

## К концепции экзистоэнцефалической системы охлажденного мозга

### Часть 5. Фрактальная гомеометрия структурно-функционального состояния иммунной и сердечно-сосудистой систем при холодном стрессе

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

## To the Conception of Existoencephalic System of Cooled Brain

### Part 5. Fractal Homeometry of Structural and Functional State of Immune and Cardiovascular System Under Cold Stress

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

Методами фрактальной морфометрии, гистологического, гистохимического, электронно-микроскопического анализа изучено структурно-функциональное состояние иммунной и сердечно-сосудистой систем при стрессовых воздействиях разного генеза. Показано, что структура миокарда при холодном стрессе в отличие от тимуса имеет существенные фрактальные свойства. Динамика чередования персистентности и антиперсистентности в сердце и мозге противофазна.

**Ключевые слова:** фрактальная морфометрия, гипотермия, миокард, тимус.

Методами фрактальної морфометрії, гістологічного, гістохімічного, електронно-мікроскопічного аналізу вивчено структурно-функціональний стан імунної та серцево-судинної систем при стресових впливах різного генезу. Показано, що структура міокарда при холодному стресі на відміну від тимуса має суттєві фрактальні властивості. Динаміка чергування персистентності та антиперсистентності в серці та мозку протифазна.

**Ключові слова:** фрактальна морфометрія, гіпотермія, міокард, тимус.

Using the methods of fractal morphometry, histological, histochemical electron-microscopic analysis there was investigated structural and functional state of immune and cardiovascular system under stress effects of different genesis. It was demonstrated that myocardium structure during cold stress had considerable fractal properties in contrast to thymus. Dynamics of the interchange of persistence and antipersistence in heart and brain is of an anti-phase character.

**Key words:** fractal morphometry, hypothermia, myocardium, thymus.

Основное положение концепции экзистоэнцефалической системы (ЭЭС) может быть определено в понятии о функциональной гомеометрии физиологических систем (измерение схожести). Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) как ключевое звено ЭЭС обеспечивает не только биохимический гомеостаз, но и постоянство (стресс-устойчивость) пространственно-временных паттернов мозга (геометрии в широком смысле слова). При холодном стрессе в реализации общего адаптационного синдрома, кроме классических функциональных систем [4], принимают активное участие иммунная и сердечно-сосудистая системы организма. Цель данной работы – определение их структурно-функциональных характеристик при болевом и холодном стрессе.

#### Материалы и методы

У белых крыс-самцов вызывали болевой стресс (БС) [3,4], проводили краниocereбральную гипотермию (КЦГ) до достижения температуры тела 32°C и ритмическую гипотермию (РГ) при частоте

Basic statement of the conception of existoencephalic system (EES) can be defined in the notion of functional homeometry of physiological systems (the measurement of similarity). Blood brain barrier (BBB) as a key link of EES provides not only biochemical homeostasis, but constantly (stress resistance) of spatial-time brain patterns (geometry in a wide meaning of the word). Under cold stress in the realization of general adaptation syndrome, in addition to classic functional systems [2], an organism's immune and cardiovascular system take an active part. The aim of this work was to determine their structural and functional characteristics under pain and cold stress.

#### Materials and methods

In white male rats the pain stress (PS) was caused [3, 4], craniocerebral hypothermia (CCH) was performed up to reaching the body temperature of 32°C and rhythmic hypothermia (RhH) at the effect frequency with cold air of 0.1Hz [1, 2, 6].

There was applied the complex of morphological methods of investigations: staining with hematoxylin

**Адрес для корреспонденции:** Марченко В.С., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 7721119, факс: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

**Address for correspondence:** Marchenko V.S. Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Nat. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7721119, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

воздействия холодным воздухом 0,1 Гц [1, 2, 6].

Был применен комплекс морфологических методов исследования: окраска гематоксилином и эозином, пирюфуксином по Ван Гизону, железным гематоксилином по Гейденгайну, основным фуксином по Ли для определения ранних стадий повреждения кардиомиоцитов (КМЦ); гистохимическое определение общего белка по Даниелли, гликогена по Шабадашу, тканевых гликопротеинов (PAS-реакция и гликозаминогликанов (ШИК) – Хейл, ДНК по Фельгену и РНК по Браше. Для изучения миофибриллярного аппарата и характеристики повреждений КМЦ использованы поляризационно-оптический метод и фазово-контрастная микроскопия. В ряде случаев проведено электронно-микроскопическое исследование [1].

Иммунологические исследования проводили на 4-е сутки после моделирования БС и применения РГ. Т-лимфоциты определяли с помощью реакции розеткообразования с использованием эритроцитов морской свинки по Фримелю [5], субпопуляций Т-лимфоцитов – путем определения теofilлин-чувствительности этих клеток. В-клетки определяли методом розеткообразования с эритроцитами морской свинки (эритроциты, нагруженные антителами в системе комплемента). Концентрацию циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) определяли по Струновой с ПЭГ-6000 [5].

### Результаты и обсуждение

Болевой стресс вызывал серьезные изменения в показателях иммунного статуса экспериментальных животных (таблица). На фоне явно выраженной лейкопении и сохраняющихся в пределах нормы показателей процентного содержания лимфоцитов наблюдалось достоверное повышение содержания Т-лимфоцитов и концентрации регуляторных субпопуляций (примерно в 2 раза). При этом иммунорегуляторный индекс ( $T_{\text{help}}/T_{\text{suppr}}$ ) достоверно не отличался от контрольных значений.

Оценка состояния гуморального звена иммунитета при БС также подтверждает факт его нарушения (таблица). На фоне почти трехкратного повышения в сравнении с контролем содержания В-лимфоцитов отмечено резкое увеличение содержания гетерофильных гемолизинов и 2-кратное снижение концентрации комплемента. Последнее обстоятельство может быть следствием чрезмерного накопления ЦИК, сорбирующих комплемент экспрессируемыми на них рецепторами к этому белку.

Быстрое повышение при стрессе количества глюкокортикоидов [2] сопровождается проявле-

and eosin, profuchin according to Van-Gieson, iron hematoxylin according to Heidenhain, basic fuchsin according to Lee for determining the early stages of damage of cardiomyocytes (CMC); histochemical determination of total protein according to Danielli, glycogen of Shabadash, tissue glycoproteins (PAS-reaction and glycosaminoglycans by Hale) DNA according to Feulgen and RNA according to Brachet. To study myofibrillar apparatus and the characteristics of CMC damage there were used polarization-optic method and phase contrast microscopy. In some cases there was performed electron-microscopic investigation [1].

Immunological studies were carried out to the 4<sup>th</sup> day after modeling the PS and application of RhH. T-lymphocytes were determined with the reactions of rosette-formation using guinea pig's erythrocytes according to Frimel [5], subpopulations of T-lymphocytes were determined on theophyllin sensitivity of these cells. B-cells were studied by the method of rosette-formation with guinea pig's erythrocytes (the erythrocytes loaded with antibodies in the complement system). CIC concentration was found according to Strunova with PEG-6000 [5].

