,3 раза. Содержание ТБК-активных продуктов в сыворотке крови старых крыс достоверно понижалось как после 6, так и после 9 РЭХВ. Спустя 3 недели количество ТБК-активных продуктов в сыворотке крови увеличивалось, хотя было ниже, чем у контрольных животных.

Можно предположить, что модифицирующий эффект перекисных соединений у старых животных менее выражен в условиях гипоксии, а РЭХВ повышают устойчивость организма, способствуя адаптивным перестройкам, а также развитию полноценной реакции восстановления.

Обращает на себя внимание тот факт, что у молодых животных полученные результаты обусловлены на первом этапе преобладанием прооксидантного эффекта в ответ на РЭХВ, однако, уже после 6 воздействия включается система антиоксидантной защиты как результат развивающихся неспецифических реакций.

Мы считаем, что РЭХВ являются «мягким» стрессом и не приводят к существенным изменениям окислительного гомеостаза в организме молодых животных. Поддержание процессов ПОЛ на стабильно низком уровне может быть обусловлено выбором наиболее целесообразной функции прооксидант-

но-антиоксидантной системы в организме в результате действия холодового фактора.

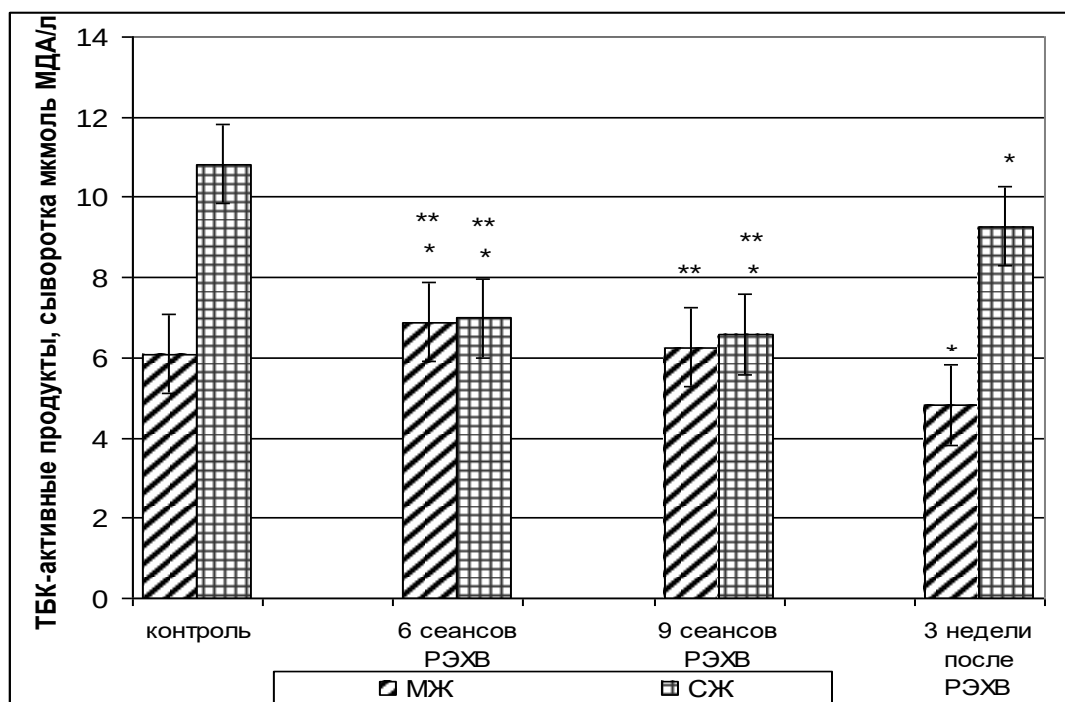


Рис. 10.3 ТБК-активные продукты в сыворотке крови молодых и старых крыс после РЭХВ.

* - достоверно относительно контроля по критерию Манна-Уитни

** - достоверно относительно 3 недель после воздействия

В наших экспериментах обнаружен интересный факт, что у старых животных кратковременный холодовой стресс вызывал выраженный антиоксидантный эффект. После 6-го и 9-го холодового воздействия содержание ТБК-активных продуктов у старых животных приближается к показателям у молодых животных.

В зависимости от возраста животных, РЭХВ приводили к достоверному повышению базального уровня ТБК-активных продуктов в сердце как молодых, так и старых крыс (рис. 10.4).

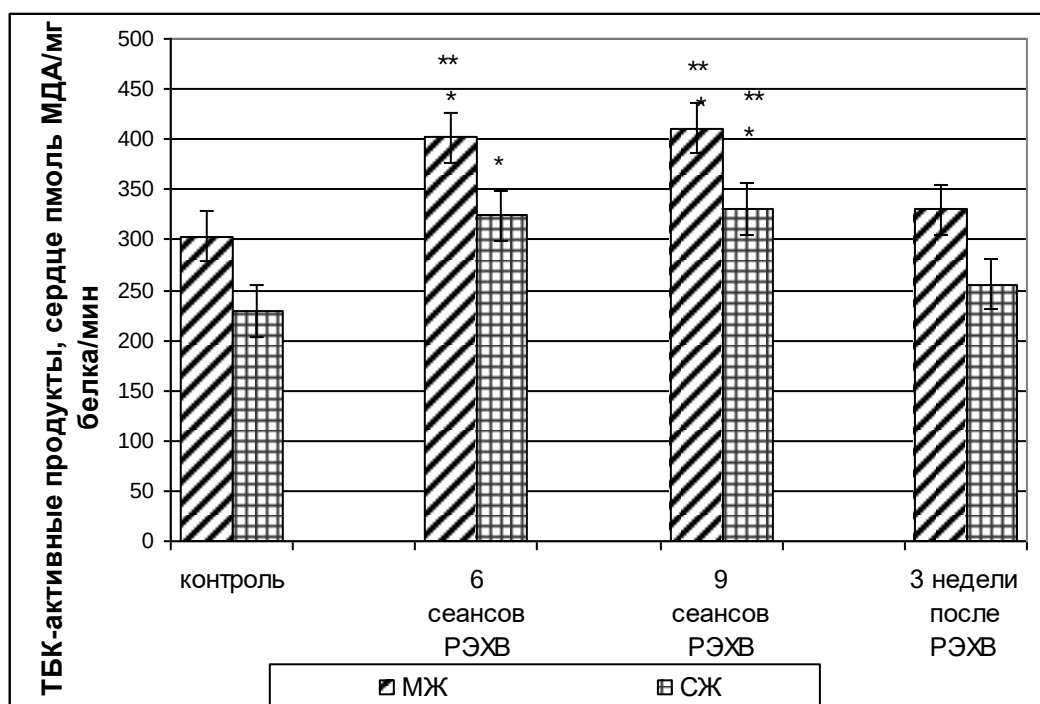


Рис. 10.4 ТБК-активные продукты, в тканях миокарда молодых и старых крыс после РЭХВ.

* - достоверно относительно контроля по критерию Манна-Уитни

** - достоверно относительно 3-х недель после воздействия

ПОЛ является основным фактором, вызывающим нарушение структуры и функции мембран и макромолекул клеток в процессе постнатального онтогенеза. Вместе с тем, данные об активности ПОЛ в поздние сроки развития организма очень противоречивы и экспериментально мало обоснованы.

Как видно из (рис. 10.4), в тканях миокарда молодых животных увеличение содержания ТБК-активных продуктов наблюдалось в те же сроки, что и изменения в сыворотке крови, что свидетельствует о том, что ПОЛ активно функционирует в молодом организме в условиях холодового стресса и направлено на активацию АОС, что необходимо для поддержания гомеостаза.

Повышенное содержание ТБК-активных продуктов отмечено и в миокарде старых животных. Достоверное их повышение (рис. 10.4) также определялось в период 6 и 9 РЭХВ, в то время как базальный уровень ТБК-активных продуктов в сыворотке крови этой группы животных был пониженным.

Важнейшим молекулярным механизмом развития повреждения сердца в пожилом организме является активация процессов ПОЛ в мембранах кардиомиоцитов, приводящая к структурно-функциональным нарушениям в ССС.

В динамике развития ишемии миокарда, которая довольно часто имеет место в пожилом возрасте, существенно ограничивается доступ кислорода к сердечной мышце и спонтанно протекающий процесс ПОЛ должен ингибироваться, а количество его активных продуктов в крови и тканях уменьшаться. Однако, в работе [214] наблюдали противоположное явление и объясняли это особенностью и ролью сердца в поддержании гомеостаза и жизни в целом. Оказалось, что в сердце даже в условиях блокады доставки кислорода сохраняется его остаточный уровень, который может поддерживать его функцию на протяжении 60 минут. Механизм этого явления объясняется продолжающейся диссоциацией оксигемоглобина HbO_2 в капиллярном русле и диффузии кислорода в клетки. Это обеспечивает минимальные условия для образования небольших количеств продуктов ПОЛ, активируя, таким образом, функциональные системы адаптации. Можно предположить, что РЭХВ повышают функциональные возможности сердца старых крыс, улучшают его гемодинамику, а повышение активности процессов ПОЛ следует рассматривать как сохранение или повышение свойств миокарда к мобилизации АОС и диктуется необходимостью стабилизации функциональных свойств сердца стареющего организма. Об этом свидетельствует и то обстоятельство, что ТБК-активные продукты в миокарде старых животных соответствовали контрольным показателям через 3 недели после последнего сеанса РЭХВ.

Подтверждением этому может быть установленный нами факт благоприятного влияния РЭХВ на ВНС, их способность выравнивать баланс активности симпатического и парасимпатического отделов и таким образом стабилизировать основные функциональные свойства ССС [295].

Известно, что ионы металлов, в том числе Fe^{2+} , обладают мощным прооксидантным потенциалом и выступают как факторы разветвления цепей сво-

боднорадикального окисления и общего усиления ПОЛ. Добавление Fe^{2+} в биологическую жидкость или реакционную смесь стимулирует процесс ПОЛ.

В проведенных экспериментах установлено, что интенсивность индуцированного ПОЛ в сердце у молодых животных снижалась в 3 раза после 6-го РЭХВ, восстанавливалась после 9-го и вновь угнеталась до 40% через 3 недели (рис. 10.5). В группе старых животных выраженных изменений в содержании индуцированных продуктов ПОЛ не происходило, после 6-го и 9-го РЭХВ наблюдалась тенденция к повышению их содержания, которая нивелировалась к отдаленным срокам наблюдения (рис. 10.5).

Адаптация животных к незначительным воздействиям факторов стресса, какими могут быть кратковременные РЭХВ, мобилизует АОС организма, которая, в свою очередь, оказывает благоприятное воздействие на течение эмоционально-болевого синдрома, часто сопровождающего нарушения деятельности ССС, повышает устойчивость к гипоксии и избытку Ca^{2+} , оказывают мембранотропные эффекты [210].

Если считать, что активация ПОЛ является важнейшим патогенетическим фактором, способствующим развитию сердечно-сосудистой патологии, то, очевидно, что РЭХВ подавляют индуцированный ПОЛ в тканях сердца и способствуют стабилизации функции прооксидантно-антиоксидантной системы организма животных.

Регуляция прооксидантно-антиоксидантного баланса осуществляется при помощи системы антиоксидантной защиты, включающей в себя неферментативное и ферментативное звенья. Восстановленный глутатион (GSH), является связующим фактором между ними, так как может участвовать в обоих типах взаимодействия со свободными радикалами.

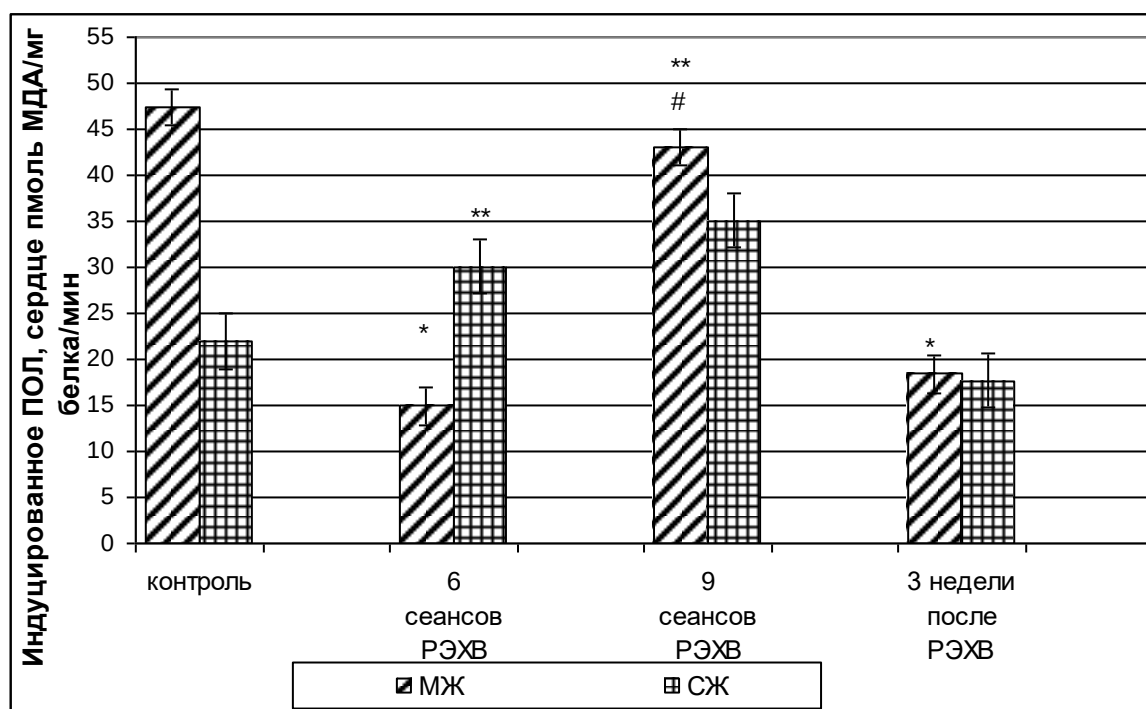


Рис. 10.5. Индуцированное ПОЛ в тканях миокарда молодых и старых крыс после РЭХВ

* - достоверно относительно контроля по критерию Манна-Уитни

** - достоверно относительно 3-х недель после воздействия

- достоверно относительно 6-го воздействия

Глутатион играет важную роль в защите клеток и внутриклеточной среды при развившемся окислительном стрессе любой природы. Пониженное его внутриклеточное содержание, обусловленное недостаточностью его синтеза ферментами, существенно снижает устойчивость клеток и организма [296, 297].

Восстановленный глутатион в больших количествах содержится внутри клеток обычно в связанном виде и высвобождается в случае повышения концентрации АМФ при высокой функциональной активности в экстремальных ситуациях, диктующих организму необходимость активного участия глутатионовой АОС [298].

Учитывая особенности реакции ССС на РЭХВ, взаимоотношение звеньев прооксидантно-антиоксидантной системы в сердце, было исследовано

состояние ферментативного звена системы антиоксидантной защиты, а именно активности каталазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы.

Каталаза обладает исключительно высокой степенью катализа, ее основная функция в клетке заключается в способности разлагать пероксид водорода. Одна молекула каталазы способна в секунду разложить десятки тысяч молекул пероксида водорода.

Каталаза функционирует в тесном контакте с супероксиддисмутазой, также обладающей способностью быстро и эффективно разлагать H_2O_2 , своевременно инактивирует активные формы кислорода как в условиях нормальной жизнедеятельности, так и в условиях повышенной активности ПОЛ, обусловленной различными факторами [299, 300].

Нами установлено, что в норме с возрастом активность каталазы в ткани сердца повышалась в 2,1 раза. РЭХВ приводили к достоверному повышению активности каталазы в сердце молодых крыс после 6-го и 9-го воздействия. Спустя три недели после РЭХВ каталазная активность в исследуемых тканях была выше, чем в контроле (рис. 10.6). У старых животных каталазная активность в сердце достоверно увеличивалась после 9-го воздействия и ещё в большей степени возрастала после 3-х недель наблюдения (рис. 10.6).

Глутатионзависимая АОС включает три фермента, среди которых глутатионпероксидаза, обладающая антиоксидантной активностью.

Функция глутатионредуктазы в метаболизме глутатиона связана с осуществлением образования GSH из окисленной формы GSSG, остальные ферменты являются потребителями восстановленного глутатиона [301, 302].

Глутатионпероксидаза является селенопротеином [300, 303], его функция заключается в обезвреживании H_2O_2 , органических и липидных пероксидов. Фермент локализован преимущественно в цитоплазме клеток и функционирует сопряженно с глутатионредуктазой.

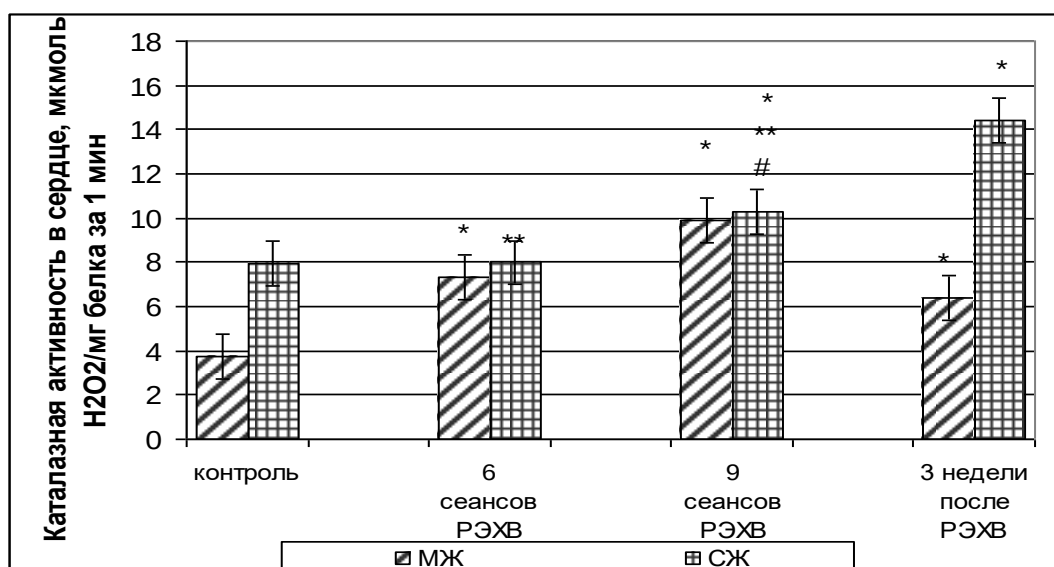


Рис. 10.6 Каталазная активность в тканях миокарда молодых и старых крыс после РЭХВ

* - достоверно относительно контроля по критерию Манна-Уитни

** - достоверно относительно 3 недель после воздействия

- достоверно относительно 6-го воздействия

После 6 процедуры РЭХВ у молодых животных отмечено снижение в 1,3 раза глутатионпероксидазной активности (рис. 10.7) и 2-кратное повышение каталазной, в то время как глутатионредуктазная активность не изменялась (рис. 10.8). После 9-го воздействия восстанавливалась глутатионпероксидазная активность, но повышалась каталазная в 2,6 раза и глутатионредуктазная в 1,4 раза относительно контроля. Через 3 недели после РЭХВ наблюдалось устойчивое увеличение ферментативной активности в тканях сердца относительно уровней контроля, что коррелирует со снижением интенсивности перекисных процессов на этом этапе экспериментов.

В то же время у СЖ после 6 процедуры РЭХВ глутатионпероксидазная активность снижалась до 74% (рис. 10.7), глутатионредуктазная достоверно увеличивалась в 1,8 раза (рис. 10.8), каталазная – не изменялась. После 9 РЭХВ глутатионпероксидаза и редуктаза соответствовали интактным показателям, а активность каталазы повышалась до 130%. На 21-й день после РЭХВ

показатели ферментативной активности находились на уровне достоверно более высоком по сравнению как с их содержанием у контрольных крыс, так и со значениями после 9-го воздействия.

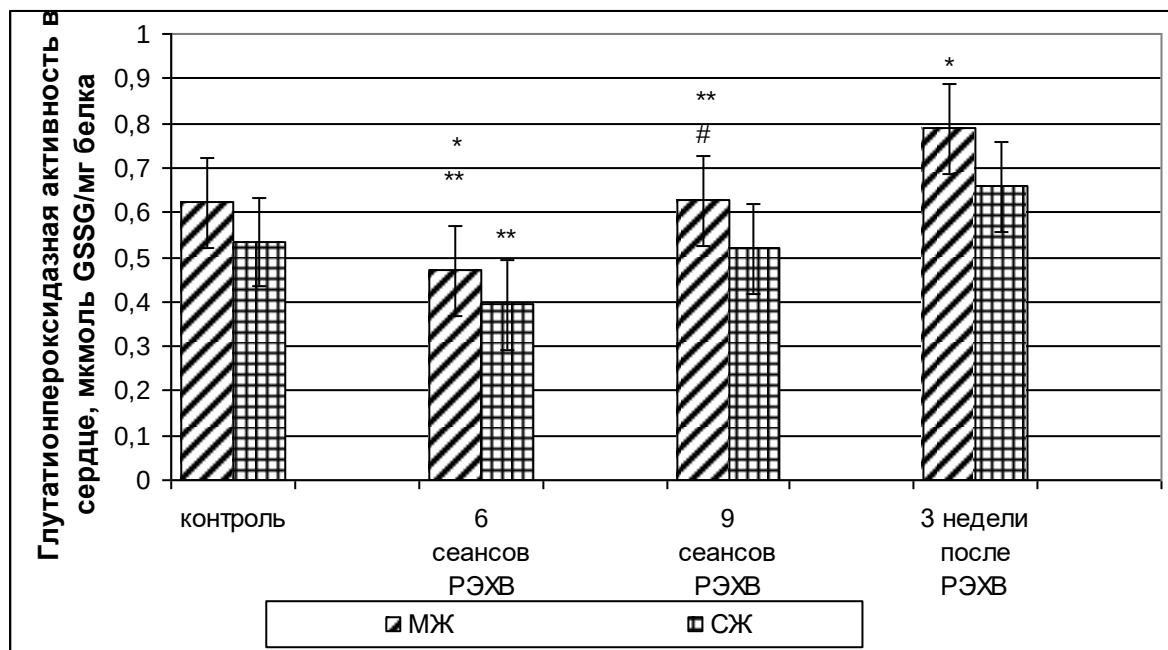


Рис. 10.7 Глутатионпероксидазная активность в тканях миокарда молодых и старых крыс после РЭХВ

* - достоверно относительно контроля по критерию Манна-Уитни

** - достоверно относительно 3 недель после воздействия

- достоверно относительно 6-го воздействия

Полученные результаты позволяют предположить, что важным механизмом действия РЭХВ является активация АОС организма исследуемых животных, которая сохраняется продолжительное время после окончания воздействия, что позволяет увеличить резистентность организма к стрессу.

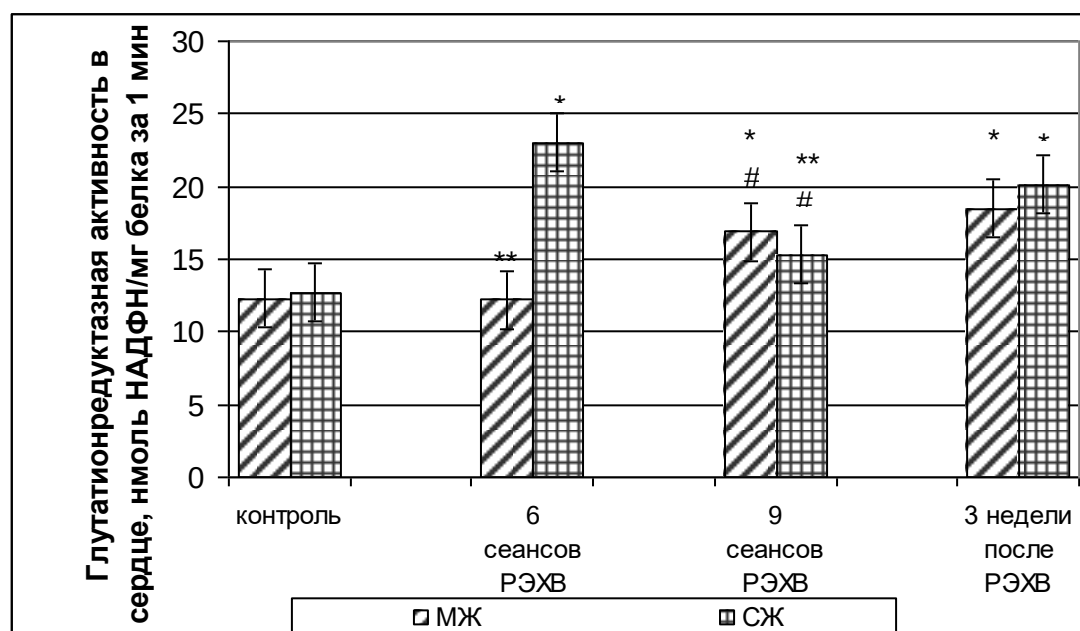


Рис. 10.8 Глутатионредуктазная активность в тканях миокарда молодых и старых крыс после РЭХВ

*- достоверно относительно контроля по критерию Манна-Уитни

** - достоверно относительно 3-х недель после воздействия

- достоверно относительно 6-го воздействия

Установлено, что после РЭХВ ультраструктура кардиомиоцитов и капилляров не претерпевала дистрофических изменений.

С увеличением количества сеансов РЭХВ наблюдается активация метаболических внутриклеточных процессов, что позволяет рассматривать криотерапию как мощный стимулирующий фактор, способствующий повышению активности миокарда и физиологической компенсаторной адаптации [136]. С увеличением сеансов РЭХВ происходит усиление репаративной и синтетической внутриклеточной активности, что структурно выражалось в гиперплазии мембран гранулярного ЭПР, увеличении числа рибосом и полисом, гипертрофии комплекса Гольджи.

В работе [295] показано, что действие ритмических экстремально низких температур не опустошает энергетические и функциональные резервы орга-

низма, а, являясь звеном стресса, значительно повышают его физиологические резервы. Повышенная проницаемость гистогематических барьеров для биологически активных веществ позволяет активно влиять на адаптационные процессы. Удалось показать [292], что усиление противофазных колебаний проницаемости ГЭБ для симпато- и парасимпатомиметиков при ритмическом охлаждении может восстановить физиологическую и «молодую» ритмику функционирования ГЭБ, существенно улучшать функциональные процессы в ССС. РЭХВ стимулируют центральные механизмы регуляции сердечного ритма, что подтверждают данные спектрального анализа ВСР. На наш взгляд, в этих взаимоотношениях важна роль ГЭБ, как структурной основы медленной управляющей системы, регулирующей и поддерживающей оптимальный уровень функциональной активности мозга и, в частности, гипоталамуса, а, следовательно, опосредованно сердечно-сосудистой системы и гомеостаза организма.

