

**К концепции экзистоэнцефалической системы охлажденного мозга**  
**Часть 4. Фрактальная морфометрия триггерных структур терморегуляции**  
**при холодовом стрессе**

Г.А. БАБИЙЧУК, В.С. МАРЧЕНКО, В.И. ГРИШЕНКО, В.Г. БАБИЙЧУК  
*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

**To the Conception of Existencecephalic System of Cooled Brain**  
**Part 4. Fractal Morphometry of Trigger Structures of Thermoregulation**  
**at Cold Stress**

БАБИЙЧУК G.A., MARCHENKO V.S., GRISCHENKO V.I., БАБИЙЧУК V.G.  
*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy*  
*of Sciences of the Ukraine, Kharkov*

Для оценки структурно-функционального состояния нейрогуморальной системы охлажденного мозга предложен метод фрактальной морфометрии с применением разработанной авторами компьютерной системы анализа FRAM 2000. Показано, что фрактальную размерность можно использовать в качестве интегрального показателя активности различных функциональных систем организма.

Для оцінки структурно-функціонального стану нейрогуморальної системи охолодженого мозку пропонується метод фрактальної морфометрії з використанням розробленої авторами комп'ютерної системи аналізу FRAM 2000. Показано, що фрактальну розмірність можна застосовувати як інтегральний показник активності різних функціональних систем організму.

To estimate structural and functional state of neurohumoral system of cooled brain there has been proposed the method of fractal morphometry using elaborated by the authors computer analysis system FRAM 2000. It was shown that fractal dimensions could be used as an integral index of the activity of various functional systems in an organism.

В настоящее время классические представления об общем адаптационном синдроме активно трансформируются, например, в концепцию эмоционального стресса, и все чаще рассматриваются с позиций теории функциональных систем, как разветвленная системная реакция организма [7, 9]. В связи с этим, приобрел былую актуальность вопрос о триггерных механизмах стресса. Если по Селье [7] процессы запуска стрессовых реакций лежат на оси гипоталамус - гипофиз - кора надпочечников, то научные положения об эмоциональном стрессе заставляют искать их в плоскости лимбико-ретикулярных структур мозга [9]. Мы считаем, что пусковым звеном в механизмах общего адаптационного синдрома является гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). В свою очередь, изменения проницаемости ГЭБ могут быть инициированы как мозгом, так и кровью, центром или периферией, в зависимости от силы и/или характера стрессора. Но ГЭБ, традиционно понимаемый как сложно организованный барьер, не может обеспечить триггерные функции в полном объеме. Обобщение понятий о ГЭБ и медленной управляющей системе во взаимодействии с терморегуляторными, иммунооксигеназными, биоэлектрическими и другими процессами привело нас к представлениям об экзистоэнцефалической системе (ЭЭС), как единой защитной системе мозга [5, 6]. Основная функция ЭЭС заключается в раскочке установочных точек

Nowadays the classic notion on general adaptation syndrome is actively transformed, for example, into the conception of emotional stress and is mostly considered from the positions of the theory of functional systems as the branched systemic reaction of an organism [7, 9]. In this connection the question on trigger stress mechanisms gained the former actuality. If according to Selye [7] the processes for triggering stress reactions are located on the axis of hypothalamus-hypophysis-adrenal cortex, the scientific regulations on emotional stress make to search them in the plane of limbic and reticular brain structures [9]. We believe, that a trigger link in the mechanism of general adaptation syndrome is blood brain barrier (BBB). The changes in BBB permeability, in their turn, can be initiated by both brain and blood, by the center or periphery depending on the force and/or stressor character. However, the BBB, traditionally considered as a barrier of complicated organisation can not provide the trigger functions in a whole volume. The summarising of the BBB notion and a slow operating system in the interaction with thermoregulatory, immune oxygenase, bioelectric and other processes resulted us to the ideas on existencecephalic system (EES) as the unified brain protective system [5, 6]. The EES main function consists in the swinging of the set points of homeostasis at the stress of different, but firstly temperature genesis and the organism transfer to the new, often hypometabolic level of functioning. Namely the EES activation is an initial process of

гомеостаза при стрессе разного, но в первую очередь температурного генеза и переводе организма на новый, часто гипометаболический уровень функционирования. Именно активация ЭЭС является первичным процессом конфликтных ситуаций, однако “инициаторы” включения триггерных механизмов могут быть по разные стороны ГЭБ (со стороны крови – при чрезмерных воздействиях, или мозга – при более слабых, но систематически действующих стрессорах). Очевидно, в первом случае преимущественно реализуются экстренные защитные функции ЭЭС, а вторым, возможно, связаны гипометаболические состояния, сопровождающие естественный или наркотический сон, зимнюю спячку или адаптационные реакции при искусственной гипотермии. Зная, что в конкретной физиологической ситуации присутствуют оба “сценария”, сложным образом сменяя и дополняя друг друга, мы попытались вычленивать каждую составляющую, используя разные экспериментальные модели (краниocereбральную гипотермию (КЦГ) – для выявления влияния периферии и ритмическую гипотермию – при оценке центральных механизмов).

Цель исследования – оценить роль гуморального звена в инициации модуляции проницаемости ГЭБ для норадреналина и ацетилхолина при КЦГ.

Эксперименты проведены на крысах-самцах линии Вистар. Животных наркотизировали внутрибрюшинными инъекциями смеси тиопентала и оксибутирата натрия из расчета 30 и 100 мг/кг массы соответственно. КЦГ проводили до достижения ректальной температуры 32°C и поддерживали в течение 6 ч. Изучение проницаемости ГЭБ для меченых по тритию норадреналина и ацетилхолина (<sup>3</sup>H-НА, <sup>3</sup>H-АХ) проводили радиоизотопным методом в гипоталамусе, таламусе, неокортексе и гиппокампе [5,6]. Электронно-микроскопические и гистологические исследования проводили традиционными методами [5,6]. Для математической обработки данных оптической и электронной микроскопии использовали разработанную нами компьютерную систему анализа FRAM 2000. Сканированные с высоким разрешением фотографии препаратов (или изображения, полученные цифровой видеотехникой) переносятся в компьютер в любой графический редактор (типа Corel Draw, Adobe PhotoShop). С помощью автофигур разного цвета выделяют анализируемые контуры клеток, субклеточных структур и т.п., при необходимости производят точную заливку исследуемых площадей. Полученные цветные автофигуры могут быть уменьшены с целью минимизации размеров файла. Далее автофигуры, как рисунки с расширением bmp, помещают в вычислительную среду Mathcad Professional, в

conflict situations, however the “initiators” for the trigger mechanism engaging can be on different sides of BBB (from blood side during the excessive effects, or from brain side during weaker but systematically affecting stressors). Evidently in the first case the urgent EES protective functions are mainly realised, but the second one is related to hypometabolic states, accompanying a natural and narcotic sleep, hibernation or adaptation reactions under artificial hypothermia. Knowing the fact, that in the certain physiological situation the both “scenarios” are presented, when alternating and supplementing in a complicated way each other, we tried to divide each component into the parts by using the following experimental models: craniocerebral hypothermia (CCH) in order to find out the periphery effect and the rhythmic one when evaluating the central mechanisms.

The investigation aim was to estimate the role of humoral link in the modulation initiation of BBB permeability for norepinephrine and acetylcholine at CCH.

