

УДК 57.043:57.084.1-615.832.96:616.71

Д.М. Пошелок*, Н.В. Дедух, С.В. Малышкина

Вплив охолодження та гіпотермії на структурно-метаболичні характеристики кістки (літературний огляд)

UDC 57.043:57.084.1-615.832.96:616.71

D.M. Poshelok*, N.V. Dedukh, S.V. Malyskina

Cooling and Hypothermia Effect on Structural and Metabolic Characteristics of Bone (Review)

Реферат: У роботі представлено загальні уявлення про гіпотермію та варіанти її класифікації. Проаналізовано результати досліджень щодо впливу гіпотермії на культивовані клітини (остеобласти та остеокласти), а також впливу холодової дії та різних режимів гіпотермії на структурно-метаболичні показники кістки.

Ключові слова: холодова дія, гіпотермія, культура остеогенних клітин, структурно-метаболичні особливості кістки.

Реферат: В работе приведены общие представления о гипотермии и варианты ее классификации. Проанализированы результаты исследований относительно влияния гипотермии на культивируемые клетки (остеобласты и остеокласты), а также влияния холодового действия и различных режимов гипотермии на структурно-метаболические показатели кости.

Ключевые слова: холодное воздействие, гипотермия, культура остеогенных клеток, структурно-метаболические особенности кости.

Abstract: The review presents the basic concept of hypothermia and its classifications. The findings of hypothermia effect on cultured cells (osteoblasts and osteoclasts) as well as the effect of cold stress and different regimens of hypothermia on structural and metabolic characteristics of bone were analyzed.

Key words: cold exposure, hypothermia, culture of osteogenic cells, structural and metabolic characteristics of bone.

Відомо, що фізіологічні та морфологічні зміни в організмі після дії холодового фактора залежать від його інтенсивності та тривалості [1, 5, 13, 14, 20, 35, 51]. У літературі наведено результати досліджень щодо впливу гіпотермії, яка викликана холодовою дією, на функцію головного мозку, периферичних нервів, імунної системи, а також на серцеву діяльність, кровообіг, вентиляцію легенів та стан шкіри [2, 11, 28, 29, 34, 40], проте питання щодо впливу гіпотермії на кісткову тканину вивчено недостатньо. У зв'язку з цим метою роботи було проаналізувати дані щодо структурно-функціональних особливостей кісткової тканини за умов гіпотермії на підставі аналізу наукової літератури.

Гіпотермія (від грецьк. *hypo* – «знизу», *therme* – «тепло») – патологічний стан організму, при якому внутрішня температура тіла для людини сягає 35°C і нижче, для тварини – 32°C і нижче внаслідок чого порушується обмін речовин та функціонування систем організму. Існує чимало класифікацій гіпотермії у людини [3, 25, 30, 41, 43, 44, 48]. Н.Е. Мишук [15] та J. Marx [45] залежно від показників температури тіла розрізняють гіпотермію: легку (32...

It has been known that physiological and morphological changes in body after cold effect depend on its intensity and duration [6, 18, 29, 30, 46, 50, 53]. In the literature there are presented the findings of hypothermia influence, associated with cold effect on function of brain, peripheral nerves, immune system, as well as heart function, blood circulation and effect on skin [7–9, 16, 25, 26]. However, impact of hypothermia on bone tissue has been poorly studied. Herewith, the research aim was to analyze the data on structural and functional characteristics of bone tissue under hypothermia effect based on an analysis of scientific publications.

Hypothermia (from Greek *hypo* – ‘below’, *therme* – ‘heat’) is a pathological state of an organism when the internal body temperature in human reaches 35°C or lower and in animal it is 32°C or lower, resulting in impaired metabolism and functioning of organism systems. There are many classifications of human hypothermia [4, 10, 11, 28, 32, 33, 38]. N.E. Mischuk [36] and J. Marx [34] depending on the indices of body temperature divide hypothermia into mild (32...35°C), moderate (28...32°C),

Інститут патології хребта та суглобів ім. С.Є. Сітенка, м. Харків, Україна

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Пушкінская, 80, м. Харків, Україна, 61024
тел.: (+38 057) 704-14-76
електронна пошта: denposhelok@gmail.com

Надійшла 05.02.2014

Прийнята до друку 22.09.2014

Проблеми кріобіології і кріомедицини. – 2014. – Т. 24, №4. – С. 279–291.
© 2014 Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

S.E. Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

*To whom correspondence should be addressed:

80, Pushkinskaya St., Kharkiv, Ukraine, 61024
tel.: +38 057 704 1476
e-mail: denposhelok@gmail.com

Received February, 05, 2014

Accepted September, 22, 2014

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2014. 24(4): 279–291.

© 2014 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

35°C), помірну (28...32°C), тяжку (20...28°C) і глибоку (менше 20°C). М.С. Безух [3] виділяє поверхневу (32...35°C), помірну (27...32°C) та глибоку (нижче 27°C) гіпотермію. К.-Р. Lee [41] класифікує гіпотермію на слабку (33...36°C), помірну (28...32°C), глибоку (10...20°C), абсолютну (5...10°C) та ультраабсолютну (0...5°C) М.Л. Mallet [43] – на легку (32...35°C) та тяжку (нижче 27...28°C).

Для класифікації гіпотермії у тварин використовують інші температурні параметри: 30...32°C – слабка, 22...25°C – помірна, нижче 22°C – тяжка [54].

За причинами розрізняють гіпотермію [42]: первинну – розвивається у здорових людей під впливом факторів зовнішнього середовища, старіння та фармакологічних препаратів, вторинну – виникає як ускладнення внаслідок захворювання [15, 43].

У проведеному М. Mallet [43] дослідженні пацієнтів із легкою гіпотермією зазначено, що 85% із них були старшими за 60 років. З віком температура тіла знижується з різних причин: здатності організму виробляти тепло [24], зниження активності термогенезу в бурій жировій тканині, звуження периферичних судин [32, 48], гальмування метаболічних процесів в організмі [46]. У людей похилого віку уповільнюються і процеси ремоделювання кісткової тканини з переважанням резорбції над кісткоутворенням, що супроводжується розвитком остеопенічних та остеопоротичних порушень [12, 20]. Аналогічні закономірності виявлено й у старих тварин [17, 18].

За умов старіння уповільнюється обмін речовин і енергії, що призводить до зниження адаптаційних можливостей організму. В першу чергу, це обумовлено змінами в процесі синтезу білків. Відбуваються порушення і в обміні вуглеводів та ліпідів, що пов'язано зі зміною активності певних ферментів і окислювальних процесів, а також накопиченням у тканинах перекисів ліпідів.

Обмін речовин знижується в результаті переохолодження, яке може призводити до розвитку гіпотермії [33, 43]. Доведено, що зниження температури тіла на 1°C супроводжується уповільненням загального метаболізму на 6% (визначено за показниками зменшення споживання кисню) [55] внаслідок спаду білкового, вуглеводного та ліпідного обміну. В умовах гіпотермії відмічено ослаблення і основного метаболізму [33, 43]. Спостерігається порушення дихальної функції крові, окислювальних процесів та кислотно-лужної рівноваги. Поєднання вказаних факторів (на фоні хронічної гіпотермії) призводить до змін регуляторних механізмів і може бути причиною патології органів і тканин, зокрема і тканин опорно-рухової системи. Так, встановлено, що загальна глибока гіпотермія (перебування щурів у спеціальній холодовій камері до зниження ректальної температури до 15°C) призводить до виражених

severe (20...28°C) and deep (below 20°C) ones. M.S. Bezukh [10] distinguishes surface (32...35°C), mode-rate (27...32°C) and deep (below 27°C) hypothermia. K.-R. Lee [33] divides hypothermia into weak (33...36°C), moderate (28...32°C), deep (10...20°C), absolute (5...10°C) and ultra absolute (0...5°C). M.L. Mallet [32] classifies mild (32...35°C) and severe hypothermia (below 27...28°C).

To classify a hypothermia in animals there are used other temperature parameters: weak (30...32°C), moderate (22...25°C), severe (below 22°C) [51].

According to the principles there are primary and secondary hypothermia [31]. Primary hypothermia develops in healthy people under the influence of environmental factors, aging, and pharmacological agents, secondary one occurs as a result of disease complications [32, 36].

In clinical study performed by M. Mallet [32] in the patients with mild hypothermia it has been emphasized that 85% of them were older than 60 years. With age, the body temperature reduces because of different reasons: an organism's ability to produce heat [3], decrease of thermogenesis activity in brown adipose tissue, peripheral vascular constriction [13, 38], inhibition of metabolic processes in an organism [37]. In older people the remodeling processes of bone tissue are inhibited with a predominance of resorption over osteogenesis, accompanied by the development of osteopenic and osteoporotic disorders [27, 50]. Similar regularities were found in aged animals [41, 42].

Aging is accompanied with an inhibition of metabolism and energy exchange, resulting in reduction of adaptive capabilities of an organism. This is primarily due to the changes in protein synthesis. There are disorders in metabolism of carbohydrates and lipids, associated with an activity change of certain enzymes and oxidative processes as well as the accumulation of lipid peroxides in tissues.

