

Структурно-функциональные механизмы действия экстремального охлаждения на терморегуляторные центры гипоталамуса

В. Г. БАБИЙЧУК, В.С. МАРЧЕНКО, Г.А. БАБИЙЧУК, Л.Н. МАРЧЕНКО, Т.И. БОНДАРЬ
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Structural and Functional Effect Mechanisms of Extreme Cooling on Hypothalamus Thermoregulatory Centers

V.G. BABIYCHUK, V.S. MARCHENKO, G.A. BABIYCHUK, L.N. MARCHENKO, T.I. BONDAR
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy
of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Исследованы центральные структурно-функциональные механизмы действия периодического краткосрочного охлаждения организма в криокамере (-120°C). Показано периодическое повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), обусловленное долгосрочной активизацией синаптического аппарата нейронов преоптической области гипоталамуса. Высказаны предположения о связи лечебного эффекта криотерапии с повышением функциональной активности системы нейротрансмиттеры – циклические мононуклеозиды – ретроградные мессенджеры (NO, CO), действие которых унифицируется на уровне цитолеммы и рецепторно-цитоскелетного комплекса.

Ключевые слова: экстремальное охлаждение, криотерапия, гипотермия, гематоэнцефалический барьер, гипоталамус, ультраструктура.

Досліджено центральні структурно-функціональні механізми дії періодичного короткострокового охолодження організму в криокамері (-120°C). Показано періодичне підвищення проникності гематоенцефалічного бар'єра, обумовлене довгостроковою активізацією синаптичного апарату нейронів преоптичної області гіпоталамуса. Висловлено припущення про зв'язок лікувального ефекту криотерапії з підвищенням функціональної активності системи нейротрансмітери – циклічні мононуклеозиди – ретроградні месенжери (NO, CO), дія яких уніфікується на рівні цитолемми і рецепторно-цитоскелетного комплексу.

Ключові слова: екстремальне охолодження, криотерапія, гіпотермія, гематоенцефалічний бар'єр, гіпоталамус, ультраструктура.

The authors studied the central structural and functional effect mechanisms of periodic short term organism cooling in cryochamber (-120°C). There has been demonstrated a periodic increase of blood brain barrier (BBB) permeability stipulated by a long-term activation of the neurons' synaptic apparatus of pre-optic hypothalamus area. There were presented the suppositions on the relation of cryotherapy therapeutic effect with the increase of functional activity in neurotransmitter-cyclic mononucleosides-retrograde messengers (NO, CO) system which effect was unified at the level of cytolemma and receptor-cytoskeleton complex.

Key-words: extreme cooling, cryotherapy, hypothermia, blood brain barrier, hypothalamus, ultrastructure.

Развитие криогенных технологий за последние 10 лет вызывает интерес практической медицины к терапевтическому использованию экстремально низких (около -120°C) температур. Анализируя фрагментарные экспериментальные данные [3, 6, 19] и клинические результаты, можно отметить как эффективность метода в комплексном лечении больных с психосоматической патологией, депрессиями различного генеза, артрозо-артритами, нейродермитами, нейрогуморальными нарушениями репродуктивных и некоторых других функций, так и необходимость проведения фундаментальных исследований механизмов функционирования центров терморегуляции и широкого клинико-экспериментального изучения всего спектра биологических реакций на экстремальное охлаждение. Существующие нейро-трансмит-

Development of cryogenic technologies within 10 recent years has caused the interest of practical medicine to therapeutic use of extremely low temperatures (-120°C). Having analyzed the fragmental experimental data [3, 6, 19] and clinical results one can note both the method efficacy in complex treatment of the patients with psychosomatic pathology, depressions of various origin, arthrosis-arthritis, neurodermites, neurohumoral disorders of reproductive and some other functions, and the necessity of conducting the fundamental studies of the functioning mechanisms of thermoregulation centers and wide clinical experimental investigation of the entire spectrum of biological responses to extreme cooling. Existing neurotransmitter concepts for central thermoregulation are known to explain easily such complicated neurophysiological processes [17, 19],

Адрес для корреспонденции: Марченко В.С., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 770-29-35, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Marchenko V.S., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7702935, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

терные концепции центральной терморегуляции объясняют сложные нейрофизиологические процессы [17, 19], но в них не учитываются активность и ультраструктурное состояние ГЭБ гипоталамуса.

Цель исследования – выяснение роли структурно-функционального состояния ГЭБ гипоталамуса в нейротрансмиттерных механизмах действия экстремально низких (порядка -120°C) для гомойотермных организмов температур.

Материалы и методы

Работа выполнена на белых беспородных крысах с соблюдением Международных принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных (Страсбург, 1985). Ритмическую гипотермию (РГ) проводили на протяжении 120 мин, обдувая тело животного 1-2 с холодным воздухом (4°C) с частотой 0,1 Гц [6]. Периодическое 2-минутное охлаждение животных проводили в криокамере при температуре -120°C . В соответствии с существующими международными требованиями к медицинской технике использовано криостатирование без применения жидкого азота. Структурно-функциональное состояние элементов ГЭБ изучали с помощью электронно-микроскопических гистохимических методов выявления активности аденилатциклазы, проницаемости ГЭБ для пероксидазы хрена [2], спектрально-корреляционного анализа сверхмедленной биоэлектрической активности головного мозга и сердца (в том числе при системном введении адреналина). Проницаемость ГЭБ для ^3H -норадреналина (^3H -НА) и ^3H -ацетилхолина (^3H -АХ) определяли радиоизотопным методом [6].

Препарирование образцов ткани гипоталамуса для трансмиссионной электронной микроскопии ультратонких срезов проводили в соответствии с общепринятыми методами [2]. Полутонкие (0,5 мкм) срезы окрашивали толудиновым синим и анализировали в оптическом микроскопе. Ультратонкие срезы изготавливали на ультрамикротоме, контрастировали 2%-м уранилацетатом на 50%-м этиловом спирте, а также цитратом свинца по методу Рейнольдса. Просмотр и фотографирование осуществляли в электронном микроскопе просвечивающего типа ПЭМ-125К при ускоряющем напряжении 75 кВ.

В качестве маркерного фермента для изучения процессов проницаемости ГЭБ и эндотелиального транспорта веществ использовали пероксидазу хрена (молекулярная масса 44000). Для выявления пероксидазной активности применяли метод [16]. Пероксидазу хрена (Reanal, активность 350-500 ед. в 1 мг) вводили в виде 20%-го раствора (на физиологическом растворе NaCl) в хвостовую вену

though with no consideration of the activity and ultrastructural state of the hypothalamus BBB.