The experiments were carried-out in Wistar male rats. Animals were narcotised using intraperitoneal injections of thiopental and sodium hydroxybutyrate 30 and 100 mg/kg of mass, correspondingly. CCH was performed up to the achieving the rectal temperature of 32°C and maintained during 6 hours. Study of BBB permeability for tritium-labeled norepinephrine and acetylcholine (<sup>3</sup>H-NE, <sup>3</sup>H-AC) was conducted using a radioisotopic method in hypothalamus, thalamus, neocortex and hippocamp [5, 6]. Electron microscopic and histological investigations were performed using traditional methods [5, 6]. For mathematical data processing of optical and electron microscopy we used the own developed computer analyser FRAM 2000. Scanned with highly resolution photographs of preparations (or the images, obtained with digital video equipment) are transferred with computer into any graphics editor (Corel Draw, Adobe PhotoShop). By means of the autofigures of different colours we underline the analysed cell contours, subcellular structures etc., if it is necessary the exact filling of the studied areas are performed. The obtained coloured autofigures can be diminished for file size minimisation. Then the autofigures as the figures with .bmp extension are put in the Mathcad Professional computer software, where they are presented as digital matrix. Then the figure array is transferred into the Excel table with the program in Visual Basic language on calculating the autofigure length and/or square with complete statistical processing in a real scale of metric values. The results are stored in the data base. For fractal analysis the black-white fragments of the analysed images of bioobjects are transferred in the Mathcad medium. When necessary the built in calculating options for the work with matrixes (for example XY:=stack (A, B, C...)) are used. Then in the Excel program according

которой их представляют в виде цифровой матрицы. Затем массив цифр переносится в таблицу Excel с программой на языке Visual Basic по вычислению длин и/или площадей автофигур с полной статистической обработкой в реальном масштабе метрических величин. Результаты сохраняются в базе данных. Для фрактального анализа в среду Mathcad переносят черно-белые фрагменты анализируемых изображений биообъектов. При необходимости используют встроенные вычислительные опции работы с матрицами (например  $XU := \text{stack}(A, B, C \dots)$ ). Затем в Excel по нашей подпрограмме, реализующей известный математический аппарат [4, 8], вычисляют фрактальные размерности объектов с их статистической оценкой. Для этого проводят линейную аппроксимацию зависимости длины кластера (агрегата точек заданной интенсивности окраски биообъекта) от размеров рамки, в которую он попадает. По наклону прямой, аппроксимирующей в нашем случае от 2 до 200 тыс. точек, судят о величине фрактальной размерности.

Результаты наших радиоизотопных исследований [1] показали возрастание при КЦГ содержания катехоламинов в крови, что свидетельствует об активации секреторных процессов при поддержке биосинтезирующей системы надпочечников. В этих условиях повышение содержания моноаминов приводило к прямому или опосредованному простагландинами изменению содержания цАМФ. Повышение активности аденилатциклазы и содержания цАМФ вело к вазодилатации мозговых микрососудов, активации эндотелиальных клеток, появлению признаков пиноцитоза, что сопровождалось увеличением везикулярного транспорта и повышением проницаемости ГЭБ [1, 5, 6]. Казалось очевидным преимущество моноаминергических систем периферии в активации ГЭБ для вазоактивных веществ охлажденного мозга. Однако классические построения развития температурного стресса требовали традиционной морфологической оценки состояния симпатoadrenalовой, гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой, гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной систем.

После охлаждения крыс до 32°C в супраоптическом (СОЯ) и паравентрикулярном ядрах (ПВЯ) гипоталамуса мы наблюдали следующую морфологическую картину. Исходя из значений клеточной формулы, самый высокий процент приходится на долю клеток с незначительным содержанием нейросекреторного материала (45-46%). Нейросекрета в нейронах этого типа мало. Положительные гранулы по Гомори расположены, в основном, перинуклеарно, наблюдается выраженная вакуолизация цитоплазмы, местами

to our program, realising the known mathematic apparatus [4, 8], the fractal dimension of objects with their statistical evaluation are calculated. For this purpose there is performed a linear approximation of dependency of the cluster length (aggregate of points with the established intensity of bioobject staining) on the dimensions of the frame where it enters. By the line slope, approximating in our case from 2 to 200 thousand points, one judges on the value of fractal dimension.

Results of our radioisotopic investigations [1] demonstrated an increase in catecholamine content in blood at CCH, that testified to the active secretory processes when supporting the biosynthesising system of adrenal glands. Under these conditions an increase in monoamine content resulted in a direct or mediated by prostaglandins change in cAMP content. The augmentation of adenilate cyclase activity and cAMP content resulted in vasodilatation of brain microvessels, endothelial cell activation, appearance of pinocytosis signs, that was accompanied with an increase in vesicular transport and augmentation of BBB permeability [1, 5, 6]. The predomination of the periphery monoaminergic systems in BBB activation for vasoactive substances of cooled brain seemed to be evident. However the classic structuring of the temperature stress development required the traditional morphological evaluation for the state of sympathoadrenal, hypothalamo-hypophysial-adrenal, hypothalamo-hypophysial-thyroid systems.

After the rats' cooling down to 32°C in supraoptical nucleus (SON) and paraventricular one (PVN) of hypothalamus we observed the following morphological picture. Proceeding from the values of cell formula the highest percentage fits to the cells with an insignificant content of neurosecretory material (45-46%). There is a small number of neurosecret in the neurons of this type. Positive granules on Gomori are placed mainly in a perinuclear way, a manifested cytoplasm vacuolisation, here and there significant, is observed. There is an increase in the percentage of light neurosecreting cells (NSC) in comparison with the control, in PVN, especially. Neurocyte nuclei are large, roundish, there is an increase in peripheric accumulation of nuclear chromatin. The number of dark and pyknomorphous cells is considerably decreased. Redistribution of cell elements of both nuclei is accompanied with the reduction of neurosecretory material in cytoplasm and cell outgrowings. NSC and their extended neurosecretory fibers with distantly located granules are often in contact with blood vessels, tightly filled with hematocytes. There is the neurosecret concentration reduction in hypothalamus posterior part, the number of Herring's bodies in respect of the control is slightly lower, the number and sizes of glial cells and their nuclei increase, the hyperaemia of vascular system is

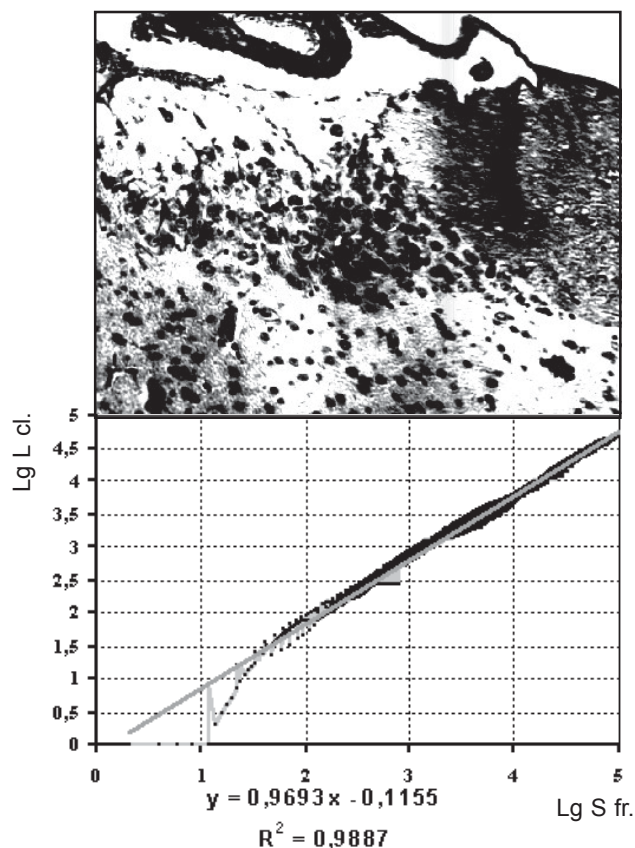
значительная. Процент светлых нейросекретирующих клеток (НСК) по сравнению с контролем возрастает, особенно в ПВЯ. Ядра нейроцитов крупные, округлые, повышается периферическая аккумуляция ядерного хроматина. Существенно снижается количество темных и пикноморфных клеток. Перераспределение клеточных элементов обоих крупноклеточных ядер сопровождается редукцией нейросекреторного материала в цитоплазме и отростках клеток. НСК и их расширенные нейросекреторные волокна с рыхло расположенными гранулами часто контактируют с кровеносными сосудами, плотно заполненными форменными элементами крови. Концентрация нейросекрета в задней части гипофиза снижается, тел Герринга относительно контроля несколько меньше, число и размеры глиальных клеток и их ядер увеличиваются, ярко выражена гиперемия сосудистой системы. Таким образом, на этом уровне температур отмечается интенсификация нейросекреторного процесса, причем не столько синтеза нейросекрета, сколько его выведения (рис. 1,2).