Metabolism is inhibited due to hypothermia, which can lead to the development of hypothermia [14, 32]. It has been established that reduction of body temperature by 1°C is accompanied by 6% slowdown of general metabolism (it is determined by reduced indices of oxygen consumption) [55], due to the decrease of protein, carbohydrate and lipid metabolism. Under hypothermia it has been noted the weakening of fasting metabolism [14, 32]. There is disruption of respiratory function of blood, oxidative processes and acid-base balance. The combination of these factors (on a background of chronic hypothermia) leads to the changes in regulatory mechanisms and can cause pathological changes in



структурно-метаболических повреждений как у клетках суставного хряща (пикноз ядер хондроцитов, лизис окремих ділянок цитоплазми, редукція ендоплазматичної сітки, апарату Гольджі, руйнація крист мітохондрій), так й у міжклітинному матриці (зміна складу протеогліканових комплексів, набряк та демаскування колагенових волокон) [8, 37].

На даний час дію гіпотермії на кісткову тканину досліджують у двох напрямках: на рівні організму, а також у культурі клітин (остеобластів і остеокластів), що дозволяє оцінити структурно-метаболическі особливості досліджуваного об'єкта без впливу ендогенних факторів організму.

Вплив гіпотермії на культивовані клітини

У культурі клітин можливо змодельовати дію температурних параметрів, які відповідають умовам гіпотермії, що спостерігається у людей та тварин.

Дію легкої (35,5°C) та помірної (34°C) гіпотермії досліджували на культивованих впродовж 14–16 днів остеобластах, виділених зі склепіння черепа новонароджених щурів, а також остеокластах, одержаних у культурі з остеокластформуючих моноцитів/макрофагів кісткового мозку мишей 6–8-тижневого віку [48]. Виявлено пригнічення проліферації та диференціації остеобластів при вказаних режимах гіпотермії. Кількість остеобластів у культурі після 14 днів культивування в умовах помірної гіпотермії (34°C) зменшилась на 30%. Крім того, знизився біосинтез лужної фосфатази, остеокальцину та колагену I типу. Формування кісткових вузликів остеобластами, культованими за температури 34°C впродовж 16 днів зменшилось на 95%, а за температури 35,5°C – на 75% у порівнянні з контрольною культурою (37°C). Відомо, що під впливом гіпотермії (32°C) у культурі фібробластів порушується мітичний цикл за рахунок подовження фази G1 [47]. J. Patel і співавт. [49] припускають, що іншим механізмом пригнічення проліферативної активності остеобластів може бути порушення функції рецепторів TRPV (Transient Receptor Potential Vanilloid) каналів, бо саме остеобласти експресують різні рецептори цих каналів (TRPV2 та TRPV4). Можливо, що TRPV канали є температурними сенсорами клітин [23], проте це припущення потребує подальшого вивчення.

У культурі остеобластів людини (лінії NHOst) досліджували дію короточасної (впродовж 12 годин) легкої (35°C) та тяжкої (27°C) гіпотермії (за класифікацією M.D. Aisha [25]). Встановлено, що після впливу легкої гіпотермії остеобласти залишаються життєздатними та біосинтетично активними, однак в них підвищується інтенсивність флуоресценції актинових волокон цитоскелета, які беруть

organs and tissues, including musculoskeletal tissues. Thus, it has been found that total deep hypothermia (exposure of rats to a special cold chamber to reduction of rectal temperature down to 15°C) leads to severe structural and metabolic disorders as in articular cartilage cells (pyknosis of chondrocytes nuclei, lysis of separate sections of cytoplasm, reduction of endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, mitochondria cristae destruction), and in the intercellular matrix (composition change of proteoglycan complexes, swelling and demasking collagen fibers) [17, 20].

Hypothermia effect on bone tissues has been currently examined in two ways: at the level of the body, and in cell culture (osteoblasts and osteoclasts) enabling to assess structural and metabolic peculiarities of investigated object without affecting endogenous factors of an organism.

Effect of hypothermia on cultured cells

In cell culture it is possible to simulate the effect of temperature parameters, which satisfy hypothermia conditions observed in humans and animals.

The effect of mild (35.5°C) and moderate (34°C) hypothermia was investigated for 14–16 days in cultured osteoblasts isolated from calvaria of newborn rats, and osteoclasts derived from the culture of osteoclast-forming monocytes/macrophages of bone marrow of 6–8 weeks old mice [38]. It was found an inhibition of proliferation and differentiation of osteoblasts under given regimens of hypothermia. The number of osteoblasts in culture after 14 days of culturing in moderate hypothermia (34°C) decreased by 30%. In addition, biosynthesis of alkaline phosphatase, osteocalcin and collagen of type-I decreased. Bone nodule formation by osteoblasts cultured at 34°C during 16 days decreased by 95% and at 35.5°C reduced by 75% if compared with the control culture (37°C). It is known that under hypothermia (32°C) in fibroblasts culture a mitotic cycle is disrupted by lengthening G1 phase [37]. J. Patel *et al.* [39] suggest that another mechanism of inhibition of osteoblasts' proliferative activity may be the dysfunction of TRPV receptors (Transient Receptor Potential Vanilloid) channels, whereas osteoblasts, in particular, express different receptors of these channels (TRPV2 and TRPV4). It is possible that TRPV channels are temperature sensors of cells [1], but this hypothesis requires further study.

In the culture of human osteoblasts (NHOst line) the effect of short-term (within 12 hours) mild (35°C) and severe (27°C) hypothermia (according to the classification of M.D. Aisha [4]) was investigated. It has been established that after exposure



участь у руховій активності клітин та клітинних органел. Після впливу на культивовані остеобласти тяжкої гіпотермії відмічено більш виражені (порівняно з дією помірної гіпотермії) зміни у структурі цитоскелета. Актинові волокна з інтенсивною флуоресценцією локалізувалися навколо ядра, а в нормі вони розташовуються рівномірно в цитоплазмі та виявляють незначну флуоресценцію. Змін у тубулінових структурах (мікротрубочки) практично не виявлено. Крім того, спостерігали зниження активності лужної фосфатази та остекальцину, а також експресії CD44 (поверхневого клітинного глікопротеїну, який відіграє важливу роль у адгезії та міграції клітин). Було встановлено, що збільшення терміну дії легкої гіпотермії до 24 годин призводило до появи апоптотичних клітин, кількість яких була на 3,54% більшою у порівнянні з контрольною культурою, проте остеобласти залишалися метаболічно активними [24]. В умовах тяжкої гіпотермії кількість апоптотичних клітин збільшилась на 13,2%, було зафіксовано зниження на 56,7% біосинтезу остеобластами білків.

Збільшення часу культивування остеобластів до 5 діб в умовах тяжкої гіпотермії (27°C) призводило до значного зниження експресії мРНК, яка кодує матриксний білок SPARC (*secreted protein acidic and rich in cysteine*). Він відіграє важливу роль у формуванні позаклітинного матриксу, а також у регуляції проліферації, адгезії та руховій активності остеобластів, що є важливою ланкою остеогенезу. За його участю відбувається збалансування процесів формування кістки та її резорбції [26]. За умов дії гіпотермії відмічено зниження експресії SPARC та проліферації клітин.

У випадку культивування впродовж 16 діб мононуклеарних попередників остеокластів на дисках зі слонової кістки з додаванням факторів, які стимулюють остеокластогенез, M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) і RANKL (*receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*), встановлено, що кількість остеокластів значно збільшується в культурах після дії легкої (35,5°C) і, особливо, помірної (34°C) гіпотермії порівняно з контрольною культурою (37°C) [48]. Збільшувалась також площа резорбції дисків, на яких культивували мононуклеарні попередники остеокластів, що свідчить про диференціацію та активацію остеокластів. Кількість остеокластів і лакун резорбції підвищилась у 1,5 рази (за температури 35,5°C) і у 2 рази (за температури 34°C) порівняно з контрольною культурою. На думку авторів, результати, одержані в культурі клітин, дозволяють припустити ймовірний негативний вплив гіпотермії на ремоделювання кістки у літніх людей через активізацію процесу резорбції.

На відміну від вищенаведених даних щодо активізації в умовах гіпотермії остеокластогенезу

of mild hypothermia the osteoblasts remain viable and biosynthetically active, however, the fluorescence intensity of actin fibers of cytoskeleton, involved in motor activity of cells and cell organelles increases. After exposure of severe hypothermia to cultured osteoblasts there were observed more expressed changes (if compared with the effect of moderate hypothermia) in the structure of cytoskeleton. Actin fibers with an intensive fluorescence are localized around the nucleus, but normally they are placed homogeneously in the cytoplasm and exhibit slight fluorescence. There were no changes in tubulin structures (microtubules). Moreover there was observed a decrease in alkaline phosphatase and osteocalcin activity as well as expression of CD44 (surface cell glycoprotein playing an important role in adhesion and cell migration). It was revealed that increasing the term of mild hypothermia effect up to 24 hours resulted in the appearance of apoptotic cells, which number was by 3.54% higher if compared with the control culture, herewith the osteoblasts remained metabolically active [3]. Under severe hypothermia the number of apoptotic cells increased by 13.2%, there was also observed a decrease by 56.7% of biosynthesis with osteoblast proteins.