The work was aimed to revealing the role of structural and functional state of the hypothalamus BBB in neurotransmitter effect mechanisms of extra-low temperatures (-120°C) for homoiothermal organisms.

Materials and methods

The work was performed in white mongrel rats with keeping the International Principles of the European Convention for Vertebrates Protection (Strasbourg, 1985). Rhythmic hypothermia (RH) was done during 120 min by blowing on the animal's body with cold air during 1-2 s (4°C) with the frequency of 0.1 Hz [6]. Periodic 2-min animal cooling was done in cryochamber under the temperature of -120°C . According to the existing international requirements to medical equipment there was used cryostating with no liquid nitrogen. Structural and functional state of BBB elements was studied using electron microscopic histochemical methods for revealing the adenylate cyclase activity, BBB permeability for horse reddish peroxidase [2], spectral correlational analysis of ultra-slow bioelectrical brain and heart activity (also at systemic adrenaline injection). BBB permeability for ^3H -noradrenaline (^3H -NA) and ^3H -acetylcholine (^3H -AC) was determined radioisotopically [6].

Samples preparing of hypothalamus tissue for transmission electron microscopy of ultra-fine sections was done according to generally approved methods [2]. Semi-fine (0.5 μm) sections were stained with tholuidine blue and analyzed using optic microscope. Ultra-fine sections were prepared in ultramicrotome, contrasted with 2% uranyl acetate with 50% ethyl alcohol, as well as lead citrate according to Reynolds' method. Viewing and photographing were performed using PEM-125K electron transmission microscope under accelerating voltage of 75 kV.

As a labeling enzyme to study the BBB permeability processes and endothelial transport of substances we used horse reddish peroxidase (molecular mass of 44000). To reveal the peroxidase activity there was used the method [16]. Horse reddish peroxidase (Reanal, 350-500 units/mg activity) was intraperitoneally injected as 20% solution (based on NaCl solution) into an animal's tail vein directly prior to decapitation and 10 min beforehand by 1 ml. At the same time the control animals were injected with the identical amount of horse reddish peroxidase solution. Animals were decapitated. Quickly procured brain was placed into 4% glutaraldehyde solution based on 0.1 M of cacodylate buffer (pH 7.3). Hypothalamus tissue pieces were fixed for 90 min and cut to 50-100 μm sections, and continued to be fixed for 30 min. Hypothalamus sections which were washed out in cacodylate buffer (pH 7.4) under the temperature of

животным непосредственно перед забоем и за 10 мин – по 1 мл внутрибрюшинно. Одновременно контрольным животным вводили те же количества раствора пероксидазы хрена. Животных забивали декапитацией. Быстро извлеченный головной мозг помещали в 4%-й раствор глутар-альдегида на 0,1М какодилатном буфере (pH 7,3). Кусочки ткани гипоталамуса фиксировали в течение 90 мин и изготавливали срезы толщиной 50-100 мкм, фиксация которых продолжалась в течение 30 мин. Срезы гипоталамуса, отмытые в какодилатном буфере (pH 7,4) при температуре 4°C быстро промывали 0,05М трис-НСl буфером (pH 7,6). Затем следовала инкубация срезов 30 мин в среде без добавления перекиси водорода: 5 мг 3,3'-диаминобензидингидрохлорида (ДАВ, Sigma) в 10 мл 0,05М трис-НСl буфера (pH 7,6). Инкубацию в среде с добавлением 0,2 мл свежеприготовленного 1%-го раствора перекиси водорода выполняли в течение 60 мин. Образцы ткани, промытые дважды дистиллированной водой, постфиксировали в 1%-м буферном растворе четырехоксида осмия 90 мин. Обезвоживание ткани производили в этаноле возрастающей концентрации и абсолютном ацетоне. Образцы заключали в смесь эпоксидных смол эпон-аралдит. Контролем служили образцы гипоталамуса, инкубированные в среде, не содержащей перекиси водорода. При просмотре срезов в электронном микроскопе продукт гистохимической реакции представляет собой гомогенный электронно-плотный осадок.

Для выявления аденилатциклазы использовали гистохимический метод [26]. Образцы фиксировали погружением в 1%-й глутаральдегид на 0,05 М какодилат-нитратном буфере (pH 7,4) с 4,5%-й декстрозой. Кусочки ткани толщиной 0,5 мм промывали в буферном растворе и помещали в среду инкубации на 30 мин при 30°C. Среда состояла из 80 мМ малеатного трис-буфера (pH 7,4), 8% декстрозы, 2,0 мМ теофилина, 4,0 мМ сульфата магния, 0,3 мМ АТФ в 0,5 мл воды, 4,8 мМ $Pb(NO_3)_2$. Для контроля проводили инкубацию в среде без субстрата и в среде с 0,0125 М фторида натрия для устранения неспецифических реакций НТФ-азы и усиления активности аденилатциклазы. Ткань промывали в забуференном растворе декстрозы и дополнительно фиксировали в 1%-м OsO_4 на веронал-ацетатном буфере с 7,5%-й декстрозой. Обезвоживание проводили в этаноле возрастающей концентрации и абсолютном ацетоне, образцы заключали в смесь эпон-аралдит. Ультратонкие срезы контрастировали 2%-м уранилацетатом на 50%-м этиловом спирте без контрастирования цитратом свинца. Электронно-плотный осадок пирофосфата свинца маркирует места локализации фермента. Уровень NO в ткани

4°C, were rapidly washed-out with 0.05 M tris-HCl buffer (pH 7.6). Then followed a 30-min incubation of sections in hydrogen peroxide-free medium: 5mg of 3.3-diaminobenzidinhydrochloride (DAB, Sigma) in 10 ml 0.05 M tris-HCl buffer (pH 7.6). Incubation in the medium with adding 0.2 ml of freshly prepared 1% hydrogen peroxide solution was accomplished within 60 min. Washed twice with distilled water tissue samples were post-fixed in 1% buffer solution of osmium tetroxide for 90 min. Tissue dehydration was done in ethanol of increasing concentration and absolute acetone. The samples were placed into epoxy resins epon-araldit mixture. Hypothalamus samples incubated in hydrogen peroxide-free medium served as the control. While viewing the sections in electron microscope the product of histochemical reaction is seen as homogenous electronically-dense sediment.