После 6-часовой гипотермии преобладающими ключевыми элементами крупноклеточных ядер гипоталамуса являются светлые клетки с небольшим количеством нейросекреторного вещества. Причем на всем протяжении гипоталамо-гипофизарной области обнаруживаются аксональные расширения, заполненные нейросекреторным веществом. Наряду с этим определяется значительное число пикноморфных клеток, клеток-теней, а также клеток с фестончатыми краями и скудным количеством нейросекрета. Наличие светло-окрашивающихся клеток свидетельствует об усиленном выделении нейросекрета, а обильных скоплений положительных гранул по Гомори в отростках нейросекреторных клеток и задней доли гипофиза – о замедленном поступлении этого вещества в кровь (рис.3).

Анализируя состояние ядер переднего гипоталамуса через 24 ч после отогрева животных, отмечено, что нейроны сильно варьируют по своим размерам и содержанию в них положительных гранул по Гомори. Доминирующим является тип клеток с умеренным содержанием нейросекрета (рис.4). Нейроциты заполнены нейросекретом в виде мелких пылевидных гранул, диффузно расположенных в цитоплазме. Тела нейронов отличались несколько увеличенными размерами, округлыми ядрами, крупными ядрышками и отчетливо видимыми зернами хроматина. Количество НСК, интенсивно выводящих нейросекрет, было примерно одинаковым для обоих ядер (20-22%). Число темных клеток сравнительно небольших размеров, обильно заполненных

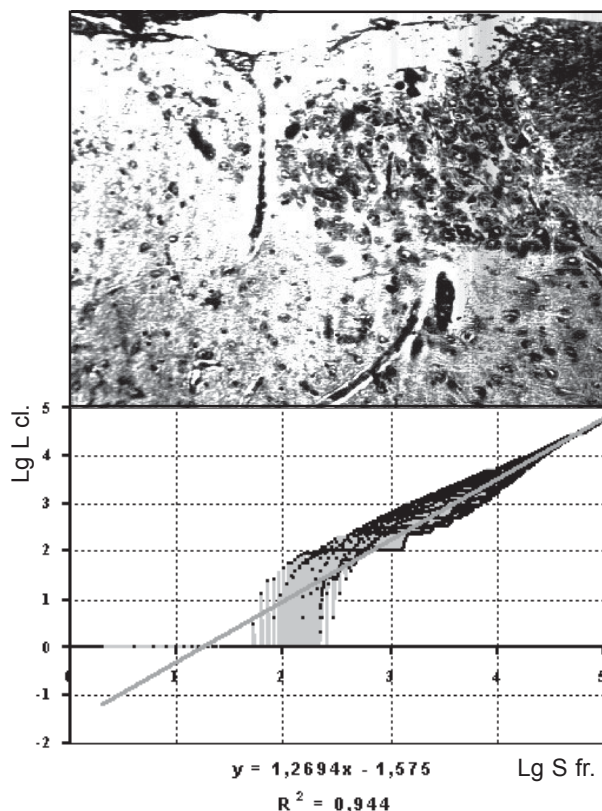
manifested in a large extent. Thus, at this level of temperatures there is observed the intensification of neurosecretory process, and rather not the neurosecret synthesis than its removal (Fig. 1, 2).

After 6 hrs hypothermia the light cells with a small number of neurosecretory substance are predominant key-elements of nuclei with large cells of hypothalamus. In this case along the whole hypothalamo-hypophysial area there are found-out the axonal extendings, filled-in with neurosecretory substance. In addition, a significant number of pyknomorphous cells, ghost cells, as well as cells with scalloped edges and a small number of neurosecret is determined. The presence of lightly stained cells testifies to a strengthened neurosecret elimination, but the presence



**Рис. 1.** СОЯ крыс до охлаждения: преобладают клетки с умеренным содержанием нейросекрета. Увеличение: ок.7; об. 20. Ось Y: логарифм длины кластера (в пикселях) из точек изображения заданной интенсивности ( $\geq 50\%$ ) окраски биообъекта; ось X: логарифм площади прямоугольной рамки (в пикселях), в которой находится кластер. Фрактальная размерность (D) равна наклону прямой  $y(x)$ ,  $R^2$  – оценка достоверности аппроксимации.

**Fig. 1.** SON in rats prior to cooling: the cells with a moderate neurosecret content are predominant. Magnification: ocular 7, lens 20. Axis Y: logarithm of a cluster length (in pixels) from the points of the intensity imaging ( $\geq 50\%$ ) of the bioobject staining; Axis X: logarithm of the square of a rectangle frame (in pixels) where the cluster is. Fractal dimensions (D) are equal to the straight line slope (x),  $R^2$  – estimation of the approximation significance.



**Рис. 2.** СОЯ крыс после охлаждения: увеличение размеров клеток и их ядер. Выраженная вакуолизация цитоплазмы, отростки НСК заполнены положительными гранулами по Гомори. Контакт НСК с капиллярной системой. Увеличение: ок.7; об. 20. Обозначения осей как на рис. 1.

**Fig. 2.** SON in rats following cooling: the size increase of cells and their nuclei. Manifested cytoplasm vacuolisation, NSC outgrowings are filled with positive granules on Homori. NSC contact with the capillary system. Magnification: ocular 7; lens 20. The axes legends are the same as in the Fig. 1.

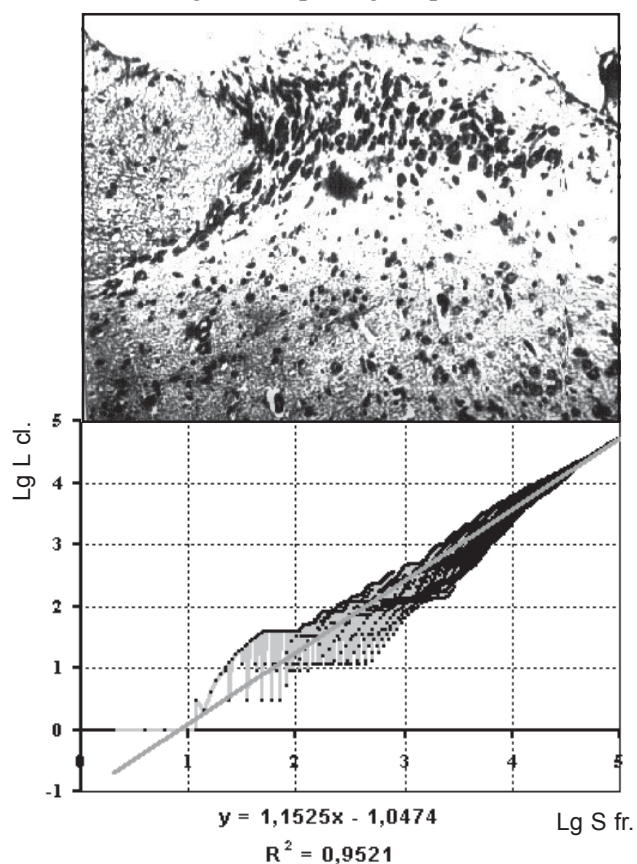
нейросекретом, существенно не отличалось от контрольного уровня. Содержание пикноморфных нейроцитов уменьшилось относительно контроля. В задней доле гипофиза отмечалось незначительное количество нейросекреторной субстанции. Расширенные капилляры заполнены форменными элементами крови, окружены нейросекреторными волокнами, которые почти не содержат гранул.