В.А.Барабой и Д.А.Сутковой [288, 289, 293, 294] считают, что периодические воздействия на организм факторов стресса умеренной силы становятся привычными, активируют и тренируют соответствующие системы организма, обуславливают увеличение числа и работоспособности функциональных единиц клеток, органа и, в конечном итоге, вызывают длительное повышение адаптационных возможностей организма.

Стабилизация функции ВНС предопределяет физиологические отношения тормозных и возбуждающих медиаторов, что благоприятно сказывается на соотношении функции ПОЛ и АОС, в том числе и в старом организме.

По результатам данного исследования опубликованы следующие работы:

1. Коцарь В.Л. Влияние экстремальных криовоздействий на свободнорадикальное окисление липидов сыворотки крови / В.Л.Коцарь, В.Г.Бабийчук, А.В.Гаевой // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т. 15, № 3. – С. 496-498.

2. Бабийчук В.Г. Возрастные особенности перекисного окисления липидов у крыс после экстремального криовоздействия / В.Г.Бабійчук // Проблемы криобиологии. – 2006. – Т. 16, № 1. – С. 32-44.

3. Бабийчук В.Г. Пероксидное окисление липидов при экстремальном охлаждении крыс / В.Г.Бабийчук // Український біохімічний журнал. – 2007. – Т. 79, № 1. – С. 112-123.

4. Коцарь В.Л. Особенности хемилюминесценции в тканях головного мозга крыс после экстремальных криовоздействий / В.Л.Коцарь, В.Г.Бабийчук // Клінічна та експериментальна патологія. – 2007. – Т. 6, № 1 – С. 60-66.

5. Коцар В.Л. Ритмічний вплив низьких температур на особливості вільнорадикального окислення тканин структур мозку / В.Л.Коцар, В.Г.Бабійчук // Проблемы криобиологии. – 2008. – № 4. – С. 547-549.

6. Бабийчук В.Г. Свободнорадикальные процессы в тканях мозга крыс после экстремальных криовоздействий / В.Г.Бабийчук, Д.А.Черкашина, В.Л.Коцарь, А.С.Лебединский // Биологический вестник – 2007. – Т. 11, № 2. – С. 23-26.

7. Коцар В.Л. Особливості хемилюмінесценції в тканинах щурів після екстремальних холодових впливів / В.Л.Коцар, В.Г.Бабійчук, Г.А.Бабійчук // Науковий вісник НАУ. – 2008. – № 126. – С. 103-107.

РАЗДЕЛ 11

СОДЕРЖАНИЕ КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ ОБМЕНА NO В ТКАНЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА, СЫВОРОТКЕ КРОВИ И МИОКАРДЕ МОЛОДЫХ И СТАРЫХ ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ РИТМИЧЕСКИХ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ХОЛОДОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

Стресс и адаптация – две социально–биологические проблемы, сопровождающие человека на протяжении всей его жизни. В современных условиях стресс и соответствующие ему реакции организма неизбежны и могут быть причиной развития болезней, особенно у людей пожилого возраста.

В этих условиях важна способность к адекватным морфо- физиологическим преобразованиям организма, в результате которых повышается его структурно–энергетический потенциал и неспецифическая резистентность. Поэтому реакции молодого и старого организмов будут разными и во многом зависят от индивидуальных особенностей регуляторных систем, диапазона их приспособительных возможностей.

С возрастом происходят количественные изменения и перестройка внутренней структуры ряда жизненно важных органов, что ведет к качественно иной реакции пожилого организма на многие внешние и внутренние влияния. Поэтому любые попытки вмешательства в процесс замедления старения, продления биологического и календарного возраста чрезвычайно актуальны.

Было обнаружено, что при РЭХВ [148, 304] происходит улучшение регуляции отдельных, наиболее ослабленных физиологических систем организма. При охлаждении свойства ГЭБ изменяются настолько, что повышается его проницаемость для многих биологически активных веществ. Это может способствовать стабилизации постоянства многих функциональных систем, активировать запуск компенсаторных реакций, направленных на поддержание гомеостаза в организме.

Представлены исследования о функциональном состоянии центральной нервной и сердечно-сосудистой систем на различных этапах РЭХВ. Показано, что наблюдаемые изменения соответствуют быстрой мобилизации адаптационных систем, направленных на оптимизацию уровня гомеостатического регулирования вегетативных функций [128]. В этом случае наблюдается стабилизация деятельности ВНС, предопределяющей физиологические отношения тормозных и возбуждающих медиаторов, что благоприятно сказывается на соотношении функций ПОЛ и АОС, играющих ведущую роль в процессах старения.

Учитывая, что при охлаждении изменяется проницаемость ГЭБ для различных биологически активных веществ, в том числе для пара- и симпатомиметиков, влияющих на состояние функции ряда органов, можно предположить наличие в организме факторов, относящихся к категории ретроградных мессенджеров, регулирующих функциональную пластичность его терморегуляторных функций [148]. Мы считаем, что таким физиологическим посредником может быть оксид азота - NO, относящийся к биологическим медиаторам.

Как свидетельствуют модельные нейрофизиологические опыты, для повышения проницаемости ГЭБ существуют оптимальные концентрации NO, так как на максимумах проницаемости ГЭБ как блокаторы, так и активаторы NO-синтаз ведут к снижению его проницаемости. В этой связи показательна оценка по содержанию нитритов и нитратов уровня NO в мозге в условиях ритмической гипотермии [258]. Весьма вероятен феномен усиления колебаний концентрации NO гипоталамуса в ритме динамики проницаемости ГЭБ и при экстремальных режимах гипотермии. Косвенно, но определённо об этом свидетельствуют полученные нами электронно-микроскопические данные о накоплении в нейроглиальных комплексах гипоталамуса на разных этапах РЭХВ липофусцина - конечного продукта ПОЛ, одним из ингибиторов которого является NO, а индуктором - свободные радикалы [305, 306].

По данным [148], NO как вторичный мессенджер уникален по своей природе в механизмах памяти, функций вазодилатации, нейротрансмиссии, деятельности иммунной системы, агрегации тромбоцитов, регуляции тонуса гладких мышц.

Установлено, что NO синтезируется при окислении аминокислоты L-аргинина при непосредственном участии фермента NO-синтазы. При внутриклеточном повышении ионов Ca^{2+} , кальмодулин присоединяется к молекуле NO-синтазы, в результате чего фермент активируется и происходит синтез NO. Это процесс прямо зависит от функционального состояния клетки [307].

В организме человека и животных существует цикл окиси азота, однако, многие механизмы этого процесса до конца не выяснены, в частности, почему молекулы со слабой окислительной способностью (NO_2^- и NO_3^-) обладают свойствами влиять на все жизненно важные процессы в организме, могут ли эти молекулы быть основным звеном метаболических превращений нитратов и нитритов, отвечающих за столь широкий спектр их физиологических эффектов.

Применяя биофизические методы исследований, [258] показал, что в основе универсального механизма действия нитритов в организме млекопитающих лежит реакция превращения NO_2^- в NO. Окись азота обладает способностью превращаться в двуокись - NO_2 , которая как свободно-радикальное соединение способно вызывать свободно-радикальные цепные реакции. Следовательно, стадию процессов восстановления ионов двуокиси азота в окись азота можно трактовать как наиболее важный этап запуска регуляторных механизмов метаболизма высокореакционных соединений, которые могут превращаться в ионы NO_2^- и NO_3^- , образуя таким образом метаболический цикл. Автор выдвинул гипотезу, в соответствии с которой эффективное использование NO и его метаболитов (NO_2^- и NO_3^-) во внутриклеточной регуляции концентрации ионов Ca^{2+} , что играет важную роль в развитии мно-

гих патологических процессов, протекающих на фоне ишемии и гипоксии клеток человека и животных.

Оксид азота синтезируется различными типами клеток [305, 306], что позволило выделить три основные изоформы NO-синтаз [310]: NOS-1 – нейрональную (nNOS) или мозговую (bNOS); NOS-2 – индуцибельную (iNOS) или макрофагальную (mNOS); NOS-3 – эндотелиальную (eNOS), являющихся продуктами различных генов. Благодаря особенностям в механизмах действия и локализации, изоформы NOS также подразделяют на конститутивную (cNOS), которая включает 2 изоформы (NOS-1 и NOS-3) с локализацией в цитоплазме, и индуцибельную NOS (i-NOS), являющуюся кальций-независимой, которая активируется при повышении генной транскрипции, играет важную роль в подавлении активности бактериальных и опухолевых клеток, развитии артериальной гипертензии, нарушении ПОЛ.

Биологическое действие NO осуществляется благодаря его способности быстро диффундировать через мембраны синтезирующей его клетки в межклеточное пространство и без участия соответствующих рецепторов проникать в клетки-мишени, где активируют необходимые ферменты.

Познание механизмов межклеточной коммуникации и регуляции деятельности клеток, вообще, и в миокарде, в частности, во многом связано с открытием и исследованием оксида азота, являющегося межклеточным посредником, обладающим многосторонним действием на жизнедеятельность органов и организма. Активное изучение NO и ферментативных систем, способных его синтезировать, началось после открытия в 80-х годах Р.Фуршготт и Д.Завадски эффекта расширения кровеносных сосудов под влиянием ацетилхолина в присутствии эндотелия эпителиальных клеток, выстилающих внутреннюю поверхность сосудов. В связи с этим одними из наиболее изученных популяций клеток, обладающих свойствами синтеза и выделения NO, являются клетки эндотелия кровеносных сосудов.

Нитраты относятся к умеренно токсическим веществам и не могут отвечать за широкий спектр действия нитросоединений, в то же время удалось показать, что в основе универсального механизма действия нитритов в организме млекопитающих лежит реакция превращения ионов NO_2^- в NO.

Важной ролью NO является его способность проникать в кардиомиоциты, где при участии цГМФ он снижает концентрацию внутриклеточного кальция, вызывая вазодилатацию и расслабление гладкомышечных клеток и тканей, обеспечивая регуляцию общего периферического сопротивления сосудов и перераспределения крови в сосудах [311]. Кроме модуляции тонуса сосудов NO участвует в регуляции сократительной функции миокарда [312, 313].

Показано [314], что нарастание гипоксии и гиперкапнии на фоне охлаждения не приводит к существенному нарушению обмена NO в клетках у гибернирующих животных. Отмеченные изменения имеют адаптивный характер и исчезают в течение 2 часов.

Установлено, что гранулярные клетки мозжечка в ответ на воздействие агонистов глутамановых рецепторов *in vitro* продуцируют NO. Учитывая короткую продолжительность жизни NO в мозге млекопитающих (несколько секунд), определить количество его в различных тканях чрезвычайно трудно. В связи с этим внимание исследователей привлекли ферментативные системы, ответственные за синтез NO, в частности нейрональная NO-синтаза (nNOS), активация которой коррелирует с количеством NO в тканях. Источниками NO в ЦНС являются глутаматергические гранулярные клетки и ГАМК-ергические клетки мозжечка, нейроны коры головного мозга [148], нейроглиальные клетки - астроциты и другие ткани мозга [315].

Влияние NO на механизмы электрогенеза нервных клеток проявляется при многих нейродегенеративных заболеваниях мозга, особенно характерных для пожилых людей. В этих случаях нервные клетки активно экспрессируют NO-синтазу и продуцируют необходимый объем NO. С нарушением этих фу-

нкий связывают гибель нейронов и других макроглиальных клеток, в частности, олигодендроцитов.

Необходимо учитывать, что внутриклеточная сигнализация, как более древний тип передачи информации по сравнению с межклеточной, остается одним из необходимых условий жизни людей и животных, а гипотеза существования нитратно/нитритного дыхания и концепция цикла окиси азота рассматриваются, как эволюционно древний механизм защиты клеток от многих факторов, неблагоприятно воздействующих на организм.

Очень важный аспект физиологической роли NO связан с его биологическим свойством нейротрансмиттера, что обусловлено способностью оказывать эффект на расстоянии до 100 мкм [316] от места синтеза. Специфически NO не связывается с рецепторами постсинаптической мембраны и не является классическим мессенджером, но, обладая свойством диффундировать в другие участки, в том числе и пресинаптические нейроны, действует как ретроградный мессенджер, нейромодулятор, способный активировать нейрорегуляторные системы мозга. Можно предположить, что NO играет чрезвычайно важную роль в развитии старости и возникновении различных патофизиологических состояний, характерных для этой возрастной группы. В этих процессах могут участвовать nNOS и eNOS, так как они широко представлены в мозге. Ферменты похожи по своим свойствам и отличаются только тем, что nNOS является цитозальным, а eNOS – мембранно-связанным ферментом.

Традиционные нейротрансмиттеры синтезируются специфическими ферментами и накапливаются в синаптических пузырьках нервных окончаний и при поляризации синаптической мембраны нервным импульсом высвобождаются в синаптическую щель, в дальнейшем оказывая воздействие на постсинаптические рецепторы с последующим обратным захватом. Нейромедиаторная функция NO реализуется после синтеза из предшественника аминокислоты L-аргинина с помощью фермента NO-синтазы. Процесс управле-

ния синтезом является ключевым в регуляции функциональной активности самого мессенджера. Обладая высокой диффузионной способностью, NO не может резервироваться, высвобождаться или подвергаться обратному захвату пресинаптическими окончаниями синаптической щели [306]. Его роль как универсального модулятора в поддержании гомеостаза, иммунного статуса, экспрессии генов, синаптической пластичности нервных тканей, памяти, высвобождении нейротрансмиттеров чрезвычайно важна.

Было показано участие в этих процессах ряда регуляторных систем, среди которых важную роль играют свободнорадикальные газы, являющиеся посредником многих физиологических процессов [138, 315, 317]. При охлаждении организма ретроградные посредники имеют большое значение в процессе терморегуляции [242, 318, 319], как нейротрансмиттерные, межклеточные коммуникационные системы, обеспечивающие долговременную потенцию [320].

Установлено [17, 306, 315, 321-324], что при РХВ оксид азота способствует повышению проницаемости ГЭБ для нейромедиаторов. Когда NO не имеет своего оптимального максимума, проницаемость ГЭБ не достигает высоких значений, в то же время стимуляция синтеза NO при внутрибрюшинном введении L-аргинина (1-2 мг/100 г) увеличивает проницаемость ГЭБ до максимума, а блокада α - и β -адренорецепторов фенотрамином и пропранололом снижает проницаемость ГЭБ до уровня контроля.

Если учесть, что ГЭБ и медленная управляющая система мозга являются структурно-функциональной основой регуляции гомеостаза [320], то возможно NO как фактор нейрональной пластичности способен опосредовать физиологические процессы типа долговременной потенции при РЭХВ.

Как видно из рис. 11.1, 11.2, содержание конечных продуктов обмена NO в коре головного мозга контрольных молодых животных было выше, чем у старых.

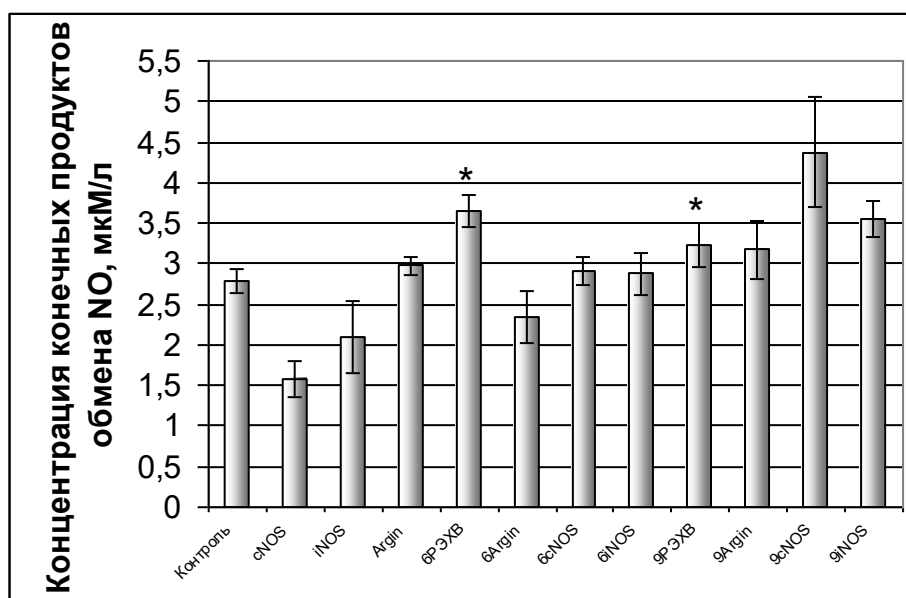


Рис. 11.1 Содержание конечных продуктов обмена NO в коре головного мозга молодых крыс после применения блокаторов и РЭХВ

cNOS – после применения специфического блокатора конститутивной NOS;

iNOS – после применения специфического блокатора индуцибельной NOS;

Argin – после применения стимулятора NOS;

6РЭХВ – шестое ритмическое экстремальное холодовое воздействие;

9РЭХВ – девятое ритмическое экстремальное холодовое воздействие.

Примечание: * – достоверно ($p < 0,05$) по отношению к контролю.

Применение специфических блокаторов конститутивной NO-синтазы (cNOS), включающей нейрональную и эндотелиальную синтазы, и индуцибельной (iNOS) подавляли активность ферментов, а агонист L-аргинин повышал их синтез.

После 6-го сеанса РЭХВ в коре головного мозга у молодых животных уровень содержания конечных продуктов метаболизма NO был значительно выше, чем в контроле (рис. 11.1) и имел тенденцию к снижению, о чем свидетельствует их содержание после 9-го сеанса РЭХВ. Применение селективных блокаторов cNOS и iNOS в наших экспериментах, вместо ожидаемого подавления синтеза ферментов, вызывало повышение их после 9-го сеанса РЭХВ, а содержание нитритов после введения аргинина в эти сроки не изме-

нялось (рис. 11.1). В коре головного мозга старых крыс (рис.11.2) уровень нитритов после 6-го и 9-го сеансов РЭХВ достоверно не отличался от контроля. Не отмечено и существенных изменений синтеза конститутивной и индуцибельной синтаз после применения соответствующих селективных блокаторов и активаторов.

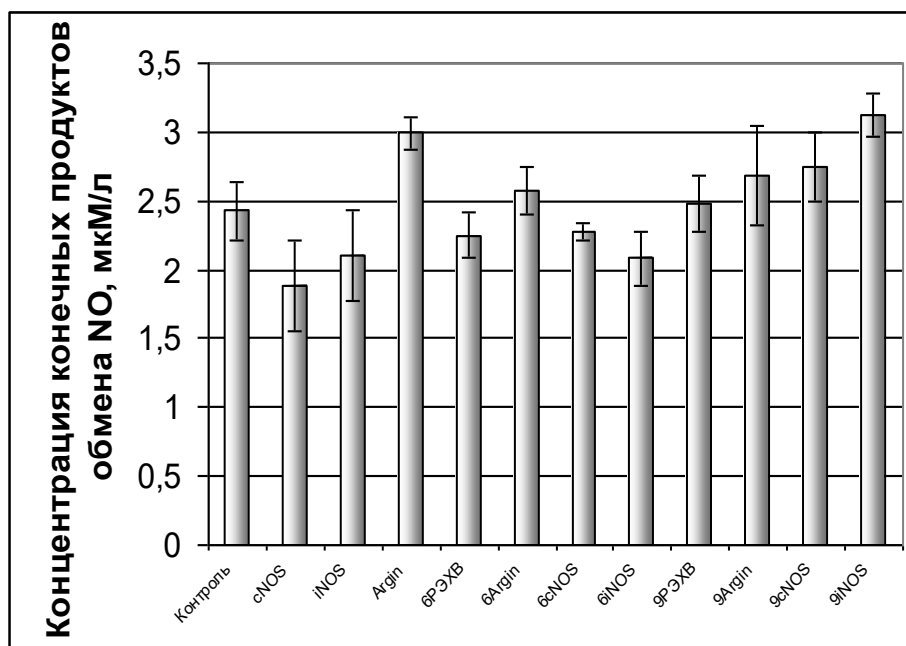


Рис. 11.2 Содержание конечных продуктов обмена NO в коре головного мозга старых крыс после применения блокаторов и РЭХВ

cNOS – после применения специфического блокатора конститутивной NOS;

iNOS – после применения специфического блокатора индуцибельной NOS;

Argin – после применения стимулятора NOS;

6РЭХВ – шестое ритмическое экстремальное холодовое воздействие;

9РЭХВ – девятое ритмическое экстремальное холодовое воздействие.

В тканях гипоталамуса у контрольных групп крыс (рис. 11.3, 11.4) базальный уровень содержания нитритов был выше у МЖ, как и активность синтеза после применения аргинина. Введение специфических блокаторов замедляло активность cNOS как у молодых, так и у старых животных.

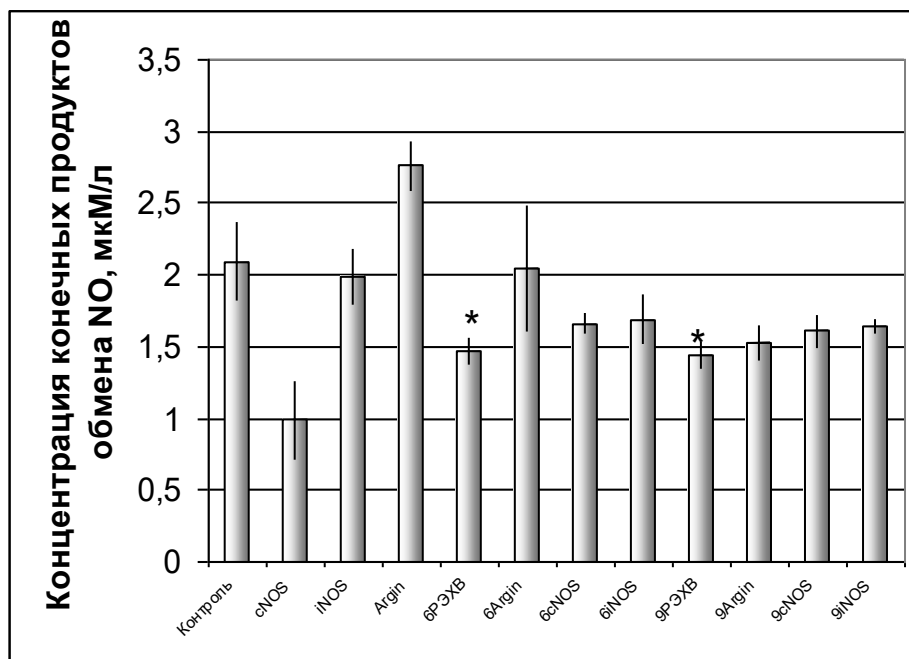


Рис. 11.3 Содержание конечных продуктов обмена NO в гипоталамусе головного мозга молодых крыс после применения блокаторов и РЭХВ

cNOS – после применения специфического блокатора конститутивной NOS;

iNOS – после применения специфического блокатора индуцибельной NOS;

Argin – после применения стимулятора NOS;

6РЭХВ – шестое ритмическое экстремальное холодовое воздействие;

9РЭХВ – девятое ритмическое экстремальное холодовое воздействие.

Примечание: * – достоверно ($p < 0,05$) по отношению к контролю.

В динамике исследования тканей гипоталамуса на содержание конечных продуктов обмена NO у молодых и старых крыс наблюдалось их снижение после 6-го сеанса РЭХВ по отношению к контролю (рис. 11.3, 11.4) с последующим достоверным увеличением у старых животных после 9-го сеанса по отношению к 6-му. Отмечена повышенная активность NO-синтаз у старых крыс после введения блокаторов как по отношению к 6-му сеансу РЭХВ, так и к контролю.

Интерпретируя полученные результаты, следует сослаться на наши предыдущие исследования [320]. Было установлено, что РХВ длительностью 1 с с частотой 0,1 Гц не приводят к изменению температуры тела, но имеет

место кардинальная перестройка БЭА мозга, коррелирующая со сложной динамикой проницаемости ГЭБ. На этапах ритмической гипотермии повышается активность медленной управляющей системы мозга параллельно с повышением проницаемости ГЭБ [325].

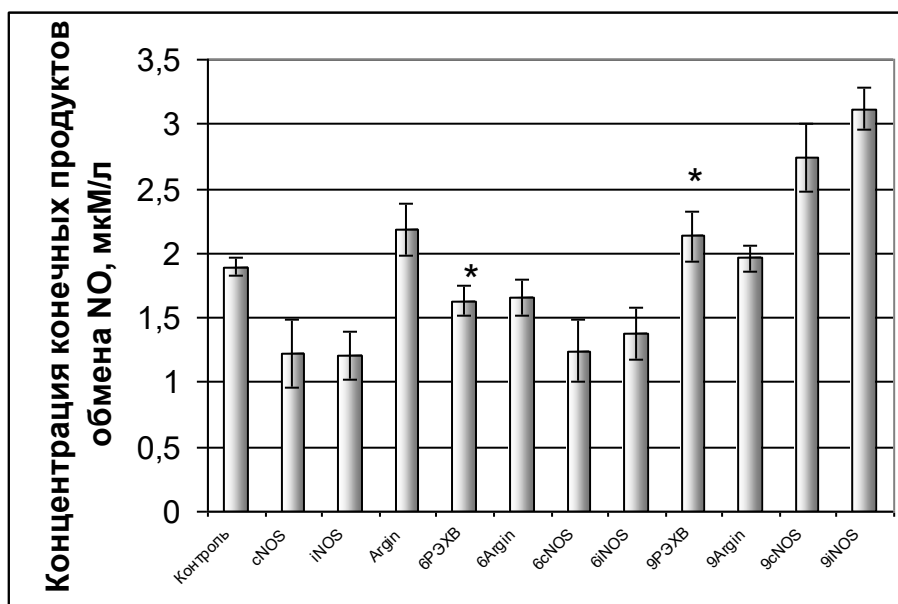


Рис. 11.4 Содержание конечных продуктов обмена NO в гипоталамусе головного мозга старых крыс после применения блокаторов и РЭХВ

cNOS – после применения специфического блокатора конститутивной NOS;

iNOS – после применения специфического блокатора индуцибельной NOS;

Argin – после применения стимулятора NOS;

6РЭХВ – шестое ритмическое экстремальное холодовое воздействие;

9РЭХВ – девятое ритмическое экстремальное холодовое воздействие.