To reveal adenylate cyclase we used the histochemical method [26]. The samples were fixed by immersion into 1% glutaraldehyde based on 0.05M cacodylate-nitrate buffer (pH 7.4) with 4.5% dextrose. Tissue pieces of 0.5mm thickness were washed out in a buffer solution and placed into the incubation medium for 30min at 30°C. The medium comprised 80mM maleate tris-buffer (pH 7.4), 8% dextrose, 2.0 mM thiophyllin, 4.0 mM magnesium sulfate, 0.3mM ATP in 0.5 ml of water, 4.8 mM $Pb(NO_3)_2$. With the aim of the control there was accomplished the incubation in a substrate-free medium with 0.0125M of sodium fluoride to remove non-specific reactions of NTPhase and intensify the adenylate cyclase activity. Tissue was washed out in buffered dextrose solution and fixed additionally in 1% OsO_4 based on veronal-acetate buffer with 7.5% dextrose. Dehydration was done in ethanol of an increasing concentration and absolute acetone, the samples were placed into epon-araldit mixture. Ultra-fine sections were contrasted with 2% uranyl acetate based on 50% ethanol without contrasting by lead citrate. Electronically dense sediment of lead pyrophosphate is known to label the sites of an enzyme localisation. NO level in brain tissue was evaluated on the content of nitrites determined by Griss-Ilosvaja spectrophotometric method [4] with sulphonamide and N(1-naftylethylen) diaminhydrochloride. Deproteinisation was done with the following solution: 75 mmol/l $ZnSO_4$ and 55 mmol/l NaOH [24]. Calibrating diagram was built within the range of 10^{-7} to 10^{-6} g/ml of nitrite (1.43-14.3 μ mol/l).

Results and discussion

Referring to morphological and neurophysiological criteria one can find 3 stages or steps of the central effect of extreme cooling, which correspond to 3 levels of BBB permeability. At the 1st stage in a capillary endothelium there is observed the intensification of the processes of non-specific pinocytosis of all known

мозга оценивали по содержанию нитритов, которое определяли спектрофотометрически методом Грисса-Илосвая [4] с сульфонамидом и N(1-нафтилэтилен)диамингидрохлоридом. Депротеинизацию проводили раствором из 75 ммоль/л ZnSO₄ и 55 ммоль/л NaOH [24]. Калибровочный график строили в диапазоне от 10⁻⁷ до 10⁻⁶ г/мл нитрита (1,43-14,3 мкмоль/л).

Результаты и обсуждение

По морфологическим и нейрофизиологическим критериям можно условно выделить 3 этапа или стадии центрального действия экстремального охлаждения, которые отвечают 3 уровням проницаемости ГЭБ. На первом этапе в капиллярном эндотелии наблюдается усиление процессов неспецифического пиноцитоза всех известных видов и их комбинаций с соответствующими изменениями люминальной плазматической мембраны эндотелиоцитов (рис.1). Пероксидаза хрена, которая маркирует пиноцитоз, обнаруживается за базальной мембраной. Неспецифический пиноцитоз протекает параллельно с рецептор-индуцированным трансцитозом, о чем свидетельствует увеличение количества клатриновых везикул. Активация специфического и неспецифического трансцитоза приводит к повышению проницаемости ГЭБ [6, 20, 21, 25, 27]. При дальнейшем усилении процессов пиноцитоза (второй этап) реактивность сосудистого эндотелия повышается за счет значительных перестроек цитоскелетно-мембранных взаимодействий, сопровождающихся образованием больших кольцевидных выростов плазмолеммы, захватывающих агрегаты белков плазмы крови, а вместе с ними и вазоактивные вещества, которые могут связываться не только с мембранными, но и со свободными рецепторами плазмы. Наши данные подтверждают такую возможность, так как гистохимически аденилатциклазная активность была выявлена в кольцевидных выростах эндотелиоцитов (рис. 2), а системное введение адреналина имело ярко выраженное центральное действие – отрицательные кардиотропные эффекты, что свидетельствует о повышении проницаемости ГЭБ. На третьем этапе действия экстремального охлаждения проницаемость ГЭБ (по пероксидазе хрена и ЭКГ-критерию) отвечает норме (рис. 3). Однако ГЭБ как физиологическая система приходит в новое функциональное состояние. На ультраструктурном уровне наблюдаются перестройки клеток базального слоя. Отростки перицитов характеризуются значительной везикуляцией, гипертрофией комплекса Гольджи (рис. 4), образуют контакты с отростками и телами эндотелиоцитов, иногда синапсоподобной формы. Выявление интенсивной

types and their combinations with the corresponding changes of luminal plasmatic membrane in endotheliocytes (Fig.1). Horse reddish peroxidase, which is known to label pinocytosis is found behind the basal membrane. Non-specific pinocytosis appears in parallel with the receptor-induced transcytosis, testified by the increase of the amount of clatrine vesicles. Activation of specific and non-specific transcytosis results in an increase of BBB permeability [6, 20, 21, 25, 27]. At further intensification of pinocytosis processes (step 2) the reactivity of vascular endothelium increases due to considerable rearrangements of cytoskeleton-membrane interactions accompanied by the formation of large ring-like plasmolemma outgrowings, capturing the aggregates of blood plasm proteins, evolving also vasoactive substances, which may bind not only to membranous but also free plasm receptors. Our data approve such a possibility, as histochemically adenylate cyclase activity was found in endotheliocytes' ring-like outgrowings (Fig.2), and systemic adrenaline injection possessed a strongly manifested central effect: negative cardiotropic effects, that testifies to an increased BBB permeability. At the 3rd step of the effect of extreme cooling the BBB permeability (on horse reddish peroxidase and ECG criterion)

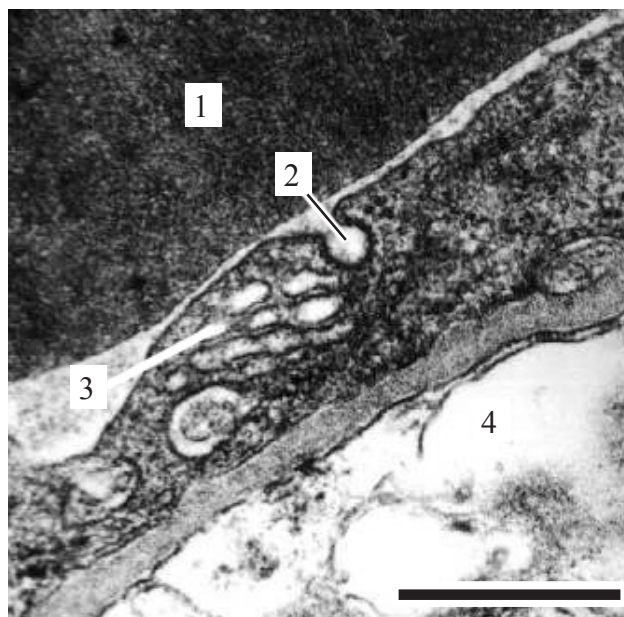


Рис. 1. Ультраструктура капиллярной стенки гипоталамуса крысы после экстремального охлаждения: 1 – эритроцит в просвете капилляра; 2 – формирование “опушенной” клатрином везикулы; 3 – комплекс пиноцитозных везикул; 4 – осмиофобные (гидратированные) концевые отростки астроцитов. Активация пиноцитоза. Масштабная линейка 0,5 мкм.