После охлаждения морфологическая картина надпочечников характеризуется некоторым увеличением коры за счет пучковой и клубочковой зон, клетки которых несколько гипертрофированы, цитоплазма светлая, гранулированная. Ядра четко контурированы, несколько увеличены по сравнению с контролем. Четкой границы между сетчатой зоной и мозговым веществом не наблюдается. В мозговом веществе надпочечника клетки крупные, округлой и полигональной формы. Ядра округлой и овальной формы, ядрышки расположены эксцентрично. Цитоплазма клеток заполнена

of large accumulations of positive granules on Homori in the neurosecretory cells outgrowings and the posterior hypophysial lobe testifies to this substance slowed-down entering into blood (Fig. 3).

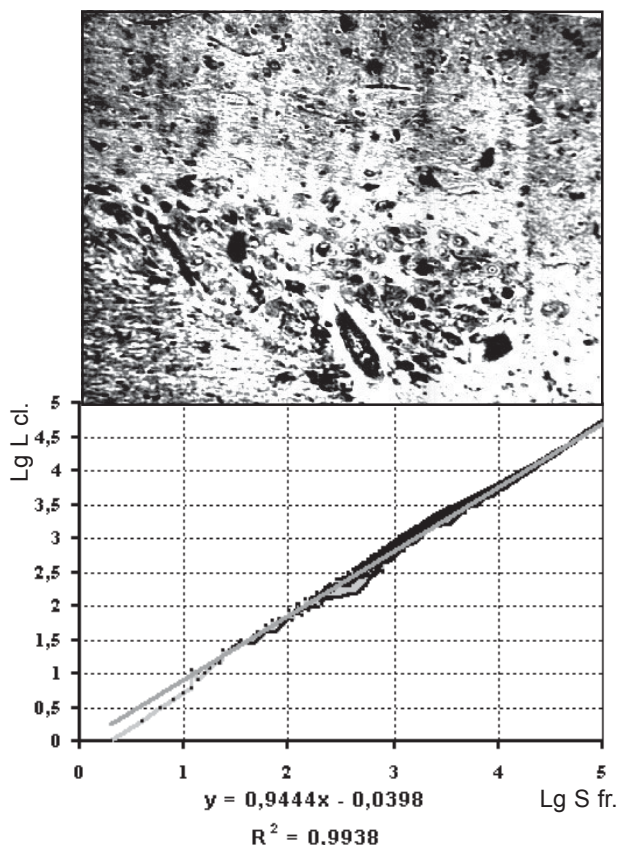
By analysing the state of nuclei of anterior hypothalamus in 24 hrs after animals' thawing there was noted, that the neurones varied in a large extent by their sizes and positive granule on Homori content in them. The cell type with a moderate neurosecret content is a dominant one (Fig. 4). Neurocytes are filled with neurosecret in the form of small dust-like granules, diffusely located in cytoplasm. The neurone bodies differed by slightly increased sizes, roundish nuclei, large nucleoli and distinctly seen chromatin granulations. The NSC number, intensively removing the neurosecret was about the same for both nuclei (20-22%). The number of dark cells with comparatively small sizes, abundantly filled with neurosecret, did not considerably differ from the control level. The content of pyknomorphous neurocytes reduced in respect of the control. In hypothalamus posterior lobe there was noted an insignificant number of neurosecretory substance. The extended capillaries are filled with hematocytes, circled with neurosecretory fibers, almost without granules.

After cooling the morphological picture of adrenal



**Рис. 3.** СОЯ крысы после 6-ти часов охлаждения. Значительное количество пикноморфных клеток. Увеличение: ок.7; об. 20. Обозначения осей как на рис. 1.

**Fig. 3.** SON in rats following 6hrs' cooling. Significant number of piknomorphous cells. Magnification: ocular 7; lens 20. The axes legends are the same as in the Fig. 1.



**Рис. 4.** СОЯ крысы после отогрева (24 ч). Увеличение: ок.7; об. 20. Обозначения осей как на рис. 1.

**Fig. 4.** SON in rats following thawing (24 hrs). Magnification: ocular 7; lens 20. The axes legends are the same as in the Fig. 1.

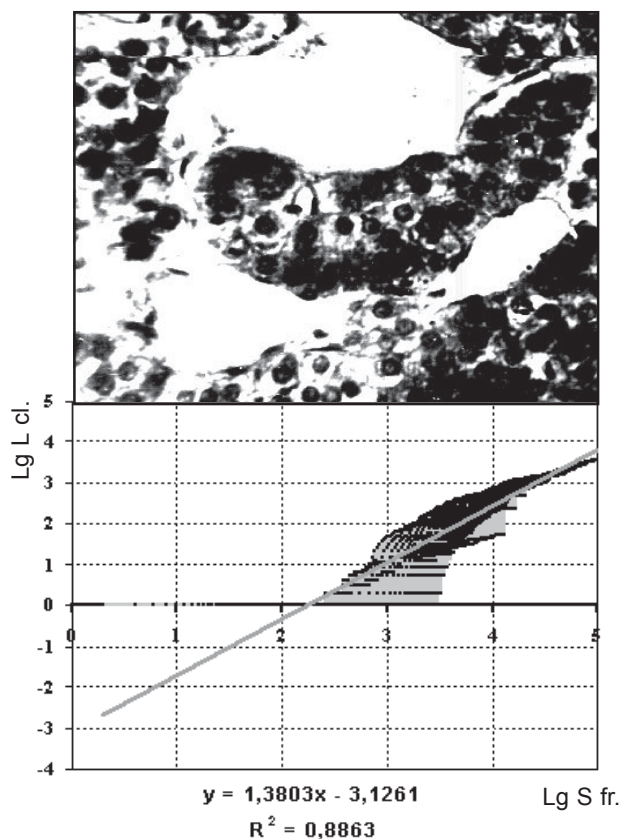
многочисленными гранулами, группы хромофинных клеток разделены венозными синусами, содержащими форменные элементы крови.

После 6-часовой гипотермии обнаруживается расширение коркового вещества надпочечников за счет гипертрофии и частичной гиперплазии клеток сетчатой и пучковой зон. Цитоплазма клеток этих зон вакуолизирована, ядра набухшие, четко определяются ядрышки. Клубочковая зона довольно широкая, размеры клеток увеличены, ядра гиперхромные. Имеются участки с признаками пролиферации клеток, которые образуют группы, окруженные соединительной тканью в виде темной капсулы. В мозговом веществе (рис.5) клетки крупные, цитоплазма полностью заполнена гранулами, ядра светлые, гипертрофированные, ядерная мембрана четко контурирована. В ядрах наблюдается 1-2 ядрышка. Венозные синусы расширены, но не содержат элементов крови. Таким образом, надпочечники на 6-часовую КЦГ отвечают явной гипертрофией структур коркового и мозгового вещества.