Примечание: * – достоверно ($p < 0,05$) по отношению к контролю.

В секундном диапазоне частот функция автокорреляции и когерентности в коре и гипоталамусе головного мозга варьирует от низких до предельно высоких значений мощности спектра БЭА. Проницаемость ГЭБ в этот период повышается в 3-4 раза, снижается до нуля и снова значительно возрастает. Ритм колебаний БЭА в отделах коры и гипоталамуса имеет синусоидальную форму.

Различными методами была показана связь между этими процессами [16, 138, 145], имеющими нейрофизиологическую основу. Полученные результаты позволили предположить, что причиной вышеописанных процессов может быть резонансное раздражение терморецепторов, что способствует синхронизации вегетативного статуса организма и в ряде случаев полным симпато–парасимпатическим переключениям, достижению адекватного соотношения симпатических и парасимпатических влияний на функцию органов и смену знака кардиотропных эффектов. Такие значительные изменения активности ЦНС и организма в целом можно объяснить влиянием РХВ на физиологические процессы, в основе которых находится высокоорганизованная функциональная система с особой нейромедиацией, обеспечивающей ее деятельность. Очевидно, ГЭБ при определенных условиях взаимодействует с системами электрогенеза, иммунной, нейрогуморальной, терморегуляторной и другими системами, обеспечивающими гомеостаз. Такого рода взаимоотношения обеспечиваются традиционными нейромедиаторами, биогенными аминами, аминокислотами, нейропептидами. Вместе с тем при действии РХВ функционирование ГЭБ и БЭА как систем медленной физиологической регуляции обеспечивается и новым классом сигнальных молекул-посредников, среди которых NO отводится особая роль. Монооксид азота является важным физиологическим посредником [138, 315, 317], обеспечивающим нейротрансмиттерные процессы [326, 327], принимает участие в организации биоритма цикла сон-бодрствование [322], играет важную роль в центральных механизмах терморегуляции [242, 319], регулирует проницаемость ГЭБ [321-324]. Установлено, что при периодических холодовых влияниях на организм повышается неспецифическая устойчивость животных к действию других экстремальных факторов [328], повышается устойчивость к гипоксии [329-331], что связано с активацией ГЭБ [17, 332, 333] и его регуляторной функцией, в основе которой генетически обусловленный механизм селективной проницаемости для веществ, обеспечивающих процессы метаболизма и ней-

рогуморальной регуляции. адекватно изменяющемуся функциональному состоянию [334].

В исследуемых тканях отмечено повышение содержания конечных продуктов обмена NO в те же сроки, что и изменение ЧСС как у старых, так и у молодых животных на внутрибрюшинное введение норадреналина. Активация pNOS приводит к повышению синтеза NO, который, в свою очередь, ведет к увеличению внутриклеточной концентрации цГМФ и Ca^{2+} , что способствует фосфорилированию цитозольных и цитоскелетных белков, создавая условия для процессов эндоцитоза медиаторов, влияющих на проницаемость ГЭБ.

Активация ГЭБ стимулирует нервно-гормональные механизмы у старых животных и таким образом не только стабилизирует гомеостаз, но и «омолаживает» его. Мы считаем, что функционирование ГЭБ, как основы медленной управляющей системы адаптации мозга, может осуществлять принципиально новый класс сигнальных молекул-посредников, в которых особая роль отводится NO. Оксид азота активирует синтез цГМФ, который как внутриклеточный посредник регулирует работу мембранных ионных каналов, таким образом, способствуя активации синаптических процессов, в том числе внутриклеточному накоплению нейромедиаторов в везикулах и их активному транспорту. Оксид азота, обладая свойствами липофильной молекулы, свободно диффундирует через клеточные мембраны и, не нуждаясь в рецепторах, проникает в соседние клетки, например, в эндотелиальные клетки сосудов, вызывая вазодилатацию сосудов мозга. Не исключено, что описанные изменения, наступившие в тканях и клетках после РХВ, понижают уровень артериального давления, который определяется балансом вазоконстрикторных и вазодилататорных влияний на гладкомышечные волокна сосудистой стенки [335, 336].

Таким образом, содержание конечных продуктов обмена NO в коре головного мозга у молодых животных было выше, чем у старых. Применение

специфических блокаторов синтеза NO-синтаз подавляло, а лиганд L-аргинина стимулировало их активность у молодых и старых животных.

Нами установлено, что в контрольной группе молодых животных исходная концентрация конечных продуктов обмена NO в сыворотке крови была выше, чем в миокарде (рис. 11.5, 11.6). Наблюдаемые изменения свидетельствуют о том, что оксид азота как вторичный мессенджер активно функционирует в клетках и тканях исследуемых животных.

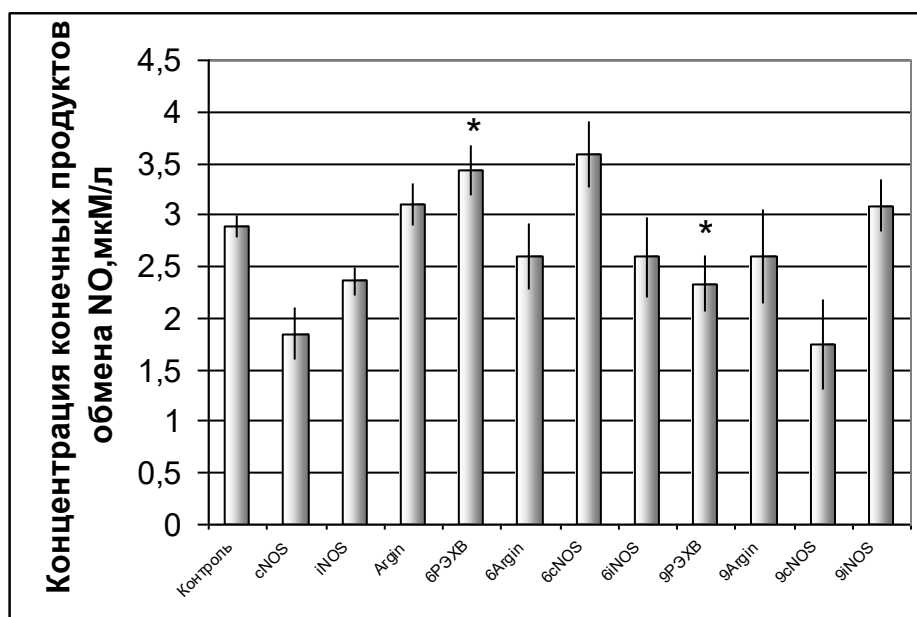


Рис. 11.5 Содержание конечных продуктов обмена NO в сыворотке крови молодых крыс после применения блокаторов и РЭХВ

cNOS – после применения специфического блокатора конститутивной NOS;

iNOS – после применения специфического блокатора индуцибельной NOS;

Arginin – после применения стимулятора NOS;

6РЭХВ – шестое ритмическое экстремальное холодное воздействие;

9РЭХВ – девятое ритмическое экстремальное холодное воздействие.

Примечание: * – достоверно ($p < 0,05$) по отношению к контролю.

Характерные величины нитритов в крови и миокарде дали возможность предположить о присутствии в них вещества, возможно NO, которое

продуцируется эндотелиальными клетками. Наблюдаемый нами в контрольных опытах процесс регулируем, так как тормозится селективными ингибиторами различных NOS и активируется предшественником синтеза ферментов, агонистом-L-аргинином.

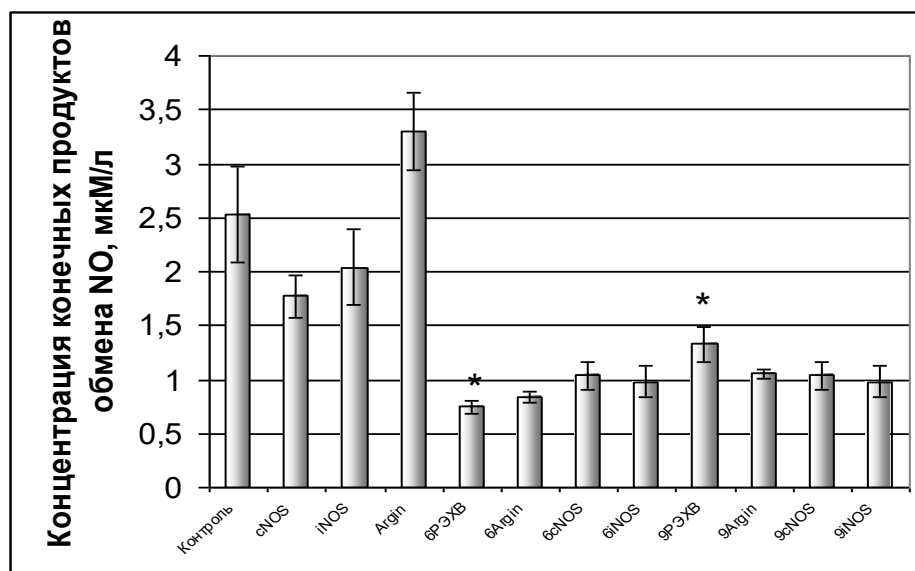


Рис. 11.6 Содержание конечных продуктов обмена NO в миокарде молодых крыс после применения блокаторов и РЭХВ

CNOS – после применения специфического блокатора конститутивной NOS;

iNOS – после применения специфического блокатора индуцибельной NOS;

Arginin – после применения стимулятора NOS;

6РЭХВ – шестое ритмическое экстремальное холодовое воздействие;

9РЭХВ – девятое ритмическое экстремальное холодовое воздействие.

Примечание: * – достоверно ($p < 0,05$) по отношению к контролю.

Как видно из рис. 11.7, 11.8, в тканях миокарда старых животных содержание нитритов, при тех же условиях эксперимента, существенно отличалось от их концентрации у молодых ($1,37 \pm 0,22$ и $2,53 \pm 0,44$ мкМ/л, $p < 0,05$).

Такое снижение нитритов у старых животных, возможно, связано с тем, что в сердце NO играет существенную роль в регуляции одной из главных функций сердца – насосной, обеспечивает контрактильную функцию миокарда [337], усиливает релаксацию желудочков и увеличивает диастолическую растяжимость и является необходимым компонентом в осуществлении β -адренергического ино- и хронотропного эффектов [338].

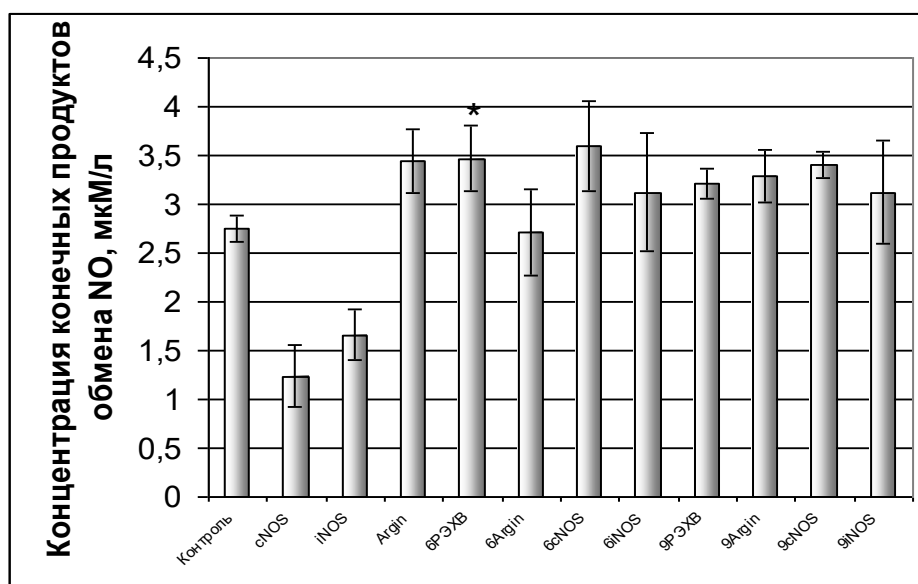


Рис. 11.7 Содержание конечных продуктов обмена NO в сыворотке крови старых крыс после применения блокаторов и РЭХВ

cNOS – после применения специфического блокатора конститутивной NOS;

iNOS – после применения специфического блокатора индуцибельной NOS;

Arginin – после применения стимулятора NOS;

6РЭХВ – шестое ритмическое экстремальное холодовое воздействие;

9РЭХВ – девятое ритмическое экстремальное холодовое воздействие.

Примечание: * – достоверно ($p < 0,05$) по отношению к контролю.

Очевидно, что в связи с выраженными в той или иной степени дистрофическими процессами и ишемией миокарда у старых крыс способность клеток к синтезу NO снижена.

Известно, что со временем происходят как качественные, так и количественные изменения целостности организма, отмечается перестройка внутренней структуры, что ведет к качественно иной реакции старого организма на многие внешние и внутренние влияния. Таким образом, молодой и старый организм существенно отличаются как структурой, так и функцией. Применение специфических блокаторов изоформ cNOS и iNOS в экспериментах подтверждают наши предположения.

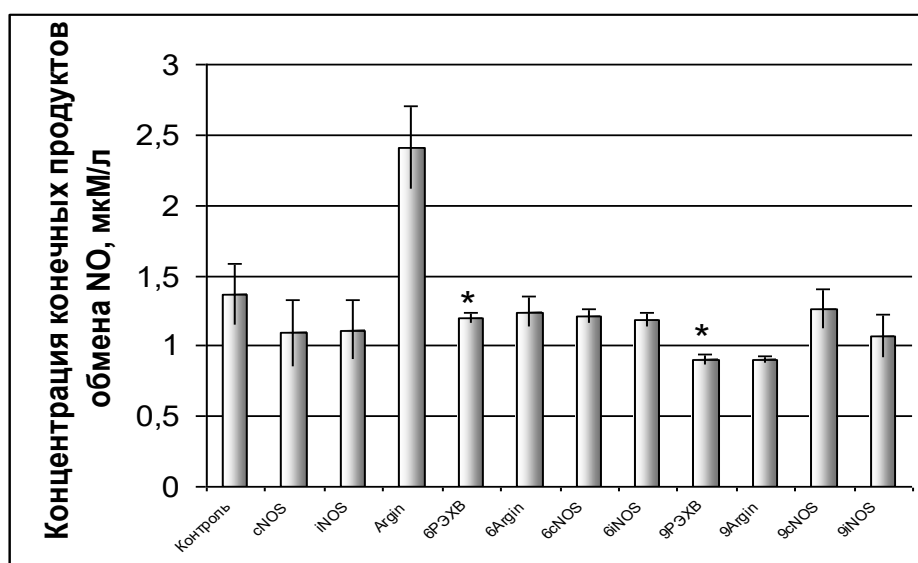


Рис. 11.8 Содержание конечных продуктов обмена NO в миокарде старых крыс после применения блокаторов и РЭХВ

cNOS – после применения специфического блокатора конститутивной NOS;

iNOS – после применения специфического блокатора индуцибельной NOS;

Arginin – после применения стимулятора NOS;

6РЭХВ – шестое ритмическое экстремальное холодное воздействие;

9РЭХВ – девятое ритмическое экстремальное холодное воздействие.

Примечание: * – достоверно ($p < 0,05$) по отношению к контролю.

Более низкое содержание конечных продуктов обмена NO в миокарде крыс, особенно старых, по сравнению с их содержанием в сыворотке крови, объясняется интенсивным потреблением оксида азота на поддержание

внутриклеточного метаболизма в миоцитах для улучшения трофики, направленной на обеспечение транспорта кислорода не только к миоцитам, но и организму в целом.

При старении, когда имеют место внутриклеточные нарушения метаболизма, становится чрезвычайно актуальным применение различных фармакологических средств и других методов, повышающих устойчивость миокарда к дефициту кислорода. В этом случае важное значение приобретают методы, повышающие резистентность организма, формирующие адаптационные реакции, способные обеспечить адекватное функционирование основных систем, в том числе и сердечно-сосудистой за счет активации универсальных факторов регуляции.

Установлено, что в организме в ответ на действие экстремальных факторов (гипоксия, холод, тепло) усиливается продукция NO клетками [339] за счет увеличения внутриклеточной концентрации ионов кальция, уровень которого коррелирует с высвобождением эндотелиального NO.

Нами установлено, что РЭХВ приводят к повышению проницаемости ГЭБ для пара- и симпатомиметиков, синхронизируют функцию ВНС, нормализуют сердечный ритм, особенно у старых животных, в связи с чем нами были изучены особенности роли NO, его конечных продуктов в функции миокарда и крови старых и молодых крыс после РЭХВ. Следует учитывать, что роль NO при нормальных физиологических и патологических состояниях организма не одинакова и, в большей степени, определяется его концентрацией.

Известно, что при многих заболеваниях, в основе которых отмечается развитие оксидативного стресса, сопровождающегося накоплением свободнорадикальных соединений, NO взаимодействует с активными формами кислорода, образуя реакционное соединение пероксинитрат, и может оказывать существенное влияние на интенсивность развития стресса и тяжесть заболеваний [340], усугубляя их тяжесть, или, генерируя NO, осуществлять защитный эффект.

По данным [341], различные периодические экстремальные воздействия приводят к нарушению суточного стереотипа и могут сопровождаться нарушениями адаптационных механизмов, призванных осуществлять поиск и формирование оптимальных форм взаимодействия организма с окружающей средой сразу же после действия стрессовых факторов. При холодовых воздействиях несомненна особая роль в механизмах адаптации норадренергической системы гипоталамуса, которая опосредует стрессовый ответ организма и участвует в специфических ответных реакциях. В работах [306, 332] показано, что норадренергическая активация вегетативных функций при охлаждении обеспечивается за счет повышения проницаемости ГЭБ. Приблизительно через сутки после охлаждения наблюдается повторное изменение активности функциональных систем, которые подготавливают организм к аналогичному воздействию по типу «реакции ожидания» на нейрохимическом уровне. По-видимому, формируется комплекс условий, обеспечивающий сохранение через 24 часа после холодовых воздействий высокий уровень катехоламинов в крови и гипоталамусе. Характерным есть то, что после повторного охлаждения активность норадренергической системы мозга аналогична, как и при первом. Установлено, что через сутки после возникновения у животных «реакции тревоги» на действие фактора стресса, в том числе и холодового, у животных происходит повторная активация нейроэндокринной системы, формируется приспособительная реакция, которая готовит организм к повторной «встрече» с имевшим место воздействием [339], однако складывается впечатление, что адаптивные системы, готовые реагировать на повторное охлаждение, через сутки более специфичны и экономичны.

«Реакция ожидания» повторного воздействия исследована учеными-физиологами и происходит, в основном, за счет внутриклеточных перестроек, синтеза адаптативных ферментов, в том числе NO-синтаз. Эти реакции, как правило, формируются в ограниченном временном интервале. В «реакции ожидания» важное значение в поддержании гомеостаза, нормальной функции сердечно-сосудистой системы принадлежит гипоталамусу, в котором

сосредоточены регуляторные центры многих вегетативных функций, в том числе и сердца. Особая роль в этих механизмах принадлежит NO, как ретроградному мессенджеру [342-350].

Учитывая вышеизложенное, образцы тканей для исследования у экспериментальных животных забирались нами через чутки после процедуры РЭХВ. Как видно из рис. 11.5, содержание конечных продуктов обмена NO в сыворотке крови, забранной для исследования через сутки после шести РЭХВ, у молодых животных достоверно отличалось от полученных результатов у контрольных животных. Базальный уровень нитритов у них был выше, чем у контрольных.

После применения специфического блокатора вместо ожидаемого, как в контроле, угнетения, нами отмечено увеличение активности фермента cNOS. В то же время, в сыворотке крови этих животных не обнаружено достоверных различий в содержании конечных продуктов обмена NO после блокады функции iNOS по сравнению с контролем. Применение предшественника синтеза оксида азота L-аргинина не приводило к увеличению содержания конечных продуктов обмена NO и было в исследуемом образце ниже, чем в контроле.

Базальный уровень нитритов повышается после шестого холодового воздействия в сыворотке крови молодых животных до $3,442 \pm 1,26$ мкМ/л от $2,53 \pm 0,44$ мкМ/л в контроле ($p < 0,05$). После девяти сеансов РЭХВ отмечена динамика снижения нитритов как по отношению к предыдущему этапу исследований, так и по отношению к контролю ($2,33 \pm 0,27$) мкМ/л ($p < 0,05$).

Особенно наглядными являются исследования активности cNOS после применения блокаторов, которая после девяти сеансов РЭХВ снижается по сравнению с предыдущим этапом, практически не отличаясь от контроля.

В то же время применение блокаторов iNOS не только не уменьшает содержание нитритов, но существенно увеличивает их концентрацию в исследуемых образцах, что дает возможность предположить о повышении активности фермента в результате формирования защитных эффектов адап-

тации, активизацией функционирования всех систем организма, в которых важную роль играют универсальные факторы регуляции физиологических систем.

Количество исследуемых метаболитов после внутрибрюшинного введения предшественника синтеза NO L-аргинина практически оставалось на том же уровне, что и после 6 воздействия.

Исследуя содержание нитритов в сыворотке крови после шестого холодого воздействия у старых животных, нами отмечено повышение их уровня по отношению к контролю, как и у молодых животных (рис. 11.7).

Аналогичная динамика роста нитритов у этих животных отмечена и после девяти сеансов РЭХВ. В эти сроки нами отмечена отрицательная корреляция между содержанием стабильных метаболитов NO и применением блокаторов синтеза cNOS и iNOS, что дает возможность предположить о повышении в сыворотке крови старых животных как конститутивной, так и индуцибельной изоформ NOS. Введение крысам предшественника синтеза NO L-аргинина не только не увеличивало количество нитритов, а, наоборот, снижало их содержание.

Таким образом, после девятого сеанса РЭХВ у старых животных все исследуемые показатели в сыворотке крови существенно превышали аналогичные у контрольных.

Возрастающий интерес к проблеме старости во многом обусловлен необходимостью гибких адекватных методов коррекции нарушенной функции органов и систем, в том числе и сердечно-сосудистой. В этих процессах важную роль может играть ухудшение эндотелий-зависимой вазодилатации, обусловленной абсолютным или относительным дефицитом окиси азота.

В процессе экспериментов установлено, что после шестого сеанса РЭХВ в миокарде молодых крыс наблюдается снижение уровня нитритов по сравнению с контрольными животными (рис. 11.6). Применение специфических блокаторов синтеза cNOS и iNOS в этих условиях эксперимента приводили к

умеренному повышению содержания конечных продуктов обмена NO в исследуемых образцах.

Введенный крысам внутрибрюшинно L-аргинин не приводил к повышению содержания нитритов в тканях миокарда. После девятой холодовой процедуры существенно повысилось содержание нитритов в миокарде по отношению к предыдущей процедуре охлаждения, но оно было ниже, чем у контрольных животных. Содержание в исследуемых образцах конечных продуктов обмена NO после применения блокаторов и предшественника синтеза по отношению к животным после шестикратного холодового воздействия практически не менялось.

Исследуя миокард старых животных на содержание нитритов в ответ на РЭХВ, нами были обнаружены статистически достоверное их снижение после шестикратного температурного воздействия, аналогично, как после девятикратного. После 9 сеансов РЭХВ отмечена тенденция к повышению содержания в исследуемых тканях нитритов после применения специфических блокаторов (рис. 11.8).

Поддержание гомеостаза у животных различных возрастных групп в условиях действия различных факторов среды осуществляется на основе мультифакторного регулирования, в процессе которого, благодаря перестройке многих жизненно важных систем, достигается новое состояние, более выгодное организму в создавшихся условиях. Одним из таких механизмов является образование NO из предшественника L-аргинина, когда в организме, в силу ряда причин, развивается в той или иной степени выраженное состояние гипоксии.

Восстановление NO из нитритов - менее затратный в энергетическом отношении механизм, чем синтез из L-аргинина. Клетки получают возможность из продуктов метаболизма NO (нитриты и нитраты) образовывать NO, используя энергетически более экономный путь.

Обобщая полученные нами результаты экспериментов на старых и молодых животных, можно предположить, что активность NO играет роль па-

тогенетического регуляторного фактора, активность которого снижается у старых контрольных животных.

Особенно интересным является факт повышения содержания конечных продуктов обмена NO после 6 сеансов экстремальных криовоздействий у молодых и после 6-9 сеансов у старых крыс.

Как установлено, NO играет важную роль в системе кровообращения, так как он является мощным сосудорасширяющим агентом. Эндотелий сосудов продуцирует выброс в кровь небольших количеств NO, выполняющего функцию эффективного биологического медиатора, однако, в пожилом организме эта функция уменьшается, в результате чего замедляются многие важные физиологические процессы, среди которых соотношение оксидантной и антиоксидантной защитных систем, нарушение стабильности которого особенно опасно, если учесть, что ПОЛ является одной из важных причин старения и развития болезни. Тот факт, что в отличие от молодых, у старых животных после 9 сеансов РЭХВ содержание нитритов повышено, по нашему предположению, может свидетельствовать об активации конститутивной NO-синтазы. Учитывая то обстоятельство, что нитриты и нитраты участвуют во многих патофизиологических процессах, повышенное содержание этих продуктов в сыворотке крови старых крыс после РЭХВ является физиологически оправданным и целесообразным и направленным на улучшение трофики и функции сосудов и сердечной мышцы. Это подтверждается и тем обстоятельством, что расшифровка механизмов сосудорасширяющего действия NO позволила создать эффективное лекарственное средство нитроглицерин, широко применяемое в медицине для снятия боли и спазма коронарных сосудов.

NO оказывает влияние на взаимодействие клеток крови с эндотелием сосудов, препятствуя прикреплению кровяных пластинок, лейкоцитов и других клеток крови к эндотелию, тем самым препятствуя агрегации последних и образованию тромбов. Такое действие NO может иметь большое значение на ранних этапах генеза и развития атеросклеротических повреждений сосудис-

той стенки, а также выступать в роли антиростового фактора, препятствующего пролиферации гладкомышечных клеток стенки сосудов.

Следовательно, повышение содержания нитритов под влиянием РЭХВ может быть благоприятным фактором, направленным на повышение резистентности пожилого организма, способствовать повышению активности внутриклеточных систем, мобилизации системы и защиты клеток и тканей в условиях гипоксии и чрезмерной патофункциональной нагрузки.

Статистически достоверное снижение уровня конечных продуктов обмена NO в миокарде молодых крыс после шестого РЭХВ может свидетельствовать об интенсивном расходовании оксида азота клетками миокарда. Подобный эффект у старых животных наступает лишь после девятого холодого воздействия. Такое «запаздывание» можно объяснить снижением адаптивных возможностей стареющего организма. Синтезируемый из L-аргинина при участии NO-синтаз оксид азота проникает в клетки миокарда, где, при участии ГМФ, снижает концентрацию внутриклеточного кальция, вызывая вазодилатацию и расслабление гладкомышечных клеток и тканей, обеспечивая регуляцию и перераспределение крови в сосудах [312, 313].