Extending the culturing of osteoblasts up to 5 days under severe hypothermia (27°C) resulted in a significant reduction in mRNA, which encodes the matrix protein SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine). It plays an important role in formation of extracellular matrix, as well as in regulation of proliferation, adhesion and movement activity of osteoblasts, that is a significant part of osteogenesis. With its participation balancing the processes of bone formation and resorption occurs [2]. During hypothermia there was observed a reduction of SPARC expression and cell proliferation.

When culturing for 16 days mononuclear precursors of osteoclasts on ivory discs with the addition of the factors, stimulating osteoclastogenesis such as M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) and RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand), it was established that the number of osteoclasts significantly increased in the cultures after exposure of mild (35.5°C) and, in particular, moderate (34°C) hypothermia if compared with the control ones (37°C) [38]. There was also increased the surface of resorption discs on which mononuclear precursors of osteoclasts were cultured, testifying to differentiation and activation of osteoclasts. The number of osteoclasts and resorption lacunae increased in 1.5 times (at 35.5°C) and 2 times (at 34°C) if compared with the control culture. The authors believe that the results obtained in cell culture suggest a potential negative impact of hypo-



S. Meghji та співавт. встановили, що за умов культивування остеобластів (клітинна лінія остеобластів MG63) упродовж доби (за температури 33°C) відмічено підвищення біосинтезу остеопротегіну, в той час як експресія рецепторів RANKL залишалася на тому ж рівні, тобто створювалися умови для пригнічення активізації остеобластів [45].

Таким чином, результати досліджень, виконаних на культурі клітин, свідчать про вплив гіпотермії різної інтенсивності на клітини кістки, які беруть участь у її ремоделюванні (остеобласти та остеокласти). Розглянемо, яким чином гіпотермія діє на стан клітин (проліферативну активність, ультраструктурну організацію, особливості метаболізму) кістки на рівні організму, а також на структурну організацію матриксу кісткової тканини.

Вплив охолодження та гіпотермії на стан кісткової тканини

Механізм дії гіпотермії та низьких температур на кісткову тканину на сьогодні не розкритий. Існують дані про те, що в умовах впливу на організм різних видів стресу, в тому числі й холодого, відбувається активізація вільнорадикального окислення ліпідів [19, 21], що призводить до порушень гормональної регуляції, збільшення жорсткості мембран клітин, зменшення їх рухливості, посилення лабілізації лізосомальних мембран [9]. Це, у свою чергу, поглиблює стресорне ушкодження і може бути причиною деструктивних змін у кістковій тканині [6, 10]. Стан кісткової тканини визначали як за умов холодової дії (без визначення температури тіла), так і гіпотермії різних режимів (з визначенням температури тіла).

Так, структурно-метаболический стан та ремоделювання кісткової тканини досліджували в умовах дії слабкої гіпотермії, яка була змодельована перебуванням 6- та 24-місячних щурів у холодій камері (-20°C впродовж 5 діб по 5 годин/добу) [17, 18]. Виявлено, що після закінчення дії холодого фактора температура тіла у 6-місячних щурів становила 36,3°C, а у 24-місячних – 32,2°C (у нормі температура тіла тварин – 38,5 та 39,5°C). Це свідчить про гіпотермічний стан організму. Результати гістологічного та ультраструктурного аналізу отримали на 28-у добу після дії гіпотермії. Доведено, що гіпотермія негативно впливала на ультраструктурну організацію клітин кістки як молодих, так і старих щурів. Були виявлені численні остецити з пікнозом ядра та апоптотичні клітини. В остеобластах та остеоцитах спостерігали порушення структури гранулярної ендоплазматичної сітки (деструкція мембран, зменшення щільності рибосом), мітохондрій і структури ядра. Значно збільшувалась кількість лізосом у цитоплазмі клітин. Виражені деструктивні зміни

thermia on bone remodeling in older people due to the activation of resorption.

Contrary to above mentioned data as for activation of osteoclastogenesis under hypothermia S. Meghji *et al.* established that during culturing of osteoblasts (MG63 osteoblasts cell line) for a day at 33°C there was observed the increase of osteoprotegrin biosynthesis, while the expression of RANKL receptors remained at the same level *i.e.* the conditions for inhibiting the activation of osteoblasts were created [34].

Thus the results of research carried out in cell culture indicate hypothermic effect of various intensity on bone cells that are involved in its remodeling (osteoblasts and osteoclasts). Let us consider how hypothermia affects bone cells (proliferative activity, ultrastructural organization, metabolism peculiarities) in organism, on the structure of bone tissue matrix as well.

Effect of cooling and hypothermia on bone tissue

Nowadays the mechanism of hypothermia and low temperatures effects on bone tissue have not been completely understood. There are the data that during influence on organism of different types of stress, including cold, the activation of free radical oxidation of lipids [44, 49] occurs, resulting in disorders of hormonal regulation, increasing flexibility of cell membranes, reduction of their mobility, destruction of lysosomal membranes [23]. This, in turn, may be the cause of destructive changes in bone tissue [24, 54]. The bone tissue state was investigated under conditions of cold stress (without determination of body temperature) and hypothermia of various regimens (with determination of body temperature).

Thus, structural and metabolic state and remodeling bone tissue were studied under weak hypothermia, modeled by keeping 6- and 24-month-old rats in a cold chamber (-20°C for 5 days, 5 hours/day) [41, 42]. It was found that after the finish of cold effect the body temperature in 6-month-old rats was 36.3°C, and in 24-month-old ones it was 32.2°C (normal body temperature of animals is 38.5 and 39.5°C). This testifies to hypothermic state of an organism. The results of histological and ultrastructural analysis were obtained to the 28th day after hypothermia effect. Hypothermia has been proved to negatively affect the ultrastructural organization of bone cells of both young and old rats. There were revealed numerous osteocytes with nucleus pyknosis and apoptotic cells. In osteoblasts and osteocytes there were observed structure damages of granular endoplasmic reticulum (destruction of



відмічені у мітохондріях – набухання та лізис мітохондріальних мембран і крист на окремих ділянках. Ці порушення позначаються на енергетичному забезпеченні клітин, що є одним із механізмів їх деструкції та загибелі. Доведено, що гіпотермія негативно впливає на стан мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку, пригнічуючи їх проліферативну активність в умовах культивування і здатність утворювати клітинні колонії.

У компактній та губчастій кістці як молодих, так і старих щурів, виявлено значні деструктивні порушення: зменшення щільності остеоцитів на поверхні кісткових трабекул, розширення лакун остеоцитів, остеолізис, розшарування кісткового матриксу з демаскуванням колагенових волокон, тріщини та щілини. Значуще більшими деструктивні зміни були у кістковій тканині старих щурів. Аналіз морфометричних показників ремоделювання кісткової тканини показав, що гіпотермія вказаного режиму активізує остеокластогенез і пригнічує остеобластогенез, що призводить до переважання (особливо у старих щурів) резорбції кістки [17,18]

Досліджували вплив тривалої холодової дії (щурів протягом 14 та 30 діб утримували в кліматокамері з температурою -15°C по 3 години на добу) на мікроелементний (Mg, Ca, Al, P) склад матриксу стегнової кістки, при цьому температуру тіла тварин не контролювали [10]. За умов вказаної холодової дії встановлено порушення мінерального обміну у кістці: на 14-ту добу вміст Mg підвищився на 37,6%, а через 30 діб знизився на 4,8% від початкового, рівень Ca на 14-ту добу підвищився на 13,7%, а через 30 діб знизився на 12,6% відносно контрольних показників. Концентрація Al у цей строк була вищою на 3,2% за контрольні показники, а через 30 діб знизилася на 32,3%. Рівень P у кістці на 14 і 30-ту добу значно знизився (67,0 і 68,1% відповідно). Було зафіксовано зміну вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів. Через 14 діб після дії холоду на організм щурів відзначали значуще накопичення (в 1,68 раза більше порівняно з контролем) дієнових кон'югатів.

Подібне дослідження було проведено О.Ю. Шарповим і співавт. [22], які вивчали кількісні показники вмісту мікроелементів (Fe, Mg, Ca) у кістковій тканині черепа щурів після тривалої холодової дії. Дослідні тварини упродовж 14 та 30 діб по 3 години на добу перебували в кліматокамері, яка створює постійний режим охолодження -15°C за вологості навколишнього повітря від 70 до 80%. Автори, як і у попередньому дослідженні [10], також не вимірювали температуру тіла тварин.