### Results and discussion

Pain stress caused serious changes in the indices of immune status of experimental animals (Table). On the background of evident leucopenia and keeping within the norm limits of lymphocyte percentage there was found a statistically true rise in the content of T-lymphocytes and the concentration of regulatory subpopulations (approximately twice). In this case immune regulatory index ( $T_{\text{help}}/T_{\text{suppr}}$ ) statistically did not differ from the control values.

The assessment of the immunity humoral link state at PS as well confirms the fact of its disorder (Table). On the background of almost three-fold increase of B-lymphocytes content in comparison with the control there was noted a sharp rise in the content of heterophylic hemolysins and two-fold reduction in complement concentration. The latter can be the consequence of extra-accumulation of CICs, absorbing the complement by the receptors to these proteins expressing on them.

Rapid rise of the amount of glucocorticoides [2] during the stress is accompanied with manifestation of their immune modulating activity as immune depressive syndrome. Such a state can be characterized with not only the death of thymocytes in thymus, but also with a rise in releasing out of it T-cells with altered structural and functional characteristics. Probably one can explain the fact that at PS the concentration of T-cells in animals' blood is increased and accompanied with a rise in concentration of regulatory subpopulations. It is not excluded that under

нием их иммуномодулирующей активности в виде иммунодепрессивного синдрома. Такое состояние может характеризоваться не только гибелью тимоцитов в тимусе, но и повышением выброса из него Т-клеток с измененными структурно-функциональными характеристиками. Видимо, этим и можно объяснить тот факт, что при БС концентрация Т-клеток в крови животных повышена и сопровождается увеличением концентрации регуляторных субпопуляций. Не исключено, что в условиях развития БС и искажения спектра продуцируемых Т-клетками цитокинов имеет место разбалансирование лиганд-рецепторных взаимодействий в общем спектре нейроиммунных взаимоотношений.

Воздействие РГ на организм животных после БС вызывало разнонаправленные изменения показателей клеточного иммунитета. Она минимизировала степень проявления лейкопении и снижения концентраций лимфоцитов. Это воздействие снижало Т-лимфоцитоз, хотя и после применения РГ этот показатель оставался выше контрольных величин. На иммунорегуляторные звенья Т-клеток РГ действовала подобным образом, можно отметить большую "тропность" РГ к Т-хелперам.

Таким образом, в экспериментальной группе животных, которым на фоне БС производили ритмические холодовые воздействия, была отмечена выраженная коррекция состояния иммунореактивности организма крыс. Это подтверждает единство функционирования иммунной и нервной систем. На клетках иммунной системы (ИС) существуют рецепторы к таким гормонам и биологически активным веществам, как кортикостероиды, инсулин,  $\beta$ -адренергические агенты и др. Известно, что интерлейкины в ЦНС могут выполнять роль нейромедиаторов. Некоторые цепи сетевых взаимодействий между иммунной и нейроэндокринной системой уже хорошо изучены (например то, что многие иммунные реакции находятся под контролем гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы). Связь с нейрональными защитными механизмами гомеостаза мозга могла бы осуществляться посредством взаимодействия центрального и периферического потоков монооксидов азота при стимуляции нейронально-глиальных, эндотелиальных и макрофагальных NO-синтаз [6].

Наличие сложных интимных механизмов нейроиммуноэндокринных взаимоотношений определяет весьма тонкий баланс положительных и отрицательных моментов перекрёстной адаптации к стресс-факторам разной модальности.

Так, в условиях КЦГ тимус охлажденных животных практически не отличался от такового

Показатели клеточного и гуморального звеньев иммунитета у обследованных животных  
Indices of cellular and immunity humoral links in examined animals

Показатели Indices	Воздействие Effect		
	Контроль Control	БС PS	РГ RhH
Лейкоциты, тыс. Leucocytes, thous.	10,0 ± 1,2	4,2 ± 0,3*	4,0 ± 0,5*
Лимфоциты, % абс. числа Lymphocytes, %, absolute numbers	36 ± 3,9 3,6 ± 0,3**	30 ± 3,7 1,36 ± 0,2*	27 ± 3,0 1,08 ± 0,12
Т-лимфоциты, % абс. числа T-lymphocytes, %, absolute numbers	45 ± 4,8 0,68 ± 0,09	16 ± 2,0 0,58 ± 0,07*	27 ± 3,1 0,31 ± 0,4**
Т-хелперы, % T-helpers, %	24 ± 2,8	10 ± 0,9*	20 ± 2,4**
Т-супрессоры, % T-suppressors, %	10 ± 1,6	5 ± 0,02*	12 ± 0,2**
$\frac{T_{\text{хелп}}}{T_{\text{хелп}}/T_{\text{супр}}}$	2,4 ± 0,21	2,0 ± 0,19	1,8 ± 0,3
В-лимфоциты, % B-lymphocytes, %	7 ± 0,1**	25 ± 3,0*	15 ± 2,0**
Комплемент Complement	1,6 ± 0,02	0,8 ± 0,09*	0,5 ± 0,04**
Гетерофильные гемолизины Heterophyllin hemolysins	0,11 ± 0,02	0,67 ± 0,07*	0,14 ± 0,03**

Примечания: \* – различия с контролем ( $p < 0,05$ );  
\*\* – с БС ( $p < 0,05$ )

Notes: \* – differences in respect of the control ( $p < 0.05$ );  
\*\* – PS ( $p < 0.05$ )

development of PS and distortion of the spectrum of produced by T-cells cytokines a misbalance of ligand-receptor interactions takes place in total spectrum of neuro-immune relationships.

RhH effect on an organism of animals after PS caused versatile changes in the indices of cell immunity. It minimized the degree of leucopenia manifestation and the reduction in lymphocyte concentration. This effect decreased T-lymphocytosis, though after RhH application this index remained higher than the control values. RhH affected immune regulatory links of T-cells in similar way, one can note a high "tropicity" of RhH to T-helpers.

Thus in experimental group of animals, which on PS background were rhythmically affected, there was found a manifested correction of the state of rats' organism immune reactivity. This confirms the unity in functioning of immune and nervous systems. On cells of immune system (IS) there are the receptors to such hormones and biologically active substances as corticosteroids, insulin,  $\beta$ -adrenergic agents etc. It is known that interleukins in CNS can play the role of neuromediators. Some chains of network interactions

у животных контрольных групп, хотя после гипотермии менее четко определялись в долях корковая и мозговая части (рис.1). В корковом веществе наблюдались многочисленные митотически делящиеся тимоциты, контакты между ними очень плотные. Сосуды в междольковых перегородках расширены и полнокровны. Большая часть долек занята корковым веществом, которое в виде небольших тяжей входит в мозговое. Сами долики увеличены. Все эти признаки свидетельствуют об определенной степени гипертрофии тимуса.

Близкая к евклидовой размерность морфологической организации тимуса на всех этапах наших экспериментов (рис.1) отнюдь не означала отсутствие, а наоборот, определяла наличие функциональных проблем. Возможно, именно их помогла выявить РГ благодаря резонансоподобному характеру своего действия на организм. Низкая фрактальность ключевого звена ИС при КЦГ выглядит неожиданной. Для ЦНС был характерен большой уровень хаотичности. На том или другом этапе воздействий в среднем фрактальная размерность нейроглиально-эндотелиальных комплексов равнялась 1,3 (рис.2). В этом смысле тимус не является исключением из закономерности о разнонаправленной динамике структурно-функционального рисунка центра и периферии при стрессах разного генеза и интенсивности.