Fig. 1. Capillary wall ultrastructure of rat hypothalamus following the extreme cooling: 1 – erythrocyte in a capillary lumen; 2 – “fuzzied” vesicle formation with clatrine; 3 – complex of pinocytotic vesicles; 4 – osmiophobic (hydrated) terminal outgrowings of astrocytes. Activation of non-specific and receptor-induced pinocytosis. Scale bar 0,5 μm.

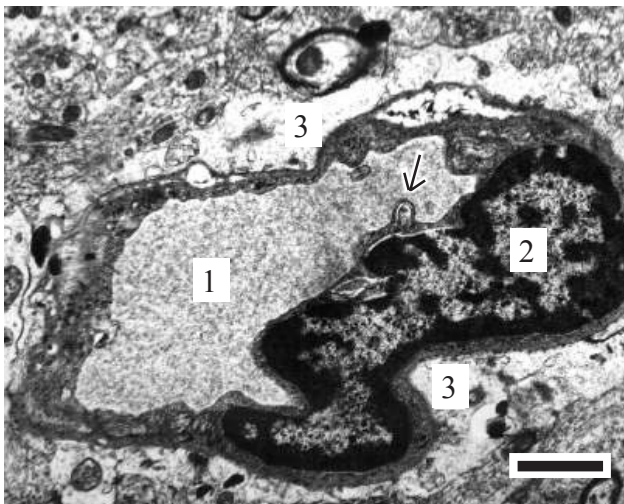


Рис. 2. Ультраструктура фрагмента капилляра гипоталамуса крысы после экстремального охлаждения: 1 – просвет капилляра; 2 – ядро эндотелиоцита; 3 – концевые отростки астроцитов. Формирование кольцевидных выростов эндотелиоцитов (стрелка). Масштабная линейка 1 μ m.

Fig. 2. Ultrastructure of rat hypothalamus capillary fragment following the extreme cooling: 1 – capillary lumen; 2 – endotheliocyte nucleus; 3 – terminal outgrowths of astrocytes. Formation of ring-like outgrowths of endotheliocytes (arrow). Scale bar 1 μ m.

аденилатциклазной активности в отростках перицитов может косвенно свидетельствовать об участии этих временных образований в захвате и экзоцитозе вазоактивных веществ в паренхиму мозга. По нашему мнению, такие ультраструктурные перестройки способствуют повышению адаптационных возможностей организма.

Вместе с тем надо заметить, что у 30% экспериментальных животных отмечались очаговые ультраструктурные нарушения в клетках, окружающих кровеносные капилляры. В ряде случаев наблюдались значительное обусловленное гидратацией просветление концевых отростков астроцитов, разрыхление базальных мембран, появление аутофагосом и апоптотических тел в перицитах и перикапиллярных астроцитах. Эти изменения мы склонны трактовать как адаптационные, но они могут иметь и предпатологический характер.

Известно, что функциональная активность сосудистого эндотелия регулируется не только гуморальными факторами, но и нейротрансмиссивными механизмами [9, 12, 22]. Установлено, что уже после первого сеанса экстремального охлаждения происходят определенные изменения субмикроскопической организации исследуемых областей гипоталамуса. У части нейронов синаптический аппарат находится в состоянии повышенного функционального напряжения, сопровождающегося перестройкой везикулярного

соответствует норме (Fig. 3). Однако BBB как физиологическая система переходит в новое функциональное состояние. На ультраструктурном уровне наблюдаются изменения базальной мембраны. Выросты перicyтов характеризуются сильной формированием везикул, гипертрофией комплекса Гольджи (Fig. 4), формируют контакты с выростами и телами эндотелиоцитов, иногда в виде синапсов. Выявление интенсивной аденилатциклазной активности в выросты перicyтов может косвенно свидетельствовать о участии этих временных образований в захвате и экзоцитозе вазоактивных веществ в паренхиму мозга. Мы считаем, что такие ультраструктурные изменения способствуют повышению адаптационных возможностей организма.

Мы также должны отметить, что у 30% экспериментальных животных были обнаружены очаговые ультраструктурные нарушения в капиллярах, окружающих клетки. В ряде случаев мы наблюдали сильное осветление терминальных выростов астроцитов, разрушение базальной мембраны, появление аутофагосом и апоптотических тел в перицитах и перикапиллярных астроцитах. Мы склонны считать эти изменения адаптационными, хотя они могут также иметь и предпатологический характер.

Функциональная активность сосудистой эпителии известна, что регулируется не только гуморальными факторами, но и нейротрансмиссивными механизмами [9, 12, 22]. Было обнаружено, что даже после первого экстремального охлаждения в исследуемых областях гипоталамуса происходят определенные изменения субмикроскопической организации. Синаптический аппарат в некоторых нейронах находится в состоянии повышенной

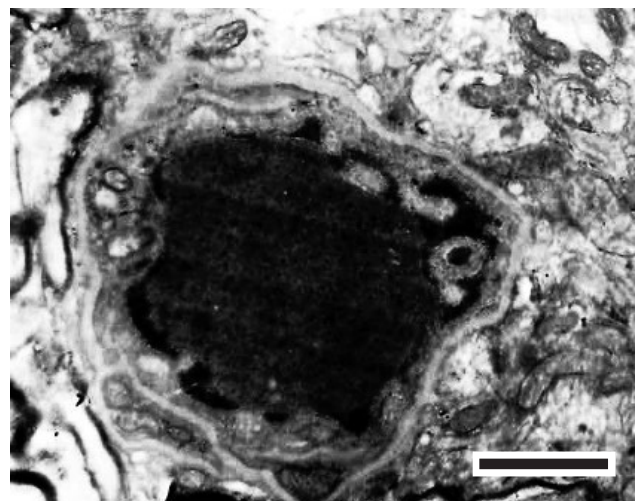


Рис.3. Ультраструктура капилляра гипоталамуса крысы в норме. Пероксидаза хрена заполняет просвет сосуда, не проникая в паренхиму мозга через структурные элементы ГЭБ. Масштабная линейка 1 μ m.