При микроскопическом исследовании ткани надпочечника после 24 ч отогрева обнаружено умеренное кровенаполнение сосудов коры и

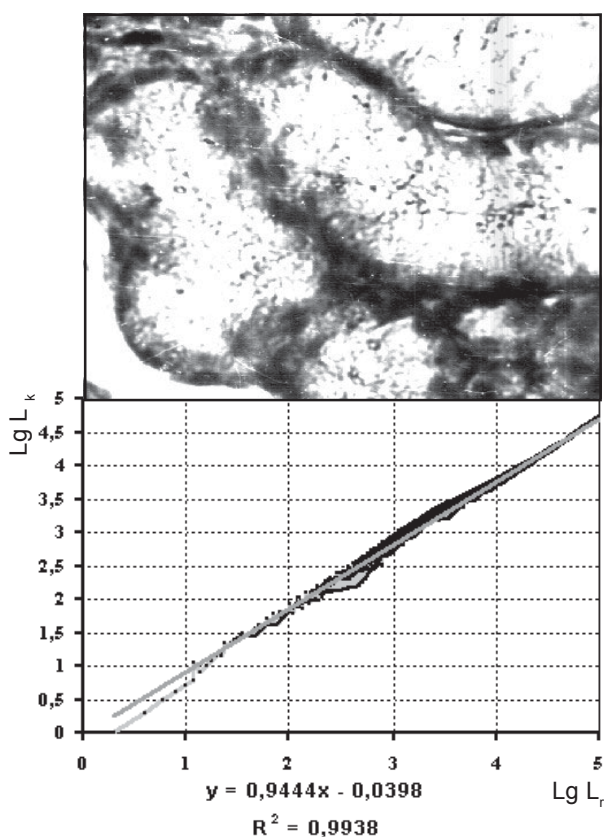
glands is characterised by a certain increase in cortex due to the fascicular and glomerular zones, which cells are slightly hypertrophied, cytoplasm is light and granulated. The nuclei are with distinct contours, slightly increased in comparison with the control. A distinct boundary between reticular zone and substantia medullaris is not seen. In substantia medullaris of adrenal glands the cells are large with roundish and polygonal shape. Nuclei of roundish and oval shapes, nucleoli are placed in an eccentric way. Cell cytoplasm is with numerous granules, the groups of chromaffin cells are divided in venous sinuses with hematocytes.

After 6 hrs hypothermia there is revealed a widening of cortical substance of adrenal glands due to the hypertrophy and a partial cell hyperplasia of reticular and fascicular zones. Cell cytoplasm of these zones are vacuolised, nuclei are swollen, nucleoli are distinctly seen. A glomerular zone is quite wide, cell sizes are increased, nuclei are hyperchromic. There are the sites with cell proliferation signs, which form the groups, circled with connective tissue as a dark capsule. In substantia medullaris (Fig. 5) the cells are large, cytoplasm is completely filled with granules, nuclei are



**Рис. 5.** Мозговое вещество надпочечника крысы после 6-ти часов охлаждения. Цитоплазма клеток полностью заполнена гранулами, венозные синусы расширены. Увеличение: ок.7; об. 40. Обозначения осей как на рис. 1.

**Fig. 5.** Adrenal medulla in rats following 6 hrs' cooling. Cell cytoplasm is completely filled with the granules, venous sinuses are widened Magnification: ocular 7; lens 40. The axes legends are the same as in the Fig. 1.



**Рис. 6.** Щитовидная железа интактной крысы. Коллоид равномерно распределен по фолликулу. Фолликулярный эпителий уплотнен. Увеличение: ок.7; об. 40. Обозначения осей как на рис. 1.

**Fig. 6.** Thyroid gland of intact rat. Colloid is equally distributed within a follicle. Follicular epithelium is thickened. Magnification: ocular 7; lens 40. The axes legends are the same as in the Fig. 1.

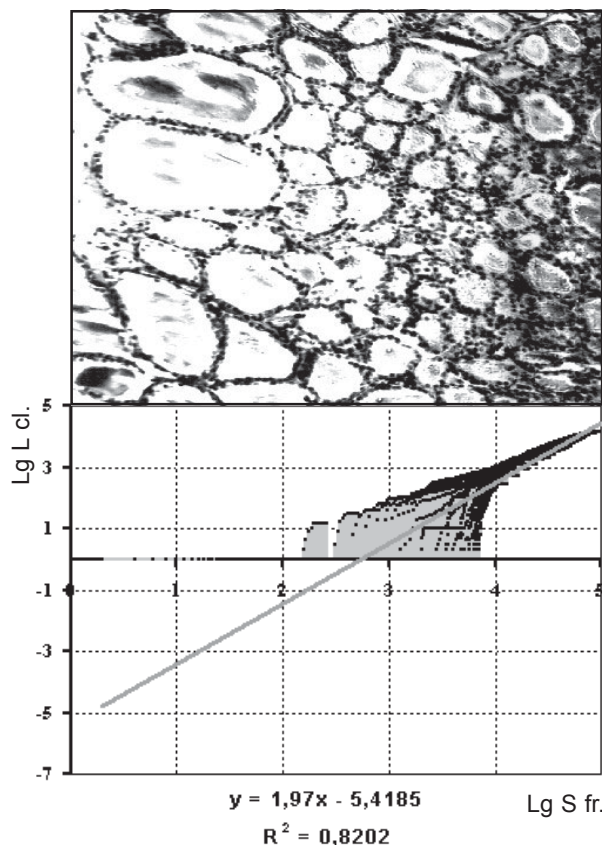
мозгового вещества, границы между ними четко выражены. Все зоны коркового вещества надпочечника содержат темные компактные клетки. Ширина коры надпочечника не отличается от таковой у животных контрольной группы. Но структура клубочковой зоны нарушена, так как клетки не образуют рисунка “клубочек”. В пучковой зоне явно выражены столбчатые образования, разделенные прослойками соединительной ткани.

В щитовидной железе интактной и наркотизированной крысы коллоид равномерно распределен в фолликуле, ядра тиреоцитов округлой формы, фолликулярный эпителий несколько уплотнен (рис.6). После гипотермии до 32°C ярко выражена зональность в распределении фолликулов (рис.7), по периферии дольки располагаются в основном более крупные фолликулы, коллоид светлый, не всегда занимает всю территорию фолликула. В центре дольки определяются фолликулы средних размеров и более мелкие. Клетки фолликулярного эпителия приобретают кубическую форму, размеры ядер существенно увеличены (рис.8). Отмечается выраженная

light, hypertrophied, nuclear membrane has distinct contours. In nuclei there are observed 1-2 nucleoli. Venous sinuses are widened but without hematocytes. Thus, the adrenal glands respond to the 6<sup>th</sup> hours CCH with an evident hypertrophy of cortical substance and substantia medullaris structures.

At a microscopic investigation of adrenal gland tissue after 24 hours of thawing there was found-out a moderate blood filling of vessels of cortex and substantia medullaris with distinctly manifested boundaries between them. All zones of cortical substance of adrenal gland contain dark compact cells. The adrenal cortex width does not differ from that in the control group’s animals. However the structure of glomerular zone is impaired as the cells do not form the “glomerulus” picture. In a glomerular zone there are distinctly manifested column-like formations, divided with connective tissue layers.

In thyroid gland of the intact and narcotised rats the colloid was uniformly distributed in follicle, thyrocyte nuclei are of roundish shape, follicular



**Рис. 7.** Щитовидная железа крысы после КЦГ (32°C). Выраженная зональность в распределении и размерах фолликулов. Неравномерное распределение коллоида с признаками вакуолизации. Увеличение: ок.7; об.20. Обозначения осей как на рис. 1.

**Fig. 7.** Thyroid gland in a rat following CCH (32°C). Manifested zoning in the distribution and follicle sizes. Uneven colloid distribution with the signs of vacuolisation. Magnification: ocular 7; lens 20. The axes legends are the same as in the Fig. 1.