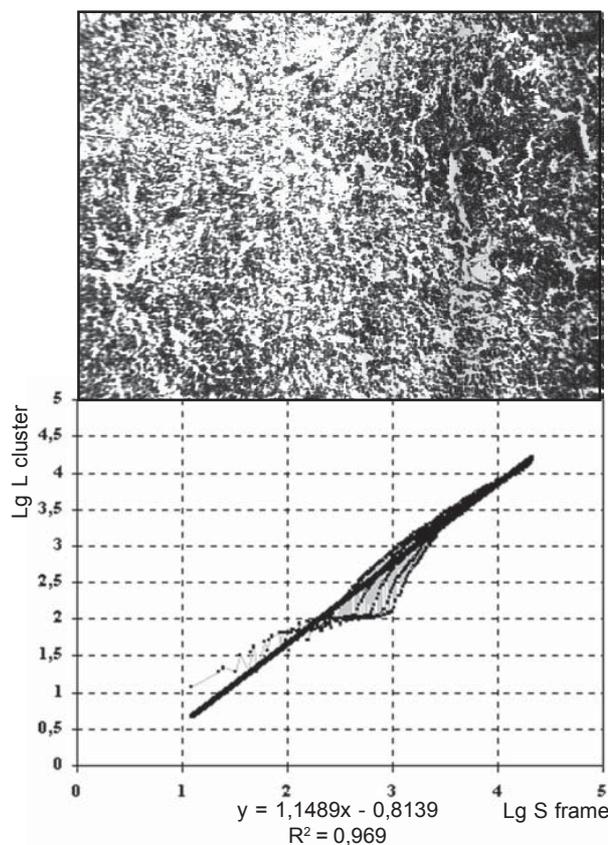
В отличие от иммунной сердечно-сосудистая система, безусловно, обладает ярко выраженными фрактальными свойствами [8]. Однако в отечественной биологической науке метод фрактальной морфометрии пока не нашёл широкого применения. Поэтому мы, наряду с фрактальной размерностью, приводим описание структурных изменений миокарда в традиционных терминах морфологии.

КЦГ приводила к изменению КМЦ, характеризующемуся снижением интенсивности и потерей исчерченности. В поляризованном свете отмечалось снижение анизотропии А-дисков, в фазовом контрасте – уменьшение оптической плотности дисков саркоплазмы мышечных клеток и Z-полос. Указанные изменения КМЦ сопровождались диффузным ослаблением реакции на общий белок Даниелли. ШИК-реакция и реакция на гликоген по Шабадашу выявляли заметное уменьшение количества гликогена (рис.3), выражающееся в нарушении ориентировки гранул гликогена и появлении крупнозернистых гранул; сохранявшийся гликоген располагался преимущественно в субсарколемных отделах клетки по ходу А-дисков. Вены с признаками значительного снижения тонуса и полнокровия. Реакция Браше на РНК выявляла участки усиленной пиронинофилии под сарколеммой КМЦ и в перинуклеарных зонах. Реакция Фельгена на ДНК имела тенденцию

between immune and neuroendocrine systems have been already well studied (e.g. the fact that many immune reactions are controlled by hypothalamus-hypophysis-adrenal system).

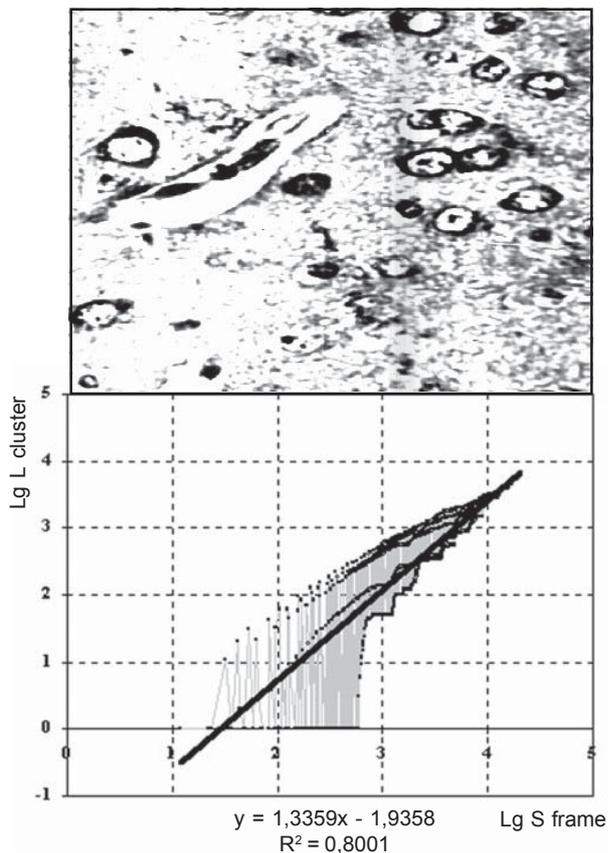
The connection with neuronal protective mechanisms of brain homeostasis could be accomplished through the interaction of central and peripheral fluxes of nitrogen monoxides during stimulation of neuronal-glial, endothelial and macrophagal NO-synthases [6].

The presence of complicated intimate mechanisms of neuroimmunoendocrine relationships determines a very fine balance of positive and negative moments of cross-adaptation to stress factors of various modality. So, under CCH conditions the thymus of cooled animals did not practically differ from that in animals of the control groups, though after hypothermia the cortex



**Рис. 1.** Тимус крысы после КЦГ (32°C). Четкая граница между корковым и мозговым веществом отсутствует.  $\times 140$ . Здесь и на следующих рисунках: 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.** Rat thymus following CCH 32°C. There is no clear boundary between cortical substance and *medulla*.  $\times 140$ . Here and in Figs 2-11: axis Y – logarithm of a cluster length (in pixels) from the image points of the set staining intensity ( $\geq 50\%$ ) of bioobject; axis x – logarithm of the square of rectangular frame (in pixels), in which the cluster is. Fractal dimension (D) is equal to the pitch of the straight line  $y(x)$ ,  $R^2$  – the probability evaluation of the approximation.