РЭХВ повышают тонус парасимпатического отдела ВНС и снижают активность гуморального звена регуляции. Кроме того, увеличивается общая спектральная мощность парасимпатического и симпатического отделов регуляции ВНС у старых животных, что свидетельствует о переходе с медленного гуморального метаболического уровня на быстрый вегетативный уровень регуляции, который не свойственен пожилому организму. Применяемые ритмические холодовые воздействия вызывают мягкий «стресс» и за счет активации высших вегетативных центров улучшают адаптационные возможности старых животных, а отмеченные эффекты нейрогуморальной регуляции отличаются целесообразностью, поскольку реализуются через более развитый и быстрый путь – автономную нервную систему. Можно предположить, что роль NO как вторичного мессенджера в этих процессах особенно важна и может играть одну из ведущих ролей в

процессах развития старости. РЭХВ способствуют повышению активности окиси азота в клетках, тем самым способствуют улучшению трофики, межклеточной коммуникации, сбалансированности функции окислительно-антиоксидантной систем.

По результатам данного исследования опубликованы следующие работы:

1. Бабийчук В.Г. Возрастные особенности роли оксида азота в механизмах адаптации животных к ритмическим холодовым воздействиям. Сообщение 1. Содержание конечных продуктов обмена NO в сыворотке крови и миокарде молодых и старых животных после ритмических холодовых воздействий / В.Г.Бабийчук // Проблемы криобиологии. – 2006. – Т. 16, № 4. – С. 377-389.
2. Бабийчук В.Г. Возрастные особенности роли оксида азота в механизмах адаптации животных к ритмическим холодовым воздействиям. Сообщение 2. Содержание конечных продуктов обмена NO в коре и гипоталамусе головного мозга молодых и старых животных после ритмических холодовых воздействий / В.Г.Бабийчук // Проблемы криобиологии. – 2007. – Т. 17, № 1. – С. 25-37.

ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Достижения науки в области фундаментальных и прикладных исследований по воздействию холода на организм человека в значительной степени предопределили интерес врачей к возможному использованию низких температур в практической медицине. Благодаря появлению адекватной медицинской техники, появилась возможность для терапевтического применения экстремальной криотерапии, которую считают одной из наиболее мощных физиотерапевтических процедур и используют в сочетании с традиционными методами при лечении патологий различного генеза. Однако данный физиотерапевтический метод лечения остаётся нетрадиционным и малоизученным. В основе АКТ лежит использование температур ниже $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Метод значительно отличается от традиционного лечения холодом. На воздействие холода при АКТ организм реагирует не только системой терморегуляции, но и механизмами адаптации, при этом активируются гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая, иммунная, эндокринная и другие системы. Непродолжительное действие экстремально низких температур не истощает энергетические и функциональные резервы организма. Немногочисленные литературные данные указывают, что кратковременное холодовое воздействие замедляет процессы перекисного окисления и фосфорилирования в покровных тканях, трансмембранный перенос клеточных метаболитов, снижает потребность клеток в кислороде и питательных веществах и имеет обратимый характер. Явления, развивающиеся в глубоко расположенных тканях и органах («ядро») тела, имеют вторичное рефлекторное и нейрогуморальное происхождение и до настоящего времени практически не изучены [351-360].

Особый интерес представляет изучение физиологических механизмов краткосрочного действия экстремально низких температур на деятельность вегетативных центров и систем нейроэндокринной регуляции, которые непосредственно отвечают за температурный гомеостаз, так как реакция этого сложного «ансамбля» высших нейроэндокринных регуляторных механизмов

на экстремальное охлаждение не изучена. Важную роль в реакции организма на охлаждение играет проницаемость ГЭБ. Нейротрансмиттерные концепции центральной терморегуляции детально объясняют сложные нейрофизиологические процессы, однако ни в одной из них не учтено функциональное и ультраструктурное состояние ГЭБ гипоталамуса на действие сверхнизких температур. Существующие схемы нейромедиаторной организации температурного гомеостаза не объясняют некоторые специфические эффекты экстремальных температурных влияний. Функционирование ГЭБ стимулируется охлаждением и не ограничивается только влиянием на состояние терморегуляции. Очевидно, ГЭБ влияет на многие адаптационные процессы, зависящие от факторов стресса и возраста.

С возрастом нарастают изменения в нейрогуморальной регуляции гемодинамики, ослабевает адрен- и холинэргический контроль над деятельностью сердца.

При старении снижается поступление из крови в клетки биологически активных веществ и кислорода, лимитируется возможность выведения продуктов расщепления. Возникающая ацидотическая альтерация клеток, особенно нервных, воздействует на их геном и приводит к вторичным изменениям и атрофии. В результате утрачиваются не только клетки, но и волокна мышечной системы, что сочетается с изменениями ВНС. Старение организма связано с нарушением механизмов саморегуляции, процессов переработки, а также передачи информации на разных уровнях жизнедеятельности. Снижаются резистентность организма, активность симпатического и парасимпатического отделов ВНС, регулирующих основные функции жизнедеятельности, в том числе и систему кровообращения. Возрастные изменения структуры и функции вегетативных центров приводят к ухудшению механизмов адаптации, снижается сопротивляемость факторам, которые могут быть причиной развития различных болезней, на фоне снижения функции иммунной системы.

Знание механизмов возникновения нарушений деятельности функциональных систем в пожилом организме научно обосновывает целесообразность проведения глубоких фундаментальных исследований по изучению и предотвращению изменений, развивающихся при старении.

Особый интерес в методиках неинвазивной терапии связан с применением слабых, но ритмически повторяющихся сенсомоторных воздействий колебательно волновой природы. Подобранный ритм резонансных влияний на процесс жизнедеятельности может способствовать регуляции активности систем гомеостаза.

Установлено, что сверхмедленные физиологические процессы головного мозга объединяют сложноорганизованную динамику биопотенциалов в частотном диапазоне от 0 до 0,05 Гц, отражающих состояние организма, чувствительность к изменениям функционального состояния головного мозга при эмоционально-психических нагрузках или сенсорных раздражениях, обусловленных разными патологическими изменениями. Показателями функционального состояния головного мозга могут быть ритмические колебания потенциалов секундного, декасекундного и минутного диапазонов (соответственно дзета-, тау- и эпсилон-волны). Для динамики сверхмедленных процессов, соотносимых с адаптивными резервными возможностями организма, характерны низковольтные декасекундные и минутные волны, доминирующие по локализации в теменно-затылочной области, которые, в свою очередь, могут быть следствием нейрогуморальных регуляторных процессов, определяющих вегетативные функции. Под влиянием сенсорных воздействий, при эмоционально-психических нагрузках наблюдается усиление минутных колебаний потенциалов головного мозга с периодом от 1 до 10-15 мин. Температурные воздействия на рецепторные зоны головы сопровождаются возникновением медленных волн [186].

В связи с этим нами было высказано и подтверждено исследованиями положение о возможности применения ритмических холодовых воздействий

как модулятора активности собственных эндогенных ритмов для коррекции нарушенных физиологических функций.

Применение ритмических гипотермических режимов охлаждения повышает лабильность регуляторных процессов в ЦНС и ССС, стимулирует их прямые и обратные связи, нормализует симпатические и парасимпатические взаимоотношения ВНС с последующей оптимизацией механизмов гомеостаза [15, 142, 143].

Разработка нового метода экстремального охлаждения организма направлена на активацию регуляторных систем гомеостаза. Положительное действие ритмических холодовых процедур связано с повышением лабильности регуляторных процессов в ЦНС и ССС, «раскачкой» симпатопарасимпатических переключений, оптимизацией центрального и периферического действия А, НА, АХ, вторичных (цАМФ, цГМФ) и ретроградных мессенджеров (NO), восстановлением фрактальных свойств биоритмов мозга. В исследованиях мы обращали особое внимание на ультраструктурные перестройки основных элементов, составляющих морфологическую основу ГЭБ.

Изучая влияние РЭХВ на структурно-функциональные особенности гипоталамуса у молодых животных, мы установили факт усиления процессов клеточного пиноцитоза и трансцитоза, активации митохондрий. Неспецифический пиноцитоз протекает параллельно с рецептор-индуцированным трансцитозом, о чем свидетельствует увеличение количества «опушенных» везикул. Критериями старения тканей мозга служит динамика численности клеток, соотношение деструктивных и адаптационных изменений, степень уменьшения количества и нарушения структуры синапсов, особенности нейрон-глия-сосудистых изменений. В наших исследованиях показано, что при усилении процессов пиноцитоза повышается реактивность сосудистого эндотелия, которая регулируется гуморальными и нейротрансмиссивными механизмами. Уже после 3-х сеансов РЭХВ у части нейронов синаптический аппарат находился в состоянии повышенного функционального напряжения, в

постсинаптических областях наблюдалось образование субповерхностных цистерн, характерных для явления долговременной потенциации, которая поддерживается ретроградными мессенджерами (NO).

У старых животных мы обнаружили уменьшение числа нейронов, повышение глиального индекса. Изменения были более выражены в заднем отделе гипоталамуса. Наблюдалась тенденция к уменьшению количества эндотелиоцитов. Изменялись объем, форма и структура нейронов. Отмечалось уменьшение числа ядер нейронов, как правило, увеличивалось количество рибосом, что свидетельствовало об усиленном синтезе белка в клетках. Эти изменения можно рассматривать как реакции, направленные на поддержание определенного уровня метаболизма и компенсацию возрастных изменений.

Признаком стареющего мозга считается появление внутриядерных включений, которые являются морфологически и функционально неоднородными, и свидетельствуют о деструктивных процессах. Митохондрии характеризуются резким набуханием и разрушением крист, образованием больших вакуолей, уплотнением матрикса. В клетках переднего и заднего отделов гипоталамуса наблюдаются включения липофусцина, что свойственно для конечной стадии созревания пигмента со сложной гетерогенной структурой. Считается, что в старости накопление липофусцина является проявлением и результатом деструктивных и дистрофических процессов, связанных с нарушением внутриклеточного метаболизма. Увеличение количества крупных его скоплений может свидетельствовать о развитии необратимых процессов в клетке.

У старых животных мы наблюдали снижение числа синапсов, а также общей протяженности зон синаптических контактов, уменьшение количества синаптических везикул. Тем не менее, синаптическая организация переднего и заднего отделов гипоталамуса существенно не отличается от молодых животных.

После 3 сеансов РЭХВ выявляются реактивные изменения нейронов, активируется комплекс Гольджи, повышается насыщенность матрикса и мно-

гих органелл, что приводит к образованию пузырьков и гранул, появляются многочисленные митохондрии и рибосомы. Синаптический аппарат находится в состоянии повышенного функционального напряжения: везикулы сливаются между собой и с синаптической мембраной. Увеличивается протяженность и электронная плотность зон синаптических контактов. Обнаруженные изменения более выражены в переднем отделе гипоталамуса, где располагаются нервные клетки, активирующиеся при температурных воздействиях. После 3 сеансов РЭХВ несколько уменьшается толщина базальной мембраны эндотелиоцитов, однако после 6 и 9 сеансов РЭХВ она увеличивается и превышает контрольное значение. Толщина базальной мембраны в переднем отделе гипоталамуса на 30% превышала толщину базальной мембраны капилляров заднего отдела гипоталамуса. Такие вариации площади базальной мембраны, по нашему мнению, могут свидетельствовать о степени изменения проницаемости ГЭБ.

При РЭХВ изменялась площадь эндотелиальных клеток по отношению к контролю, причем в заднем отделе гипоталамуса более значительно, чем в переднем, и после 9 сеанса РЭХВ этот показатель возвращался к норме. Необходимо отметить, что при РЭХВ относительная длина люминальной мембраны капилляров значительно возрастает, увеличивается количество микровилей на люминальной поверхности капилляров.

После РЭХВ характерно появление в капиллярном эндотелии гипоталамуса большого количества эндоцитозных везикул различных размеров, количество которых возрастает в 2-3 раза по сравнению с контролем. Изменения поверхности эндотелиоцитов вместе с увеличением количества и относительной площади эндоцитозных везикул свидетельствуют о развитии процессов пиноцитоза в эндотелиоцитах капилляров гипоталамуса. Мы наблюдали все этапы формирования пиноцитозных везикул: инвагинация люминальной мембраны, образование открытой, а затем замкнутой везикулы, прикрепленной к люминальной мембране, появление свободных пиноцитозных

пузырьков, слияние их между собой, формирование каналов и слившихся везикул.

Для оценки изменения проницаемости ГЭБ при РЭХВ мы внутрибрюшинно вводили пероксидазу хрена, являющуюся маркером пиноцитоза. Она обнаруживалась в виде электронно-плотных включений в составе везикул и цитоплазматических каналах, образованных слиянием таких везикул. Кроме того, электронно-плотный осадок, образованный пероксидазой хрена, выявлялся за базальной мембраной. В 30% исследованных просветов капилляров наблюдали расхождение контактов между эндотелиальными клетками.

Таким образом, при РЭХВ возникают структурные перестройки во всех звеньях ГЭБ гипоталамуса, приводящие к увеличению его проницаемости. Отмеченные изменения физиологически значимы для процессов центральной терморегуляции, возможно, они стимулируют адаптационные механизмы, а пероксидаза хрена визуализирует процесс трансэндотелиального переноса биологически активных веществ. По нашему мнению, при РЭХВ активируются и специфические нейротрансмиттерные механизмы, изменяющие проницаемость ГЭБ, что приводит к активации гипоталамических центров терморегуляции. Мы считаем, что при РЭХВ активируются норадренергические синапсы, так как адренергических синапсов в гипоталамусе очень мало, а уровень секреции серотонина при охлаждении не изменяется.

Следовательно, можно предположить, что повышение проницаемости ГЭБ для НА обусловлено процессом высокоспецифического рецептор-индуцированного транцитоза.

«Одетые» или «опушенные» везикулы обнаруживаются в цитоплазме эндотелиоцитов после 3 и 6 сеансов РЭХВ и встречаются в 70% исследованных просветов капилляров, причем в переднем отделе гипоталамуса их в 2,5 раза больше, чем в заднем. Размер «одетых» везикул варьируется в одной и той же клетке. По мере проникновения в цитоплазму везикулы сливаются друг с другом.

РЭХВ является мощным средством стимуляции функциональной активности ГЭБ. На разных этапах РЭХВ происходят быстрые адаптационные преобразования как на субклеточном уровне в эндотелии капилляров (везикуляция, трансцитоз), так и во взаимоотношениях нейрон-глия-капилляр (активация базального слоя, разветвление и увеличение поверхности мембран капилляров).

Повышение структурно-функциональной активности ГЭБ сопровождается долгосрочной активацией синаптического аппарата нейронов гипоталамуса, оптимизацией содержания ретроградных мессенджеров.

Приведенные данные показывают, насколько обнаруженные изменения обусловлены особенностями функционирования структур мозга и центров интегрирования вегетативных функций в условиях старения и действия РЭХВ, ролью проницаемости ГЭБ у животных с пониженной резистентностью, связанной с возрастом.

Можно постулировать, что поступление биологически активных веществ в ЦНС из крови или выход в кровь продуктов специфического синтеза нейронов при РЭХВ могут существенным образом изменить состояние определенных структур мозга, тем самым активно изменяя саморегуляцию физиологических функций. При данных условиях на этот процесс может влиять специфическая морфология эндотелиального слоя базальной мембраны, перicyтов и окружающей сосуда мозга глии, определяющих свойства ГЭБ, а РЭХВ создают необходимые условия для избирательного прохождения веществ из крови в мозг и обратно. Эти функциональные особенности ГЭБ, по нашему мнению, являются важнейшими звеньями адаптации организма, которые обеспечивают более быструю доставку в мозг энергетически богатых соединений, способствуют поступлению из паренхимы мозга в органы и ткани вазоактивных веществ и медиаторов, что чрезвычайно важно для коррекции гомеостаза при патологии у пожилых людей.

Мы считаем, что наблюдаемое в экспериментах усиление процессов пиноцитоза после действия РЭХВ является основным путем проникновения

веществ в паренхиму мозга, который обусловлен функциональной активностью клеток эндотелия, приспособляющих кровоснабжение определенного локуса мозга к его метаболическим потребностям посредством активации функции митохондрий.

По нашему мнению, прохождение макромолекул в паренхиму мозга может осуществляться через каналы, соединяющие люминальную поверхность эндотелия с субэндотелиальной базальной мембраной, что имеет временный характер, так как физиологические свойства ГЭБ восстанавливаются быстро.

Установленные морфофункциональные особенности ГЭБ гипоталамуса в условиях действия экстремального холода у крыс разных возрастных групп должны проявляться и в механизмах нейрогуморальной регуляции вегетативных функций, где гипоталамус осуществляет связь с корой больших полушарий, и таким образом вегетосоматическую и вегетомотивационную интеграцию, а также контролирует безусловно- и условно-рефлекторную регуляцию жизненно важных функций.

Электронно-микроскопические исследования кардиомиоцитов и эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда интактных старых крыс показало наличие дистрофических и деструктивных нарушений органелл, часть митохондрий была сильно набухшей с просветленным матриксом и расширением межкristных пространств. Встречались митохондрии в различных стадиях дегенерации, сопровождающейся лизисом крист и формированием миелиноподобных структур, наблюдалась высокая активность катаболических процессов, структурно проявляющихся включением в саркоплазму липидов и липофусцина. Выявленные особенности могут свидетельствовать о нарушениях сократительной способности кардиомиоцитов.

После РЭХВ у старых животных электронно-микроскопическое исследование кардиомиоцитов выявило перестройки компенсаторного типа, увеличение количества митохондрий и крист, уменьшение количества очагов деструкций и дегенеративно-измененных митохондрий, активацию процессов их размножения, что проявляется формированием органелл с перетя-

жками в виде «гантелей», являющихся свидетельством процесса деления. В саркоплазме появляются рибосомы, полисомы и гранулы гликогена, что указывает на повышение метаболической активности кардиомиоцитов.

В эндотелии кровеносных капилляров активируются компенсаторно-регенеративные процессы, что подтверждается увеличением количества мембран и эндоплазматической сети и рибосом. Возрастает активность трансцеллюлярного обмена веществ, о чем свидетельствует увеличение количества микропиноцитозных пузырьков в цитоплазме эндотелиоцитов.

Все это подтверждает, что РЭХВ – метод, повышающий сократительную способность миокарда, за счет нормализации внутриклеточной биоэнергетики, тесно связанной с состоянием митохондрий.

Структурно-функциональная организация ВНС определяет процесс интегрирования ряда функций организма, обеспечивая приспособительные реакции, направленные на повышение его жизнеспособности. С возрастом происходят количественные и качественные изменения центров, обеспечивающих гомеостаз. Возникают изменения в нейрогуморальной регуляции функции сердца.

По нашим наблюдениям, уже после 3-го сеанса РЭХВ у молодых крыс незначительно возрастает общая мощность спектра нейрогуморальной регуляции, уменьшается удельный вес волн очень медленного периода (VLF), увеличивается удельный вес низкочастотных (LF) и в меньшей степени высокочастотных (HF) волн. Следовательно, после сеанса РЭХВ вегетативное обеспечение сердечной деятельности характеризуется активацией симпатического отдела ВНС в ответ на действие «мягкого» холодового стресса.

После 6-го сеанса РЭХВ значительного изменения удельного веса волн очень медленного и высокого периодов (VLF и HF волны) не установлено, достоверно не отличалась и общая мощность спектра (TP), в то время как активность симпатико-адреналовой системы снизилась, что может свидетельствовать об эмоциональной адаптации животных к действию сверхнизких температур.

После 9-ти сеансов РЭХВ увеличивается значение общей спектральной мощности, повышается активность симпатического и парасимпатического отделов ВНС, что проявляется в увеличении низко- и высокочастотных волн, однако преобладает симпатико-адреналовая система.

Увеличение удельного веса волн очень низкой частоты может быть следствием влияния на миокард эндокринных и гуморальных факторов, а также их связью с ритмами терморегуляции.

Через неделю и месяц после холодовых воздействий отмечено снижение спектральной мощности, однако ее значение оставалось выше исходного.

Повышение спектральной мощности является результатом активации деятельности, как вегетативных центров, так и гуморального звена регуляции, что свидетельствует о наличии у молодых крыс развитой сбалансированной вегетативной регуляции.

После 3-ей процедуры РЭХВ у старых животных отмечался значительный подъем общей спектральной мощности за счет активации гуморального звена регуляции (VLF), в то время как активность симпатического и парасимпатического отделов ВНС практически не изменялась. Это свидетельствует о том, что в пожилом возрасте процесс управления сердечным ритмом заменяется менее специфическим гуморальным регулированием, то есть происходит переход с быстрого вегетативного или рефлекторного уровня регуляции на более медленный – гуморально-метаболический. Четко прослеживался сдвиг в сторону преобладания симпатико-адреналовой системы. После 6-го сеанса РЭХВ активность симпатического и парасимпатического отделов ВНС оставалась неизменной, также как и их баланс. Отмечался еще более значительный подъем общей спектральной мощности за счет гуморального звена регуляции (VLF).

После 9 сеансов РЭХВ отмечен рост спектральной мощности за счет активации не только гуморального звена регуляции, но и симпатического и парасимпатического звеньев ВНС. В отдаленные сроки наблюдения по сравнению с 3, 6 и 9-м воздействиями четко отслеживается тенденция к повышению

тонуса парасимпатического отдела ВНС и снижение активности гуморального звена регуляции. Увеличение общей спектральной мощности у старых животных за счет активации ВНС свидетельствует о переходе процесса регуляции сердечным ритмом с медленного гуморально-метаболического на быстрый вегетативный уровень, не присущий пожилому организму. Это может быть связано с тем, что организм реагирует на РЭХВ не только системой терморегуляции, но и всеми возможными адаптационными механизмами, тем самым активируя физиологические резервы организма.

В живых системах постоянно протекают процессы ПОЛ, а повышенное количество активных форм кислорода ведет к патофизиологическим механизмам деструкции клеточных мембран и гибели клеток. Обоснована концепция участия продуктов активации ПОЛ в механизмах развития стресса, в то же время клетки организма располагают эффективными защитными механизмами, противодействующими активации ПОЛ, в частности это антиоксидантная система. Подавление интенсивности ПОЛ следует квалифицировать как состояние повышенной резистентности организма к действию экстремальных факторов. В стареющем организме ПОЛ играет одну из ведущих ролей в нарушении гомеостаза, в подавлении его активности особенно важны центры регуляции вегетативной и эндокринной систем. Установлено, что малоновый диальдегид в реакции с тиабарбитуровой кислотой дает возможность изучать вторичные продукты ПОЛ, характеризующие изменения прооксидантного статуса.

Выявлено, что уровень ТБК-активных продуктов в сыворотке крови контрольных молодых животных был значительно ниже, чем у контрольных старых. После РЭХВ уровень ТБК-активных продуктов у молодых животных достоверно повышался по сравнению с контролем, в то время как у старых животных мы наблюдали существенное снижение ТБК-активных продуктов, практически достигающее уровня молодых. После 9-го РЭХВ отмечалась тенденция к снижению ТБК-активных продуктов у молодых и старых животных, причем их величины были на одном уровне. Через 3 недели после РЭХВ

количество ТБК-активных продуктов увеличивалось как у молодых, так и у старых животных, хотя было ниже, чем в контроле.

Важен тот факт, что у молодых животных полученные результаты обусловлены преобладанием прооксидантного эффекта в ответ на РЭХВ, однако, в дальнейшем, включается система антиоксидантной защиты как результат развивающейся неспецифической реакции.

У старых животных кратковременный холодовой стресс способствовал более раннему и значительному возникновению антиоксидантного эффекта, в результате чего ТБК-активные продукты у старых животных определялись на уровне показателей молодых крыс.

Мы считаем, что при РЭХВ («мягком» стрессе) пожилой организм выбирает наиболее целесообразную функцию прооксидантно-антиоксидантной системы и приближает ее к функциональному уровню молодого.

Установлено, что содержание ТБК-активных продуктов в тканях миокарда молодых было выше, чем у старых животных. В динамике РЭХВ наблюдается увеличение количества исследуемых продуктов в миокарде и только через три недели после холодовых процедур эти значения практически возвращались к исходным.

Важнейшим механизмом повреждения сердца в пожилом организме является активация процессов ПОЛ в мембранах кардиомиоцитов. В динамике развития ишемии миокарда, которая чаще встречается у пожилых людей, существенно ограничивается доступ кислорода к сердечной мышце и спонтанно протекающий процесс ПОЛ ингибируется, а количество его активных продуктов в крови и тканях уменьшается. Мы считаем, что в данном случае имеет место особенность и роль миокарда в поддержании основной функции сердца – насосной, определяющей жизнедеятельность организма в целом.

Можно предположить, что РЭХВ повышают функциональные возможности сердца у молодых и старых крыс, улучшают его гемодинамику, а повышение активности ПОЛ следует рассматривать как возможность сохра-

нения механизмов миокарда в мобилизации систем для стабилизации и обеспечения функции ССС.

Подтверждением этому является установленный нами факт благоприятного влияния РЭХВ на вегетативную нервную систему, ее способность выравнивать баланс симпатического и парасимпатического звеньев. Характерна тождественность в содержании ТБК-активных продуктов у молодых и старых животных через 3 недели после криопроцедур, что может быть связано с мобилизацией механизмов, направленных на улучшение функциональных свойств клеток и миокарда, в целом.

Как известно, регуляция прооксидантно-антиоксидантного баланса осуществляется ферментативной и неферментативной системами.

Каталаза как фермент обладает высокой способностью разлагать пероксид водорода, инактивировать активные формы кислорода в условиях повышенной активности ПОЛ.

У контрольных старых животных каталазная активность в тканях миокарда была выше, чем у контрольных молодых. РЭХВ приводят к достоверному повышению каталазной активности в сердце у молодых животных после 6 и 9 воздействий, которая несколько снижается через 3 недели после охлаждения.