вакуолизация коллоида. На фоне значительного кровенаполнения сосудов мелкие фолликулы чередуются с крупными.

После 6-часовой гипотермии отмечается гипертрофия паренхимы щитовидной железы, высота клеток фолликулярного эпителия увеличивается, тиреоциты приобретают призматическую форму, в их базальной части четко определяются крупные ядра. Коллоид в фолликуле пенистый. Хорошо выражена базальная мембрана, разделяющая фолликулярный эпителий и гипертрофированные соединительно-тканевые клетки. Размеры фолликулов варьируют от крупных до мелких (рис.8).

Таким образом, КЦГ до 32°C, пролонгированная в течение 6 ч, вызывает отчетливую реакцию крупноклеточных нейросекреторных ядер СОЯ и ПВЯ. Причем после усиленного биосинтеза нейросекрета и его выведения в задней доле гипофиза отмечается замедление этого процесса после 6-часовой гипотермии. Изменение состояния эндокринных желез характеризуется повышением функциональной активности, что отмечено в надпочечниках и щитовидной железе. На этапах самоотогрева от 6 до 72 ч наблюдается постепенная нормализация структурно-функциональной

epithelium is slightly flattened (Fig. 6). After hypothermia down to 32°C there is strikingly manifested zoning in follicles distribution (Fig. 7), along the lobule periphery the largest follicles are mainly located, colloid in them is light (lucid), not always is located within the whole territory of a follicle. In the lobule center the medium-sized follicles and smaller ones are found. Follicular epithelium cells are getting cubic shape, nuclei sizes are significantly augmented (Fig. 8). Manifested colloid vacuolisation is noted. At the background of considerable blood filling in vessels small follicles are interchanging with the large ones.

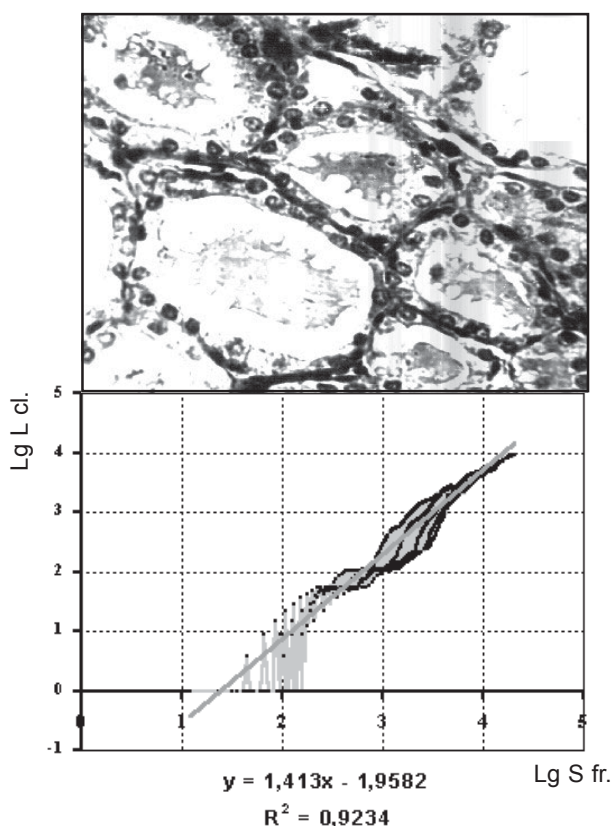
Following 6 hrs' hypothermia parenchyma hypertrophy in pancreas is noted, cell height in follicular epithelium increases, thyrocytes are getting prismatic shape, in their basal site large nuclei are determined. Colloid is foamy in follicle. Basal membrane, dividing follicular epithelium and hypertrophied connective tissue cells, is significantly manifested. Follicles vary from large to small sizes (Fig. 8).

Thus, CCH down to 32°C prolonged within 6 hrs, causes a distinct reaction of large-cellular neurosecretory SO and PV nuclei. Following an increased neurosecrete biosynthesis and its removal the slowing down of these processes observed in posterior lobe of the hypophysis after 6 hrs' hypothermia. The change in endocrine glands state is characterised by the augmentation of functional activity, noted in adrenal and thyroid glands. At the stages of self-thawing 6 to 72 hrs a gradual normalisation of structural and functional organisation of both hypothalamus-hypophysis system and peripheral endocrine glands being studied was observed.

The data obtained seemed to be quite trivial. Traditional morphological analysis did not allow to determine the major direction of a triggering mechanism's vector (brain-blood) of neuro-humoral system, where BBB is not a dividing line, but a component.

Therefore according to the aim of the work we have performed fractal morphometric assay used for bioobjects analysis [8, 10-12]. First of all, there was determined the general link in such relatively autonomous functional systems as brain structures and various organs and tissues in an organism. In this concern the idea about endothelium as an active and the largest endocrine organ occurred to be quite productive [2]. Diffusely disseminated in all the tissues it synthesises bioactive substances, regulating blood rheology, tonus and tension, heart contractile activity and brain metabolic supply. According to current notions, endothelium as an "endocrine tree" [2] is the biological fractal as many components of respiratory, cardiovascular, nervous and other functional systems in an organism [10-12].

For quantitative estimation of the data presented in "terms" of descriptive morphology (redistribution,



**Рис. 8.** Щитовидная железа крысы после пролонгированной КЦГ (32°C). Пенистый коллоид в фолликулах. Увеличение: ок.7; об. 40. Обозначения осей как на рис. 1.

**Fig. 8.** Thyroid gland in rat following prolonged CCH (32°C). Foamed colloid in follicles. Magnification: ocular 7; lens 40. The axes legends are the same as in the Fig. 1.



организации, как гипоталамо-гипофизарной системы, так и изученных периферических эндокринных желез.

Полученные данные казались в значительной степени тривиальными. Традиционный морфологический анализ не позволил определить преимущественное направление вектора пускового механизма (мозг ↔ кровь) нейрогуморальной системы, в которой ГЭБ – не разделительная линия, а составная часть.

Поэтому, в соответствии с целью работы, мы провели фрактальный морфометрический анализ, который используют для анализа биообъектов [8, 10-12]. Прежде всего, было обозначено общее звено в таких относительно автономных функциональных системах, как структуры мозга и различные органы и ткани организма. В связи с этим, весьма продуктивной оказалась идея об эндотелии, как активном, самом большом эндокринном органе [2]. Диффузно рассеянный по всем тканям, он синтезирует биоактивные вещества, регулирующие реологию крови, тонус и давление, сократительную активность сердца и метаболическое обеспечение мозга. По современным представлениям, эндотелий – “эндокринное дерево” [2] – является биологическим фракталом, как и многие компоненты дыхательной, сердечно-сосудистой, нервной и других функциональных систем организма [10-12].

Для количественной оценки приведенных в “терминах” описательной морфологии данных (перераспределение, аккумуляция, рыхлость, пылевидность, пенистость и т. п.) мы рассчитывали их фрактальную размерность (D). “Качественные” определения фракталов [4, 10-12] содержат аналогичные образы: канторовская пыль, шероховатая линия, рыхлая поверхность, вспененное пространство-время. Следует подчеркнуть, что в расчётах учитывались представления об обобщенном броуновском движении [4]. Так, если коразмерность объекта ( $H=2-D$ ) находилась в пределах  $0,5 < H < 1$ , то структурно-функциональный рисунок системы считали персистентным (поддерживающим в будущем тенденции прошлого). Если  $0 < H < 0,5$ , то динамический паттерн определяли как антиперсистентный.