Доведено, що тривалий холодний вплив значно збільшує концентрацію мікроелементів у кістковій тканині дослідних тварин порівняно з інтактною

membranes, reduction of density of ribosomes), mitochondria and nucleus structure. A number of lysosomes in cytoplasm was significantly increased. In mitochondria there were observed expressed destructive changes such as swelling and lysis of mitochondrial membranes and cristae in some areas. These disorders affect the energy supply of cells that is one of the mechanisms of their destruction and death. It is proved that hypothermia negatively affects the state of mesenchymal stromal bone marrow cells, inhibiting their proliferative activity during culturing and ability to form cell colonies.

In a compact and spongy bone of both young and aged rats strong disruptive disorders such as decrease of osteocytes density on the surface of bone trabeculae, osteocytes lacunae expand, osteolysis, fibering of bone matrix with collagen fibers retrieval, cracks and crevices were revealed. Destructive changes were significantly higher in bone tissue of old rats. Analysis of morphometric indices of bone tissue remodeling showed that hypothermia of the given regimen activated osteoclastogenesis and inhibited osteoblastogenesis, leading to the prevalence (especially in aged rats) of bone resorption [41, 42].

There was studied the effect of prolonged cold effect (the rats were maintained for 14 and 30 days in climate-chamber at -15°C for 3 hours a day) on microelement (Mg, Ca, Al, P) composition of thigh matrix, while the body temperature of animals was not controlled [24]. Under cold stress there was revealed a disturbance of mineral metabolism in bone: to the 14th day Mg content increased by 37.6%, and after 30 days it decreased by 4.8% from the initial one, Ca level to the 14th day increased by 13.7%, and after 30 days it decreased by 12.6% if compared with the control indices. The concentration of Al in this period was by 3.2% higher if compared with the control indices, and after 30 days the one decreased by 32.3%. The level of P in bone to the 14th and 30th day was significantly reduced (by 67.0 and 68.1%, respectively). There was revealed a change in the content of lipid peroxidation products. Significant accumulation of diene conjugates (in 1.68 times higher if compared with the control) was observed 14 days later cold exposure on rats.

A similar study was performed by O.Yu. Sharapov *et al.* [45] who studied the quantitative indices of microelement content (Fe, Mg, Ca) in bone tissue of rat cranium after long-term cold effect. The experimental animals during 14 and 30 days for 3 hrs were kept in climate chamber, which maintained a constant cooling regimen -15°C at humidity from 70 to 80%. The authors, as in the previous study [24] also did not measure the body temperature of animals.



групою. Так, на 14-ту добу концентрація Fe була вищою за показники початкового рівня ($164,47 \pm 0,77\%$) ($p < 0,01$), а на 30-у добу дещо знизилась і становила ($72,81 \pm 0,32\%$) у порівнянні з інтактними щурами ($p < 0,01$). Концентрація Mg на 14-ту добу була на ($34,54 \pm 2,48\%$) вищою ($p < 0,01$), а на 30-ту – на ($10,28 \pm 1,02\%$) нижчою ($p < 0,05$) за показники початкового рівня. В цей строк спостереження відзначали деяке підвищення концентрації Ca на ($12,45 \pm 1,66\%$) від вихідної ($p < 0,05$), а на 30-у добу – вірогідне її зниження на ($13,02 \pm 0,28\%$) у порівнянні з початковими показниками ($p < 0,01$).

У експериментальному дослідженні А. Riesenfeld [50] встановлено зменшення товщини кортикального шару довгих кісток щурів на 7-у добу після холодової дії (плавання тварин у холодній воді (8°C) по 10 хв протягом 10 діб). Пригнічення ростових процесів у епіфізарному хрящі внаслідок загибелі хондроцитів та руйнування епіфізів довгих кісток кролів під впливом холодової дії (охолодження кінцівки молодих кролів у етиловому спирті (96°) до 20 та 15°C) призвело до значущого зменшення довжини кінцівки [30].

В. Steinberg і співавт. [53] вивчали вплив холодового стресу через 7, 15, 21, 50 і 90 діб на стан стегнової кістки хом'яків, які перебували в холодовій камері при 5°C . Контрольних тварин утримували за температури 27°C . Гістоморфометричний аналіз показав, що після 90 діб холодового стресу відбуваються зміни структурної організації кісткової тканини: збільшення кількості резорбційних порожнин, заповнених остеобластами; розширення просвіту центральних каналів остевів; зменшення кількості остевів та площі кісткових трабекул. Зафіксовані зміни в кістковій тканині автори відносять до остеопоротичних порушень.

В умовах холодової дії досліджували і метаболічні зміни у кістковій тканині. В експерименті, проведеному Р. Patterson-Buckendahl і співавт. [49], щурів охолоджували (холодова камера -8°C) протягом 3-х тижнів (1,5 години на добу), після чого було зафіксовано зниження на ($21,8 \pm 1,4\%$) рівня остеокальцину в плазмі крові порівняно з контролем, що вказує на пригнічення біосинтетичної активності остеобластів та уповільнення перебудови матриксу кістки, оскільки синтезований остеобластами остеокальцин накопичується в органічному компоненті матриксу кістки.

У експерименті Т.П. Вавілова та співавт. спостерігали значуще зниження активності лужної фосфатази та вмісту анексіну V у пульпі зуба щурів, яких піддавали холодовій дії шляхом щоденного (10-хвилинного) занурення в холодну воду (4°C) протягом 30 діб у порівнянні з контрольними тваринами [4]. Автори припустили, що зменшення вмісту анек-

Long-term cold effect is established to significantly increase the concentration of microelements in bone tissue of experimental animals if compared with the intact group. So, to the 14th day Fe concentration was higher than initial indices ($164.47 \pm 0.77\%$) ($p < 0.01$), and to the 30th day it slightly decreased and made ($72.81 \pm 0.32\%$) if compared with the intact rats ($p < 0.01$). The concentration of Mg to the 14th day was in ($34.54 \pm 2.48\%$) higher ($p < 0.01$), and to the 30th day it was in ($10.28 \pm 1.02\%$) lower ($p < 0.05$) than initial indices. During observation a slight increase of Ca concentration by ($12.45 \pm 1.66\%$) from initial one ($p < 0.05$) was noted and to the 30th day there was statistically significant reduction by ($13.02 \pm 0.28\%$) if compared with initial indices ($p < 0.01$).

In experimental study of A. Riesenfeld [43] the reduction of cortical layer thickness of rat long bones to the 7th day after cold effect (swimming animals in cold water (8°C) for 10 min during 10 days) was established. Inhibition of growth processes in epiphyseal cartilage due to chondrocytes death and destruction in epiphysis of long bones of rabbits under cold stress (cooling limbs of young rabbits in ethanol (96°C) down to 20 and 15°C) resulted in a significant reduction of limb length [11].

В. Steinberg *et al.* [48] studied the effect of cold stress (staying in a cold chamber at 5°C) for 7, 15, 21, 50 and 90 days on a state of hamsters' thigh. Control animals were kept at 27°C . Histomorphometrical analysis showed that after 90 days of cold stress there were changes in structural organization of bone tissue: increased number of resorption cavities filled with osteoblasts; expansion of lumen of the central channels of osteones; decrease of osteones number and surface of bone trabeculae. The observed changes in bone tissue were referred by the authors to osteoporotic disorders.

Metabolic changes in bone tissue were studied under cold stress. In the experiment performed by P. Patterson-Buckendahl *et al.* [39] the rats were cooled (cold chamber -8°C) for 3 weeks (1.5 hours per day), and then there was revealed a decrease of osteocalcin by ($21.8 \pm 1.4\%$) in plasma if compared with the control, indicating the inhibition of biosynthetic activity of osteoblasts and deceleration of remodeling bone matrix whereas the synthesized osteocalcin by osteoblasts was accumulated in the organic component of bone matrix.

In the experiment T.P. Vavilov *et al.* observed a significant decrease of alkaline phosphatase activity and the content of V annexin in dental pulp of rats, which were exposed to cold stress by daily (10 minutes) immersion into cold water (4°C) for 30 days if compared with the control animals [52]. The au-

сину V у пульпі зуба може бути причиною пригнічення транспорту іонів Ca^{2+} та зниження рівня мінералізації. В дослідженні В.С. Пікалюка та співавт. [16] підтверджено той факт, що зменшення вмісту анексину V та лужної фосфатази призводить до уповільнення процесу мінералізації органічного матриксу кістки.

Поряд із дослідженнями, що виконувались на тваринах без патології, відомі роботи, у яких оцінювали дію гіпотермії в умовах індукованого порушення метаболізму кісткової тканини, а саме – остеопорозу. У тварин із експериментальним остеопорозом (шляхом овариоектомії як моделі постменопаузальних порушень у жінок) вивчали холодову дію (примусове плавання щурів у холодній воді (8°C) по 5 хв протягом 7 днів), на обмін кальцію та його виведення із кістки [38]. Доведено, що у щурів із остеопорозом, які зазнали холодової дії, значуще підвищується вміст у плазмі крові кортикостероїдів, тироксину й тиреотропного гормону порівняно як з контрольними, так і щурами з овариоектомією, яких не піддавали холодовій дії. Виявлено зниження (у середньому на 31,8% порівняно зі щурами з овариоектомією без холодової дії) транспорту Ca^{2+} через слизову оболонку кишечника, статистично значуще зниження активності лужної фосфатази та кальцій залежної АТФ-ази (Ca^{2+} -АТФ-ази). У плазмі крові дослідних щурів (після холодової дії) показники активності лужної фосфатази та концентрація Ca^{2+} були значуще вищими у порівнянні з контрольними щурами та щурами з овариоектомією без холодової дії. Автори роблять висновок про негативний вплив холодової дії на кісткову тканину в умовах дефіциту естрогенів [38].