Fig. 3. Ultrastructure of rat hypothalamus capillary in norm. Horse reddish peroxidase fills in vascular lumen with no penetrating into brain parenchyma through structural BBB elements. Scale bar 1 μ m.

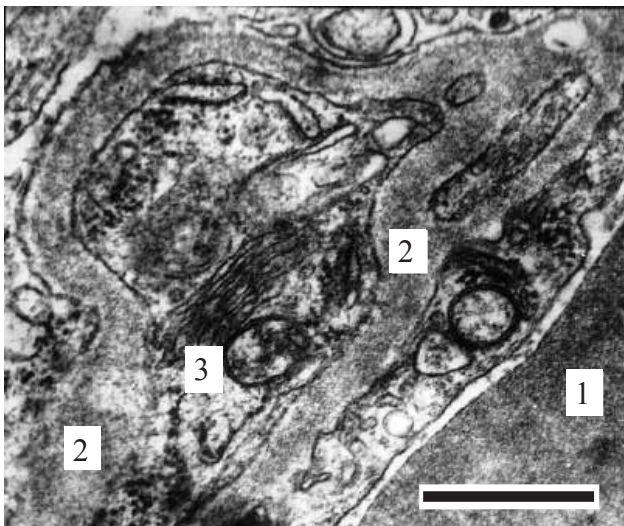


Рис. 4. Ультраструктура фрагмента капиллярной стенки с отростком перicyта из гипоталамуса крысы после экстремального охлаждения: 1 – эритроцит; 2 – базальная мембрана капилляра; 3 – комплекс Гольджи перicyта. Масштабная линейка 0,5 μm.

Fig. 4. Ultrastructure of capillary wall fragment with pericyte's outgrowing of rat hypothalamus following the extreme cooling: 1 – erythrocyte; 2 – basal membrane of a capillary; 3 – Golgi complex in pericyte. Scale bar 0,5 μm.

аппарата пресинаптических бутонов: везикулы агглютинируют между собой и сливаются с синаптической мембраной, увеличиваются длина и электронная плотность зон синаптических контактов, а также длина активной зоны (рис. 5). В постсинаптических областях образуются субповерхностные цистерны, характерные для явления долговременной потенциации.

Инициация процесса долговременной потенциации подтверждается и модельными электрофизиологическими исследованиями по ритмическому холодному раздражению периферического аппарата терморепреции. В этих условиях, как и при экстремальной криотерапии, не происходит общего охлаждения организма, однако наблюдается усиление сверхмедленной биоэлектрической активности в коре и гипоталамусе, в спектре которой доминирует квазисинусоидный секундный ритм; повышается пространственная синхронизация биоэлектрической активности неокортекса. Процессы долговременной потенциации поддерживаются ретроградными мессенджерами NO и CO [14, 15, 18, 28, 29]. Как свидетельствуют модельные нейрофизиологические опыты, существуют оптимальные для повышения проницаемости ГЭБ концентрации NO и CO. На максимумах проницаемости ГЭБ как блокаторы, так и активаторы NO-синтаз ведут к снижению проницаемости [6, 7]. В этой связи показательна оценка уровня NO по содержанию нитритов в мозге в условиях ритмической гипотермии (рис.6).

functional tension accompanied by the rearrangement of vesicular apparatus of pre-synaptic buds: vesicles agglutinate and fuse with synaptic membrane, the length and electron density of synaptic contact zones, as well as the length of active zone were noted to increase too (Fig. 5). In post-synaptic areas sub-superficial cisterns are formed, characteristic for the phenomenon of long-term potentiation.

Initiation of the process of long term potentiation is also approved by model electrophysiological investigations on rhythmic cold irritation of peripheric thermoreception apparatus. Under these conditions the same as at extreme cryotherapy, no general cooling of an organism occurs, but the intensification of overflow bioelectric activity in cortex and hypothalamus, in the spectrum of which a quasi sinusoid second rhythm dominates; a spatial synchronisation of neocortex bioelectric activity increases. The processes of long term potentiation are supported by retrograde NO and CO messengers [14, 15, 18, 28, 29]. As model neurophysiological experiments testify, there exist optimum NO and CO concentration to increase BBB permeability. In the maximums of BBB permeability both blockers and activators of NO synthases cause the permeability reduction [6, 7]. In this respect the estimation of the NO level is demonstrative in terms of nitrite content in brain under the conditions of rhythmic hypothermia (Fig. 6). The phenomenon of increase in the NO concentration oscillations of hypothalamus in the rhythm of BBB permeability dynamics and under extreme hypothermia regimens is thought to be quite possible. Electron-microscopic data obtained by us on lipofuscin, the final LPO product

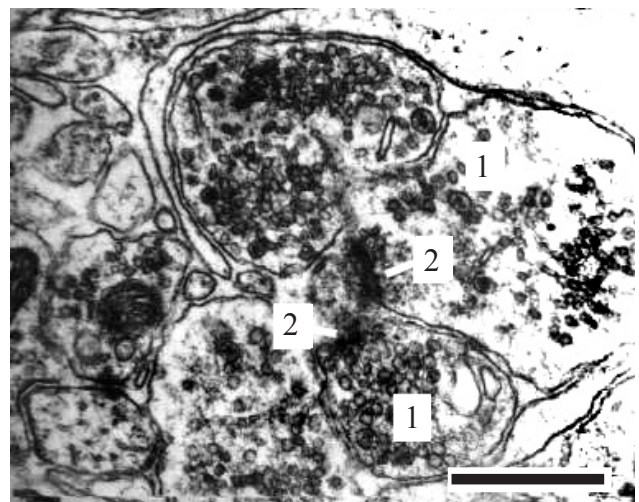


Рис.5. Активные синапсы в гипоталамусе крысы после их экстремального охлаждения: 1 – везикулы пресинаптических окончаний нейронов; 2 – активная зона синапсов. Масштабная линейка 0,5 μm.

Fig. 5. Active synapses in rat hypothalamus after their extreme cooling: 1 – vesicles of presynaptic neuron endings; 2 – active synapses zone. Scale bar 0,5 μm.