**Рис. 2.** Кора больших полушарий крысы после 6 ч охлаждения.  $\times 280$ .

**Fig. 2.** Large hemispheres cortex in rats following a 6-hrs' cooling.  $\times 280$ .

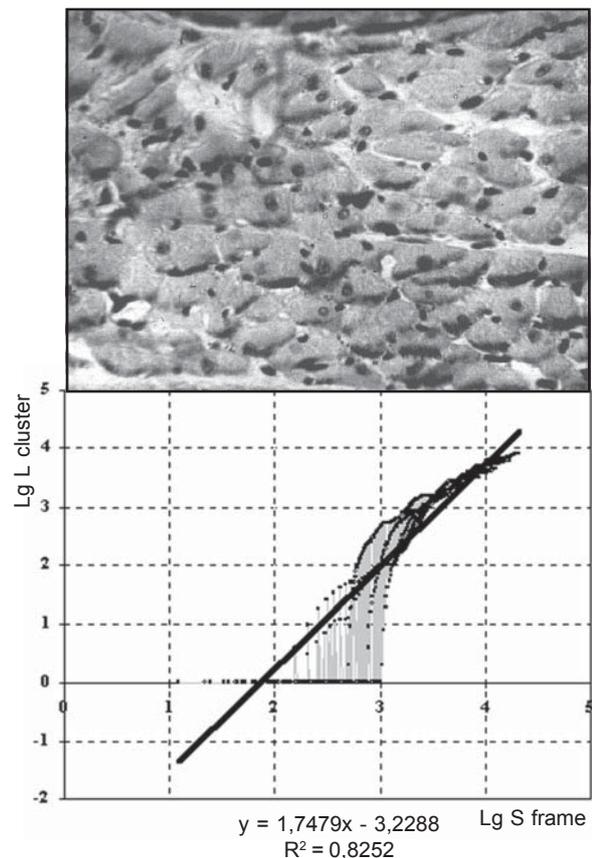
к снижению. Электронно-микроскопически описанные гистологические изменения реализовывались в виде просветления цитоплазмы, умеренной гетерогенности митохондрий, изменения формы ядра (рис.4).

Артериальное русло большей частью с признаками повышенного тонуса, что более выражено в мелких интрамуральных артериях, где отмечалось реактивное состояние эндотелия с утолщением гладкомышечного слоя (спазм). Вены миокарда, особенно в перимизии, расширены, полнокровны с перераспределением элементов крови в просвете; отмечена повышенная сосудистая проницаемость в виде набухания стенки вен с парциальным, преимущественно эндотелиальным, восприятием железного гематоксилина по Гейденгайну (рис.5), фуксинофилией по Ли, ШИК-положительной реакцией с усилением реакции на щелочную фосфатазу. Микроциркуляторное русло (МЦР) с признаками неравномерного снижения тонуса, хорошо выявлялась ШИК-реакция железным гематоксилином по Гейденгайну, усиливалась реакция на щелочную фосфатазу (рис.6). В месте снижения тонуса МЦР, в расширенных капиллярах, наблюдались эритроциты с обычными тинкториальными свойствами.

and medulla parts were less determined in the lobes (Fig. 1). In cortical substance there were observed multiple mytотically cleaving thymocytes, the contacts between them were very tight. The vessels in interlobar septum were extended and filled with blood. The major part of lobes was occupied with cortical substance, which as small bonds enters the medulla.

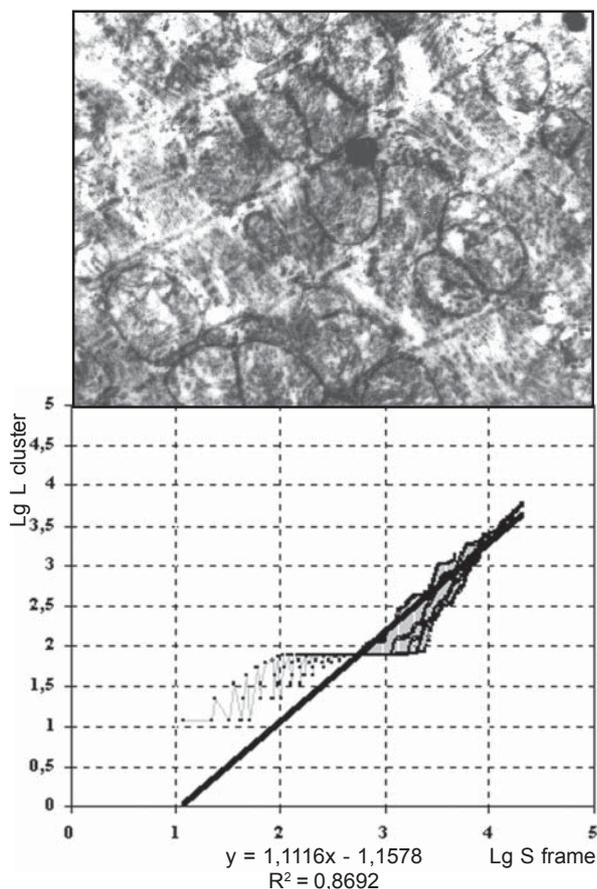
The lobes themselves are increased. All these signs testify to a certain degree of thymus hypertrophy.

Close to Euclidian one the dimensions of morphological organization of thymus at all the stages of our experiments (Fig. 1) did not mean the absence not at all and vice a versa it determined the presence of functional problems. It is them, which probably were revealed with RhH due to resonance-like character of their effect on an organism. Low fractality of IS key link at CCH looks sudden. For CNS there was characteristic a high level of chaotic state, at this or that stage of effects a fractal dimensions of neuroglial-endothelial complexes was equal to  $\sim 1.3$  (Fig. 2). In this meaning the thymus is not the exception of the regularity about versatile dynamics of structural and functional picture of the center and periphery under stresses of various genesis and intensity.



**Рис. 3.** Миокард левого желудочка крысы через 1 ч после КЦГ. Снижение количества гликогена в КМЦ. Реакция по Шабашу.  $\times 400$ .

**Fig. 3.** Left ventricle myocardium of rat in 1 hour following CCH. Fall of glycogen amount in CMC. Satining according to Shabadash.  $\times 400$ .



**Рис. 4.** Миокард крысы через 1 ч после КЦГ. Гетерогенность митохондрий КМЦ.  $\times 15000$ .

**Fig.4.** Rat myocardium in 1 hour following CCH. Heterogeneity of CMC mitochondria.  $\times 15000$ .

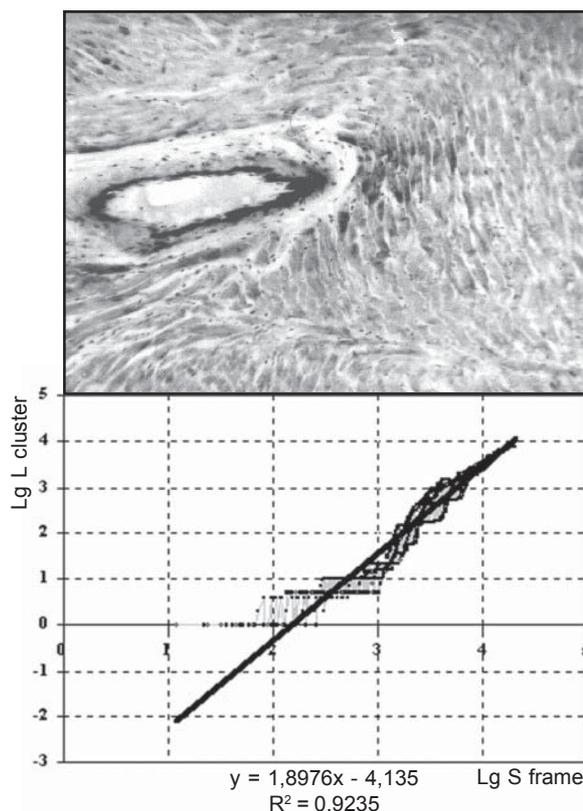
В строме отмечен умеренный отек, преимущественно вокруг расширенных вен с накоплением в эндомизии PAS Хейл-положительного материала с распространением на прилежащие отделы эндомизия.