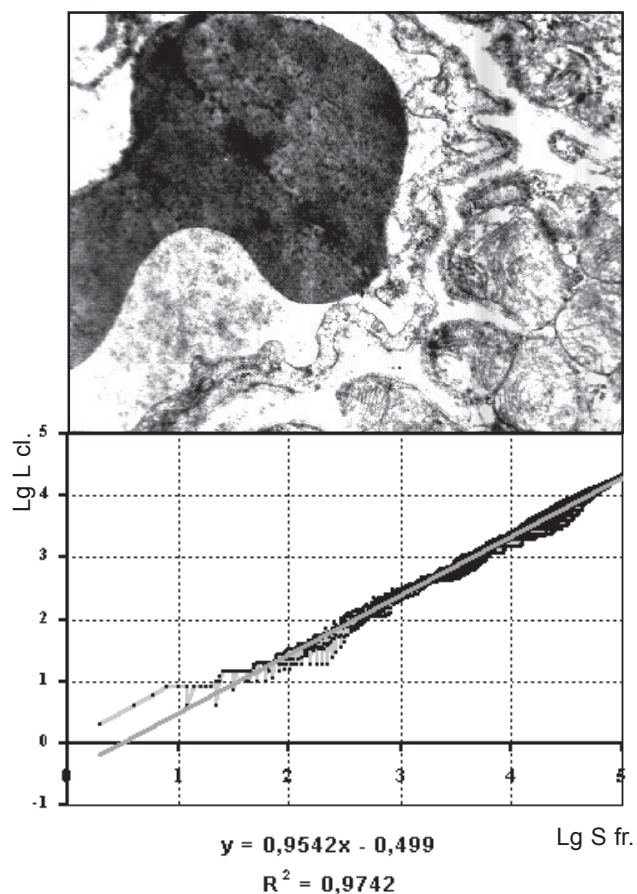
В норме и после отогрева характерная геометрия изученных структур “гладкая”, с размерностью евклидовых линий близкой к единице (рис.1, 4, 6).

В интактной щитовидной железе в среднем равномерное распределение коллоида в фолликулах ( $D \sim 1$ ) включает фрактальную группу фолликулов с персистентностью ( $D \sim 1,2$ ) и антиперсистентностью ( $D \sim 1,6$ ). Возможно, эта особенность способствует адаптивным реакциям тироцитов при охлаждении организма, обеспе-

accumulation, porosity, dust-likeness, foaminess etc.) we calculated their fractal dimensions (D). “Qualitative” definitions of fractals [4, 8, 10-12] comprise analogous images: Cantor’s dust, rough line, porous surface, foamed space-time. It should be noted that in calculations we have considered the ideas about the generalised Brownian motion [6]. Thus if co-dimension of the object ( $H=2-D$ ) is within the limits of  $0.5 < H < 1$ , structural and functional picture of the system is considered to be persistent (the one maintaining in future the tendencies of the past). If  $0 < H < 0.5$ , the dynamic pattern was determined to be anti-persistent.

In the norm and after thawing the geometry characteristic for the structures studied is “smooth”, with the Euclidean lines dimensions close to 1 (Fig. 1, 4, 6).

In intact thyroid gland the mean even colloid distribution in follicles ( $D \sim 1$ ) comprises a follicular fractal group with the persistence ( $D \sim 1.2$ ) and anti-persistence ( $D \sim 1.6$ ). Obviously, this characteristic promotes adaptive reactions in thyrocytes during an organism cooling, providing the proper rate of the alteration in supporting and rearrangement processes,



**Рис. 9.** Миокард крысы через 1 час после КЦГ (32°C). Эритроцит в просвете капилляра, гомогенное состояние плазмы крови. Увеличение 15000. Обозначения осей как на рис. 1.

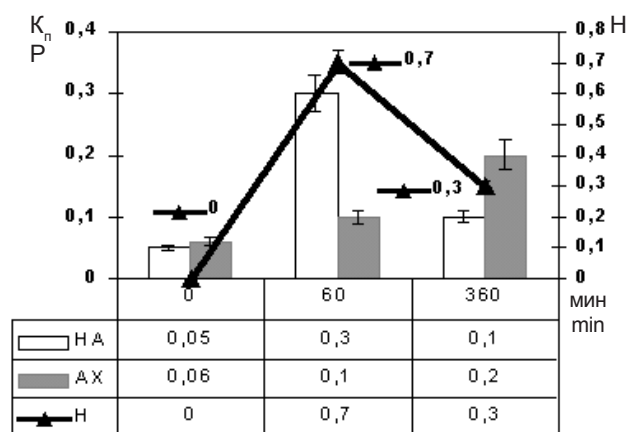
**Fig. 9.** Rat’s myocardium in 1 hr after CCH (32°C). Red cell in a capillary lumen, homogenous state of blood plasma. Magnification: 15000. The axes legends are the same as in the Fig. 1.

чивая оперативность чередования поддерживающих и перестроечных процессов, в частности пермиссии калоригенного действия катехоламинов. Так, в первый час охлаждения до 32°C разрушается персистентность фолликулов, а антиперсистентность возрастает (D~1,8) (рис.7). В эти же экспериментальные сроки обнаруживается персистентность крупноклеточных ядер переднего гипоталамуса (D~1,3) (рис. 2). Мозг поддерживает антиперсистентность периферических желез, включённых в функциональные системы общего адаптационного синдрома при холодовом стрессе. Пролонгирование гипотермии “консервирует” процесс. На смену антиперсистентному распределению коллоида приходят персистентные структуры, в том числе и в мозговом веществе надпочечника (D~1,3) (рис.5). На этой стадии гипотермии по данным фрактальной морфометрии вмешательство гипоталамуса минимально (D~1) (рис.3).

Следует отметить важный отрицательный результат - отсутствие фрактальной размерности плазмы в просвете капилляров сердца, печени, мягких тканей тригеминальной зоны (рис. 9).

При КЦГ в капиллярах мозга, напротив, происходил активный “фрактальный рост”. Существует много экспериментальных данных, указывающих на гуморальную регуляцию микроциркуляции крови. В их числе есть данные электронной микроскопии капиллярного русла различных органов белых крыс о том, что белки плазмы могут образовывать внутрикапиллярные структуры, влияющие на реологию крови [3]. В наших исследованиях только в мозговых капиллярах структурирование плазмы последовательно проходило стадии персистентности и антиперсистентности. В этом смысле, относительная уникальность реагирования мозговых капилляров на охлаждение могла указывать на ведущую роль мозга в активации ГЭБ, как ключевой структуры ЭЭС.

Сопоставим полученные результаты фрактального анализа с радиоизотопными данными по изучению проницаемости ГЭБ. Повышенной проницаемости для <sup>3</sup>H-НА в гипоталамусе соответствует состояние персистентности (H~0,7), а на периферии – антиперсистентности, для <sup>3</sup>H-АХ, по-видимому, характерна обратная ситуация (рис. 10). Центральные и системные эффекты симпато- и парасимпатомиметиков также противоположны [1, 5, 6], поэтому будем рассматривать фрактальную размерность биологических систем в качестве интегрального показателя симпато-парасимпатических взаимоотношений и проницаемости ГЭБ для vasoактивных веществ. Таким образом, при КЦГ (32°C) повышение проницаемости ГЭБ для <sup>3</sup>H-НА инициируется мозгом. Проницаемость же для <sup>3</sup>H-АХ в меньшей степени



**Рис. 10.** Коразмерность и проницаемость ГЭБ для <sup>3</sup>H-НА и <sup>3</sup>H-АХ при КЦГ. Ось Y (левая) – коэффициент проницаемости ГЭБ ( $K_p = \text{радиоактивность мозга} / \text{радиоактивность крови}$ ); Y (правая) – коразмерность ( $H=2-D$ ). Ось X – время воздействия в мин (0 соответствует контролю).