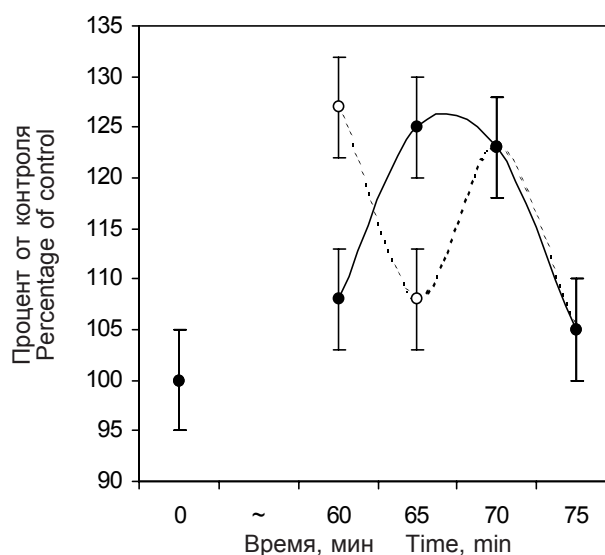
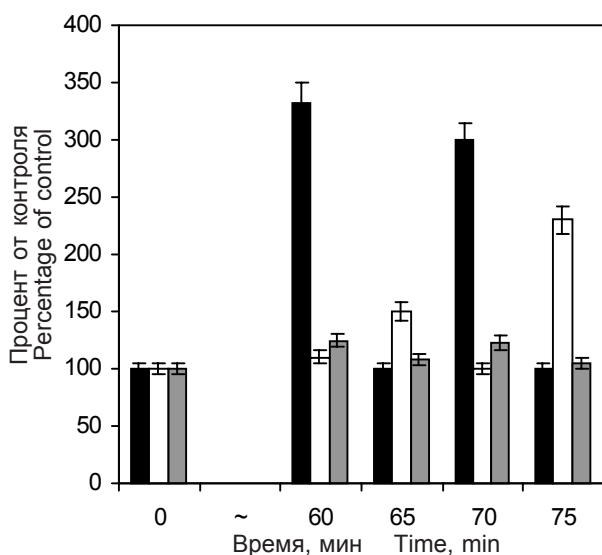


Рис. 6. NO-зависимые физиологические параметры сердечно-сосудистой и центральной нервной систем после ритмической гипотермии: 0 – контрольные параметры до охлаждения; ■ – коэффициент проницаемости ГЭБ для ³H-НА (контроль 0,07); □ – коэффициент проницаемости ГЭБ для ³H-АХ (контроль 0,06); ▨ – артериальное давление (контроль 120 мм рт.ст.); ○ – концентрация нитритов в мозге (контроль 6,8 мкМ/л); ● – концентрация нитритов в сердце (контроль 6,4 мкМ/л). Охлаждение прекращено на 60-й минуте.

Fig. 6. NO-dependent physiological parameters of cardiovascular and central nerve system in the dynamics of rhythmic hypothermia: 0 – control parameters prior to cooling; ■ – BBB permeability coefficient for ³H-NA (control – 0,07); □ – BBB permeability of ³H-AC (control – 0,06); ▨ – arterial pressure (control – 120 mm of mercurium column); ○ – nitrites concentration in brain (control – 6,8 μmol/l); ● – nitrites concentration in heart (control – 6,4 μmol/l). Cooling was terminated by the 60th minute.

Весьма вероятен феномен усиления колебаний концентрации NO гипоталамуса в ритме динамики проницаемости ГЭБ и при экстремальных режимах гипотермии. Об этом свидетельствуют полученные нами электронно-микроскопические данные (рис. 7) о накоплении в нейроглиальных комплексах гипоталамуса на разных этапах экстремального охлаждения липофусцина – конечного продукта перекисного окисления липидов, одним из ингибиторов которого является оксид азота, а индуктором – свободные радикалы [5, 8].

Мы считаем, что лечебное действие экстремальной криотерапии в ряде случаев может быть связано с модификацией процессов физиологического действия монооксидов азота и углерода. Недостаточный синтез оксида азота приводит к свободнорадикальному повреждению мембран, его избыточный синтез обуславливает апоптозную гибель клеток и лишь концентрация порядка нескольких наномолей оказывается оптимальной для процессов жизнедеятельности [1, 7, 10, 11, 13]. Снижение концентрации оксида азота является одним из механизмов старения организма, которое приводит к повышению риска развития артериальной гипертензии, атеросклероза, снижению противоопухолевой и противоинфекционной активности иммунной системы, к угнетению сексуальной функции [13, 21]. Ещё в 1992 году оксид азота был объявлен молекулой года, с тех

accumulation in neuroglial hypothalamus complexes at different extreme cooling stages, one of the inhibitors of which is nitric oxide, and free radicals are known to be its inductor, testify to this fact [5, 8].

We consider the medical effect of extreme cryotherapy to be related to the processes modification

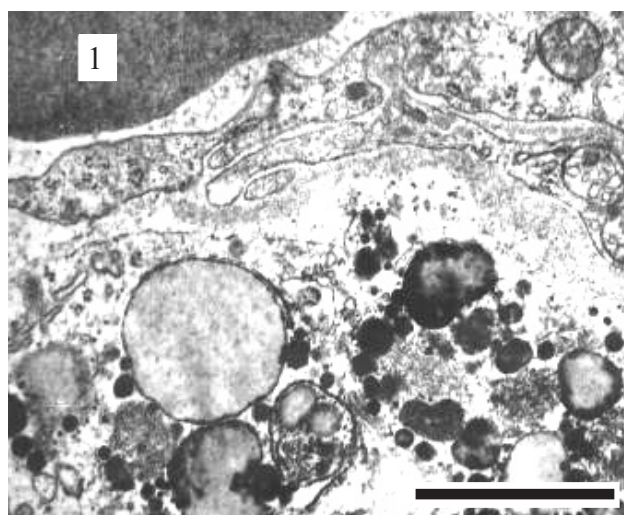


Рис. 7. Липофусциновые гранулы в цитоплазме перикапиллярного астроцита в гипоталамусе крысы после экстремального охлаждения: 1 – эритроцит в просвете капилляра. Масштабная линейка 1 μм.

Fig. 7. Lipofuscin granules in cytoplasm of pericapillary astrocyte in rat hypothalamus following the extreme cooling: 1 – erythrocyte in a capillary lumen. Scale bar 1 μm.

пор не уменьшается количество публикаций по его участию в физиологических, биохимических и патофизиологических процессах [7, 13, 23].