Метод Ли выявлял очаговые повреждения единичных КМЦ контрактурного характера, которые локализовались в интрамуральных отделах миокарда левого желудочка, вокруг расширенных полнокровных вен (рис.7). Эти повреждения характеризовались сближением А-дисков при поляризационной микроскопии и повышением оптической плотности указанных сегментов в фазовом контрасте. Зоны повреждений давали усиленную реакцию на общий белок по Даниелли, окрашивались основным фуксином по Ли и железным гематоксилином по Гейденгайну. В КМЦ отмечалось значительное снижение реакций на ферменты окислительно-восстановительного ряда, однако их полного исчезновения не обнаруживалось даже в поврежденном сегменте волокна. По данным [7], указанные контрактурные повреждения, выявляемые лишь специальными методами, являются начальными стадиями изменений и имеют обратимый характер.

В области предсердий, особенно правого, в

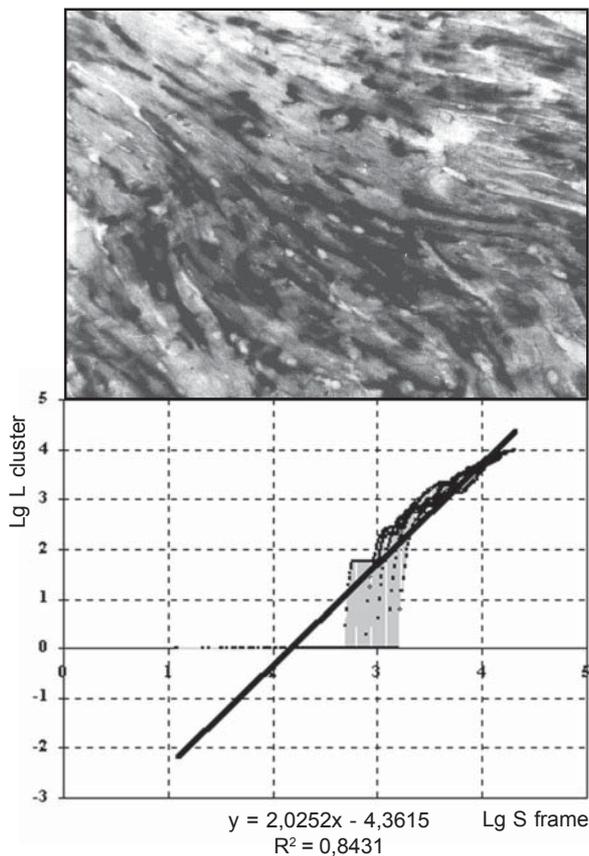
In contrast to immune system the cardiovascular one possesses evidently manifested fractal properties [8]. However in biology of this country the method of fractal morphometry has not been widely applied yet. Therefore we together with fractal dimensions are describing the structural changes in myocardium in traditional morphology terms.

CCH resulted in the change of CMCs, characterized by the intensity decrease and loss of covering with lines. In a polarized light there was noted the reduction of A-discs anisotropy, in a phase contrast there was found the optic density lessening in muscular cells sarcoplasm and Z- stripes. The mentioned CMC changes were accompanied by a diffuse weakening of Danielli's total protein reaction. PAS-reaction and glycogen reaction on Shabadash revealed a noticeable reduction of glycogen amount (Fig. 3), manifested in the impairment of glycogen granules orientation and manifestation of large-grained granules; the glycogen remained was mainly located in subsarcolemma cell sites along the discs. Veins characterized with the signs of significant tonus reduction and plethora. RNA Brachet reaction revealed the sites of an increased pironinophylia under CMC sarcolemma and in perinuclear zones. Feulgen reaction on DNA showed the tendency to reduction. Electron microscopically



**Рис. 5.** Миокард крысы через 1 ч после КЦГ. Повышенная сосудистая проницаемость субэндотелиальных отделов вены. Окраска по Гейденгайну.  $\times 200$ .

**Fig. 5.** Rat myocardium in 1 hour following CCH. An increased vascular permeability of subendothelial vein compartments. Staining by Heidenhain.  $\times 200$ .



**Рис. 6.** Миокард крысы через 1 ч после КЦГ. Усиление активности щелочной фосфатазы в стенках капилляров. Реакция Гомори.  $\times 200$ .

**Fig. 6.** Rat myocardium in 1 hour following CCH. Activity increase of alkaline phosphatase in capillaries walls. Homori reaction.  $\times 200$ .

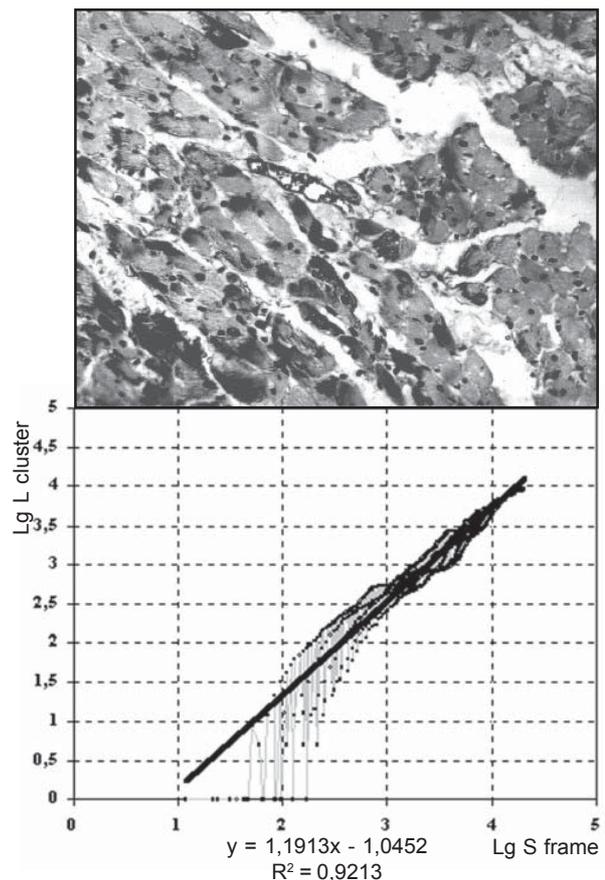
субэндокардиальных отделах обнаруживались одиночные очаговые повреждения КМЦ (рис.8), характеризующиеся некоторым уменьшением количества миофибрилл при фазово-контрастной микроскопии и их набуханием. Анизотропные свойства КМЦ соответствовали количеству сохранившихся миофибрилл. Ядра гипохромные, набухшие. Поврежденные сегменты КМЦ утолщены с увеличением диаметра в 2-2,5 раза и захватывали несколько саркомеров. Участки волокон с явлениями миоцитолита окрашивались кислыми и основными красителями слабее, чем нормальные волокна. Отмечены снижение реакции и нарушение ориентации зерен гликогена. Зона миоцитолита не обладала ШИК – положительными свойствами, не окрашивалась железным гематоксилином по Гейденгайну и основным фуксином по Ли. Реакция на общий белок значительно снижена. Реакции на РНК и ДНК в зонах миоцитолита также снижены. Гранулы формазана, соответствующие локализации ферментов окислительно-восстановительного ряда, дезориентированы и расположены преимущественно диффузно и реже, чем в неповрежденных мышечных волокнах.

described histological changes were realized as a cytoplasm lightening, moderate heterogeneity of mitochondria, change of the nucleus shape (Fig. 4).