У старых животных каталазная активность достоверно увеличилась после 9-го РЭХВ и через 3 недели после последнего сеанса охлаждения. Функция глутатионпероксидазы, заключающаяся в инактивации H_2O_2 , после 6 сеансов РЭХВ у молодых животных уменьшалась в 1,3 раза, в то время как глутатионредуктазная активность не изменялась. После 9-го воздействия глутатионпероксидазная активность восстанавливалась, а глутатионредуктазная повышалась в 1,4 раза относительно контроля. Через 3 недели у молодых животных наблюдалось повышение активности глутатионпероксидазы. У старых животных глутатионпероксидазная активность также снижалась после 6-й процедуры РЭХВ, увеличиваясь после 9-й и через 3 недели после охлаждения. Существенно возрастала глутатионредуктазная активность в

тканях миокарда у старых животных после 6-го сеанса РЭХВ, снижаясь после 9-го, однако содержание фермента было достоверно выше контроля и через 3 недели после процедур охлаждения.

Полученные результаты позволяют предположить, что важным механизмом действия РЭХВ является повышение ферментативной активности АОС, которая сохраняется продолжительное время после экстремального охлаждения. Очевидно, активация АОС сердца в процессе процедур РЭХВ позволяет увеличить резистентность организма к действию неблагоприятных факторов, в том числе и к процессу старения, как правило, сопровождающемуся возникновением различных заболеваний.

Исследования ПОЛ, кинетики свободнорадикальных процессов позволили нам установить направленность физиологических механизмов умеренно выраженной стресс-реакции живого организма в ответ на экстремальное охлаждение, роль прооксидантно-антиоксидантного равновесия в гомеостазе пожилого организма. Очевидно, функция АОС организма в случае применения РЭХВ ограничивает опасность активации ПОЛ и выступает как фактор сохранения гомеостаза, активации защитных механизмов, препятствующих «атаке» свободных радикалов. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что РЭХВ стимулируют АОС организма, вызывают выраженный антистрессовый эффект за счет подавления выработки первичного медиатора стресса (ПОЛ) и ослабления реакции стресс-реализующих систем.

Уменьшение продукции гормонов или ослабление их эффектов свидетельствуют о нарушении процессов гормонообразования и гормоновыделения, приводящего к изменению эндокринного равновесия, как правило, во всех звеньях эндокринной системы.

Реакции организма на охлаждение протекают при участии гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, которая быстрее других реагирует на холодовой стресс и является основным звеном в восстановлении нарушенного гомеостаза, нормализации структурно-энергетических процессов,

регуляции вегетативных функций. Столь сложная и многогранная роль ГГНС в устойчивости организма к стрессу обеспечивается связью со всеми отделами нервной системы, участием эндокринной деятельности, которая осуществляется при участии гипофиза и адреналовой системы. У людей пожилого возраста существенно снижается гормональная функция многих желез (щитовидной, половых, коры надпочечников), что может быть связано с ослаблением функции гипофиза.

Некоторые гормоны оказывают действие непосредственно на основные функции организма, к числу которых следует отнести тиреоидные гормоны щитовидной железы (T_3 и T_4). От их уровня зависит реактивность деятельности гипоталамуса, следовательно, тонус вегетативных отделов нервной системы.

Обладая широким спектром влияния на физиологические процессы, T_3 и T_4 способны возбуждать симпатический отдел ВНС, усиливать при необходимости белковый, липидный и углеводный обмен, участвовать в регуляции сердечного ритма. Из этого следует, что снижение функции щитовидной железы сопровождается метаболическими нарушениями в организме.

Механизм действия йодированных тиреоидных гормонов заключается в стимуляции тканевого дыхания, что сопровождается повышением интенсивности распада углеводов, жиров и белков с высвобождением большого количества энергии. Из проведенных нами экспериментов следует, что содержание у контрольных молодых животных T_3 и T_4 в сыворотке крови было достоверно выше, чем у старых. Существенное увеличение содержания гормонов T_3 и T_4 у старых крыс отмечено после 6 и 9-го сеансов РЭХВ, а увеличение уровня T_4 после охлаждения было сопоставимо с таковым у молодых. Очевидно, повышение концентрации тиреоидных гормонов в сыворотке крови старых крыс лимитируется необходимостью увеличения их синтеза и потребления для обеспечения органов и тканей адекватным количеством кислорода с целью более интенсивного образования энергии в клетках, как ответной реакции на действие холода. Применение РЭХВ усиливает нейrome-

диаторную и нейрорегуляторную функции гипоталамуса. Возможно, под действием РЭХВ активируются ферменты – дейодиназы, способствующие превращению основного биологически активного вещества щитовидной железы тироксина в трийодтиронин, обладающего максимальной биологической активностью. В свою очередь, повышение уровня гормонов T_3 и T_4 влияет на содержание дейодиназ и их способность метаболизировать T_4 в T_3 и таким образом воздействовать на вегетативные функции и обменные процессы в стареющем организме.

Известно, что тиреоидные гормоны оказывают влияние на функцию надпочечников. Они могут увеличивать секрецию глюкокортикоидов, одновременно усиливая их распад в печени, превращая кортизол в кортизон.

При недостаточности функции гормонов T_3 и T_4 процессы деградации кортикостероидов ослабевают.

В наших экспериментах исходное содержание 11-оксикортикостерона в сыворотке крови молодых и старых крыс существенно не отличалось.

Установлено снижение уровня 11-ОКС в сыворотке крови молодых крыс после 3-го сеанса РЭХВ с возвращением к исходным величинам после 6-го, а также незначительным его понижением после 9-го.

У старых животных имела место динамика нарастания содержания 11-ОКС и только после 9-го холодового воздействия отмечена тенденция к его понижению. Во все сроки экспериментов содержание 11-ОКС в крови старых крыс было выше, чем у молодых. Как известно, 11-ОКС обладает высокой физиологической активностью и постоянно определяется в крови, оттекающей из надпочечников.

Создавая свою теорию, Селье пришел к выводу, что при стрессе выделяется адренокортикотропный гормон, который стимулирует секрецию гормонов коры надпочечников, обеспечивающих резистентность организма к действию неблагоприятных факторов.

Существует определенная зависимость между способностью организма к адаптации и его жизнеспособностью, которая при старении утрачивает свою

пластичность. Как следует из наших экспериментов, кратковременный «мягкий» холодовой стресс существенно не изменяет содержание 11-ОКС у молодых животных. Повышенное его содержание у старых животных обусловлено необходимостью повышения активности механизмов, направленных на повышение устойчивости пожилого организма. Особенно если учесть, что в динамике старения нарушается взаимосвязь в системе гипоталамус–надпочечники, уменьшается реакция надпочечников на тропные гормоны гипофиза. Вероятно, эти изменения могут быть причиной снижения сопротивляемости организма к развитию сопутствующих заболеваний. По нашему предположению, РЭХВ прерывают эту цепочку, а увеличение выброса в кровь 11-ОКС является благоприятным фактором для организма, способствующим улучшению деятельности функциональных систем, ответственных за гомеостаз.

Анализ полученных нами экспериментальных данных свидетельствует о том, что содержание в крови тестостерона молодых крыс как до, так и после процедур РЭХВ существенно не отличалось. У старых контрольных животных количество гормона было ниже, чем у молодых. После 6 и 9-го сеансов холодового воздействия содержание тестостерона в крови старых животных значительно увеличивалось и приближалось к показателю молодых. Содержание эстрадиола в сыворотке крови у контрольных молодых и старых крыс отличалось незначительно, однако после 3 и 9 процедур РЭХВ наблюдалось достоверное его снижение в сыворотке крови молодых крыс, в то время как у старых оно увеличивалось. Повышение уровня тестостерона и эстрадиола в сыворотке крови старых животных является чрезвычайно важным, поскольку они обладают выраженным анаболическим эффектом. Воздействуя на генетический аппарат клетки, гормоны усиливают в ней биосинтез белков, обмен липидов, влияют на азотистый баланс и повышают потребление кислорода в присутствии тиреоидных гормонов. Оказывая действие на сперматогенный эпителий, они существенно повышают репродуктивную функцию. Все функции андрогенов и эстрогенов регулируются гипофизом и подконтрольны ги-

поталамусу, деятельность которого, как показано в наших экспериментах, благодаря РЭХВ направлена на восстановление нарушенных функциональных систем организма старых животных.

Можно считать доказанным, что стресс возникает вследствие сложного взаимодействия нервной и эндокринной систем. В наших экспериментах при кратком воздействии низких температур на кожные покровы возбуждаются центры терморегуляции, расположенные в гипоталамусе, который координирует и регулирует функции центров ВНС. Активизируя центры терморегуляции ГЭБ, гипоталамус посредством релизинг-факторов оказывает влияние на важное звено эндокринной системы – гипофиз. Последний синтезирует ряд гормонов, которые влияют на деятельность других эндокринных желез. В частности, АКТГ воздействует на кору надпочечников, щитовидную железу, половые железы.

При кратковременных РЭХВ «мягкий» стресс функционально обоснован и необходим для стареющего организма, так как позволяет повысить его резистентность к неблагоприятным условиям существования.

Исследуя патофизиологические механизмы у животных, нам удалось установить, что реакции организма на старение находятся в неразрывной связи с их структурой, а скорость и направленность реакций гомеостаза обеспечивают устранение и минимальное действие патологических факторов. Это предположение подтверждается при сравнительном анализе влияния РЭХВ на состояние систем нейрогуморальной регуляции и ультраструктурных изменений миокарда.

Для определения неспецифичности влияния РЭХВ у животных нами для сравнения была выбрана модель алиментарного ожирения, как часто встречающегося у людей состояния, связанного с нарушением жирового и углеводного обменов.

Факторами риска развития различного рода заболеваний внутренних органов у людей как молодого, так и пожилого возраста являются нерациональное питание, алкоголизм, курение.

В основе развития данной нозологии лежит энергетический дисбаланс, заключающийся в несоответствии между количеством калорий, поступающих с пищей, и энергетическими затратами организма. Ожирение является следствием неадекватного взаимодействия многих эндо- и экзогенных факторов, влияние которых реализуется через нервную и эндокринную системы. Гипоталамус является центром энергетического баланса в организме человека, управляющим расходом энергии через ВНС, гипоталамо-гипофизарно-адреналовую и другие системы.

У контрольных животных с моделью алиментарного ожирения отмечается значительное снижение общей мощности спектра нейрогуморальной регуляции по сравнению с контрольной группой животных без ожирения. Нейрогуморальная регуляция таких животных характеризуется низким уровнем как вагальных (парасимпатических), так и симпатических влияний в модуляции сердечного ритма. Следует отметить, что у крыс этой группы отмечается относительное сохранение мощности в диапазоне очень медленных колебаний (т.е. VLF- компонент доминирует над высоко- и низкочастотными колебаниями LF и HF), что может быть связано с влиянием эндокринных факторов на синусовый узел.

Показатели спектрального анализа ВСР у животных с ожирением, получивших 9 сеансов РЭХВ, достоверно не отличались от таковых в группе чистого контроля (без ожирения). Значения общей спектральной мощности увеличиваются, возрастает активность как симпатического, так и парасимпатического отделов ВНС. Увеличение удельного веса волн очень низкой частоты, вероятно, обусловлено их связью с ритмами терморегуляции, подконтрольными гипоталамусу и, в первую очередь, активацией медленной управляющей системы, основным звеном которой является ГЭБ.

Проведенный анализ экспериментальных данных по влиянию РЭХВ на функциональное состояние систем нейрогуморальной регуляции крыс с моделью алиментарного ожирения через неделю и месяц после охлаждения продемонстрировал значительный рост общей спектральной мощности на

фоне контрольных значений. Активность симпатического и парасимпатического отделов ВНС практически соответствуют аналогичному показателю в группе чистого контроля. На основании этого факта можно предположить, что РЭХВ способствуют восстановлению функциональных резервов организма животных с моделью алиментарного ожирения.

Динамическое исследование ВСР у крыс с ожирением позволяют сделать вывод, что непродолжительное действие экстремально низких температур не только не истощает функциональные резервы организма, а значительно их повышает благодаря генерализованному специфическому воздействию на гомеостатические регуляторные системы.

В современных условиях стресс и соответствующие ему реакции организма неизбежны и могут быть причиной развития болезни, особенно у людей пожилого возраста. Установлено, что NO как биологический медиатор уникален по своей природе в механизмах памяти, вазодилатации, деятельности иммунной системы, регуляции тонуса мышц. Действие NO осуществляется благодаря его способности быстро диффундировать через мембрану синтезирующей его клетки в межклеточное пространство и без участия соответствующих рецепторов проникать в клетки мишени, где активирует ферменты. Важной особенностью NO является его способность проникать в миокардиальные клетки, снижать внутриклеточную концентрацию кальция, вызывать вазодилатацию и расслабление гладкомышечных клеток и тканей, регулировать тонус сосудов и сократительную функцию миокарда. NO играет чрезвычайно важную роль в развитии явлений, сопровождающих старение. Нами установлено, что при ритмической гипотермии NO способствует повышению проницаемости ГЭБ для нейротрансмиттеров. Концентрация конечных продуктов NO в сыворотке крови контрольной группы молодых животных была выше, чем в миокарде, что может быть связано с необходимостью поддержания на нужном уровне одной из наиболее важных функций сердца – насосной. У старых контрольных крыс содержание нитритов в миокарде было снижено по сравнению с молодыми, что, возможно, является

следствием нарушения функции сердца, в частности сокращения миокарда, так как известно, что NO усиливает релаксацию желудочков, увеличивает диастолическую растяжимость и является необходимым компонентом в осуществлении адренергического инотропного и хронотропного эффектов. Более низкое содержание конечных продуктов обмена NO в миокарде старых крыс, по сравнению с их содержанием в сыворотке крови, объясняется интенсивным потреблением NO для поддержания внутриклеточного метаболизма в миоцитах.

После 6 сеанса РЭХВ базальный уровень продуктов NO в сыворотке крови у молодых животных был в 2 раза выше, чем у контрольных. В этих условиях после применения специфических блокаторов вместо ожидаемого, как в контроле, угнетения, отмечено увеличение активности фермента cNOS. В то же время в сыворотке крови этих животных, по сравнению с контролем, достоверных различий в содержании конечных продуктов обмена NO после блокады функции iNOS не обнаружено. Предшественник синтеза оксида азота – L-аргинин не влиял на содержание конечных продуктов обмена NO, которое в исследуемом образце было ниже, чем в контроле. После 9 сеансов РЭХВ отмечена динамика снижения нитритов как по отношению к предыдущему этапу исследований, так и по отношению к контролю.

Доказательными являются исследования активности cNOS после применения блокаторов, которая после 9 сеансов РЭХВ снижается по сравнению с предыдущими сеансами и практически не отличается от контроля.

В то же время применение блокаторов iNOS не только не уменьшает содержание нитритов, но существенно его увеличивает в исследуемых образцах. Поэтому можно предположить, что активность фермента повышается в результате формирования защитных эффектов адаптации, активизации функционирования всех систем организма.

Исследуя содержание нитритов в сыворотке крови после 6-го холодового воздействия у старых животных, нами отмечено его повышение по отношению к контролю, как и у молодых животных.

Аналогичная динамика увеличения содержания нитритов у этих животных отмечена и после 9 сеансов РЭХВ. В этот срок нами установлена отрицательная корреляция содержания стабильных метаболитов NO и применения блокаторов синтеза cNOS и iNOS, поэтому можно предположить, что в сыворотке крови старых животных повышается активность как конститутивной, так и индуцибельной изоформ NOS.

Установлено, что после 6 и 9-го сеансов РЭХВ в миокарде у старых животных наблюдалось снижение уровня нитритов по отношению к контролю. Специфические блокаторы приводили к умеренному ингибированию синтеза cNOS и iNOS. После 9-й холодовой процедуры содержание нитритов в миокарде после применения блокаторов повысилось. Основываясь на предположении, что активность NO играет роль регуляторного фактора, которая снижается с возрастом, интересным является факт повышения содержания конечных продуктов NO у молодых и старых крыс.

Известно, что эндотелий сосудов продуцирует выброс в кровь NO, выполняющего функцию биологического медиатора, обладающего, в том числе мощным вазодилаторным эффектом и, препятствуя агрегации кровяных пластинок и лейкоцитов к стенкам сосудов, снижает возможность образования тромбов. В пожилом организме эта функция снижается. Повышение содержания NO у старых крыс может свидетельствовать об активации конститутивной NO-синтазы, что содержит элементы целесообразности, так как направлено на улучшение трофики и функции сосудов и сердечной мышцы.

Таким образом, увеличение содержания нитритов под влиянием РЭХВ направлено на повышение резистентности организма, способствуя улучшению трофики межклеточной коммуникации и сбалансированной функции оксидантно-антиоксидантной системы. Недостаточный синтез NO приводит

к свободнорадикальному повреждению мембран, а избыточный – апоптозу клеток.

Можно предположить, что NO играет роль универсального модулятора разнообразных функций организма, включая поддержание сердечно-сосудистого гомеостаза, иммунного статуса организма, синаптической пластичности нервной ткани, высвобождения нейротрансмиттеров. Оксид азота, по нашему мнению, сильный патогенетический фактор, связанный с такими выраженными расстройствами, как ишемия миокарда и мозга.

Таким образом, нами впервые изучено состояние ряда функциональных систем организма животных разных возрастных групп в ответ на действие РЭХВ.

Экспериментально обосновано преимущество предложенной методики холодовых воздействий по сравнению с традиционными. Показано быстрое восстановление соотношения ВНС и частоты сердечного ритма в зависимости от потребности организма, в результате которого значительно активизируются адаптационные возможности у старых животных.

Повышение активности гипоталамуса увеличивает проницаемость ГЭБ для биологически активных веществ, что сопровождается долговременной активностью синаптического аппарата нейронов.

Доказано, что в кардиомиоцитах старых крыс после РЭХВ наблюдаются перестройки компенсаторного типа, возрастает активность трансцеллюлярного обмена веществ. Важным механизмом действия РЭХВ является активация АОС, что позволяет существенно повысить резистентность организма. Это особенно важно, если учесть, что в концепциях развития старости доминирующая роль отводится активации ПОЛ.

РЭХВ способствуют повышению активности NO, который, проникая в эндотелиальные клетки сосудов, способен вызывать вазодилатацию и таким образом влиять на механизмы проницаемости ГЭБ и центры вегетативной регуляции.

Таким образом, проведенные экспериментальные исследования механизмов влияния РЭХВ на функциональные системы пожилого организма обосновывают целесообразность их применения с целью коррекции дезинтеграции центров регуляции гомеостаза. Применение РЭХВ в условиях криокамеры при температуре воздуха ($-120\text{ }^{\circ}\text{C}$) повышает лабильность регуляторных процессов в центральной нервной и сердечнососудистой системах, нормализует симпатические и парасимпатические взаимоотношения ВНС, стимулирует функцию ГЭБ и эндокринной системы.

Внедрение метода РЭХВ в медицинскую практику может повысить работоспособность и улучшить память, снизить профессиональную депрессию и утомляемость, нарушения сна, головные боли, получить существенный лечебный результат, который позволит создать высокоэффективный, не имеющий аналогов, метод оздоровления населения Украины.

ВЫВОДЫ

Современное состояние экспериментальных исследований, касающихся кратковременных низкотемпературных воздействий в условиях криокамеры ($-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $-160\text{ }^{\circ}\text{C}$) на организм людей и животных, не позволяет обосновать широкомасштабное применение криотерапии в практической медицине. Поэтому в диссертационной работе на основании детального анализа морфо-функциональных, биохимических, электрофизиологических, гистохимических данных определено влияние РЭХВ ($-120\text{ }^{\circ}\text{C}$) на состояние гомеостаза у животных разных возрастных групп. На основе исследования механизмов адаптации функциональных систем организма животных разных возрастных групп к кратковременному действию экстремально низких температур приведено теоретическое обобщение и новое решение медико-биологической проблемы использования РЭХВ для коррекции нарушенных функций организма у старых животных. Внедрение метода в медицинскую практику может быть эффективным для комплексного лечения заболеваний у людей преклонных лет, в частности замедление процессов преждевременного старения, повышение устойчивости организма к действию факторов, которые приводят к нарушению гомеостаза.

1. Экспериментально обоснована возможность применения ритмических экстремальных холодовых воздействий для стимуляции и улучшения функций центральной нервной, сердечно-сосудистой, эндокринной систем с целью восстановления функциональной активности гомеостаза, направленного на повышение резистентности организма к действию неблагоприятных факторов, особенно у старых крыс.

2. Выявлен феномен «задержки» возникновения отрицательного хронотропного эффекта частоты сердечных сокращений на системное введение норадреналина у крыс, которые охлаждались по традиционной методике. Системно введенный НА на фоне РЭХВ вызывал центральный эффект действия

медиатора (замедление ЧСС) значительно быстрее, что может свидетельствовать о более эффективном влиянии РЭХВ на центральные механизмы вегетативной регуляции сердечного ритма.

3. Установлено, что ритмические экстремальные холодовые воздействия являются мощным фактором стимуляции функциональной активности ГЭБ. На разных этапах РЭХВ происходят быстрые адаптационные приспособления как на субклеточном уровне в эндотелии капилляров (повышена активность синаптического аппарата, везикуляция, транцитоз), так и в отношениях нейрон-глия-капилляр. При РЭХВ активируются специфические нейротрансмиттерные механизмы, которые изменяют проницаемость ГЭБ, что повышает активность нейрорегуляторных гипоталамических центров.

4. В группе экспериментальных молодых животных после РЭХВ на электронограммах мышцы сердца выявлены изменения, которые характерны для активности внутриклеточных метаболических процессов. В миокарде старых крыс отмечаются перестройки компенсаторного типа, о чем свидетельствует увеличение количества митохондрий, уменьшение количества очагов деструкции и дегенеративных изменений, наличие в саркоплазме рибосом, полисом и гранул гликогена.

5. Спектральный анализ вариабельности сердечного ритма позволил выявить периодические составляющие в его колебании и оценить их количественный вклад в динамику ритма сердца после сеансов РЭХВ, которые благодаря генерализованному специфическому влиянию на регуляторные системы повышают функциональные резервы организма.

6. Выявлена тенденция к повышению тонуса парасимпатического отдела вегетативной нервной системы и снижения активности гуморального звена регуляции у животных после РЭХВ. Повышение общей спектральной мощности нейрогуморальной регуляции у старых животных за счет активации симпатического и парасимпатического отделов вегетативной нервной системы свидетельствует о переходе процесса управления сердечным ритмом с

медленного гуморально-метаболического уровня регуляции на быстрый вегетативный, который не характерен для старых животных.

7. У животных, которые получали РЭХВ, результаты исследований ультраструктурных изменений в надпочечниках и щитовидной железе, а также содержания гормонов в сыворотке крови свидетельствуют о развитии адаптационно-компенсаторных реакций, которые сопровождаются внутриклеточной репаративной активностью. Повышение активности эндокринной системы структурно подтверждались гиперплазией мембран эндоплазматического ретикулума, увеличением количества рибосом и полисом в цитоплазме, гипертрофией цитоплазматического комплекса Гольджи и ростом количества мелких везикул и микропиноцитозных пузырьков, характерных для ускорения трансцеллюлярного транспорта веществ через стенку капилляров.

8. Определена степень эффективности применения РЭХВ для коррекции нарушенного прооксидантно-антиоксидантного равновесия у старых крыс, дана количественная оценка параметров ПОЛ и эффективности антиоксидантных резервов как у молодых, так и у старых животных. Установлено, что РЭХВ у старых животных изменяют соотношение прооксидантно-антиоксидантного равновесия за счет мобилизации антиоксидантных систем.

9. Активность NO, который является патогенетическим регуляторным фактором, снижается у старых интактных животных и значительно повышается под воздействием РЭХВ. Определено, что ритмические холодовые воздействия (-120°C) повышают содержание нитритов в сыворотке крови молодых и старых животных, что является положительным фактором, поскольку направлено на повышение резистентности организма. Выявленные изменения являются физиологически значимыми, поскольку необходимы для улучшения функции и трофики сосудов и миокарда.

10. Кратковременное ритмическое действие экстремально низких температур на организм животных с моделью алиментарного ожирения приводит к улучшению функции вегетативной нервной системы, значительно повышает

его физиологические резервы, благодаря генерализованному влиянию на регуляторные системы гомеостаза. У животных РЭХВ способны патогенетически влиять на основные звенья развития ожирения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пушкарь Н.С. Введение в криобиологию / Н.С.Пушкарь, А.М.Белоус. - К.: Наукова думка, 1975. – 342 с.
2. Белоус А.М. Криобиология / А.М.Белоус, В.И.Грищенко. - К.: Наукова думка, 1994. – 428 с.
3. Влияние охлаждения на структуру клетки / [Т.Н.Юрченко, А.П.Белоножко, Т.П.Говоруха и др.]; под. ред. Т.Н.Юрченко. - К.: Наукова думка, 1992. – 145 с.
4. Сандомирский Б.П. Низкие температуры при лечении хронических диффузионных заболеваний печени / [Б.П.Сандомирский, Н.С.Сигал, К.В.Дубровский и др.]; отв. ред. С.А. Шалимова. - К.: Наукова думка, 1992. – 132 с.
5. Гольцев А.Н. Обоснование возможности использования эмбриональных нервных клеток при лечении органоспецифических аутоиммунных заболеваний / А.Н.Гольцев, Н.Н.Бабенко // Проблемы криобиологии. - 2003. - № 2. – С. 49-61.
6. Грищенко В.И. Криообновление, его роль в сохранении здоровья и долголетия / В.И.Грищенко, Э.И.Алексеевская. - К.: Наукова думка, 2009. – 286 с.
7. Гордієнко Є.О. Фізика біомембран / Є.О.Гордієнко, В.В.Товстяк. - К.: Наукова думка, 2009. – 268 с.
8. Yamauchi T. Whole-body cryotherapy is method of extreme cold -175 °C treatment initially used for rheumatoid arthritis / T.Yamauchi // Z.Phys. Med.Baln.Med.Klim. - 1986. – V. 15. – P. 311.
9. Fricke R. Ganzkörperkaltetherapie in kaltekammer mit Temperaturen um -110 °C / R.Fricke // Z. Phys. Med.Bain. - 1989. - № 1. - P. 1-10.
10. Суздальский Д.В. Аппаратура и средства для локальной криотерапии / Д.В.Суздальский, Баранов А.Ю. // Вопросы курортологии. - 1999. - № 4. - С. 51-53.