Выводы

Экстремальное охлаждение приводит к периодическому изменению функциональной активности ГЭБ, долгосрочной активации синаптического аппарата нейронов гипоталамуса, оптимизации содержания ретроградных мессенджеров, действие которых интегрируется на уровне цитолеммы и рецепторно-цитоскелетного комплекса эндотелиоцитов.

Литература

1. Башкатова В.Г., Вицкова Ю.Г., Наркевич В.Б. и др. Возможная роль оксида азота в патогенезе модельных судорожных состояний различной природы // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1998. – Т. 125, №1. – С. 26-29.
2. Боголепов Н.Н. Методы электронно-микроскопического исследования мозга. – М.: Изд. мед. ин-та им. И.М.Сеченова, 1976. – 187 с.
3. Булдакова С.Л., Дутова Е.А., Ивлев С.В. Вызванная температурой длительная потенциация в срезах гиппокампа // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. – 1993. – Т. 29, №4. – С. 364-370.
4. Ванханен В.Д., Суханова Г.А. Техника санитарно-гигиенических исследований. – Киев: Вища школа, 1983. – С. 236-237.
5. Марков Х.М. Окись азота и окись углерода – новый класс сигнальных молекул // Успехи физиолог. наук. – 1996. – Т. 27, №4. – С. 30-43.
6. Марченко В.С., Бабийчук Г.А., Шило А.В. и др. К механизмам регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера охлажденного мозга. Сообщение 3. Оксид азота (II) – один из триггеров проницаемости гематоэнцефалического барьера в структуре сверхмедленной управляющей системы организма? // Пробл. криобиологии. – 1995. – №3. – С. 10-19.
7. Раевский К.С. Оксид азота – новый физиологический мессенджер: возможная роль при патологии нервной системы // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1997. – Т. 123, №5. – С. 484-490.
8. Реутов В.П. Цикл окиси азота в организме млекопитающих // Успехи биол. наук. – 1995. – Т.35. – С. 189-228.
9. Ткаченко М.М. Оксид азота та судинна регуляція (огляд літератури) // Журн. АМН України. – 1997. – Т. 3, №2. – С. 241-254.
10. Шимановский Н.Л., Гуревич К.С. Роль оксида азота в механизмах действия лекарственных веществ // Международ. мед. журн. – 2000. – №1. – С. 104-107.
11. Воје К.М. Inhibition of nitric oxide synthase attenuates blood-brain barrier disruption during experimental meningitis // Brain Res. – 1996. – Vol. 720, N 1-2. – P. 75-83.
12. Busse R., Fleming I., Schini V. Nitric oxide formation in vascular wall: regulation and functional implications // The role of nitric oxide in physiology and pathophysiology. – Berlin-Heidelberg: Springer Verlag. – 1995. – P. 7-18.
13. Crow J., Beckman J. The role of peroxynitrite in nitric oxide – mediated toxicity // The role of nitric oxide in physiology and pathophysiology. – Berlin-Heidelberg: Springer Verlag, 1995. – P. 57-73.

in the physiological effect of nitrogen and carbon monoxides. The lack of nitric oxide synthesis causes free radical membrane damage, its surplus synthesis results in apoptotic cell death and only the concentration of some nanomoles was found to be the optimum for vital activity processes [1, 7, 10, 11, 13]. The fall of nitric oxide concentration is known to be one of the mechanisms of an organism aging, causing the risk increase for arterial hypertension, atherosclerosis, the decrease of antitumor and anti-infectious immune system activity, sexual function suppression [13, 21]. Even in 1992 nitric oxide was announced as the molecule of the year, since then the number of publications on its participation in physiological, biochemical and pathophysiological processes is high as well [7, 13, 23].

Conclusions

Extreme cooling was found to cause a periodic change of the BBB functional activity, long term activation of synaptic apparatus in hypothalamus neurons, optimisation of the content of retrograde messengers, which effect is integrated at the level of cytolemma and receptor-cytoskeletal complex of endotheliocytes.

References

1. Bashkatova V.G., Vitskova Yu.G., Narkevich V.B. et al. Probable role of nitric oxide in pathogenesis of model convulsive states of various origin // Byul. Experim. Biol. Med. – 1988. – Vol. 125, N1. – P. 26-29.
2. Bogolepov N.N. Methods for electron-microscopic brain investigation. – Moscow: Sechenov Medical Institute Edition, 1976. – 187 p.
3. Buldakova S.L., Dutova E.A., Ivlev S.V. Long-term temperature-induced potentiation in hippocampus sections // Zhurnal evolutsii biokhimii i fiziologii. – 1993. – Vol. 29, N4. – P. 364-370.
4. Vankhanen V.D., Sukhanova G.A. Methods for sanitary-hygienic investigations. – Kiev: Vyscha shkola, 1983. – P. 236-237.
5. Markov Kh.M. Nitric oxide and carbon oxide: the new class of signalling molecules // Uspekhi fiziolog. nauk. – 1996. – Vol. 27, N4. – P. 30-43.
6. Marchenko V.S., Babijchuk G.A., Shilo A.V. et al. On the mechanisms of regulation of blood brain barrier permeability of the cooled brain. Report III. Is nitric oxide one of the triggers of BBB permeability in the structure of the supraslow controlling system of the brain? // Problems of Cryobiology. – 1995. – N3. – P. 10-19.
7. Raevsky K.S. Nitric oxide as the new physiological messenger: probable role at nerve system pathology // Bul. Experim. Biol. Med. – 1997. – Vol. 123, N5. – P. 484-490.
8. Reutov V.P. Nitric oxide cycle in a mammal's organism // Uspekhi Biol. Nauk. – 1995. – Vol. 35. – P. 189-228.
9. Tkachenko M.M. Nitric oxide and vascular regulation (review) // Zhurnal AMN Ukrainy. – 1997. – Vol. 3, N2. – P. 241-254.
10. Shimanovsky N.L., Gurevich K.S. Nitric oxide role in effect mechanisms of medicines // International Medical Journal. – 2000. – N1. – P. 104-107.