Відомо, що підвищення рівня кальцію в крові супроводжується його накопиченням у клітинах організму. Згідно з гіпотезою Р. Ночачка [36] в умовах гіпотермії фактором, що дестабілізує метаболізм клітин і призводить до порушення її функції, є іонізований Ca^{2+} , який накопичується у цитозолі. Внаслідок відкриття вольтаж-залежних Ca^{2+} каналів та швидкого накопичення Ca^{2+} , що призводить до фосфоліпідного гідролізу мембран, відбувається незворотне ушкодження клітин [31, 52]. Вказаний механізм деструкції клітин може бути характерним і для клітин кістки, однак це припущення потребує додаткових досліджень.

Структурну організацію кістки та її метаболізм, а також транспорт кальцію і ферментів слизової оболонки кишечника (лужна фосфатаза та Ca^{2+} -АТФ-аза) вивчали у щурів з моделлю остеопорозу [38] в умовах холодової дії різної інтенсивності: помірної 15°C та тяжкої 4°C (за визначенням автора), змодельованої примусовим 5-хвилинним плаванням щурів у холодній воді протягом 7 днів [39]. Встанов-

thors suggested that the reduction of V annexin in a tooth pulp might be the cause of inhibition of Ca^{2+} ions transport and decrease of mineralization. In other study V.S. Pikalyuk *et al.* [40] confirmed the fact that reduction of V annexin and alkaline phosphatase resulted in bone organic matrix mineralization slowing down.

Along with the studies performed in the animals without pathology there are the reports, wherein the hypothermia effect under conditions of metabolic bone disease, namely, osteoporosis has been evaluated. In the animals with experimental osteoporosis (resulted from ovariectomy as a model of postmenopausal disorders in women) there was studied the effect of cold (forced swimming of rats in cold water (8°C) for 5 min during 7 days) on calcium metabolism and its removal of a bone [21]. It has been established that in the rats with osteoporosis exposed to cold stress the content of corticosteroids, thyroxine and thyroid-stimulating hormone in blood plasma significantly increased if compared with both control (intact) rats and the ones with ovariectomy, not exposed to cold stress. There was revealed a reduction (in average by 31.8% compared to the rats with ovariectomy without cold stress) of Ca^{2+} transport through intestinal mucosa and a statistically significant decrease of alkaline phosphatase activity and calcium dependent ATPase (Ca^{2+} -ATP-ase). In blood plasma of experimental rats (after cold effect) the indices of alkaline phosphatase and concentration of Ca^{2+} were significantly higher if compared with the control rats and the ones with ovariectomy without cold stress. The authors conclude about the negative impact of cold stress on bone tissue under conditions of estrogen deficiency [21].

It is known that calcium increase in blood is accompanied by its accumulation in cells of a body. According to the hypothesis of P. Hochachka [19] under hypothermia the factor destabilizing the cell metabolism and leading to impairment of its function is ionized Ca^{2+} , accumulating in cytosol. Due to the opening of voltage-dependent Ca^{2+} channels and rapid accumulation of Ca^{2+} the phospholipid hydrolysis of membranes and irreversible cell damage occur [12, 47]. The given mechanism of cell destruction may be characteristic for bone cells, but this hypothesis requires further research.

The structural organization of bone and its metabolism as well as transport of calcium and enzymes of intestinal mucosa (alkaline phosphatase and Ca^{2+} -ATP-ase) were studied in the rats with osteoporosis [21] under cold stress of various intensity: moderate 15°C and severe 4°C (as defined by the author), simulated with forced 5-min swimming of rats in cold water for 7 days [22]. It has been established that



лено, що помірна холодова дія суттєво не впливає на зазначені метаболічні показники експериментальних тварин. В умовах тяжкої холодової дії спостерігали значуще зменшення активності лужної фосфатази та Ca^{2+} -АТФ-ази порівняно з контролем (щурів з моделлю оваріоектомії, але без холодового стресу) та дослідними щурами після помірної холодової дії. Відмічено активізацію резорбційних процесів у кістковій тканині та зменшення мінеральної щільності кістки. На активізацію резорбції кістки також вказує значне підвищення в сечі показників екскреції фосфору та кальцію, а також відношення кальцію до креатиніну в порівнянні з контрольними тваринами.

Під впливом гіпотермії внаслідок холодової дії розвиваються не тільки морфологічні та метаболічні порушення в клітинах та матриксі кісткової тканини, а й ціла низка негативних змін у параосальних тканинах, що може впливати на стан кісткової тканини. Так, дослідженню мікроциркуляторного русла м'язової тканини у щурів за умов гіпотермії присвячена робота А.С. Дмитренко [7]. Гіпотермію моделювали шляхом одноразового утримання щурів у холодовій камері до зниження ректальної температури до 15°C . Через 1, 3 і 7 діб після дії гіпотермії було встановлено зменшення просвітів мікросудин і гемокапілярів м'язової тканини внаслідок набряку і вираженої деструкції ендотеліальних клітин. Автори припустили, що виявлені зміни в мікроциркуляторному руслі можуть впливати на стан кісткової тканини через розвиток у ній гіпоксії, оскільки мікроциркуляторне русло кістки підтримує парціальний тиск кисню у тканинній рідині та виконує функцію доставки живильних і регуляторних речовин до клітин. Відомо, що кісткоутворення може відбуватися тільки за наявності кисню, тобто деструктивні зміни в мікроциркуляторному руслі кістки супроводжуються порушенням процесу диференціації клітин-попередників у остеогенному напрямку, пригніченням метаболізму клітин кістки (остеоцитів, остеобластів), затримкою процесів регенерації кістки та порушенням процесів ремодельовання.

Гіпотермія може бути спричинена не тільки холодовою дією навколишнього середовища, але й дією деяких медикаментозних препаратів. При гіпотермії ($33,5^{\circ}\text{C}$), викликаній у мишей внутрішньочеревним введенням резерпіну протягом 4 діб, встановлено збільшення кількості мікронуклеарних клітин (діаметр ядра $< 1/4$ діаметра цитоплазми) у кістковому мозку [27]. Автори пов'язують зазначене явище з порушенням механізмів мітозу в клітинах. Встановлені зміни в клітинах кісткового мозку можуть спричинити зменшення кількості клітин-попередників остеобластів, що, в свою чергу, може призвести до пригнічення кісткоутворення.

moderate cold effect does not significantly affect these metabolic indices of experimental animals. Under severe cold effect there was observed a significant decrease of alkaline phosphatase and Ca^{2+} -ATP-ase activity if compared with the control (rats with osteoporosis, but without cold stress) and experimental rats after moderate cold effect. Activation of resorption processes in bone tissue and reduction of bone mineral density were revealed. A significant increase of phosphorus and calcium excretion indices in urine, as well as the ratio of calcium to creatinine if compared with the control animals indicates an activation of bone resorption.

Under hypothermia caused by cold effect, not only morphological and metabolic abnormalities in cells and matrix of bone tissue, but also a series of negative changes in paraosseous tissues develop, that can affect the bone tissue. Thus, the research of A.S. Dmitrenko is devoted to the study of microvasculature of muscle tissue in rats under hypothermia [15]. Hypothermia was modelled by a single maintenance of rats in chamber while decrease of rectal temperature down to 15°C . After 1, 3 and 7 days of hypothermia exposure there were found luminal occlusion of microcirculation vessels and hemocapillaries of muscle tissue due to swelling and expressed destruction of endothelial cells. The authors suggested that the found changes in microvasculature might affect the bone tissue state due to development of hypoxia in it, whereas microcirculatory bloodstream of bone maintained the partial pressure of oxygen in tissue fluid and supplied cells with nutrient and regulatory substances. It is known that bone formation may occur only in the presence of oxygen, *i.e.* destructive changes in microvasculature of bone are accompanied by disordered differentiation of precursor cells in osteogenic direction, inhibition of bone cell metabolism (osteocytes, osteoblasts) and delay of bone regeneration processes and defect of remodelling.

Hypothermia may be caused not only by environmental cold stress, but also effect of some medicines. When hypothermia ($33,5^{\circ}\text{C}$) induced in mice by intraperitoneal administration of reserpine for 4 days there was found an increase of micronuclear cells number (nucleus diameter $< 1/4$ of cytoplasm diameter) in a bone marrow [27]. The authors associate these facts with the defect of mitosis mechanisms in cells. The found changes in bone marrow cells can lead to reduction in the number of osteoblast precursor cells that, in turn, results in inhibiting the bone formation.