11. Суздальницкий Р.С. Криотерапия и ее сочетание с другими физическими факторами (механизмы действия, аппаратура, показания для применения в спортивной медицине) / Р.С.Суздальницкий, В.Д.Григорьева, И.С.Чернышев [и др.] // Теория и практика физической культуры. - 2000. - № 7. - С. 12-23.
12. Баранов А.Ю. Лечение холодом / А.Ю.Баранов, В.Н.Кидалов. – СПб: Астрель, 2000. – 160 с.
13. К механизмам регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера охлажденного мозга. Сообщение 1. Системное введение бомбезина повышает проницаемость гематоэнцефалического барьера для нейромедиаторов / Г.А.Бабийчук, В.С.Марченко, Ю.Ф.Пастухов [и др.] // Проблемы криобиологии. - 1995. - № 1. – С. 3-9.
14. Бабийчук Г.А. Триггерная функция гематоэнцефалического барьера в нейротрансмиссивных механизмах терморегуляции при гипотермии и гибернации / Г.А.Бабийчук, В.С.Марченко // Проблемы криобиологии. - 1997. - № 1-2. – С. 72-77.
15. К механизмам регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера охлажденного мозга. Сообщение 2. Ритмические холодовые воздействия повышают проницаемость гематоэнцефалического барьера для терморегуляторных нейромедиаторов / Г.А.Бабийчук, В.С.Марченко, А.В.Шило [и др.] // Проблемы криобиологии. - 1995. - № 2. - С. 3-8.
16. К механизмам регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера охлажденного мозга. Сообщение 3. Оксид азота (II) – один из триггеров проницаемости гематоэнцефалического барьера в структуре сверхмедленной управляющей системы организма / Г.А.Бабийчук, В.С.Марченко, А.В.Шило [и др.] // Проблемы криобиологии. - 1995. - № 3. – С. 10-19.
17. Марченко В.С. Влияние ритмического охлаждения на проницаемость гематоэнцефалического барьера для экзогенного норадреналина / В.С.Марченко, Л.В.Полищук, В.Г.Бабийчук // Проблемы криобиологии. - 2000. - № 1. – С. 36-40.

18. Марченко В.С. Кардиорегуляторная функция гематоэнцефалического барьера при резонансной гипотермии / В.С.Марченко, В.Г.Бабийчук // Проблемы криобиологии. - 2001. - № 4. - С. 17-29.
19. Фролькис В.В. Старение мозга / В.В.Фролькис. – Л.: Наука, 1991. - 277 с.
20. Фролькис В.В. Синдромы старения / В.В.Фролькис // Вестник АМН СССР. - 1990. - № 1. – С. 8-13.
21. Коркушко О.В. Сердечно-сосудистая система и возраст / О.В.Коркушко. - М.: Медицина, 1983. – 176 с.
22. Бутенко Г.М Генетические и иммунологические механизмы возрастной патологии / Г.М.Бутенко, В.П.Войтенко. – К.: Здоров'я, 1983. – 142 с.
23. Вальтер А.П. О влиянии холода на живые существа / А.П.Вальтер. - К.: Совр. медицина, 1863. – С. 836-843.
24. Хорват А.Н. Об охлаждении поперечно-полосатых мышц лягушки. Работа, представленная для получения степени д-ра медицины / А.Н.Хорват. – СПб, 1874. – 29 с.
25. Майстрах Е.В. Физиология острого охлаждения организма / Е.В.Майстрах // Физиология терморегуляции / К.П.Иванов, О.П.Минут-Сорохтина, Е.В.Майстрах [и др.] - Л., 1984. – С. 181-222.
26. Осташков К.В. Современные проблемы гипотермии / К.В.Осташков // Физиологический журнал СССР им. И.М.Сеченова. - 1979. – Т.25, № 5. – С. 585-592.
27. Понугаева А.П. Физиологические исследования инстинктов у млекопитающих / А.П.Понугаева. – М.-Л., Изд-во Акад. наук СССР (Ленингр. отд-ние), 1960. - 180 с.
28. Погребнякова И.С. Сезонные изменения интенсивности и температурная зависимость тканевого дыхания у краснощеких сусликов / И.С.Погребнякова, В.В.Хаскин // Циркадные ритмы человека и животных: Сб.ст. – Фрунзе, 1975. – С. 253-256.

29. Bartholomew G.A. Size body temperature thermal conductance, oxygen consumption, and heart rate in Australian varanid lizards / G.A.Bartholomew, V.A.Tucker // *Physiol. Zool.* - 1964. - V. 37. - P. 341-354.
30. Black E.C. Blood levels hemoglobin and lactic acid in some freshwater fishes following exercise / E.C.Black // *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 1955. – V. 12. - P. 917-920.
31. Cabanac M. Thermoregulatory behavior: Essays on temperature regulation / M.Cabanac [Eds. J. Bligh, R.Moor]. - Amsterdam, 1972. – P. 19-36.
32. Cabanac M. Le comportement thermoregulaneur / M.Cabanac // *J. Physiol. Paris.* - 1979. – V. 75. – P. 115-178.
33. Brattstrom B.H. The evolution of reptilian social behavior / B.H.Brattstrom // *Amer. Zool.* - 1974. – V. 14. – P. 35-49.
34. Влияние гипотермии на метаболизм мозга / Э.З.Эмирбеков, С.П.Львова, М.И. Мукайлов [и др.] // *Вопросы биохимии нервной системы: сб. ст./отв. ред. Э.З.Эмирбеков.* – Махачкала, 1973. - Вып. 2. – С. 3-10.
35. Baker R.V. The effect of gradual changes in temperature on the release of hormones from nerve endings isolated from bovine neural lobes / R.V.Baker, D.V.Hope // *J. Neurochem.* - 1976. – V. 2. – P. 197-202.
36. El-Fakchany E. Temperature dependence of muscarinic acetylcholine receptor activation, desensitization, and resensitization / E.El-Fakchany, E.Richelison // *J. Neurochem.* -1980. – V. 34, № 5. - P. 1288-1295.
37. Adolph E.F. Oxygen consumption of hypothermic rats and acclimatization to cold / E.F.Adolph // *Amer. J. Physiol.* - 1950. – V. 161, № 3. – P. 359-373.
38. Bigelow W.G. General hypothermia for experimental intracardiac surgery / W.G.Bigelow, J.C.Collaghan // *Ann. Surg.* - 1950. – V. 132, № 3. – P. 531-539.
39. Deep hypothermia for intracardiac surgery: experimental and clinical use with an oxygenator / A.S.Gordon, J.S.Jones, L.J.Suddington [et al.] // *Amer. J. Surg.* - 1960. – V. 100, № 2. – P. 332-337.

40. A study of oxygen consumption during profound hypothermia induced by perfusion of the entire body / S.Kameya, M.Oz, W.E.Neville [et al.] // Surg. Forum. - 1960. – V. 19, № 4. - P. 692-697.
41. Бернштейн И.А. Гипотермия и мозг / И.А.Бернштейн // Успехи физиологических наук. - 1971. – Т. 2, № 2. – С. 49-67.
42. Singh M. Topical myocardial cooling. An intensive laboratory investigation / M.Singh // Arch. Surg. - 1975. – V. 110. - P. 1368-1374.
43. Laschinger J.C. Myocardial cooling: beneficial effect of topical hypothermia / J.C.Laschinger, F.P.Catinella, J.N.Cunningham // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. - 1983. – V. 84, № 6. – P. 807-814.
44. Floyd R.D. The effect of duration of hypothermic cardioplegia on ventricular function / R.D.Floyd, D.Sabiston, L.Lee Kerry // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. - 1983. – V. 85. – P. 606-611.
45. Nayler W.J. Protection of the myocardium against postischemic reperfusion damage. The combined effect of myocardial and nifedepine / W.J.Nayler // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. - 1982. – V. 34, № 6. – P. 897-905.
46. Chitwood W.R. The effect of hypothermia on myocardial oxygen consumption and transmural coronary blood flow in the potassium-arrested hearts / W.R.Chitwood, J.D.Sink, R.S.Rill // Ann. Surg. - 1979. – V. 190. - P. 106-116.
47. Chitwood W.R. Transmural myocardial flow distribution during myocardia. Effects of coronary inflow restriction / W.R.Chitwood // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. - 1983. – V. 86, № 1. - P. 61-69.
48. Tamura M. Intracellular oxygen concentration in myocardium during hypothermic potassium cardioplegia / M.Tamura // Assac. Thorac.Surg. - 1982. – V. 30, № 6. - P. 1121-1134.
49. Pupello D.F. Local deep hypothermia for combined vascular and coronary heart disease / D.F.Pupello, R.H.Blanc, B.L.Nessone // Ann. Thorac. Surg. - 1976. – V. 21, № 6. – P. 508-513.

50. Grieppe R.B. Profound local hypothermia for myocardial protection during open-heart surgery / R.B.Grieppe, E.B.Stinson, N.E.Shumway // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. - 1973. – V. 66. - P. 731-738.

51. Lamberti J.J. Local cardiac hypothermia for myocardial protection during correction of congenital heart disease / J.J.Lamberti, L.H.Cohn, H.Lake // Ann. Thorac. Surg. - 1975. – V. 20, № 4. – P. 446-453.

52. Effects of profound topical cardiac hypothermia on myocardial blood flow, metabolism compliance and function / R.L.Nelson, D.Y.McConnell, S.V.Goldstein [et al.] // Surg. Forum. - 1975. – V. 26. - P. 261-263.

53. Brody W.R. Long-term morphologic and hemodynamic evaluation of the left ventricle after cardiopulmonary bypass. A comparison of normothermic anoxic arrest, coronary artery perfusion, and profound topical cardiac hypothermia / W.R.Brody, B.A.Reitz, M.L.Andrews // Cardiovasc. Surg. - 1975. -V. 70, № 6. – P. 1073-1087.

54. Zoia P. Study of temperature changes of the blood in various phases of subrenal aortic surgery and of the existing relations between hypothermia and metabolic and hemodynamic changes / P.Zoia, B.Allaria, B.Brunetti [et al.] // Minerva Anesthesiol. - 1983. - V. 49, № 1-2. - P. 27-40.

55. Волколаков Я.В. Экспериментальное обоснование применения методики глубокой гипотермии / Я.В.Волколаков // Экспериментальная хирургия и анестезиология. - 1973. - № 6. – С. 53-57.

56. Goor B. Enhanced protection of myocardial function by systemic deep hypothermia during cardioplegic arrest in multiple coronary bypass grafting / B.Goor, R.Mohr, J.Lavee // J.Thorac. Cardiovasc. Surg. - 1982. – V.84, № 2. – P. 237-242.

57. Swain J.A. Regulation of pH during hypothermia: (letter) / J.A.Swain // J.Thorac. Cardiovasc. Surg. - 1983. – V .85, № 1. – P. 147-149.

58. Петров И.Р. Искусственная гипотермия / И.Р.Петров, Д.В.Гублер. – Л.: Медгиз, 1961. - 228 с.

59. Berne R. Cardiodynamics and coronary circulation in hypothermia / R.Berne // *Ann. N.Y.Acad.Sci.* - 1959. – V.80, № 2. – P. 365-382.
60. Гурвич Н.Л. Фибрилляция и дефибрилляция сердца / Н.Л.Гурвич. – М.: Медгиз, 1957. – 252 с.
61. Singh V. Nature of ventricular fibrillation during hypothermia / V.Singh // *Ind. Med. J.* - 1968. – V. 20, № 4. – P. 393-396.
62. Фельд Б.Н. Нарушения распространения возбуждения по сердцу при экспериментальном инфаркте миокарда и их роль в возникновении экстрасистол и фибрилляции желудочков: автореф. дис. на соиск. ученой степ. канд. мед. наук / Б.Н.Фельд. – М., 1971. – 27 с.
63. Табак В.Я. Изменения фибриллярных осцилляций желудочков сердца при умирании и оживлении организма: автореф. дис. на соиск. ученой степ. канд. мед. наук / В.Я.Табак. – М., 1969. - 26 с.
64. Lloyd E.L. B. Factors affecting the onset of ventricular fibrillation during hypothermia / E.L.Lloyd, B.Mitchell // *Lancet.* - 1974. – T.2, № 7892. – P. 1294-1296.
65. Покровский В.М. Сердце при гипотермии / В.М.Покровский, Ю.Р.Шейх-Заде, В.В.Воверайт. – Л.: Наука, 1984. – 143 с.
66. Belliveau R. Cardiac metabolism during hypothermia / R.Belliveau, B.Covino // *Arch. Int. Pharmacodyn.* - 1969. –V. 180, № 2. – P. 333-340.
67. Mouritzen C. Myocardial temperature gradients and ventricular fibrillation during hypothermia / C.Mouritzen, M.Andersen // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* - 1965. – V.49, № 6. – P. 937-944.
68. Буков В.А. Определение температуры головного мозга при охлаждении головы / В.А.Буков, Б.И.Гобков, В.И.Виноградов // *Вестник хирургии им. И.И.Грекова.* - 1970. – Т. 104, № 5. – С. 113-114.
69. Буков В.А. Методика и термодинамика кранио-церебральной гипотермии при операции на открытом сердце / В.А.Буков, И.Г.Бобков, О.А.Смирнов // *Кардиология.* - 1970. - № 11. – С. 138-142.

70. Бураковский В.И. Сухое сердце в условиях гипотермии в хирургии врожденных и приобретенных пороков / В.И.Бураковский - М.: Медгиз, 1961. - 215 с.
71. Глузман Ф.А. Проблема гипотермии в современной медицине / Ф.А.Глузман // Вопросы гипотермии и патологии: тр. каф. пат. физиологии / под ред. Н.Н.Сиротинина – К.: Госмедиздат УССР, 1959. – С. 17-45.
72. Грищенко В.И. Гипотермия и криохирurgia в акушерстве и гинекологии / В.И.Грищенко. – М: Медицина, 1974. - 279 с.
73. Майстрах Е.В. Гипотермия и анабиоз / Е.В.Майстрах – М.-Л.: Наука, 1964. - 327 с.
74. Майстрах Е.В. Патогенез и клиника замерзания / Е.В.Майстрах, В.Н.Шейнис. – Л.: Наука, 1967. - 32 с.
75. Малыгин А.М. Функциональное состояние миокарда при кранио-церебральной гипотермии: автореф. дис. на соиск. ученой степ. канд. мед. наук / А.М.Малыгин. – Иваново, 1964. - 27 с.
76. Мешалкин Е.И. Наш опыт применения краниоцеребральной гипотермии при операциях на сердце / Е.И.Мешалкин, Г.Д.Мезенцев, Д.И.Азбель // Грудная хирургия. - 1971. - № 5. – С. 12-15.
77. Мурский Л.И. Формирование инфаркта миокарда в условиях кранио-церебральной гипотермии / Л.И.Мурский // Экспериментальный инфаркт миокарда в условиях гипотермии: сб.ст. – Владимир, 1974. – Вып. 3. – С. 204-218.
78. Мурский Л.И. Кранио-церебральная гипотермия (в эксперименте) / Л.И.Мурский. – М.: Медицина, 1975. - 247 с.
79. Неговский В.И. Оживление организма и искусственная гипотермия / В.И.Неговский. – М.: Медицина, 1960. - 302 с.
80. Пионтковский Г.И. Регионарная сократительная способность миокарда при гипотермии и экспериментальном инфаркте: автореф. дис. на соиск. ученой степ. канд. биол. наук / Г.И.Пионтковский. – Махачкала, 1972. - 23 с.

81. Гурин В.Н. Терморегуляция и симпатическая нервная система / В.Н.Гурин. - Минск: Наука и техника, 1989. - 231 с.
82. Сааков Б.А. Электрофизиологические изменения нервной системы при гипотермии / Б.А.Сааков // Материалы XIV конф. физиологов юга РСФСР. 4-9 июня 1962 г. – Краснодар, 1962. – С. 284.
83. Смит О. Биологическое действие замораживания и переохлаждения: [Пер. с англ.] / О.Смит. – М.: Изд-во иностр.лит., 1963. - 503 с.
84. Сумбатов Л.А. Антигипоксическое защитное действие гипотермии / Л.А.Сумбатов, А.М.Лехтман, М.В.Руденко // Советская медицина. - 1981. - № 10. – С. 19-20.
85. Тимофеев Н.Н. Искусственный гипобиоз / Н.Н.Тимофеев. – М.: Медицина, 1983. - 292 с.
86. Чепкий Л.П. Лечебная гипотермия / Л.П.Чепкий, А.И.Трещинский. – К.: Здоров'я, 1969. - 201 с.
87. Swan H. Hypothermia for general and cardiac surgery / H.Swan // J. Clin. N. Amer. - 1956. – V. 36, № 4. – P. 1009-1024.
88. Березовский В.А. Напряжение кислорода в тканях животных и человека / В.А.Березовский. – К.: Здоров'я, 1975. - 279 с.
89. Дарбинян Т.М. Современный наркоз и гипотермия в хирургии врожденных пороков сердца / Т.М.Дарбинян. – М.: Медицина, 1964. – 236 с.
90. Вайнер Э.М. Некоторые стороны кислородного режима при гипотермии мозга / Э.М.Вайнер, В.А.Вишневский // Физиология гипотермии: Сб. ст. – Владимир, 1975. – С. 63-67.
91. Иванов К.П. Биоэнергетика и температурный гомеостаз / К.П.Иванов – Л.: Наука, 1972. - 172 с.
92. Подробинек П.А. Анализ некоторых изменений кислородного баланса при гипотермии / П.А.Подробинек // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 1971. - № 4. – С. 20-24.

93. Тверской А.Л. Температурная коррекция показателей КЩР при гипотермии / А.Л.Тверской // Экспериментальная хирургия и анестезиология. - 1965. - № 5. – С. 56-60.
94. Тверской А.Л. Исследование КЩС крови больных с врожденными пороками сердца, оперированных в условиях гипотермии: автореф. дис. на соиск. ученой степ. канд. мед. наук / А.Л.Тверской. – М., 1966. – 23 с.
95. Шнейдер В.К. Анестезия с гиперкапнической ИВЛ при операциях на открытом сердце в условиях умеренной гипотермии: автореф. дис. на соиск. ученой степ. канд. мед. наук / В.К.Шнейдер. – Красноярск, 1979. - 21 с.
96. Brooks D.K. Acid-base balance in hypothermia / D.K.Brooks // Modern trends in anesthesia. - 1962. -№ 2. – P. 102-122.
97. Holobut W. Irrigation sanguine et consommation d'oxyg ne de divers organes en temp rature normale / W.Holobut, E.Mardzzyewski, W.Starka // J. Physiol. - 1969. –V. 61. - P. 507-517.
98. Lewis D.G. The effect of mild hypothermia and hyperventilation on aced/base balance in major vascular surgery / D.G.Lewis, A.MacKenzie // British J. Anaesthes. - 1972. - V. 44, № 10. - P. 1085-1088.
99. Сумбатов Л.А. Экспериментальная терапия с использованием глубокой гипотермии в токсикологии и иммуноагрессологии / Л.А.Сумбатов, Л.В.Новодержкина // Механизмы повреждения, резистентности, адаптации и компенсации: тез.науч.сообщ. – Ташкент, 1976. – С. 553-555.
100. Гадоев Р.И. Интенсивная терапия при отравлении снотворными препаратами / Р.И.Гадоев // Сб. науч. тр. Ростовского мед. ин-та. - Ростов-на-Дону, 1979. - Т. 97. – С. 107.
101. Milleran J. Hypothermia par intoxication barbiturigue et immersion / J.Milleran // Can. Anasthesiol. - 1980. –V. 28, № 4. - P. 479-481.
102. Мурский Л.И. Фазовая структура сердечного цикла при ишемии миокарда в условиях кранио-церебральной гипотермии / Л.И.Мурский, А.П.Русских // Биологические науки. - 1973. - № 1. - С. 29-33.

103. Щербакова Е.И. Метаболизм миокарда при экспериментальном инфаркте миокарда / Е.И.Щербакова, А.П.Русских // Экспериментальный инфаркт миокарда в условиях гипотермии: сб.ст. – Владимир, 1974. – Вып.3. – С. 153-162.
104. Пономарев Ю.Е. Усвоение сердцем ритмов разной частоты стимуляции при кранио-церебральной гипотермии / Ю.Е.Пономарев // Матер. конф. по возрастной и экспериментальной кардиологии. - Владимир, 1968. – С. 315-319.
105. Salisbury P.F. Integrative study of the circulation in moderate hypothermia / P.F.Salisbury, C.E.Gross, P.A.Rieben // Am. J. Cardiol. - 1963. – V. 12. – P. 184-193.
106. Вишневский В.А. Некоторые стороны кислородного режима организма в условиях КЦГ / В.А.Вишневский // II-я Всесоюзная конференция по теоретическим и прикладным вопросам криобиологии: Тез.докл. –Харьков, 1984. – Т. 2. – С. 136.
107. Ганнушкина И.В. К вопросу об изменении мозгового кровотока и отека мозга при травме (патофизиологическая и электронномикроскопическая корреляция) / И.В.Ганнушкина, В.С.Храпов, Л.И.Сухорукова // Вестник АМН СССР. - 1974. – № 12. - С. 48-53.
108. Суворов В.В. Кровоснабжение головного мозга в условиях кранио-церебральной гипотермии / В.В.Суворов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 1964. - № 2. – С. 41-44.
109. Суворов В.В. Изменение мозгового кровообращения при гипотермии / В.В.Суворов // Физиологический журнал СССР им. И.М.Сеченова. - 1972. – Т. 58, № 9. – С. 1425-1429.
110. Суворов В.В. Влияние глубокого охлаждения головного мозга на режим сердечной деятельности / В.В.Суворов // Материалы IV межвуз.науч.конф. физиологов и морфологов пед.ин-тов. – Ярославль, 1970. – С. 337-339.

111. Суворов В.В. Кровообращение головного мозга при гипотермии: автореф. дис. на соиск. ученой степ. д-ра биол. наук / В.В.Суворов. – Свердловск, 1973. – 34 с.
112. Abendahein D.R. Protection of ischemic myocardium by whole-body hypothermia after coronary artery occlusion in dogs / D.R.Abendahein // Amer. Heart. J. - 1978. – V. 98, № 6. – P. 772-780.
113. Metabolic and functional affects of progressive degrees of hypothermia during global ischemia / J.T.Plaherty, H.V.Schaff, R.A.Coldman [et al.] // Am. J. Physiol. - 1979. –V. 236. – P. H839-H845.
114. Schaff H.V. Effect of potassium cardioplegia on myocardial ischemia and post-arrest ventricular function / H.V.Schaff, R.Dombroff, J.T.Flatherty // Circulation. - 1978. -V. 58. – P. 240-249.
115. Hearse D.J. The additive effects of potassium ions and hypothermia for the induction of elective cardiac arrest / D.J.Hearse, D.Stewart // Biochem.Boc. France. - 1975. – V. 3. – P. 417-420.
116. Goldberg L.I. Effects of hypothermia on contractility of the intact dog heart / L.I. Goldberg // Amer. J. Physiol. - 1958. – V. 194, № 1. - P. 92-98.
117. Enler C.F. A preliminary note on slow hypothermic “osmopotencials” / C.F.Enler // Acta Physiol. Scand. - 1953. – V. 29, № 1. – P. 133-136.
118. Гольцев Ю.А. О прогностическом значении Ω -потенциала при экспериментальных воздействиях / Ю.А.Гольцев, В.Г.Дорошев, В.Н.Усиков // Проблемы оценки и прогнозирования функциональных состояний в прикладной физиологии: 2-ой Всесоюзн. симп. 16-17 мая 1984 г.: тез. докл. – Фрунзе: Илим, 1984. – Т. 1. - С. 81-89.
119. Глебова Н.Ф. Влияние периферической терморепции на электрическую активность переднего гипоталамуса / Н.Ф.Глебова, Л.И.Данилова // Физиологический журнал СССР им. И.М.Сеченова. – 1970. - № 10. – С. 1433-1437.

120. Аладжалова Н.А. Психофизиологические аспекты сверхмедленной ритмической активности головного мозга / Н.А.Аладжалова. – М.: Наука. 1979. - 214 с.
121. Баклаваджян О.Г. Центральные механизмы гомеостаза / О.Г.Баклаваджян // Частная физиология нервной системы. –Л.: Наука, 1983. – С. 218-313.
122. Гурин В.И. Центральные механизмы терморегуляции / В.И.Гурин. – Минск: Беларусь, 1980. - 127 с.
123. Бабийчук Г.А. Роль норадренергической системы в сверхмедленных процессах головного мозга при кранио-церебральной гипотермии / Г.А.Бабийчук, В.С.Марченко, М.И. Шифман // Криобиология. -1985. - № 2. – С. 43-47.
124. Лупандин Ю.В. Медиаторные механизмы терморегуляции / Ю.В.Лупандин // Физиология терморегуляции / К.П.Иванов, О.П.Минут-Сорохтина, Е.В.Майстрах [и др.]. – Л., 1984. – С. 348-377.
125. Фельдберг В. Новые перспективы в изучении механизма регуляции температуры тела / В.Фельдберг // Достижения современной фармакологии: сб. посвящен 80-летию со дня рождения С.В.Аничкова / Ред.коллегия Н.П.Бехтерева – Л., 1976. – С. 222-234.
126. Bligh J. Neuronal of hypothermic temperature regulation: hypothalamus in thermoregulation / J.Bligh // Recent studies of hypothalamus functions. - Basel: S.Karger, 1974. - P. 315-327.
127. Myers R.D. An integrative model of monoamine and ionic mechanisms in the hypothalamic control of body temperature / R.D.Myers // Temperature regulation and drug action: Proc. Symp. Paris, 1974. – Basel, 1975. - P. 32-42.
128. Бабийчук Г.А. Нейрохимические процессы в центральной нервной системе при гипотермии / Г.А.Бабийчук, М.И.Шифман. – К.: Наукова думка, 1989. - 152 с.
129. Гипотермия в лечении острых отравлений / Г.А.Бабийчук, В.А.Аркатов, Ю.Н.Арцыбушев [и др.]. – К.: Наукова думка, 1990. – 128 с.

130. Нейрофизиологические процессы охлажденного мозга / Г.А.Бабийчук, В.С.Марченко, И.И.Ломакин [и др.]. – К: Наукова думка, 1992. – 208 с.

131. Ткаченко Т.В. Електрофізіологічні кореляти терапевтичних ефектів краніоцеребральної гіпотермії у осіб із депресивними розладами / Т.В.Ткаченко // Експериментальна і клінічна медицина. - 2006. - № 3. - С. 139-142.

132. Титкова А.М. Гормонально-медиаторные критерии депрессивных расстройств у женщин с незавершенными суицидами и эффективности их коррекции методом краниоцеребральной гипотермии / А.М.Титкова, Т.В.Ткаченко, С.М.Харитонов // Світ медицини та біології. - 2007. - № 2. – С. 59-62.