14. Dawson T., Snyder S. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain // *J. Neurosci.* – 1994. – Vol. 14 (9). – P. 5147-5159.
15. Garthwaite J., Boulton C. Nitric oxide signaling in the central nervous system // *Annu. Rev. Physiol.* – 1995. – Vol. 57. – P. 683-706.
16. Graham R.C., Karnovsky M.J. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique // *J. Histochem. Cytochem.* – 1966. – N14. – P. 291-302.
17. Gerstberger R. Nitric oxide and body temperature control // *News Physiol. Sci.* – 1999. – Vol. 14. – P. 30-36.
18. Ingi T., Ronnett G.V. Direct demonstration of a physiological role for carbon monoxide in olfactory receptor neurons // *J. Neuroscience.* – 1995. – Vol. 15, N12. – P. 8214-8222.
19. Marchenko V.S. Neuronal gas (NO and CO) in the mechanisms of permeability of the blood-brain barrier of the cooled brain // *Problems of cryobiology.* – 1997. – N3. – P. 57-59.
20. Mayhan W.G. Role of nitric oxide in histamine-induced increases in permeability of the blood-brain barrier // *Brain res.* – 1996. – Vol. 743, N1-2. – P. 70-76.
21. Mayhan W.G. Role of nitric oxide in the blood-brain barrier during acute hypertension // *Brain Res.* – 1995. – Vol. 686, N1. – P. 99-103.
22. Miller R.D., Monsul N.T., Vender J.R., Lehmann J.C. NMDA and endothelin-1-induced increases in blood-brain barrier permeability quantitated with Lucifer yellow // *J. Neurol. Sci.* – 1996. – Vol. 136, N1-2. – P. 37-40.
23. Motterlini R., Hidalgo A., Sammut I., et al. A precursor of the nitric oxide donor SIN-1 modulates the stress protein heme oxygenase-1 in rat liver // *Biochem. Biophys. Research Commun.* – 1996. – Vol. 225. – P. 167-172.
24. Nakamura T., Ohyama Y., et al. Chronic blockade of nitric oxide synthesis increases urinary endothelin-1 excretion // *J. Hypert.* – 1992. – Vol. 15, N4. – P. 373-383.
25. Nag S. Role of the endothelial cytoskeleton in blood-brain-barrier permeability to protein // *Acta Neuropathol. (Berl.)* – 1995. – Vol. 90, N5. – P. 454-460.
26. Reik J., Petzold G.L., Higgins J.A., et al. Hormosensitive adenylyl cyclase: cytochemical localization in rat liver // *Science.* – 1970. – Vol. 168. – P. 382-384.
27. Shukla A., Dikshit M., Srimal R.C. Nitric oxide- dependent blood-brain barrier permeability alteration in the rat brain // *Experientia.* – 1996. – Vol. 52, N2. – P. 136-140.
28. Stevens C.F., Wang Y. Reversal of long-term potentiation by inhibitors of haem oxygenase // *Nature.* – 1993. – Vol. 364. – P. 147-148.
29. Zhuo M., Small S.A., Kandel E.R., Hawkins R.D. Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long-term synaptic enhancement in hippocampus // *Science.* – 1993. – Vol. 260. – P. 1946-1950.
11. Boje K.M. Inhibition of nitric oxide synthase attenuates blood-brain barrier disruption during experimental meningitis // *Brain Res.* – 1996. – Vol. 720, N 1-2. – P. 75-83.
12. Busse R., Fleming I., Schini V. Nitric oxide formation in vascular wall: regulation and functional implications // *The role of nitric oxide in physiology and pathophysiology.* – Berlin-Heidelberg: Springer Verlag. – 1995. – P. 7-18.
13. Crow J., Beckman J. The role of peroxynitrite in nitric oxide – mediated toxicity // *The role of nitric oxide in physiology and pathophysiology.* – Berlin-Heidelberg: Springer Verlag, 1995. – P. 57-73.
14. Dawson T., Snyder S. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain // *J. Neurosci.* – 1994. – Vol. 14(9). – P. 5147-5159.
15. Garthwaite J., Boulton C. Nitric oxide signaling in the central nervous system // *Annu. Rev. Physiol.* – 1995. – Vol. 57. – P. 683-706.
16. Graham R.C., Karnovsky M.J. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique // *J. Histochem. Cytochem.* – 1966. – N14. – P. 291-302.
17. Gerstberger R. Nitric oxide and body temperature control // *News Physiol. Sci.* – 1999. – Vol. 14. – P. 30-36.
18. Ingi T., Ronnett G.V. Direct demonstration of a physiological role for carbon monoxide in olfactory receptor neurons // *J. Neuroscience.* – 1995. – Vol. 15, N12. – P. 8214-8222.
19. Marchenko V.S. Neuronal gas (NO and CO) in the mechanisms of permeability of the blood-brain barrier of the cooled brain // *Problems of cryobiology.* – 1997. – N3. – P. 57-59.
20. Mayhan W.G. Role of nitric oxide in histamine-induced increases in permeability of the blood-brain barrier // *Brain res.* – 1996. – Vol. 743, N1-2. – P. 70-76.
21. Mayhan W.G. Role of nitric oxide in the blood-brain barrier during acute hypertension // *Brain Res.* – 1995. – Vol. 686, N1. – P. 99-103.
22. Miller R.D., Monsul N.T., Vender J.R., Lehmann J.C. NMDA and endothelin-1-induced increases in blood-brain barrier permeability quantitated with Lucifer yellow // *J. Neurol. Sci.* – 1996. – Vol. 136, N1-2. – P. 37-40.
23. Motterlini R., Hidalgo A., Sammut I., et al. A precursor of the nitric oxide donor SIN-1 modulates the stress protein heme oxygenase-1 in rat liver // *Biochem. Biophys. Research Commun.* – 1996. – Vol. 225. – P. 167-172.
24. Nakamura T., Ohyama Y., et al. Chronic blockade of nitric oxide synthesis increases urinary endothelin-1 excretion // *J. Hypert.* – 1992. – Vol. 15, N4. – P. 373-383.
25. Nag S. Role of the endothelial cytoskeleton in blood-brain-barrier permeability to protein // *Acta Neuropathol. (Berl.)* – 1995. – Vol. 90, N5. – P. 454-460.
26. Reik J., Petzold G.L., Higgins J.A., et al. Hormosensitive adenylyl cyclase: cytochemical localization in rat liver // *Science.* – 1970. – Vol. 168. – P. 382-384.
27. Shukla A., Dikshit M., Srimal R.C. Nitric oxide- dependent blood-brain barrier permeability alteration in the rat brain // *Experientia.* – 1996. – Vol. 52, N2. – P. 136-140.
28. Stevens C.F., Wang Y. Reversal of long-term potentiation by inhibitors of haem oxygenase // *Nature.* – 1993. – Vol. 364. – P. 147-148.
29. Zhuo M., Small S.A., Kandel E.R., Hawkins R.D. Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long-term synaptic enhancement in hippocampus // *Science.* – 1993. – Vol. 260. – P. 1946-1950.

Поступила 18.05.2004

Accepted in 18.05.2004