Thus, on the basis of the results of the presented studies of hypothermia effect on bone performed

Таким чином, на підставі результатів у представлених дослідженнях щодо дії гіпотермії на кісткову тканину, виконаних як у культурі клітин, так і на рівні організму, встановлено, що механізм дії гіпотермії складний. Гіпотермія впливає як безпосередньо на кістку – порушує її структурно-метаболичні характеристики, змінює мікроелементний склад і мінеральну щільність, так і опосередковано – провокує системні порушення в організмі (антиоксидантної системи, балансу гормонів, кровопостачання та ін.).

Під дією гіпотермії у кістковій тканині зафіксовані значні порушення ультраструктурної організації остеобластів, підвищення остеокластогенезу та зниження остеобластогенезу, що сприяє активізації резорбції кістки. Зниження остеобластогенезу може бути пов'язано зі зменшенням кількості стромальних клітин кісткового мозку, які можуть диференціюватися у остеогенному напрямку, та порушенням фаз мітозу в остеобластах. У клітинах кістки порушуються і метаболичні процеси. У остеобластах знижується біосинтез лужної фосфатази та остеокальцину, який є складовою частиною органічного матриксу кістки. Змінюється рівень мембранних глікопротеїдів, що відповідають за адгезію клітин, знижується вміст Ca^{2+} -АТФ-ази, що призводить до накопичення кальцію у клітинах та сприяє їх загибелі. Доведено чіткий зв'язок між зниженням біосинтезу остеопротегерину клітинами та підвищенням активності остеокластів. Проте у літературі практично не представлена інформація щодо особливостей структурних змін компактної та губчастої кістки, особливостей перебудови кісткового матриксу, ультраструктурної організації остеокластів та остеобластів, мікроциркуляторного русла кістки, клітин кісткового мозку. Не виявлено даних щодо дії гіпотермії на кісткову тканину тварин різного віку та її ремоделювання. Такі дослідження можуть бути корисними для попередження розвитку остеопорозу у людей похилого віку.

Отже, перспективним науковим напрямком є продовження досліджень впливу гіпотермії різних режимів на структурно-метаболичні показники кістки та розкриття механізмів порушення ремоделювання компактної та губчастої кістки за цих умов.

Література

1. Астаева М.Д., Абдуллаев В.Р., Кличханов Н.К. Влияние гипотермии на интенсивность окислительной модификации белков плазмы крови сусликов // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19, №3. – С. 254–260.
2. Бабийчук В.Г. Количественная оценка антиген-специфических клеток в крови человека после ритмических

both in cell culture, and at an organism level it has been found that the mechanism of hypothermia effect is complicated. Hypothermia affects both directly the bone, *i.e.* impairing structural and metabolic characteristics, changes the microelement composition and mineral density, and indirectly does by triggering systemic disorders in a body: antioxidant system, balance of hormones, blood supply, *etc.*

Under hypothermia in bone tissue there were revealed significant disorders of ultrastructural organization of osteoblasts, increase of osteoclastogenesis and decrease of osteoblastogenesis promoting activation of bone resorption. Reduction of osteoblastogenesis may be associated with a decrease in a number of bone marrow stromal cells which can differentiate towards osteogenesis and disordered mitosis phases in osteoblasts. Metabolic processes in bone cells are impaired. In osteoblasts the biosynthesis of alkaline phosphatase and osteocalcin, being a part of organic matrix of bone, reduces. The level of membrane glycoproteins responsible for cell adhesion changes, the content of Ca^{2+} -ATP-ase decreases, resulting in accumulation of calcium in cells and contributes to their death. A distinct link between osteoprotegrin biosynthesis decrease with cells and increase of osteoclasts' activity has been established. However, the literature does not provide an information on peculiarities of structural changes of compact and spongy bone, remodelling bone matrix, ultrastructural organization of osteocytes and osteoclasts, microvasculature of bone, bone marrow cells. There were no studies about hypothermia effect on bone tissue of animals of all the ages and its remodelling. These studies may be useful for preventing the development of osteoporosis in aged people.

Further study of hypothermia effect of different regimens on structural and metabolic indices of bone and revealing the defect mechanisms of the remodelling of compact and spongy bone under these conditions is a prospective research direction.

References

1. Abed E., Labelle D., Martineau C. et al. Expression of transient receptor potential (TRP) channels in human and murine osteoblast-like cells. *Mol Membr Bio.* 2009; 26: 146–158.
2. Aisha M.D., Nor-Ashikin M.N., Sharaniza A.B. The effects of hypo- and hyperthermia on sparc in normal human osteoblast cells. *Regenerative Research* 2012; 1(1): 62–65.
3. Aisha M.D., Nor-Ashikin M.N., Sharanisa R. et al. Moderate hypothermia induces growth arrest in normal human osteoblast cells but retained mitochondrial metabolism in vitro. *Bone (Abstracts)* 2013; (1): 192.



- холодовых воздействий // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19, №2. – С. 143–153.
3. Безух М.С. Нейровегетативная блокада и гипотермия в системе нейрохирургического лечения больных с травмой черепа и головного мозга: Дис. ... д-ра мед. наук. – Ленинград, 1982. – С. 437.
 4. Вавилова Т.П., Митронин А.В., Островская И.Г., Гаверова Ю.Г. Влияние эмоционально-холодового стресса на фосфорно-кальциевый обмен в пульпе зубов крыс // Российская стоматология. – 2008. – №1. – С. 12–14.
 5. Венцовская Е.А., Шило А.В., Бабийчук Г.А. Терморегуляция, сон и температурные воздействия // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т. 20, №4. – С. 363–378.
 6. Воронин Н.И., Кириченко В.И. Холодовое воздействие на живые организмы. Морфологические изменения в костной ткани // Сб. науч. тр. Травматология и ортопедия России. – СПб., 1995. – С. 19–21.
 7. Дмитренко А.С. Гісто-, ультраструктурні зміни гемомікроциркуляторного русла (ГМЦР) та скелетних м'язів у ранні терміни після дії загальної глибокої гіпотермії // Вісник морфології. – 2003. – Т. 9, №2. – С. 294–295.
 8. Дутчак У.М. Морфофункціональний стан суглобового хряща на висоті дії загальної глибокої гіпотермії // Вісник морфології. – 2003. – Т. 9, №2. – С. 229–230.
 9. Казначеев В.П., Куликов В.Ю., Колесникова Л.И. Антиокислительная активность крови у пришлого и коренного населения Крайнего Севера: Материалы Рос. науч. конф. «Механизмы адаптации человека на территории строительства БАМа». – Благовещенск: Вести, 1993. – С. 20–22.
 10. Киреев А.А. Регенерация костной ткани при холодовой травме в условиях лечения изотиорбаминотом: Автореф. дис. ... канд. мед. наук: спец. 14.00.22. – Якутск, 2006. – 21 с.
 11. Колінко Я.О. Стан провідникового апарату та мікроциркуляторного русла сидничного нерва щура на сьому добу після дії загальної глибокої гіпотермії // Укр. морфолог. альманах. – 2010. – Т. 8, №2. – С. 91–94.
 12. Корж Н.А., Поворознюк В.В., Дедух Н.В., Зупанец И.В. Остеопороз: эпидемиология, клиника, диагностика, профилактика и лечение. – Харьков: Золотые страницы, 2002. – 646 с.
 13. Ломако В.В., Самохіна Л.М. Вплив ритмічного охолодження на деякі етіологічні та біохімічні показники щурів з експериментальною депресією // Проблемы криобиологии. – 2011. – Т. 21, №1. – С. 22–33.
 14. Ломако В.В., Шило А.В. Влияние общего охлаждения на поведение крыс в открытом поле // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19, №4. – С. 421–430.
 15. Мищук Н.Е. Холодовая болезнь (гипотермия) // Медицина неотложных состояний. – 2006. – Т. 4, №5. – С. 42–47.
 16. Пикалюк В.С., Мостовой С.О. Современные представления о биологии и функции костной ткани // Таврический медико-биол. вестник. – 2006 – Т. 9, №3. – С. 186–194.
 17. Пошелок Д.М., Дедух Н.В., Малишкіна С.В. Влияние гипотермии на ремоделирование трабекулярной кости крыс: Сб. статей по материалам XXXIII международной научно-практической конференции «Современная медицина: актуальные вопросы». – Новосибирск, 2014 – Т. 7, №33. – С. 70–85.
 18. Пошелок Д.М., С.В. Малышкіна. Структурная организация компактной кости после общей гипотермии // Таврический медико-биологический вестник. – 2013. – Т. 16, №1. – С. 197–201.
 19. Тихонов В.И., Воронин Н.И., Грицун А.В. и др. Процессы липидного обмена в хрящевой ткани экспериментальных животных при холодовой адаптации и возбуждении периферических м-холинорецепторов // Дальневосточ. мед. журнал. – 2003. – №1. – С. 26–29.
 4. Aisha M.D., Nor-Ashikin M.N., Sharanisa R. et al. Normal human osteoblast cells exerts an adaptive effect towards moderate hypothermia by retaining bone metabolism and cellular function in vitro. Bone (Abstracts) 2013; (1): 193.
 5. Asanami S., Shimono K. Hypothermia induces micronuclei in mouse bone marrow cells. Mutat Res 1997; 393(1–2): 91–98.
 6. Astaeva M.D., Abdullaev V.P., Klichkhanov N.K. Influence of hypothermia on intensity of oxidative modification of ground squirrels' blood plasma proteins. Problems of Cryobiology 2009; 19(3): 254–260.
 7. Babijchuk V.G. Quantitative estimation of antigen-specific cells in human blood after rhythmic cold effect. Problems of Cryobiology 2009; 19(2): 143–153.
 8. Baylor K., Stecker M.M. Peripheral nerve at extreme low temperatures 2: pharmacologic modulation of temperature effects. Cryobiology 2009; 59 (1): 12–18.
 9. Bennet L., Roelfsema V., George S. et al. The effect of cerebral hypothermia on white and grey matter injury induced by severe hypoxia in preterm fetal sheep. J Physiol 2007; 578 (2): 491–506.
 10. Bezukh M.S. Neurovegetative blockade and hypothermia in the system of neurosurgical treatment of patients with head and brain injuries [dissertation]. Leningrad; 1982.
 11. Bierens de Haan B., Wexler M.R., Porat S. et al. The effects of cold upon bone growth: a preliminary study. Ann Plast Surg 1996; 16(6): 509–515.
 12. Boutilier R.G. Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. J Exp Biol 2001; 204(18): P. 3171–3181.
 13. Collins K.J., Exton Smith A.N., Dore C. Urban hypothermia: preferred temperature and thermal perception in old age. Br Med J 1989; 282: 175–177.
 14. Danzl D.F., Pozos R.S. Accidental hypothermia. N Engl J Med 1994; 331: 1756–1760.
 15. Dmytrenko A.S. Histo-, ultrastructural changes of hemomicrocirculatory system and skeletal muscles changes in the early period after general deep hypothermia. Visnyk Morfologii 2003; 2: 294–295.
 16. Duebener L.F., Hagino I., Sakamoto T. et al. Effects of pH management during deep hypothermic bypass on cerebral microcirculation: alpha-stat versus pH-stat. Circulation 2002; 106(12): 103–108.
 17. Dutschak U.M. Morphofunctional state of articular cartilage via the action of general deep hypothermia. Reports of Morphology 2003; 2: 229–230.
 18. Frink M., Flone S., van Griensven M. et al. Facts and fiction: the impact of hypothermia on molecular mechanism following major challenge [Electronic document]. Mediators of inflammation 2012: [web-site] <http://dx.doi.org/10.1155/2012/762840>.
 19. Hochachka P.W. Defense strategies against hypoxia and hypothermia. Science. 1986; 231 (4755):234–241.
 20. Hunter S., Timmermann S., Schachar N., Muldrew K. The effects of hypothermic storage on chondrocyte survival and apoptosis in human articular cartilage. Cell Preservation Technology 2006; 4(2): 82–87.
 21. Islam N., Chanda S., Ghosh T.K., Mitra C. Cold stress facilitates calcium mobilization from bone in an ovariectomized rat model of osteoporosis. Jpn J Physiol 1998; 48(1): 49–55.
 22. Islam M.N., Chanda S., Mitra C. Effects of different intensities of cold stress on certain physiological phenomena related to skeletal health in a hypogonadal rat model. J Physiology Pharmacology 2000; 51(4): 857–870.
 23. Kaznacheev V.P., Kulikov V.Yu., Kolesnikova L.I. The antioxidant activity of the blood at the alien and the native population of the Far North. Proceedings of Russian scientific conference 'Mechanisms of human adaptation in the territory of BAM'; Blagoveshchensk: Vesti; 1993. p. 20–22.
 24. Kireev A.A. Bone repair at cold trauma on the conditions of treatment with isothiorbamine [dissertation]. Yakutsk; 2006.