Arterial bed is mainly characterized by an increased tonus, that is more manifested in small intramural arteries, where there was noted the reactive state of endothelium with the thickening of smooth muscular layer (spasm).

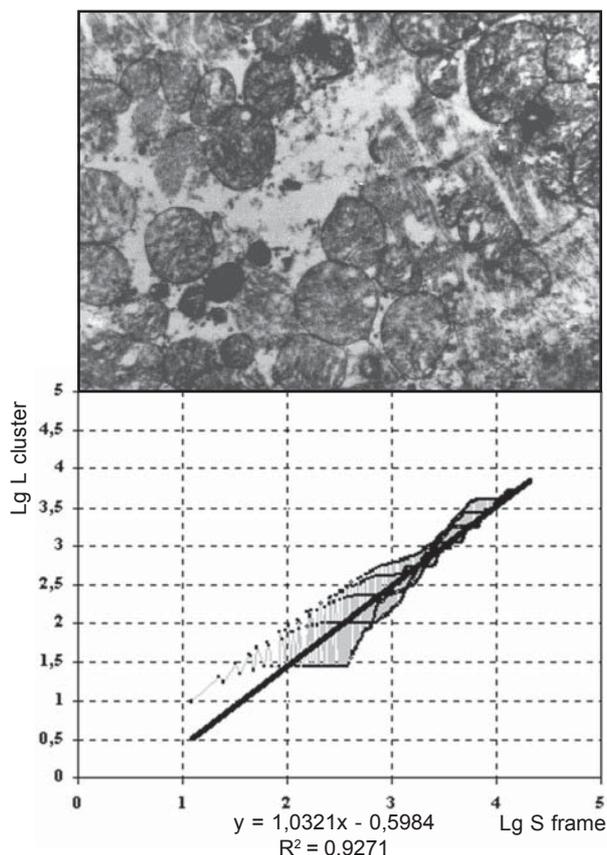
Myocardium veins, especially in perimysium, are widened, plethoral with blood elements redistribution in lumen; an increased vascular permeability is noted as a vein wall swelling with partial, predominantly endothelial perception of ferrous hematoxylin on Heidenhain (Fig. 5), fuchsinophylia on Lee, PAS-positive reaction with its intensification to alkaline phosphatase. Microcirculatory bed (MSB) was characterized by the signs of an uneven tonus reduction, PAS reaction by ferrous hematoxylin on Heidenhain was well manifested, alkaline phosphatase reaction intensified (Fig. 6). In the site of MCB reduction, in widened capillaries there were observed the erythrocytes with common tinctorial properties.

Moderate edema was noted in stroma, mainly around widened veins with accumulation PAS (Hale)-



**Рис. 7.** Миокард крысы через 1 ч после КЦГ. Контрактурные изменения вокруг интрамуральных вен. Окраска по Ли.  $\times 200$ .

**Fig. 7.** Rat myocardium in 1 hour following CCH. Contracture changes around intramural veins. Staining according to Lee.  $\times 200$ .



**Рис. 8.** Миокард крысы через 1 ч после КЦГ. Очаговый миоцитоллиз КМЦ.  $\times 15000$ .

**Fig. 8.** Rat myocardium in 1 hour following CCH. Focal myocytolysis of CMC.  $\times 15000$ .

Эти изменения носят характер очаговых повреждений миофибрилл с признаками миоцитоллиза и являются обратимыми [7].

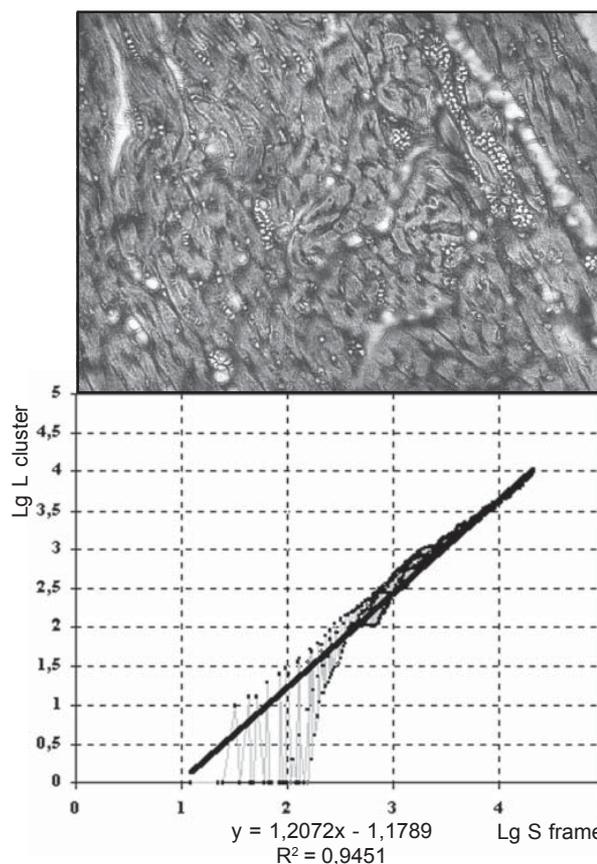
Морфологическое исследование сердца экспериментальных животных после 6-часового воздействия КЦГ на уровне температуры тела  $32^{\circ}\text{C}$  выявляло изменения, аналогичные таковым при часовом охлаждении. Они касались функционально-активной паренхимы и стромы КМЦ, имели более распространенный характер. Так, электронно-микроскопически в КМЦ отмечались гетерогенность, набухание митохондрий, нечеткость контуров крист и их частичное разрушение, что наиболее характерно для очаговых повреждений контрактурного типа. Указанные изменения сопровождалось снижением реакции на гликоген и общий белок.

Стромальные изменения характеризовались сниженным тонусом сосудистого русла с повышением сосудистой проницаемости венозного сегмента, выявляемого ШИК-реакцией, железным гематоксилином по Гейденгайну и основным фуксином по Ли. Изучение МЦР показало снижение тонуса (рис. 9), капилляры были расширены с умеренно разрыхленной ШИК-положительной стенкой, в которой отмечалась

positive material in endomysium with spreading on the adjoining endomysium sites.