133. Бачеригов А.М. Динаміка психофізіологічних показників у жінок, які страждають на депресивний розлад з аутоагресивною поведінкою, під впливом краніоцеребральної гіпотермії / А.М.Бачеригов, Т.В.Ткаченко // Проблеми криобиології. - 2008. – Т.18, № 4. – С. 544-546.

134. Ткаченко Т.В. Пароксизмальная электрическая активность мозга как коррелят лечебных эффектов краниоцеребральной гипотермии у больных рекуррентным депрессивным расстройством / Т.В.Ткаченко, Е.В.Веселовская // Вісник психіатрії та психофармакотерапії. - 2006. – Т. 10, № 2. – С. 107-109.

135. Современные представления о системе терморегуляции / А.М.Бачеригов, В.Н.Кузьминов, Т.В.Ткаченко, А.Г.Назарчук // Вісник психіатрії та психофармакотерапії. - 2006. – Т. 10, № 2. – С. 178-183.

136. Бабийчук Г.А. Реакции организма на кранио-церебральную гипотермию / Г.А.Бабийчук // Проблеми криобиології. - 1998. - № 2. - С. 3-8.

137. Бабийчук Г.А. Моноаминергические механизмы пространственной синхронизации биоэлектрической активности охлажденного мозга / Г.А.Бабийчук, И.В.Чижевская, В.С.Марченко // Лечебная гипотермия: Сб.науч.тр. – Харьков, 1992. – С. 22-29.

138. Марченко В.С. К концепции экзистэнцефалической системы охлажденного мозга. Часть 1. / В.С.Марченко // Проблемы криобиологии. - 1997. - № 4. – С. 14-20.

139. Проницаемость гематоэнцефалического барьера для кардиотропных лекарственных веществ при краниocereбральной гипотермии / В.С.Марченко, В.Г.Бабийчук, И.И.Ломакин [и др.] // Проблемы криобиологии. - 1998. - № 2. – С. 42-45.

140. P300-response: possible psychophysiological correlates in delta and theta frequency chanals. A review / С.Basar-Eroglu, E.Basar, T.Demiralp [et al.] // Int.J. Psychophysiol. - 1992. – V. 13, № 2. – P. 161-179.

141. Жгенти Т.Г. О воздействии низкочастотного электромагнитного поля на биологическую метку/ Т.Г.Жгенти, Г.Ш.Кеванишвили // Биофизика. - 1991. – Т. 36, № 3. – С. 483-488.

142. Маркевич Н.И. Математическая модель резонансного усиления внешних проявлений на мембраны / Н.И.Маркевич, Е.Е.Сельков // Биофизика. - 1986. – Т. 31, № 4. – С. 662-666.

143. Дмитриева Н.В. Явление резонанса в кардиореспираторно-гемодинамической системе человека / Н.В.Дмитриева // Известия АН СССР. Серия биологическая. - 1990. - № 4. – С. 579-589.

144. Первушин Ю.В. Резонансные механизмы смены биологических состояний / Ю.В. Первушин // Биофизика. - 1991. –Т. 36, № 3. – С. 534-536.

145. Барабаш Н.А. Адаптация к холоду / Н.А.Барабаш, Г.Я.Двуречанская // Физиология адаптационных процессов / Ф.З.Меерсон, М.П.Пшенникова, Н.А.Барабаш [и др.]. – М.: Наука. - 1986. – С. 283-293.

146. Барабаш Н.А. Периодическое действие холода на устойчивость организма / Н.А.Барабаш // Успехи физиологических наук. - 1996. – Т. 27, № 4. – С. 116-132.

147. Федотчев А.И. Неспецифические механизмы адаптации ЦНС к прерывистым раздражениям, спектральная структура ЭЭГ и оптимальные

параметры ритмических сенсорных воздействий / А.И.Федотчев, А.Т.Бондарь // Успехи физиологических наук. - 1996. – Т. 27, № 4. – С. 44-61.

148. Реушкин В.Н. Механизмы адаптации в биоритмологическом аспекте / В.Н.Реушкин // Вестник АМН СССР. - 1981. - № 12. – С. 50-53.

149. Норадренергические процессы в гипоталамусе крыс после двукратного воздействия кранио-церебральной гипотермии / В.В.Ломако, Г.А.Бабийчук, В.С.Марченко [и др.]. // Проблемы криобиологии. – 1994. - № 4. - С. 11-17.

150. Баранов А.Ю. Лечение холодом. Криомедицина / А.Ю.Баранов, В.Н.Кидалов. – СПб.: Атон, 1999. - 272 с.

151. Beeinflussung hamatologischer und entzündlicher Laborparameter / G.Birwe, M.Taghawinejad, R.Fricke [et al.] // Z.Phys. Med.Balneol.Klimatol. Grafelfing. - 1998. - V. 18. - S. 16.

152. Шиман А.Г. Клинические аспекты применения локальной криотерапии / А.Г.Шиман, С.В.Пирогова // Криотерапия в России: I междунар. науч.-практ. конф. 15 мая 2008 г.: тез. докл. – СПб, 2008. – С. 62-67.

153. Various applications of the extreme cryotherapy and strenuous exercise program focusing on rheumatoid arthritis / T.Yamauchi, S.Nogami, K.Miura [et al.] // Physiotherapy Rehabilitation. - 1981. - V. 35, № 5. – P. 35-39.

154. Die bedeutung der Ganzkörperkaltetherapie im Rahmen der Rehabilitation bei Patinten mit rheumatischen Erkrankungen / D.Metzer, C.Zwiggmann, W.Potz [et al.] // Rehabilitation. – 2000. – V. 39. – P. 93-100.

155. Gregorow H. Whole body cryotherapy – indications and contraindications, the procedure and its clinical and physiological effects / H.Gregorow // Acta Bio-Optica Inform. Med. – 1998. - № 4. – P. 119-131.

156. Analgetische wirkungen von natrichen Scliwefelbadern und Kaltelum-mertxposicion bei Fibramyagie / C.Gutenbrunner, G.Englert, M.Neues-Lahusen [et al.] // Phys.Rehab.Med. – 1999. - № 9. – S. 56-62.

157. Richter C. Wirkung einer Ganzkörper-Kaltetherapie auf Zytokin-Serumspiegel bei chronischen Polyarthrititis / C.Richter, R.Fricke // Med.Balneol.Med.Klimatol. - 1991. – S. 42-49.

158. Stratz Th. Indikation der Ganzkörperkalte therapie in der Rheumatologie / Th.Stratz, P.Mennet, W.Muller // Ther. Scliweiz. - 1994. – V. 10. – S. 528-533.

159. Практические нюансы общей экстремальной аэрокриотерапии / В.И.Коченов, С.Н.Цыбусов, О.П.Гончаров [и др.] // Криотерапия в России: I междунар. науч.-практ. конф. 15 мая 2008 г.: тез. докл. – СПб, 2008. – С. 68-70.

160. Taghawinejad M. Telemetrich-Elektrokardiographische Untersuchungen bei Ganzkörperkaltetherapie (GKKT) / M.Taghawinejad // Z. Phys. Med.Bain.Klim. - 1989. - V. 18. – S. 31-36.

161. Arman M.I. Therapeutische Effekts der Kryotherapie bei der aktivierten Gonarthrose / M.I.Arman // Z. Phys. Med.Bain.Klim. – 1988. - V. 17. - S. 368.

162. Engel P. Lungenfunktion und Ganzkörperkaltetherapie bei Patienten mit chronic Polyarthrititis / P.Engel // Z. Phys. Med.Bain.Klim. - 1989. – V. 18. – S. 37-43.

163. Ganzkörper-Kaltetherapie bei entzündlichen und nichtentzündlichen Erkrankungen / D.Kargus, K.Blum, T.Tauber, J.Teuber // Ortop. Prax - 2000.

164. Birwe G. Ganzkörperkaltetherapie. Beeinflussung der subjektiven Beschwerdelingerung und der Celenkfunction / G.Birwe, R.Fricke, R.Harimann // Z. Phys. Med.Bain.Klim. - 1989. – V. 18. - S. 11-15.

165. Fricke R. Beeinflussung hormoneller Reaktionen durch Ganzkörperkaltetherapie / L.Fricke, R.Fricke, W.Wiegelman // Z. Phys. Med.Bain.Klim. - 1988. – V. 17. - S. 363-364.

166. Баранов А.Ю. Криотерапия в спорте: технологии, комментарии, прогнозы / А.Ю.Баранов // Медицина и спорт. – 2006. - № 5. - С. 38-40.

167. Апрелева А.В. Использование общей криотерапии для интенсификации тренировочного процесса / А.В.Апрелева, А.Ю.Баранов,

Т.А.Малышева // Криотерапия в России: I междунар. науч.-практ. конф. 15 мая 2008 г.: тез.докл. – СПб, 2008. – С. 101-107.

168. Whole body cryotherapy in athletes / G.Banfi, G.Lombardi, A.Colombini, G.Melegati // Sports Medicine. – 2010. - V. 40, № 6. – P. 509-517.

169. Миронов С.П. Клинический опыт применения воздушной криотерапии в лечении больных с дегенеративно-дистрофическими заболеваниями позвоночника / С.П.Миронов, А.С.Самков, И.С.Косов. - М.: ГУН ЦИТО им. Н.Н.Приорова МЗ РФ, 2006. - 36 с.

170. Героева И.Б. Функциональные методы профилактики развития и компенсации статодинамических нарушений при лечении коксартроза: автореф. дис. на соиск.уч.степ.доктора мед. наук / И.Б.Героева. - М., 1995. - 39 с.

171. Портнов В.В. Общая криотерапия / В.В.Портнов, Р.Х.Медалиева // Общая и локальная криотерапия. – М., 2009. – С. 5–24.

172. Андриевский С.Д. Иммунологические аспекты общего криотерапевтического воздействия / С.Д.Андриевский, Л.П.Волкова // Криотерапия в России: I междунар. науч.-практ. конф. 15 мая 2008 г. – СПб, 2008. – С. 57-59.

173. Pohlen B. Verhalten der Lymphozytenpopulation nach Kaltekammer-Therapie / B.Pohlen, R.Fricke // Z.Phys. Med.Balneol.Klimatol. Grafelfing. - 1998. – V. 17. - S. 363.

174. Die bedeutung der Ganzkörperkaltetherapie im Rahmen der Rehabilitation bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen / D.Metzger, C.Zwingmann, W.Potz, W.Jackel // Rehabilitation. - 2000. - V. 19. - S. 93-100.

175. Schuh A. Ausdauertraining bei gleichzeitiger Kalteadaption / A.Schuh // Phys.Rehab.Kur.Med. - 1991. - № 1. - S. 22-28.

176. Fruhstorfer H. Method for quantitative estimation of thermal thresholds in patients / H.Fruhstorfer, U.Lindblom, WC.Schmidt // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. – 1976. – V. 39. – S. 1071-1075.

177. Verdugo R Quantitative somatosensory thermotest A key method for functional evolution of small caliber afferent channels / R.Verdugo, J.L.Ochoa // Brain. – 1992. - V. 115. – P. 893-913.

178. Yamitzky D. Thermal testing. Normative data and rehabilitee for various test algorithms / D.Yamitzky, E.Sprecher // J Neurol Sci. – 1994. – V. 125. – P. 39-45.
179. Yamitzky D. Heat pain thresholds: normative data and rehabilitee / D.Yamitzky, E.Sprecher, R.Zaslansky // Pain. – 1995. – V. 60. - P. 329-332.
180. Hildebrandt G. Temperaturregulation und thermischer Komfort / G.Hildebrandt, P.Engel, M.Attia // Z Phys Med. - 1981. – V. 10. – P. 49-61.
181. Stempel H. On adaptation to cold pain / H.Stempel, H.Stroh. [Eds G.Hildebrand, H.Hensel] // Biological Adaptation. - Stuttgart: Thieme-Verlag, 1982. - P. 296-304.
182. Thermal sensation and comfort in women exposed repeatedly to whole-body cryotherapy and winter swimming in ice-cold water / J.Smolander, M.Mikkelsen, J.Oksa [et al.] // Physiology & Behavior. - 2004. –V. 82, № 4. – P. 691-695.
183. Analgetische Wirkungen von natdrlichen Scliwefelbadern und Kalte-lummerexposition bei Fibramyalgie / C.Gutenbrunner, G.Englert, M.Neues-Lahusen, A.Gehrke // Phys.Rahab.Med. - 1999. - № 9. - S. 56-63.
184. Нагу́та Л.О. Клініко-патогенетичні аспекти екстремальної кріотерапії в лікуванні дисфункційних маткових кровотеч: автореф. дис. на здобуття наук. ступ. канд. мед. наук / Л.О.Нагу́та. – Харків, 2010. – 19 с.
185. Нагу́та Л.О.Клініко-патогенетичні аспекти аерокріотерапії у лікуванні дисфункцій маткових кровотеч / Л.О.Нагу́та, В.І.Грищенко // Проблеми, досягнення и перспективи розвитку медико-біологічних наук и практического здравоохранения: труды Крымского гос. мед. ун-та им. С.И.Георгиевского. – Симферополь, 2008. – Т. 144, Ч. 4. – С. 41-43.
186. Influence of whole body cryotherapy on depressive symptoms / J.Rymaszewska, A.Tulczynsky, Z.Zagrobelny [et al.] //Acta Neuropsychiatria. - 2003. – V. 15, № 3. – P. 122-128.

187. Rymaszewska J. Whole body cryotherapy as a novel adjuvant therapy for depression and anxiety / J.Rymaszewska, D.Ramsey // *Psychiatra psychoterapia*. - 2008. – V. 4, № 2-3. – P. 49-57.

188. Щербаков А.В. Общая экстремальная аэрокриотерапия при синдроме хронической усталости: психоэмоциональный аспект / А.В.Щербаков, Е.С.Пинтус, Т.В.Шахов // *Криотерапия в России: I междунар. науч.-практ. конф.* 15 мая 2008 г. – СПб, 2008. – С. 40-41.

189. Lange U. Serial whole body cryotherapy in the cryostream for inflammatory rheumatic disease. A pilot study / U.Lange, C.Uhlemann, U.Muller-Lander // *Medizinische Klinik*. - 2008. – V. 103, № 6. – P. 383-388.

190. Effects of whole body cryotherapy on serum mediators of inflammation and serum muscle enzymes in athletes / G.Banfi, G.Melegati, A.Barassi [et al.] // *J. Therm. Biol.* - 2009. - V. 34, № 2. – P. 55-59.

191. Баранов А.Ю. Криогенная физиотерапия / А.Ю.Баранов // *Физиотерапия, бальнеология и реабилитация*. - 2005. - № 3. – С. 25-31.

192. Малькевич Л.А. Особенности общей аэрокриотерапии в комплексном лечении больных ревматоидным артритом / Л.А.Малькевич // *Криотерапия в России 2009: II междунар. науч.-практ. конф.: сб. докл.* - СПбГУ НиПТ, 2009. - С. 137.

193. Пальчикова А.А. О практике лечения псориаза с применением общего криотерапевтического воздействия / А.А.Пальчикова // *Криотерапия в России: I международ.науч.-практ. конф.* 15 мая 2008г. – СПб, 2008. – С. 77-80.

194. Альтман Д.Ш. Изменения функциональных систем организма у ветеранов современных военных конфликтов с НПНКМ под влиянием общей аэрокриотерапии / Д.Ш.Альтман, С.К.Галанова, С.Н.Теплова // *Криотерапия в России 2009: II междунар. науч.-практ. конф.: сб. докл.* / - СПбГУ НиПТ, 2009. - С. 46.

195. Асланов М.Л. Опыт применения экстремальной аэокриотерапии аппаратом КАЭКТ-1-«Крион» в комплексном лечении диабетической поли-

нейропатии / М.Л.Асланов // Медицинская криология. – Нижний Новгород, 2009. – Вып. 7. – С. 391-396.

196. Кирьянов В.В. Методические указания по применению аэро-криотерапии / В.В.Кирьянов, А.В.Максимов. - СПбГУ НиПТ, 2008. - 140 с.

197. Первичная профилактика поражений нижних конечностей при сахарном диабете / А.А.Маевский, Г.В.Новик, В.И.Мартюк [и др.]. // Медицинская криология. – Нижний Новгород, 2009. – Вып. 7. – С. 389-391.

198. Общая аэрокриотерапия / [Г.Н.Пономаренко, В.П.Середа, А.Ю.Баранов, Л.П.Волкова]. – М.: ВМедА, 2005. - 12 с.

199. Ускоренное старение участников современных военных конфликтов / В.В.Ямпольская, В.Н.Самойлова, А.А.Бальберт [и др.] // Известия Уральского гос. ун-та. – 2006. - № 45. – С. 264-272.

200. Общая экстремальная аэрокриотерапия в комплексных лечебно-профилактических программах медицинской криологии / В.И.Коченов, С.Н.Цыбусов, В.В.Козьякин [и др.]. // Криотерапия в России: I междунар. науч.-практ. конф. 15 мая 2008г. –СПб, 2008. – С. 101-107.

201. Баранов В.Г. Чувствительность к инсулину, толерантность к глюкозе и инсулиновая активность крови у крыс с алиментарным ожирением / В.Г.Баранов, Н.Ф.Баранов, М.Ф.Беловинцева // Пробл. эндокринологии. - 1972. – Т. 6. – С. 52-58.

202. Боголепов Н.Н. Методы электронно-микроскопического исследования мозга / Н.Н.Боголепов. – М.: Медицина. - 1976. - 187 с.

203. Graham R.C. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique / R.C.Graham, M.J.Karnovsky // J.Histochem. Cytochem. - 1966. – № 14. – P. 291-302.

204. Гаер Г. Электронная гистохимия / Г.Гаер; пер. с англ. – М.: Мир, 1974. - 488 с.

205. Божокин С.В. Фракталы и мультифракталы / С.В.Божокин, Д.А.Пар-шин. – Ижевск: НИЦ регулярная и хаотическая динамика, 2001. – 128 с.
206. Mandelbrot D.D. The fractal geometry of nature / D.D.Mandelbrot. – New York: Freeman, 1983. – 468 p.
207. Пащенко Р.Э. Фрактальный анализ аэрокосмических изображений / Р.Э.Пащенко, А.В.Шаповалов // Фрактальный анализ процессов, структур и сигналов. – Харьков: Эко Перспектива, 2006. – С. 210-287.
208. Михайлов В.М. Вариабельность ритма сердца: опыт практического применения метода // В.М.Михайлов. – Иваново, 2002. – 288 с.
209. Яблучанский Н.И. Основы практического применения неинвазивной технологии исследования регуляторных систем человека // Н.И.Яблучанский, А.В.Мартыненко, А.С.Исаева. – Харьков: Основа, 2000. – 86 с.
210. Хемолюминесценция крови при радиационном воздействии // [Я.И.Серкиз, Н.А.Дружин, А.П.Хариенко и др.] – К.: Наукова думка, 1989. – 176 с.
211. Фартхутдинов Р.Р. Свободнорадикальные методы исследований в биологии и медицине / Р.Р.Фартхутдинов, В.А.Лиховских. – Уфа, 1998. – 167 с.
212. Андреева Л.М. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л.М.Андреева // Лабораторное дело. - 1998. - № 11. – С. 41-43.
213. Арутюнян А.В. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма / А.В.Арутюнян, Е.Е.Дубинина, Н.Н.Жибина - СПб.: ИКС «Фолиант», 2000. - 200 с.
214. Владимиров Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.А.Владимиров, А.И.Аргаков. – М.: Наука, 1972. - 252 с.

215. Путилина Ф.В. Определение содержания восстановленного глутатиона в тканях / Ф.В. Путилина // Методы биохимических исследований / под ред. М.И.Прохоровой. – Л: Изд-во ЛГУ, 1982. – С. 183-185.
216. Королук М.А. Метод определения активности каталазы / М.А.Королук, Л.И.Иванова, И.Г.Майоров // Лабораторное дело. - 1998. - № 1. – С. 16-19.
217. Тертюева А.Б. Вплив настоянки перстачу прямостоячого на глутатионову систему щурів за умов токсичного гепатиту / А.Б.Тертюева, І.М.Яремій, Н.П.Гигор'єва // Медична хімія. - 2001. – Т. 3, № 4. – С. 52-55.
218. Чернов Н.Н. Исследование глутатионредуктазы в печени крыс / Н.Н.Чернов // Энзимология опухолей: сб.науч.тр. / Под ред. Т.Т.Березова. – М.: Изд-во Ун-та дружбы народов, 1979. – С. 96-101.
219. Measurement of nitric oxide. production in biological systems by using Griess reaction assay / J.Sun, X.Zhang, M.Broderick, H.Fein // Sensor. – 2003. – № 3. - P. 276-284.
220. Вплив холодового подразнення пальців кисті на спектрально-когерентні характеристики ЕЕГ людини / В.В.Гаркавенко, О.П.Маньківська, Т.Г.Омельченко [та ін.] // Нейрофізіологія. - 2008. - Т. 40, № 3. - С. 268-270.
221. Изменения ЭЭГ человека во время произвольных циклических движений пальцев правой кисти: влияние локального контралатерального охлаждения / В.В.Гаркавенко, Е.П.Маньковская, Т.Г.Омельченко [и др.] // Нейрофізіологія. - 2008. - Т. 40, № 5/6. - С. 439-447.
222. Портниченко В.И. Гипометаболическое состояние как механизм адаптации организма к гипоксии нагрузки / В.И.Портниченко, Ю.Н.Онопчук, В.Н.Ильин // Фізіологічний журнал. - 2008. - Т. 54, № 4. - С. 85.
223. Шокуева А.Г. Динамика показателей сверхмедленной электрической активности головного мозга человека при адаптации к гипоксии / А.Г.Шокуева // Фізіологічний журнал. — 2008. - Т. 54, № 4. - С. 99.
224. Горшкова О.П. Реактивность пиальных артериол у крыс с нормальным артериальным давлением и со спонтанной гипертензией при альве-

олярной гипоксии / О.П.Горшкова, В.Н.Шуваева // Фізіологічний журнал. — 2008. - Т. 54, № 4. - С. 64-65.

225. Активация жирового обмена при гипометаболическом состоянии под час високогірної гіпоксії у адаптованих щурів / В.І.Носар, В.І.Портніченко, Б.Л.Гавенаускас, А.М.Сидоренко // Фізіологічний журнал. — 2008. - Т. 54, № 4. - С. 81.

226. Применение метода фрактального анализа для оценки структурно-функционального состояния печени крыс *in vivo* / А.А.Олефиренко, Д.Г.Луценко, И.В.Слета, В.С. Марченко // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2009. – Т. 147, № 2 – С. 237–240.

227. Теорія хаосу та злоякісні лімфоми / В.Е.Орел, С.О.Сівкович, Л.О.Зотіков [та ін.] // Журнал АМН України. – 2006. – Т. 12, № 2. – С. 209–228.

228. Lapi D. Geometric characteristics of arterial network of rat pial microcirculation / D.Lapi, P.L.Marchiafava, A.Colantuoni // J.Vasc.Res. – 2008. - V. 45. – P. 69 –77.

229. Пишнов Г.Ю. Ультроструктурна організація ядер дорсомедіальної ділянки гіпоталамуса щурів при експериментальному хронічному стресі / Г.Ю.Пишнов, Т.М.Коваленко // Фізіологічний журнал. - 2009. - Т. 55, № 4. - С. 100-108.

230. Abbott N.J. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier / N.J.Abbott, L.Ronnback, E.J.Hansson // Nat. Rev. Neurosci. – 2006. – V. 7. – P. 41-53.

231. Pivneva T.A. Microglia in normal condition and pathology / T.A.Pivneva // Fiziol Zh. - 2008. - Т. 54, № 5. - С. 81-89.

232. Nag S. Role of endothelial cytoskeleton in blood-brain barrier permeability to protein / S.Nag // Acta Neuropathol. (Berl.). - 1995. – V. 90, № 5. – P. 454-460.

233. Shukla A. Nitric oxide – dependent blood-brain barrier permeability alteration in the rat brain / A.Shukla, V.Dikshit, R.C.Srimal // *Experientia*. - 1996. – V. 52, № 2. – P. 136-140.

234. Lukyanetz E.A. Role of synaptic proteins in neurotransmitter release-related vesicular trafficking / E.A.Lukyanetz. // *Molecular Mechanisms of Synaptic Transmission Regulation: Proc. Int. Symp. in Memoriam of Professor Vladimir Skok*. September 27–29, 2007, Kyiv. // *Neurophysiology*. - 2008. - Т. 40, № 2. - С. 155-159.

235. Key role of clathrin-mediated endocytosis in synaptic vesicle recycling / Y.Tsytsyura, N.Glyvuk, M.Krikunova [et al.] // *Нейрофизиология*. — 2007. — Т. 39, № 4-5. — С. 388-389.

236. К механизмам регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера охлажденного мозга. Сообщение 4. Ультраструктурные особенности и функциональная активность гематоэнцефалического барьера при ритмических холодовых воздействиях / Г.А.Бабийчук, В.С.Марченко, А.В.Шило [и др.] // *Проблемы криобиологии*. - 1995. - № 1. - С. 2-12.

237. Коцюба А.Е. Нитроксидергические нервные волокна внутримозговых сосудов / А.Е.Коцюба, Е.П.Коцюба, В.М.Черток // *Морфология*. – 2009. - № 2. - С. 27-32.

238. Стабилизация моторной асимметрии у золотой рыбки под влиянием оптокинетической стимуляции / Н.Ю.Дектярева, Р.Ш.Штанчаев, Г.З.Михайлова, Д.А.Мошков // *Нейрофизиология*. — 2008. — Т. 40, № 3. — С. 211-220.

239. Кулагина И.Б. Влияние структурных характеристик реконструированных мотонейронов на их возбудимость (модельное исследование) / И.Б.Кулагина // *Нейрофизиология*. — 2009. — Т. 41, № 2. — С. 137-143.

240. Сафтенку Е.Э. Допустимость упрощений при моделировании эффектов перелива нейротрансмиттера и постсинаптических ответов, вызванных повторной стимуляцией / Е.Э.Сафтенку // *Нейрофизиология*. — 2007. — Т. 39, № 2. — С. 126-132.