**Fig. 10.** Co-dimensions and BBB permeability for <sup>3</sup>H-NA and <sup>3</sup>H-AH during CCH. Axis Y (the left one) – coefficient of the BBB permeability ( $P$ , permeability coefficient = brain radioactivity/ blood radioactivity); Y (the right one) – co-dimensions ( $H=2-D$ ). Axis X – time of the effect in minutes (0 corresponds to the control).

in particular, permission of calorigenic effect of catecholamines. By the 1<sup>st</sup> hour of cooling down to 32°C the persistence in follicles is destroyed, and anti-persistence increases (D~1.8) (Fig. 7). At the same experimental terms the persistence of large-cellular nuclei in anterior hypothalamus (D~1.3) is observed (Fig. 2). Brain supports the anti-persistence in peripheral glands, comprised by the functional systems of total adaptation syndrome under a cold stress. The hypothermia prolongation “preserves” the process. Anti-persistent distribution of colloid is changed by persistent structures, as well as in adrenal medulla of adrenal glands (D~1.3) (Fig. 5). At this stage of hypothermia according to the data of fractal morpho-metry the hypothalamus interference is minimum (D~1) (Fig. 3).

An important negative result should be noted: the absence of plasm fractal dimensions in the lumens of capillaries in heart, liver, soft tissues of trigeminal zone (Fig. 9).

During CCH in brain capillaries, there was, in contrast, an active “fractal growth”.

In our investigations only in brain capillaries the plasm structuring gradually passed the stages of persistence and antipersistence. In this respect relatively unique response of blood capillaries cooling could point to the leading role of brain in BBB activation as a key EES structure.

Let us compare the results of fractal analysis obtained with radioisotopic data on studying the BBB permeability. The state of persistence ( $H\sim 0.7$ ) corresponded to an increased permeability for <sup>3</sup>H-NA in hypothalamus, and in periphery did to the anti-

зависит от центральных влияний.

Большое количество обратных связей часто приводит биологические системы к новому качеству, когда, в принципе, неправомерно разграничение причинно-следственных отношений. Именно такая типичная ситуация характерна и для пусковых механизмов холодного стресса. Обилие взаимопереплетений прямых и обратных связей, их взаиморегуляция на “перекрестке ГЭБ” лишают смысла вопрос, являются ли сомато-вегетативные реакции по Селье вторичными проявлениями стресса по отношению к изменениям в лимбико-ретикулярных структурах, оставляя прерогативу триггера за ЭЭС.

### Литература

1. *Бабийчук Г.А., Марченко В.С.* Триггерная функция гематоэнцефалического барьера в нейротрансмиттерных механизмах терморегуляции при гипотермии и гибернации // Пробл. криобиологии. – 1997. – № 1-2. – С.72-77.
2. *Гомазков О.А.* Эндотелий – эндокринное дерево // Природа. – 2000. – С.38-46.
3. *Лазарев В.А.* К вопросу об участии белков плазмы в регуляции капиллярного кровообращения // Тез. докл. IV съезда физиологов Сибири. – Новосибирск, 2002. – С. 149.
4. *Мандельброт Б.* Фрактальная геометрия природы. М.: Эдиториал УРСС, 2002. – 656 с.
5. *Марченко В.С.* К концепции экзистоэнцефалической системы охлажденного мозга: Ч.1 // Пробл. криобиологии. – 1997. – №4. – С. 14-20.
6. *Марченко В.С., Бабийчук Г.А., Марченко Л.Н., Полищук Л.В.* К концепции экзистоэнцефалической системы охлажденного мозга: Ч.3. Нейрональные газы (NO, CO) как нейротрансмиттерная система “раскачки” гомеостаза // Пробл. криобиологии. – 2000. – №4. – С. 27-36.
7. *Селье Г.* Стресс без дистресса. – Рига: Виеда, 1992. – 109 с.
8. *Смирнов Б.М.* Физика фрактальных кластеров. – М.: Наука, 1991. – 136 с.
9. *Судаков К.В.* Новые акценты классической концепции стресса // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1997. – №2. – С. 124-130.
10. *Goldberger A.L., Ridney D.R., Mietus J., et al.* Nonlinear dynamics in sudden cardiac death syndrome: heart-rate oscillations and bifurcations // *Experientia*. – 1988. – Vol. 44. – P. 983-987.
11. *Goldberger A.L., West B.J.* Fractals in physiology and medicine // *Yale J. Biol and Med*. – 1987. – Vol. 60. – P. 421-435.
12. *West B.J., Goldberger A.L.* Physiology in fractal dimensions // *American Scientist*. – 1987. – Vol. 75, N4. – P. 354-365.

Поступила 24.12.2002

persistence state; and for  $^3\text{H-Ax}$ , the opposite situation is, obviously, characteristic (Fig. 10). Central and systemic effects of sympatho- and parasympathomimetics are also contrast [1, 7, 8], therefore we will consider fractal dimensions of biological systems as an integral index of sympatho- parasympathic interactions and BBB permeability for vasoactive substances. Thus during CCH (32°C) an increase of BBB permeability for  $^3\text{H-HA}$  is initiated by brain. Permeability for  $^3\text{H-Ax}$  depends in less extent on central effects. Significant number of reversible bonds has often caused the new quality of biological systems while, principally, differentiation of casual-consequence relationship is not rightful. Such a typical situation is also characteristic for cold stress' triggering mechanisms. An abundance of interlacings in direct and reverse bonds, their interregulation at “BBB crossroad” make to be senseless the question whether somato-vegetative reactions according to Selye are the secondary stress manifestations in respect of the change in limbic-reticular structures, keeping the prerogative of trigger for EES.

### References

1. *Babijchuk G.A., Marchenko V.S.* Trigger function of blood-brain barrier in neurotransmitter mechanisms of thermoregulation at hypothermia and hibernation // *Problems of Cryobiology*. – 1997. – N1-2. – P.72-77.
2. *Gomazkov O.A.* Endothelium: endocrine tree // *Priroda*. – 2000. – P. 38-46.
3. *Lazarev V.A.* To the question of plasm proteins participation in the regulation of capillary blood circulation // Abstracts of the IVth Meeting of Physiologists in Siberia. – Novosibirsk. – 2002. – P. 149.
4. *Mandelbrot B.* Fractal geometry of nature. – Moscow: Editorial URSS, 2002. – 656 p.
5. *Marchenko V.S.* To the concept of existo-encephalic system of cooled brain. Part 1 // *Problems of Cryobiology*. – 1997. – N4. – P. 14-20.
6. *Marchenko V.S., Babijchuk G.A., Marchenko L.N., Polischuk L.V.* To the conception of existoencephalic system of cooled brain. Part 3. Neuronal gases (NO, CO) as neurotransmitter system of homeostasis “kindling” // *Problems of Cryobiology*. – 2000. – N4. – P. 27-36.
7. *Smirnov B.M.* Physics of fractal clusters. – Moscow: Nauka, 1991. – 136p.
8. *Selye H.* Stress without distress. – Riga: Vieda, 1992. – 109p.
9. *Sudakov K.V.* New aspects of classical stress conception // *Bull. experim. biol. i med*. – 1997. – N2. – P. 124-130.
10. *Goldberger A.L., Ridney D.R., Mietus J., et al.* Nonlinear dynamics in sudden cardiac death syndrome: heart-rate oscillations and bifurcations // *Experientia*. – 1988. – Vol. 44. – P. 983-987.
11. *Goldberger A.L., West B.J.* Fractals in physiology and medicine // *Yale J. Biol and Med*. – 1987. – Vol. 60. – P. 421-435.
12. *West B.J., Goldberger A.L.* Physiology in fractal dimensions // *American Scientist*. – 1987. – Vol. 75, N4. – P. 354-365.

Accepted in 24.12.2002