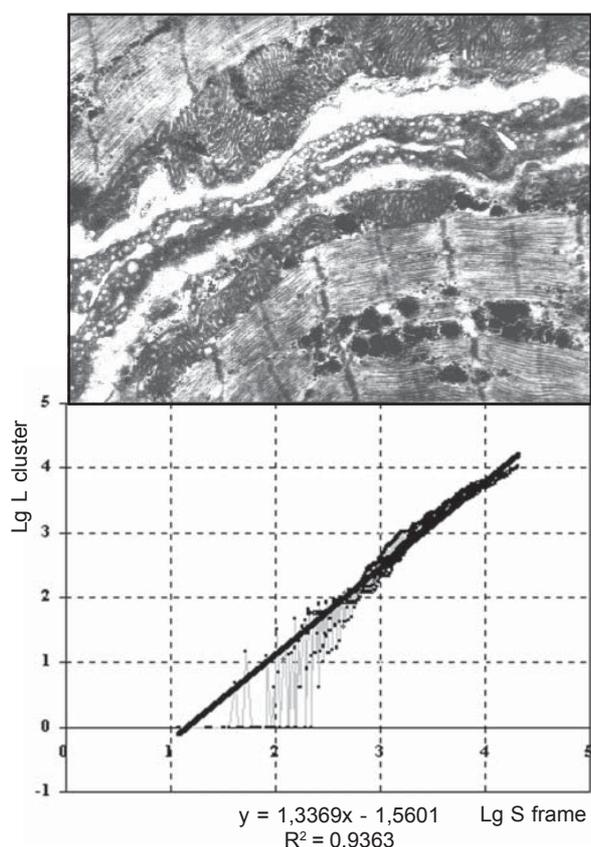
Lee method revealed focal damages of contracture character of single CMCs, which were localized in intramural myocardium compartments of left ventricle, around widened plethoric veins (Fig. 7). These damages characterized by A-discs approaching at polarization microscopy and by an optic density rise of the segments mentioned in a phase contrast. Damages zones showed an intensified reaction on a total protein according to Danielli, were fuchsin stained mainly according to Lee and ferrous hematoxylin according to Heidenhain. In CMCs there was noted a considerable decrease of responses to oxidative-recovery row enzymes, although no complete disappearance of those was noted even in a damaged fiber segment. According to the data [7] the mentioned contracture impairments revealed only by specific methods are the initial stages of the alterations and possess a reversible character (Fig. 8).

In pericardial site, especially of the right one, in subendocardial compartments there were revealed single focal CMCs impairments (Fig. 8), characterized by a slight reduction of myofibrilles number at phase-contrast microscopy and by their swelling as well.



**Рис. 9.** Миокард крысы после 6-часовой КЦГ. Снижение тонуса МЦР. Фазово-контрастная микроскопия.  $\times 2000$

**Fig. 9.** Rat myocardium 6 hours following CCH. Tonus reduction of MCR. Phase-contrast microscopy.  $\times 2000$ .



**Рис. 10.** Электронно-микроскопический снимок фрагмента миокарда крысы спустя 6 ч после КЦГ. Восстановление структур КМЦ.  $\times 15000$ .

**Fig.10.** Electron-microscopic image of rat myocardium fragment 6 hrs after CCH. Recovery of CMC structures.  $\times 15000$ .

выраженная реакция на щелочную фосфатазу. Замедление кровотока в капиллярах наблюдали в зонах с очаговыми изменениями КМЦ. Эритроциты в этих сегментах капилляров теряли свои тинкториальные свойства и воспринимали, хотя и не постоянно, основной фуксин и железный гематоксилин. Стромальный отек был более выражен в сравнении с предыдущей группой наблюдений и распространялся на эндомизий.

Описанные очаговые контрактурные повреждения КМЦ по глубине изменений оставались в пределах 1-й стадии со значительным снижением реакции на общий белок. Количество специфических биологически активных гранул, локализующихся в КМЦ с признаками миоцитолита, большое, за счет внутриклеточного отека они оттеснены далеко от ядра. По оптической плотности и размерам гранулы гетерогенны. Следует отметить выраженный отек вокруг поврежденных клеток с их разобщением. В этих же зонах предсердий отмечались небольшие реологические изменения МЦР, которые хорошо выявлялись фазово-контрастной микроскопией.

В течение 24-48 ч после отогрева животных наблюдалось восстановление структуры КМЦ

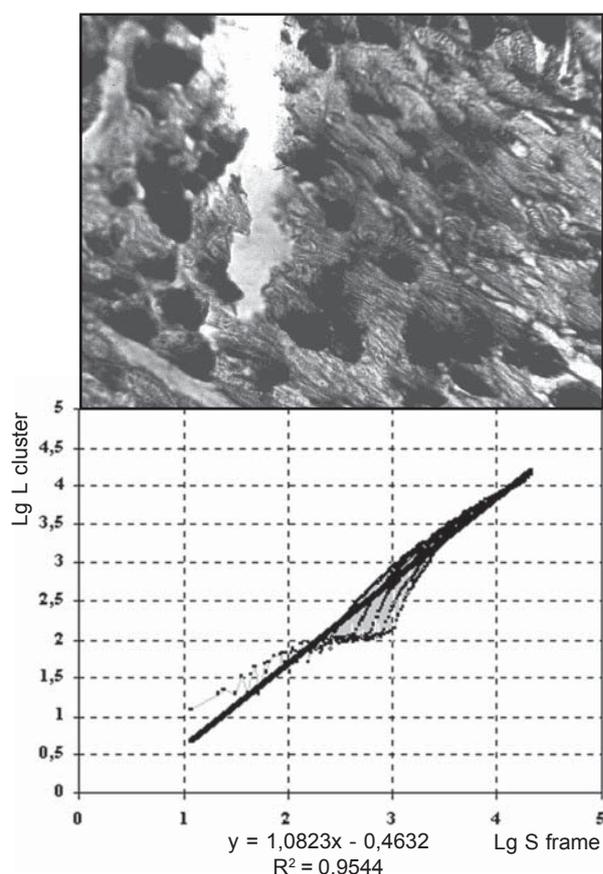
CMCs anisotropic properties corresponded to the amount of myofibrilles remained. The nuclei are hypochromic, swollen. Damaged segments of CMCs are thickened with the 2-2.5-fold diameter rise and captured a few sarcomeres. Fibers sites with the phenomena of myocytolysis were weakly stained by acidic and main dyes, comparing to normal fibers. There were noted the reaction decrease and the failure of glycogen grains orientation. Myocytolysis zone did not possess the PAS-positive characteristics, had not been stained by ferrous hematoxylin according to Heidenhain and basic fuchsin according to Lee. Total protein reaction was considerably lowered. RNA and DNA responses in myocytolysis zones were also decreased. Formazan granules, corresponding to enzymes localization of oxidative-recovering row, were disoriented and mainly located diffusely and rarely than in non-damaged muscular fibers.

These alterations have the character of focal myofibrilles impairments with myocytolysis signs and are considered to be reversible [7].

Morphological investigation of experimental animals' heart following the 6-hrs' CCH effect at the level of the body temperature  $32^{\circ}\text{C}$ , had revealed the changes analogous to the ones under a 1-hour cooling. They were related to a functionally-active parenchyma and CMCs stroma, and were of a more spread character. Electron-microscopic test of CMC had noted heterogeneity, mitochondria swelling, unclarity of the cristas contours and their partial damage, that was the most characteristic for a contracture type focal damages. Mentioned changes were accompanied by the response reduction on glycogen and total protein.