241. Gerstberger R. Nitric oxide and body temperature control / R.Gerstberger // *News Physiol.Sci.* - 1999. – V. 14, № 1. – P. 30-36.
242. Ingi T. Direct demonstration of a physiological role for carbon monoxide in olfactory receptor neurons / T.Ingi, G.V.Ronnett // *J.Neuroscience.* - 1995. – V. 15, № 12. – P. 8214-8222.
243. Колесникова Е.Э. Изменения чувствительности системы респираторного контроля к гиперкапнии и интенсивности свободнорадикальных процессов при старении у людей / Е.Э.Колесникова // *Нейрофизиология.* — 2008. — Т. 40, № 1. — С. 53-57.
244. Демченко О.М. Вікові особливості вмісту гліального фібрилярного кислого білка в структурах головного мозку щурів за умов больового синдрому / О.М.Демченко, П.О.Неруш // *Фізіологічний журнал* — 2007. — Т. 53, № 4. — С. 43-48.
245. Верещака В.В. Особливості структурних змін гемомікроциркуляторного русла кон'юнктиви у людей різного віку / В.В.Верещака // *Фізіологічний журнал* — 2007. — Т. 53, № 6. — С. 60-66.
246. Фролькис В.В. Старение и биологические возможности организма / В.В.Фролькис. – Л.: Наука, 1988. – 239 с.
247. Фролькис В.В. Стресс-возраст-синдром / В.В.Фролькис // *Физиологический журнал* - 1991. – Т.37, № 3. – С. 3-11.
248. Кастрикина Т.Ф. Возрастные особенности кальпаин-кальпастатиновой церебральной системы крыс в аспекте кальциевой гипотезы старения мозга / Т.Ф.Кастрикина, Л.Н.Стельмах, М.К.Малышева // *Нейрофизиология.* — 2009. — Т. 41, № 2. — С. 113-118.
249. Kochubey S. Geometrical size of the neuronal network plays a key role in synchronization of its activity / S.Kochubey, L.Savtchenko // *Нейрофизиология.* — 2008. — Т. 40, № 3. — С. 264-267.
250. Schierwagen A. Neuronal morphology: shape characteristics and models / A.Schierwagen // *Molecular Mechanisms of Synaptic Transmission*

Regulation: Proc. Int. Symp. in Memoriam of Professor Vladimir Skok. September 27–29, 2007, Kyiv. // *Neurophysiology*. — 2008. — Т. 40, № 4. — С. 366-372.

251. Klingauf J. Visualizing recycling of synaptic vesicle proteins / J.Klingauf // *Нейрофизиология*. — 2007. — Т. 39, № 4-5. — С. 350-355.

252. Магура І.С. Інтегративна функція нервових клітин: роль калієвих каналів / І.С.Магура, О.В.Долга, Н.О.Богданова // *Фізіологічний журнал* — 2008. — Т. 54, № 5. — С. 16-22.

253. Резніков О.Г. Кальційзалежні механізми порушень стресової та норадренергічної реактивності гіпоталамо-гіпофізарно-адренотікальної системи у неонатально андрогенізованих самиць щурів / О.Г.Резніков, Н.Д.Носенко, П.В.Сініцин // *Фізіологічний журнал* — 2008. — Т. 54, № 6. — С. 24-29.

254. Neurotrophins improve synaptic transmission in the adult rodent diaphragm / L.G.Ermilov, G.C.Sieck, Wen-zhi Zhan, C.B.Mantilla // *Нейрофизиология*. — 2007. — Т. 39, № 4-5. — С. 327-337.

255. Майзеліс М.Я. Гематоэнцефалический барьер и его регуляция / М.Я.Майзеліс. — М.: Медицина, 1973. - 183 с.

256. Banks W.A. Permeability of the blood-brain barrier to neuropeptides: the case for penetration / W.A.Banks, A.J.Kastin // *Psychoneuroendocrinol.* —1985. —V. 10, № 4. — P. 385-399.

257. Нейрофизиологические механизмы экологической устойчивости: прогнозирование и биоритмологическая коррекция / Н.Н.Василевский, Н.Б.Суворов, Ю.А.Сидоров [и др.] // *Вестник Российской Академии медицинских наук*. - 1994. - № 2. — С. 40-43.

258. Реутов В.П. Цикл окиси азота в организме млекопитающих / В.П.Реутов // *Успехи биологических наук*. - 1995. — Т. 35. — С. 189-228.

259. Boje K.M. Inhibition of nitric oxide synthase attenuates blood-brain barrier disruption during experimental meningitis / K.M.Boje // *Brain Res.* - 1996. — V. 720, № 1-2. - P. 75-83.

260. Cardilo G. Impaired endothelial regulation of vascular tone in patients with systemic arterial hypertension / G.Cardilo, J.A.Panza // Vasc.Med. - 1998. – V. 3, № 2. - P. 132-144.

261. Task force report of European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: standarts of measurement, physiological interpretation and clinical use // Circulation. - 1996. – V. 96. – P. 1043-1065.

262. Анализ вариабельности сердечного ритма при использовании различных электрокардиографических систем / Р.М.Баевский, Г.Г.Иванов, Л.В.Чирейкин [и др.]. – Челябинск, 2002. – 64 с.

263. Endogenous corticotrophin-releasing hormone inhibits conditioned-fear-induced vagal activation in the rat / M.J.Nijsen, G.Croiset, M.Diamant [et al.] // Eur. J. Pharmacol. – 2000. – V. 389, № 1. - P. 89-98.

264. Швалев В.Н. Феномен ранньої вікової інволюції симпатичного відділу вегетативної нервової системи / В.Н.Швалев, Н.А.Тарський // Кардіологія. – 2001. - № 2. - С. 10.

265. Sayers B.M. Analysis of heart rate variability / B.M.Sayers // Ergonomics. - 1973. – V. 16, № 1. – P. 17-32.

266. Борисов В.И. Анализ вариабельности сердечного ритма в оценке состояний больных инфарктом миокарда / В.И.Борисов. - Нижний Новгород: Изд-во НГМА, 1997. - С. 15.

267. Preiss G. Patterns of sympathetic neuron activity associated with Mayer waves / G.Preiss, C.Polosa // Arn.J.Physiol. - 1974. – V. 226, № 3. – P. 724-730.

268. Писарук А.В. Вариабельность ритма сердца при старении / А.В.Писарук// Нарушения ритма сердца: возрастные аспекты : I Укр. науч.-практ. конф. с междунар. участием 19-20 октября 2000 г.: материалы. - Киев, 2000. - С. 176-182.

269. Чеботарьова Ю.М. Особливості біологічних ритмів серцевосудинної системи та вегетативного тону у здорових осіб та хворих на ІХС похи-

лого віку: автореф.дис. на здобуття наук.ступ. канд. мед. наук / Ю.М Чеботарьова. – К., 2006. – 20 с.

270. Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat cardiovascular control / S.Akselrod, D.Gordon, F.A.Ubel [et al.] // Science. - 1981. – V. 213. – P. 220-222.

271. Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variability's as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog / M.Pagani, F.Lombardi, S.Guzzanti [et al.] // Circ. Res. – 1986. – V. 59. – P. 178-193.

272. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain / A.Malliani, M.Pagani, F.Lombardi [et al.] // Circulation. – 1991. – V. 84. – P. 1482-1492.

273. Малиани А. Физиологическая интерпретация спектральных компонентов variability сердечного ритма / А.Малиани // Вестник аритмологии. – 1998. – Т. 9. – С. 47-57.

274. Сметнев А.С. Variability ритма сердца, желудочковые аритмии и риск внезапной смерти / А.С.Сметнев, О.И.Жаринов, В.Н.Чубучный // Кардиология. – 1995. - Т. 35, № 4. - С. 49-52.

275. Матусова А.П. Клиническое значение статистического анализа сердечного ритма у больных с острым инфарктом миокарда / А.П.Матусова // Кардиология. – 1989. – Т. 29, № 1. - С. 29-32.

276. Илюхина В.А. Нейрофизиология функциональных состояний человека / В.А.Илюхина. – Л.: Наука, 1986. – 171 с.

277. Журавлев К.И. Развитие идей Б.Н.Тарусова о роли цепных процессов в биологии / К.И.Журавлев // Биоантиокислители и регуляция метаболизма в норме и патологии. – М.: Наука, 1982. – С. 3-37.

278. Griffit O.W. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutastion synthesis / O.W.Griffit // Free Radic.Biol.Med. - 1999. - V. 27, № 9-10. - P. 922-935.

279. Перекисное окисление и стресс / В.А.Барабой, И.И.Брахман, В.Г.Гологин [и др.]. – СПб: Наука, 1992. – 148 с.

280. Дубинина Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса / Е.Е.Дубинина // Вопросы медицинской химии. - 2001. – Т. 47, № 6. – С. 561-581.
281. Тарусов Б.Н. Первичные процессы лучевого поражения / Б.Н.Тарусов. – М.: Госатомиздат, 1962. – 96 с.
282. Перекисное окисление липидов растений различного уровня организации при микрогравитационном стрессе / В.А.Барабой, С.И.Жадько, Е.Л.Кордюм [и др]. // Известия АН СССР, сер. Биологическая. - 1991. - № 3. - С. 368-375.
283. Барабой В.А. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и при патологии / В.А.Барабой, Д.А.Сутковой. – СПб: Наука, 1997. - 167 с.
284. Биленко М.В. Ишемические и реперфузионные поражения органов. (Молекулярные механизмы, пути предупреждения и лечения) / М.В.Биленко. - М.:Медицина, 1989. – 368 с.
285. Гусев М.В. Свободный кислород и эволюция клетки / М.В.Гусев, Г.Б.Гохлернер. – Иркутск, 1980. - 223 с.
286. Никитченко Ю.В. Регуляция свободнорадикального окисления липидов в процессе старения организма / Ю.В.Никитченко // Биологические механизмы старения: 5 междунар. симп.: тезисы. - Харьков, 2002. - С. 38-39.
287. Бабийчук Г.А. Моноаминергические механизмы пространственной синхронизации биоэлектрической активности охлажденного мозга / Г.А.Бабийчук, И.В.Чижевская, В.С.Марченко // Лечебная гипотермия: Сб. науч. тр. – Харьков, 1992. – С. 33-29.
288. Барабой В.А. Роль перекисного окисления в механизме стресса / В.А.Барабой // Физиологический журнал. - 1989. – Т. 35, № 5. – С. 8-16.
289. Барабой В.А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов / В.А.Барабой // Успехи современной биологии. - 1991. – Т. 111, № 6. – С. 923-931.

290. Система протеиназа-ингибитор протеиназ старых крыс со стимулированной гипертензией после сочетанного применения кордовой крови и ритмического холодового воздействия / В.В.Ломако., Л.М.Самохина, В.Г.Бабийчук [и др.] // Проблемы криобиологии. – 2002. - № 2. – С. 70-75.

291. Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца / Ф.З.Меерсон. – М.: Медицина, 1984. - 269с.

292. Меерсон Ф.З. Предупреждение нарушений сократительной способности сердца при инфаркте миокарда с помощью предварительной адаптации к коротким стрессорным воздействиям / Ф.З.Меерсон, В.И.Заяц, Л.М.Булкина // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 1985. - № 3. – С. 9-13.

293. Влияние продуктов перекисного окисления липидов на окислительное фосфорилирование в митохондриях печени крыс / Д.А.Сутковой, В.А.Барабой, А.Н.Алферов [и др.] // 1 Всесоюз. биофиз. съезд: тез.докл. – М., 1982. – Т. 2. – С. 225-226.

294. Сутковой Д.А. Перекисное окисление липидов и окислительное фосфорилирование при стрессовых воздействиях и антистрессорное действие условий горных высот / Д.А.Сутковой // Актуальные проблемы современной физиологии. – К.: Наукова думка, 1986. - С. 229-230.

295. Бабийчук В.Г. Ультраструктурные изменения щитовидной железы крыс после нескольких сеансов нахождения в камере при температуре -120 °С / В.Г.Бабийчук, В.П.Невзоров, А.В.Гаевой // Харківська хірургічна школа. – 2006. - № 1. - С. 176-178.

296. Harris J.W. Non-protein sulfhydryl content and cell cycle dynamics of Ehrlich ascites tumor / J.W.Harris, H.M.Patt // Exp. Cell Res. - 1969. – V. 56, № 1. – P. 134-141.

297. Hassan H.M. Superoxide dismutase: an antioxidant defense enzyme // Free radicals in molecular biology. Aging and disease / H.M.Hassan; - Ed. by D.Armstrong [et al.]. - New York: Raven press, 1984. – P. 47-96.

298. Function of glutathione: biochemical, physiological, toxicological and clinical. Ed. by P.Larsson. – New York: Raven press, 1983. – 403 p.
299. Latta K. The purification of human lens glutathione reductase / K.Latta, R.C.Augustin // Exp.Eur.Res. - 1984. – V. 39, № 3. – P. 343-354.
300. Cohen G.M. Freedman RB. Roles and functions of glutathione / G.M.Cohen, R.B.Freedman // Biochem. Soc. Trans. - 1982. – V. 10. - P. 78-85.
301. Elkow-Lastrom L. On the mechanisms of glutathione depletion in hepatocytes exposed to morphine and ethylmorphine / L.Elkow-Lastrom, P.Maidens, S.Orrenius // Toxicology. - 1986. – V. 42, № 4. - P. 13-21.
302. The effect of chronic ethanol ingestion on brain lipid peroxide and glutathione levels in rats / M.Uysal, M.Keyer-Uysal, N.Kosak-Toker [et al.] // Drug Alcohol depend. - 1986. – V. 18, № 1. – P. 73-75.
303. Dayies M. D-thiolthione – induced alterations in hepatic glutathione and related enzymes in male mice / M.Dayies, A.Blackler, R.Shnell // Biochem. Pharmacol. - 1987. – V. 36, № 4. – P. 568-570.
304. Бредбери М. Концепция гематоэнцефалического барьера / М.Бредбери. – М.: Медицина, 1983. – 480 с.
305. Марков Х.М. Окись азота и окись углерода – новый класс сигнальных молекул / Х.М.Марков // Успехи физиологических наук. - 1996. – Т. 27, № 4. – С. 30-43.
306. Раевский К.С. Оксид азота – новый физиологический мессенджер: возможная роль при патологии нервной системы / К.С.Раевский // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 1997. – Т. 123, № 5. – С. 484-490.
307. Физиология гисто-гематических барьеров: Руководство по физиологии. – М.: Наука, 1977. – 575 с.
308. Pepper C.B. Nitric oxide: from laboratory to bedside / C.B.Pepper, A.M.Shah // Spectrum Int. - 1996. - V. 36, № 2. – P. 20-23.

309. Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long-term synaptic enhancement in hippocampus / M.Zhuo, S.A.Small, E.R.Kandel [et al.] // Science. - 1993. – V. 260. - P. 1946-1950.
310. Nitric oxide and endothelial in pathophysiological setting / N.E.Hunley, S.Iwasaki, T.Homma [et al.] // Pediatr.Nephrol. - 1995. – V. 9, № 2. – P. 235-244.
311. Chaffee R.R. Temperature acclimation in birds and mammals / R.R.Chaffee, J.C.Roberts // Ann.Rew.Physiol. – 1971. – V. 33. – P. 155-202.
312. Motterlini R. Hemoglobin-nitric oxide interaction and its implications / R.Motterlini, K.D.Vandergriff, R.M.Winslow // Transfus. Med. Rev. - 1996. – V. 10, № 2. - P. 77-84.
313. Stevens C.F. Reversal of long-term potentiation by inhibitors of haem oxygenase / C.F.Stevens, Y.Wang // Nature. - 1993. – V. 364. - P. 147-148.
314. Banks W.A. Saturable transport of peptides across the blood-brain barrier / W.A.Banks, A.J.Kastin // Life Sci. – 1987. – V. 41, № 11. – P. 1319-1338.
315. Mayhan W.G. Role of nitric oxide in the blood-brain barrier during acute hypertension / W.G. Mayhan // Brain Res. - 1995. – V. 686, № 1. - P. 99-103.
316. Umans J.G. Nitric oxide in the regulation of blood flow and arterial pressure / J.G.Umans, R.Levi // Annu Rev. Physiol. – 1985. – V. 57. - P. 771-790.
317. NMDA and endothelin-1 induced increases in blood-brain barrier permeability quantitated with Lucifer yellow / R.D.Miller, N.T.Monsul, J.R.Vender [et al.] // J.Neurol.Sci. - 1996. –V. 136, № 1-2. - P. 37-40.
318. Конечные продукты метаболизма оксида азота при искусственном гипометаболизме у крыс и хомяков /А.В.Шило, В.В.Ломако, Т.Н.Бондарь, Г.А.Бабийчук // Проблемы криобиологии. - 2005. - № 1. – С. 3-13.
319. Иванов Е.М. Медицинские аспекты миграционных процессов в Дальневосточном районе / Е.М.Иванов, В.Н.Потапов, В.Н.Лучанинова // Вестник Российской Академии медицинских наук. - 1993. - № 8. - С. 35-37.

320. Paulus W.J. Acute effects of nitric oxide on left ventricular relaxation and diastolic dispensability in humans. Assessment by bicoronary sodium nitroprusside infusion / W.J.Paulus, P.J.Vantrimpont, A.M.Shah // *Circulation*. - 1994. - V. 89. - P. 2070-2078.
321. Voltametric detection of cerebral NO in rats. Variations of the signal throughout the sleep-wakefulness cycle / R.Cespuglio, S.Burlet, S.Marinesco [et al.] // *C.R.Acad.Sci.* - 1996. – V. 319, № 3. - P. 191-200.
322. Nitric oxide and the renin angitens in system: contributions to blood pressure in the young rat / M.Charbit, L.Blazy, J.Gogusev [et al.] // *Pediatr. Nephrol.* – 1997. – V. 11, № 5. - P. 617-622.
323. Michael N., Gewalting G.K. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential / N.Michael, G.K.Gewalting // *Cardiovasc.Res.* - 2002. - V. 55. - P. 250-260.
324. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells / C.Nathan // *FASEB J.* - 1992. - V. 6. - P. 3051-3064.
325. Диагностика и прогнозирование функционального состояния мозга человека / М.Н.Ливанов, В.С.Русинов, П.В.Симонов [и др.]. – М.:Наука, 1988. – 206 с.
326. Wang Y. Nitric oxide syntases: biochemical and molecular regulation / Y.Wang, P.A.Marsden // *Curr.Opin.Nephrol.Hyphetens.* - 1995. - V. 4. - P. 12.
327. Бабійчук В.Г. Вплив екстремальної кріотерапії на функціональний стан систем нейрогуморальної регуляції старих щурів / В.Г.Бабійчук // *Науковий вісник нац. мед. ун-т ім.О.О.Богомольця*. – 2007. - № 1. – С. 60-62.
328. Булдакова С.Л. Вызванная температурой длительная потенция в срезах гиппокампа / С.Л.Булдакова, Е.А.Дутова, С.В.Ивлев // *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. - 1993. – Т. 29, № 4. – С. 364-370.
329. Інтервальні гіпоксичні тренування та L-аргінін як засоби корекції енергозабезпечення міокарда за умов гострої гіпоксії / Н.М.Кургалюк,

Т.В.Серебровська, В.І.Носар [та ін.] // Український біохімічний журнал - 2002. - Т. 74, № 1. - С. 82-87.

330. Forsterman U. Nitric oxide can act as an endogenous antipyretic factor in endotoxin-induced fever in rabbits / U.Forsterman, E.L.Closs, J.S.Pollock // *Gen.Pharmac.* - 1995. - V. 26, № 4. - P. 835.

331. Mayhan W.G. Glutamate-induced disruption of the blood-brain barrier in rats. Role of nitric oxide / W.G.Mayhan, S.P.Didion // *Stroke.* - 1996. – V. 27, № 5. - P. 965-970.

332. К концепции экзистэнцефалической системы охлажденного мозга. Часть 3. Нейрональные газы (NO, CO) как нейротрансмиттерная система «раскачки» гомеостаза / В.С.Марченко, Г.А.Бабийчук, Л.Н.Марченко [и др.] // *Проблемы криобиологии.* - 2000. - № 4. - С. 27-36.

333. Марьянович А.Т. Нейропептиды и гематоэнцефалический барьер / А.Т.Марьянович, Е.Л.Поляков // *Успехи физиологических наук.* - 1991. – Т. 22, № 2. – С. 33-51.

334. Атауллаханов Р.И. Иммуитет и инфекция: динамичное противостояние живых систем / Р.И.Атауллаханов, А.Л.Гинзбург // *Детские инфекции.* – 2005. – Т.4, № 1. – С. 11-21.

335. Gourine A.V. Pharmacological evidence that nitric oxide can act as an endogenous antipyretic factor in endotoxin-induced fever in rabbits / A.V.Gourine // *Gen. Pharmac.* – 1995. - V. 26, № 4. - P. 835.

336. Weindl A. The blood-brain barrier and its role in the control of circulating hormone effects on the brain. Central cardiovascular control. Basis and clinical aspects / A.Weindl; [Eds D.Ganten, D.Pffaf]. – B.: Springer, 1983. – P. 150-186.

337. Rakhit M.J. Nitric oxide: an emerging role in cardioprotection? / M.J.Rakhit, C.G.Li // *Heart.* - 2001. – V. 86. - P. 368-372.

338. Rand M.J. Nitric oxide as a neurotransmitter in peripheral nerves: nature of transmitter and mechanism of transmission / M.J.Rand, C.G.Li // *Ann.Rev.Physiol.* – 1995. – V. 57. – P. 659-682.

339. Влияние повторного воздействия краниocereбральной гипотермии на функциональную активность норадренергической системы гипоталамуса крыс / В.В.Ломако, Ф.В.Шило, В.С.Марченко [и др.] // Лечебная гипотермия: Сб. науч. тр. - Харьков, 1992. - С. 134-139.
340. Игнатьев А.А. Изучение физиологических эффектов неокторфина (НКТ) на зимоспящих и незимоспящих животных / А.А.Игнатьев, С.Г.Колаева, Г.С.Сухова // Физиологическое и клиническое значение регуляторных пептидов. - Пушино, 1990. – С. 112.
341. Марков Х.М. Окись азота и окись углерода – новый класс сигнальных молекул / Х.М.Марков // Успехи физиологических наук. - 1996. – Т. 27, № 4. – С. 30-43.
342. Ткаченко М.М. Оксид азота та судинна регуляція (огляд літератури) / М.М.Ткаченко // Журнал АМН України. - 1997. – Т. 3, № 2. –С. 241-254.
343. Шимановский Н.Л. Роль оксида азота в механизмах действия лекарственных веществ / Н.Л.Шимановский, К.С.Гуревич // Международный медицинский журнал. - 2000. - № 1. – С. 104-107.
344. Boje K.M. Inhibition of nitric oxide synthase attenuates blood-brain barrier disruption during experimental meningitis / K.M.Boje // Brain Res. - 1996. – V. 720, № 1-2. – P. 75-83.
345. Busse R. Nitric oxide formation in vascular wall: regulation and functional / R.Busse, L.Fleming, V.Shcini // The role oxide in physiology and pathophysiology [Eds. H.Koprowski, H.Maeda]. – Springer–Veeg–Heidelberg, 1995. – P. 7-18.
346. Crow J. The role of peroxynitrite in nitric oxide – mediate toxicity / J.Crow, J.Beckman // The role oxide in physiology and pathophysiology [Eds. H.Koprowski, H.Maeda]. – Springer–Veeg –Heidelberg, 1995. – P. 57-73.
347. Dawson T. Gases as biological messengers: nitric oxide in the brain / T.Dawson, S.Snyder // J.Neurosci. - 1994. – V. 14, № 9. – P. 5147-5159.

348. Garthwaite J. Nitric oxide signaling in the central nervous system / J.Garthwaite, C.Boulton // *Annu.Rev.Physiol.* - 1995. – V. 57. – P. 583-706.
349. Graham R.C. The early stage of absorption of injected horse-radish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique / R.C.Graham, M.J.Karnovsky // *J.Histochem.Cytochem.* - 1966. – № 14. – P. 291-302.
350. Вплив N–стеароїлетаноламіну та рівень стабільних метаболітів NO за різних патологічних станів організму, що супроводжуються оксидативним стресом / Г.В.Гула, Н.Л.Косякова, Т.О.Кіндрук [та ін.] // *Український біохімічний журнал.* - 2005. - Т. 77, № 3. - С. 113-119.
351. Effects of the whole-body cryotherapy on a total antioxidative status and activities of some antioxidative enzymes in blood of patients with multiple sclerosis-preliminary study / E.Miller, M.Mrowichka, K.Malinowska [et al.] // *J.Med.Invest.* - 2010. - V. 57, № 1-2. - P. 68-73.
352. Cryotherapy decreases histamine levels in the blood of patients with rheumatoid arthritis / E.Wojtecka-Lukasik, K.Ksiezopolska-Orlowska, E.Gaszewska [et al.] // *Inflamm. Res.* – 2010. – V. 59, № 2. – S. 253-255.
353. Effects of the whole-body cryotherapy on NTproBNP, hsCRP and troponin I in athletes/ G.Bahfi, G.Melegati, A.Barassi [et al.] // *J. Sci. Med. in Sport / Sports Medicine Australia.* - 2009. – V. 12, № 6. – P. 609-610.
354. Hermann J. Cryotherapy / J.Hermann // *Zeitschrift fur Rheumatologie.* – 2009. – V. 68, № 7. – P. 539-541.
355. Effects of repeated whole-body cold exposures on serum concentrations of growth hormone, thyrotropin, prolactin and thyroid hormones in healthy women / J.Smolander, J.Leppaluoto, T.Westerlund [et al.] // *Cryobiology.* - 2009. – V. 58, № 3. – P. 275-278.
356. Whole-body cryostimulation in kayaker women: a study of the effect of cryogenic temperatures on oxidative stress after the exercise / C.Mila-Kierzenkowska, A.Wozniak, B.Wozniak [et al] // *J. Sports Med.Phys. Fitness.* - 2009. – V. 49, № 2. – P. 201-207.

357. Acute cold stress rheumatoid arthritis inadequately activates stress responses and induces an increase of interleukin 6 / R.H.Straub, G.Pongratz, H.Hirvonen [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* - 2009. – V. 68, № 4. – P. 572-578.
358. Pulmonary dysfunction and therapeutic hypothermia in asphyxiated newborns: whole-body versus selective head cooling / S.Sakar, J.D.Barks, I.Bhagat [et al.] // *Am. J. Perinatol.* - 2009. – V. 26, № 4. – P. 265-270.
359. Activity of selected enzymes in erythrocytes and level of plasma antioxidants in response to single whole-body cryostimulation in humans / A.Lubkowska, B.Dolegowsxa, Z.Szygula [et al.] // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* - 2009. – V. 69, № 3. – P. 387-394.
360. Acute whole-body cooling for exercise-induced hypothermia: a systematic review / D.P.McDermott, D.J.Casa, M.S.Ganio [et al.] // *J. Athletic Training.* - 2009. – V.44, № 1. – P. 84-93.