- 20.Ткач Г.Ф. Вікові особливості остеометричних показників скелета тварин в умовах впливу гіпергідратації організму // Укр. морфолог. альманах. – 2010. – Т. 8, №1. – С. 101–104.
- 21.Шабанов П.Д. Гипоксия и антигипоксанта // Вестник Рос. Военно-мед. академии. – 2003. – №1. – С. 111–121.
- 22.Шарапов О.Ю., Ионцев В.И., Лемещенко А.В., Парфенов Ю.А. Количественные показатели содержания некоторых микроэлементов в костях висцерального черепа крысы на фоне введения антиоксиданта // Фундамент. науки. – 2012. – №10. – С. 356–358.
23. Abed E., Labelle D., Martineau C. et al. Expression of transient receptor potential (TRP) channels in human and murine osteoblast-like cells // Mol. Membr. Biol. – 2009. – Vol. 26. – P. 146–158.
- 24.Aisha M.D., Nor-Ashikin M.N., Sharanisa R. et al. Moderate hypothermia induces growth arrest in normal human osteoblast cells but retained mitochondrial metabolism *in vitro* // Bone (Abstracts). – 2013. – №1. – P. 192.
- 25.Aisha M.D., Nor-Ashikin M.N., Sharanisa R. et al. Normal human osteoblast cells exerts an adaptive effect towards moderate hypothermia by retaining bone metabolism and cellular function *in vitro* // Bone (Abstracts). – 2013. – №1. – P. 193.
- 26.Aisha M.D., Nor-Ashikin M.N., Sharanisa A.B. The effects of hypo- and hyperthermia on sparc in normal human osteoblast cells // Regenerative Research. – 2012. – Vol. 1, №1. – P. 62–65.
- 27.Asanami S., Shimono K. Hypothermia induces micronuclei in mouse bone marrow cells // Mutat. Res. – 1997. – Vol. 393, №1–2. – P. 91–98.
- 28.Baylor K., Stecker M.M. Peripheral nerve at extreme low temperatures 2: pharmacologic modulation of temperature effects // Cryobiology. – 2009. – Vol. 59, №1. – P. 12–18.
- 29.Bennet L., Roelfsema V., George S. et al. The effect of cerebral hypothermia on white and grey matter injury induced by severe hypoxia in preterm fetal sheep // J. Physiol. – 2007. – Vol. 578, Pt. 2. – P. 491–506.
- 30.Bierens de Haan B., Wexler M.R., Porat S. et al. The effects of cold upon bone growth: a preliminary study // Ann. Plast. Surg. – 1996. – Vol. 16, №6. – P. 509–515.
- 31.Boutillier R.G. Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia // J. Exp. Biol. – 2001. – Vol. 204, №18. – P. 3171–3181.
- 32.Collins K.J., Exton Smith A.N., Dore C. Urban hypothermia: preferred temperature and thermal perception in old age // Br. Med. J. – 1989. – Vol. 282. – P. 175–177.
- 33.Danzl D.F., Pozos R.S. Accidental hypothermia // N. Engl. J. Med. – 1994. – Vol. 331. – P. 1756–1760.
- 34.Duebener L.F., Hagino I., Sakamoto T. et al. Effects of pH management during deep hypothermic bypass on cerebral microcirculation: alpha-stat versus pH-stat // Circulation. – 2002. – Vol. 106, №12, Suppl. 1. – P. 103–108.
- 35.Frink M., Flone S., van Griensven M. et al. Facts and fiction: the impact of hypothermia on molecular mechanism following major challenge [Electronic document] // Mediators of inflammation. – 2012. – [web-site] <http://dx.doi.org/10.1155/2012/762840>.
- 36.Hochachka P.W. Defense strategies against hypoxia and hypothermia // Science. – 1986. – Vol.231, №4755. – P. 234–241.
- 37.Hunter S., Timmermann S., Schachar N., Muldrew K. The effects of hypothermic storage on chondrocyte survival and apoptosis in human articular cartilage // Cell Preservation Technology. – 2006. – Vol. 4, №2. – P. 82–87.
- 38.Islam N., Chanda S., Ghosh T.K., Mitra C. Cold stress facilitates calcium mobilization from bone in an ovariectomized rat model of osteoporosis // Jpn. J. Physiol. – 1998. – Vol. 48, №1. – P. 49–55.
- 39.Islam M.N., Chanda S., Mitra C. Effects of different intensities of cold stress on certain physiological phenomena related to
- 25.Kolinko Ya. The state of explorer vehicle and hemomicrocirculatory bed of sciatic nerve of rat on seventh day after action of general deep hypothermia. Ukrainian Medical Almanac 2010; 8 (2): 91–94.
- 26.Kondratiev T.V., Myhre E.S., Simonsen O. et al. Cardiovascular effects of epinephrine during rewarming from hypothermia in an intact animal model. J Appl Physiol 2006; 100(2): 457–464.
- 27.Korz N.A., Povoroznyuk V.V., Diedukh N.V. Osteoporosis: epidemiology, clinical features, diagnosis, prevention and treatment. Kharkov: Zoloty strannitsy; 2002.
- 28.Lee K.-R., Chung S.-P., Park I.-C., Kim S.-H. Effect of induced and spontaneous hypothermia on survival time of uncontrolled hemorrhagic shock rat model. Yonsei Medical Journal 2002; (4): 511–517.
29. Lomako V.V., Samokhina L.M. Effect of rhythmic cooling on some ethological and biochemical indices in rats with experimental depression. Problems of Cryobiology 2011; 21(1): 22–33.
- 30.Lomako V.V., Shilo A.V. Effect of general cooling on rat behaviour in 'open field' test. Problems of Cryobiology 2009; 19(4): 421–430.
- 31.Long W.B., Edlich R.F., Winters K.L., Britt L.D. Cold injuries. J Long Term Eff Med Implants 2005; 15(1): 67–78.
- 32.Mallet M.L. Pathophysiology of accidental hypothermia. QJM 2002; 95(12): 775–785.
- 33.Marx J., Hockberger R., Walls R. Rosen's emergency: concepts and clinical practice. Mosby; 2002.
- 34.Meghji S., Maddi A., Vinayahah G.. Osteoblasts respond to mild-heat stress by change in OPG/RANKL ratio. J Bone Min Res 2006; 3(3): 1155–1158.
- 35.Meunier N., Beattie J., Ciarapica D. et al Basal metabolic rate and thyroid hormones of late-middle-aged and older human subjects. Eur J Clinical Nutrition 2005; 59(Suppl. 1, 2): 53–57.
- 36.Mishchuk N.E. Cold diseases (hypothermia). Meditsina neotlozhnykh sostoyanii 2006; 4(5): 42–47.
- 37.Nishiyama H., Itoh K., Kaneko Y. et al. A glycine-rich RNA-binding protein mediating cold-inducible suppression of mammalian cell growth. J Cell Biol. 1997; 137: 899–908.
- 38.Patel J.J., Utting J.C., Key M.L. et al. Hypothermia inhibits osteoblast differentiation and bone formation but stimulates osteoclastogenesis. Exp Cell Res 2012; 318(17): 2237–2244.
- 39.Patterson-Buckendahl P., Kvetnansky R., Fukuhara K. et al. Regulation of plasma osteocalcin by corticosterone and norepinephrine during restraint stress. Bone 1995; 17(5): 467–472.
- 40.Pikaljuk V.S., Mostovoy V.S., Mostovoy S.O. Modern understanding of the biology and function of bone. Tavricheskiy Mediko-Biologicheskii Vestnik 2006; 9(3): 186–194.
- 41.Poshelok D., Dedukh N., Malysheva S. Effect of hypothermia on rat trabecular bone remodeling. Proceedings of XXXIII Scientific and Practical Conference 'Future medicine: actual questions'; Novosibirsk, 2014; 7(33): 70–85.
- 42.Poshelok D., Malysheva S. Structural organization of compact bone after general hypothermia. Tavricheskiy Mediko-Biologicheskii Vestnik 2013; 16(1): 197–201.
- 43.Riesenfeld A. Compact bone changes in cold-exposed rats. Am J Phys Anthropol 1982; 4: 111–112.
- 44.Shabanov P.D. Hypoxia and antihypoxants. Vestnik Rossiiskoy Voenno-Meditsinskoy Akademii 2003; (1): 111–121.
- 45.Sharapov O.Y., Iontsev V.I., Lemeschenko A.V., Parfonov J.A. Quantitative indices of some trace elements in skull bone vis-ceral rats at introduction of antioxidants. Fundamental Researches 2012; (10): 356–358.
- 46.Sieber R. Akzidentelle hypothermie. Schweiz Med Forum 2006; 6: 939–944.
- 47.Stefanovich P., Ezzel R.M., Sheehan S.J. et al. Effects of hypothermia on the function, membrane integrity and cytoskeletal structure of hepatocytes. Cryobiology 1995; 32: 389–403.