Stromal changes were characterized by the decreased tonus of a vascular flow with an increase of a venous segment vascular permeability, revealed by PAS-reaction, ferrous hematoxylin according to Heidenhain and basic fuchsin according to Lee. MCB investigation showed the tonus reduction (Fig. 9), capillaries were widened with moderately crumbled PAS-positive wall, where there was noted a manifested response to alkaline phosphatase. The slowing down of blood flow in capillaries was observed in the sites with CMCs focal changes. Erythrocytes in those capillary segments lost their tinctorial characteristics and perceived the basic fuchsin and ferrous hematoxylin, although not constantly. Stromal oedema was more manifested comparing to the previous group of observations and was spreading to an endomysium.

The described focal contracture CMCs impairments on the changes depth remained to be within the 1<sup>st</sup> stage with a significant decrease of total protein response. The amount of specific biologically active granules, localized in CMC with the signs of myocytolysis is huge, due to an intracellular oedema they are pushed-out far away from the nucleus. The



**Рис. 11.** Миокард крысы на 2-е сутки после 6-часовой КЦГ. Восстановление гликогена в КМЦ. ШИК-реакция.  $\times 400$ .

**Fig. 11.** Rat myocardium to the 2<sup>nd</sup> day after 6-hrs' CSH. Glycogen recovery in CMC. PAS-reaction.  $\times 400$ .

(рис. 10), появлялись поперечная исчерченность и анизотропия мышечных волокон с приближением показателей реакций на общий белок к таковым в контрольной группе животных; восстанавливался диффузный и, большей частью, ориентированный гликоген в мышечных волокнах (рис. 11).

Формирование морфофизиологических фракталов в ткани миокарда – признак нормальной электромеханической работы сердца (рис.2-11). По современным представлениям это и квазифрактальная структура сосудов, и фракталоподобные соединительно-тканые образования, прикрепляющие клапаны сердца к мышцам, и фрактальная организация разветвлений некоторых сердечно-мышечных волокон и системы Гиса [8]. Фрактальные структуры из-за своей избыточной нерегулярности являются робастными системами и хорошо противостоят повреждениям.

### Выводы

Фрактальная морфометрия структурно-функциональных особенностей ткани миокарда при КЦГ показала, что для сердечно-сосудистой системы в основном характерна полученная ранее закономерность: противофазная динамика

granules are heterogenous on the optic density and sizes. The manifested edema around the damaged cells and their dissociation should be noted. In those pericardial zones there were observed slight rheological changes of MCB, revealed by a phase-contrast microscopy.

Within 24-48 hrs following the animals' warming there was noted the recovery of CMCs structure (Fig. 10), there was appeared a diametrical covering with lines and muscular fibers anisotropy with approaching the indices of total protein reaction to those in the control animals group; diffusive and oriented glycogen in muscular fibers was mainly recovered (Fig.11).

### Conclusions

Fractal morphometry of the tissue structural and functional peculiarities of a myocardium tissue during hypothermia had shown that for cardiovascular system the obtained earlier regularity was also characteristic: anti-phase dynamics of the persistence and antipersistence interchange of brain and periphery functional systems.

Formation of morphophysiological fractals in a myocardium tissue is the sign of normal heart electromechanic functioning (Fig. 2-11). According to current notions these are a vascular quasi-fractal structure and fractal-like connective-tissue formations, connecting heart valves to muscles and fractional organization of branching of some heart muscular fibers and His' system [8]. Because of the surplus irregularity fractal structures are known to be robust systems and are resistant to damages. The revealed by us fractal dynamics may be considered as an important part of general adaptational syndrome during a cold stress.

### References

1. Babijchuk G.A. Mechanisms of neurochemical and pathophysiological processes at cranio-cerebral hypothermia: Thesis for doctors degree obtaining (biology).– Kharkov, 1986.– 280 p.
2. Babijchuk V.G., Marchenko V.S., Grischenko V.I., Babijchuk G.A. To the conception of existoencephalic system of cooled brain. Part 4. Fractal morphometry of trigger thermoregulation structures under cold stress // Problems of Cryobiology.– 2002, N4.– P. 30-44.
3. Vedyayev F.P., Vorobyeva T.M. Models and mechanisms of emotional stresses.– Kiev:Zdorovja, 1983.– 136 p.
4. Vorobyeva T.M., Bakumenko L.P., Nikishkova I.N., Kutikov A.E. Behavioral approaches to non-medicamentous correction of emotional reactions caused by stress// Ukr. visnyk psykhonevrologii.– 1995.– Vol.3, Issue 2.– P. 294-296.
5. *Immunological methods* / Ed. by G. Frimel.– Moscow: Meditsina, 1987.– 472 p.
6. Marchenko V.S., Babijchuk G.A., Marchenko L.N., Polischuk L.V. To the conception of existoencephalic brain cooling system. Part 3. Neuronal gases (NO, CO) as neurotransmitter system of "homeostasis triggering" // Problems of Cryobiology.– 2000.– N4.– P. 27-36.

чередования персистентности и антиперсистентности функциональных систем мозга и периферии. Отчасти поэтому обнаруженную нами фрактальную динамику можно считать важной составной частью общего адаптационного синдрома при холодовом стрессе.

7. Cellarius Yu.G., Semenova L.A. Histopathology of myocardium focal metabolic damages.– Novosibirsk: Nauka, 1972.– 212 p.
8. Goldberger A.L., West B.J. Fractals in physiology and medicine // Yale J. Biol. and Med.– 1987.– Vol.60.– P. 421-435.

*Accepted in 03.01.2003*

### Литература

1. Бабийчук Г.А. Механизмы нейрохимических и патофизиологических процессов при краниocereбральной гипотермии: Дис... докт.биол.наук.– Харьков, 1986.– 280 с.
2. Бабийчук В.Г., Марченко В.С., Грищенко В.И., Бабийчук Г.А. К концепции экзистэнцефалической системы охлажденного мозга. Часть 4. Фрактальная морфометрия триггерных структур терморегуляции при холодовом стрессе // Пробл. криобиологии.– 2002.– №4.– С. 30-44.
3. Ведяев Ф.П., Воробьева Т.М. Модели и механизмы эмоциональных стрессов.– Киев: Здоров'я, 1983.– 136 с.
4. Воробьева Т.М., Бакуменко Л.П., Никишкова И.Н., Кутиков А.Е. Поведенческие подходы к немедикаментозной коррекции эмоциональных реакций, вызванных стрессом // Укр. вісник психоневрології.– 1995.– Т.3, Вип.2.– С. 294-296.
5. Иммунологические методы / Под.ред. Г. Фримеля.– М.: Медицина, 1987.– 472 с.
6. Марченко В.С., Бабийчук Г.А., Марченко Л.Н., Полищук Л.В. К концепции экзистэнцефалической системы охлажденного мозга. Часть 3. Нейрональные газы(NO, CO) как нейротрансмиттерная система “раскачки гомеостаза” // Пробл. криобиологии.– 2000.– №4.– С. 27-36.
7. Целлариус Ю.Г., Семенова Л.А. Гистопатология очаговых метаболических повреждений миокарда. – Новосибирск: Наука, 1972. – 212 с.
8. Goldberger A.L., West B.J. Fractals in physiology and medicine // Yale J. Biol. and Med.– 1987.– Vol. 60.– P. 421-435.

*Поступила 03.01.2003*