- skeletal health in a hypogonadal rat model // *J. Physiology Pharmacology*. – 2000. – Vol. 51, №4. – P. 857–870.
40. Kondratiev T.V., Myhre E.S., Simonsen O. et al. Cardiovascular effects of epinephrine during rewarming from hypothermia in an intact animal model // *J. Appl. Physiol.* – 2006. – Vol. 100, №2. – P. 457–464.
 41. Lee K.-R., Chung S.-P., Park I.-C., Kim S.-H. Effect of induced and spontaneous hypothermia on survival time of uncontrolled hemorrhagic shock rat model // *Yonsei Medical Journal*. – 2002. – №4. – P. 511–517.
 42. Long W.B., Edlich R.F., Winters K.L., Britt L.D. Cold injuries // *J. Long Term Eff. Med. Implants*. – 2005. – Vol. 15, N1. – P. 67–78.
 43. Mallet M.L. Pathophysiology of accidental hypothermia // *QJM*. – 2002. – Vol. 95, №12. – P. 775–785.
 44. Marx J., Hockberger R., Walls R. Rosen's emergency: concepts and clinical practice. – Mosby, 2002. – 2766 p.
 45. Meghji S., Maddi A., Vinayahah G.. Osteoblasts respond to mild-heat stress by change in OPG/RANKL ratio // *J. Bone Min. Res.* – 2006. – Vol. 3, №3. – P. 1155–1158.
 46. Meunier N., Beattie J., Ciarapica D. et al Basal metabolic rate and thyroid hormones of late-middle-aged and older human subjects // *Eur. J. Clinical Nutrition*. – 2005. – Vol. 59, Supp. 1, 2. – P. 53–57.
 47. Nishiyama H., Itoh K., Kaneko Y. et al. A glycine-rich RNA-binding protein mediating cold-inducible suppression of mammalian cell growth // *J. Cell Biol.* – 1997. – Vol. 137. – P. 899–908.
 48. Patel J.J., Utting J.C., Key M.L. et al. Hypothermia inhibits osteoblast differentiation and bone formation but stimulates osteoclastogenesis // *Exp Cell Res.* – 2012. – Vol. 318, №17. – P. 2237–2244.
 49. Patterson-Buckendahl P., Kvetnansky R., Fukuhara K. et al. Regulation of plasma osteocalcin by corticosterone and norepinephrine during restraint stress // *Bone*. – 1995. – Vol. 17, №5. – P. 467–472.
 50. Riesenfeld A. Compact bone changes in cold-exposed rats // *Am. J. Phys. Anthropol.* – 1982. – Vol. 4. – P. 111–112.
 51. Sieber R. Akzidentelle hypothermie // *Schweiz Med Forum*. – 2006. – Vol. 6. – P. 939–944.
 52. Stefanovich P., Ezzel R.M., Sheehan S.J. et al. Effects of hypothermia on the function, membrane integrity and cytoskeletal structure of hepatocytes // *Cryobiology*. – 1995. – Vol. 32. – P. 389–403.
 53. Steinberg B., Singh I., Mitchel O. The effects of cold-stress, hibernation and prolonged inactivity on bone dynamics in the golden hamster // *J. Morphology*. – 1981. – Vol. 167, №1. – P. 43–51.
 54. Tuli J.S., Gilbert R.C. Hypothermia in animals [Electronic document] // [web site]: [<http://www.hypothermia.org/animalhypo.htm>] accessed 25.01.2009).
 55. Wong K.C. Physiology and pharmacology of hypothermia // *West J. Med* 1983; 138: 227–232.
 48. Steinberg B., Singh I., Mitchel O. The effects of cold-stress, hibernation and prolonged inactivity on bone dynamics in the golden hamster. *J Morphology* 1981; 167(1): 43–51.
 49. Tikhanov V.I., Voronin N.I., Gritsun A.V. et al. Lipid metabolism in cartilage tissue of experimental animals and excitement of peripheral muscarinic receptors in the period of cold exposure. *Dalnevostochnyi Meditsinskii Jurnal*. 2003; (1): 26–29.
 50. Tkach G.F. The age changes of the osteometric dates of animals skeleton under the overhydration. *Ukrainian Medical Almanac* 2010; 8(1): 101–104.
 51. Tuli J.S., Gilbert R.C. Hypothermia in animals [Electronic document]: [web site]: <http://www.hypothermia.org/animalhypo.htm> Accessed on 25 January 2009
 52. Vavilova T.P., Mitronin A.V., Ostrovskaia I.G., Gaverova Iu.G. The influence of emotional-cold stress on phosphorous and calcium metabolism in the pulp of rat teeth. *Rossijskaia Stomatologija* 2008; (1): 12–14.
 53. Ventskovska O.A., Shylo O.V., Babychuk G.O. Thermoregulation, sleep and temperature influences. *Problems of Cryobiology* 2010; 20(4): 363–378.
 54. Voronin N.I., Kirichenko V.I. Cold exposure on living organisms. Morphological changes of bone tissue. *Collection of Scientific Papers Traumatology and Orthopedics of Russia* 1995: 19–21.
 55. Wong K.C. Physiology and pharmacology of hypothermia. *West J Med* 1983; 138: 227–232.

