

УДК 577.175.44«461»-«464»:612.014.4.064:57.086.13:[611.018.5:618.48

В.В. Ломако^{1*}, О.В. Шило¹, Л.М. Самохіна², Д.Г. Луценко¹

Гіпофізарно-тиреоїдна система щурів різного віку за умов десинхронозу, загальної кріостимуляції та введення кордової крові

UDC 577.175.44«461»-«464»:612.014.4.064:57.086.13:[611.018.5:618.48

V.V. Lomako^{1*}, O.V. Shylo¹, L.M. Samokhina², D.G. Lutsenko¹

Pituitary-Thyroid System in Rats of Different Ages Under Desynchronization, Whole-Body Cryostimulation, and Cord Blood Injection

Реферат: Оцінювали стан центральної та периферичної ланок гіпофізарно-тиреоїдної системи (за вмістом у сироватці крові тиреотропного гормону (ТТГ) та тиреоїдних гормонів Т4 і Т3) у 6- і 18-місячних щурів, яким шляхом інвертування світлового режиму ініціювали циркадний десинхроноз (ЦД). Моделювали ЦД на тлі окремого і сполученого впливу загальної кріостимуляції (ЗКС) за -120°C та ін'єкції кріоконсервованих ядровмісних клітин (ЯВК) кордової крові людини, що застосовувалися превентивно (за добу і тиждень відповідно). У 6-місячних щурів вміст ТТГ істотно зменшувався за умов ЦД та його ініціації після окремого і сполученого з ЗКС введення ЯВК (у 3,4; 3,9 та 6,3 раза відповідно), за ЦД на тлі ЗКС він не змінювався. У 18-місячних тварин вміст ТТГ зменшувався тільки за умов ЦД у 1,8 раза. Вміст Т4 не змінювався за ЦД у щурів обох вікових груп, а також за умов розвитку ЦД на тлі сполученої дії ЗКС та введення ЯВК у 6-місячних тварин та на тлі введення ЯВК у 18-місячних. Вміст Т4 зменшувався в обох вікових групах за умов ЦД на тлі окремого впливу ЗКС (у 1,6 і 1,4 раза відповідно), а збільшувався у 1,3 раза тільки у 18-місячних тварин за розвитку ЦД після сполученої дії ЗКС та введення ЯВК. Вміст Т3 не змінювався.

Ключові слова: тиреотропний гормон, тиреоїдні гормони, десинхроноз, кріостимуляція, кріоконсервована кордова кров, вік.

Abstract: The state of the pituitary-thyroid system central and peripheral links (according to the levels of thyroid stimulating hormone (TSH) and thyroid hormones T4 and T3 in blood serum) were studied in 6- and 18-month-old rats under initiated circadian desynchronization (CD) by the light regime inverting. The CD was simulated against the background of separate and combined effect of both the whole body cryostimulation (-120°C) (WBC) and injections of the nucleated cells (NCs) of human cord blood, applied preventively (for a day and week, respectively). In 6-month-old rats, the TSH level decreased under the CD and its initiation after separate NCs administration and combined with WBC (by 3.4, 3.9 and 6.3 times, respectively) and remained unchanged under CD against the WBC. In 18-month-old rats the TSH level was reduced only at CD by 1.8 times. The T4 level in rats of both age groups did not change under the CD as well as during its development against the background of a combined effect of WBC and NCs administration in 6-month-old animals and against the NCs injection in 18 months-old rats. The T4 level in rats of both age groups decreased at the background of separate effect of the WBC (by 1.6 and 1.4 times, respectively). In 18-month-old animals, the T4 increased under the CD development after a combined effect of WBC and NCs injection by 1.3 times. No changes in the T3 level were found.

Key words: thyroid-stimulating hormone, thyroid hormones, desynchronization, cryostimulation, cryopreserved cord blood, age.

Стан центральної ланки гіпофізарно-тиреоїдної системи (ГТС) визначається за вмістом у сироватці крові (СК) тиреотропного гормону (ТТГ), а периферичної — за рівнем основного гормону щитовидної залози тироксину (Т4) і найбільш активного гормону трийодтироніну (Т3). У СК Т4 і Т3 присутні як у вільній (незв'язаній із білками), так і зв'язаній формах. Гормонально активні тільки вільні форми Т4 і Т3. Тиреоїдні гормони (ТГ) задіяні у процесах терморегуляції, стимулюють ріст і розвиток організму, диференціацію

The state of the central link of the pituitary-thyroid system (PTS) is conditioned by the content of thyroid-stimulating hormone (TSH) in blood serum (BS), and the levels of the main thyroid hormone: thyroxine (T4) and the most active hormone triiodothyronine (T3) determine the state of peripheral one. In BS, the T4 and T3 are present in both free (not bound to proteins) and bound forms. Only free forms of T4 and T3 are hormonally active. Thyroid hormones (THs) are involved in thermoregulation, stimulate the body's growth

¹ Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

² ДУ «Національний інститут терапії ім. Л.Т. Малої НАМН України», м. Харків, Україна

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: victoria0regia@gmail.com

Надійшла 02.06. 2021

Прийнята до друку 07.09.2022

¹ Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

² GI 'L.T. Mala National Institute of Therapy of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine', Kharkiv, Ukraine

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavka str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: victoria0regia@gmail.com

Received 02, June, 2021

Accepted 07, September, 2022

тканин, активують еритропоез і синтез багатьох структурних білків тощо. Тому вміст ТТГ і ТГ у СК може бути інформативним показником стану організму та його адаптивних можливостей, зокрема за старіння й впливу різних ендо- та екзогенних чинників.

Відомо, що циркадна (добова) регуляція — це основа більшості поведінкових, фізіологічних і молекулярних ритмів організму. Неузгодженість центрального водія біоритму, який розташований у супрахіазматичних ядрах гіпоталамуса, з периферичними водіями призводить до розвитку десинхронозу [3]. Сучасна людина постійно або тимчасово стикається з факторами, що сприяють десинхронозу: трансконтинентальні перельоти, праця за змінним графіком або з нічними змінами, соціальний джет-лаг тощо. Значний інтерес становить аспект старіння за таких умов.

За тривалої дії десинхронозу порушується функціонування практично всіх систем організму та розвивається низка захворювань. Короткочасна дія неузгодженості водіїв біоритмів зазвичай проявляється втомою, млявістю, розладами сну та травлення, погіршенням розумової діяльності та працездатності [3, 10, 11, 15]. Більшість механізмів цих порушень залишаються невивченими, а наявні методи корекції наслідків десинхронозу є малоефективними, досить складними та мають побічні ефекти.

Останні роки в фундаментальній, клінічній, спортивній та відновлювальній медицині набули розповсюдження методи загальної кріостимуляції (ЗКС) [5, 9, 13] та використання кріоконсервованих компонентів кордової крові (КК) людини [7, 8, 17], зокрема її ядровмісних клітин (ЯВК) [5], для корекції та лікування багатьох патологічних станів. Ми припустили, що ЗКС і компоненти КК можуть бути застосовані превентивно для запобігання наслідків десинхронозу.

Метою роботи було вивчення стану гіпофізарно-тиреоїдної системи за умов ініціювання циркадного десинхронозу на тлі превентивного введення кріоконсервованої кордової крові, загальної кріостимуляції за температури -120°C та їхньої комбінованої дії у щурів різного віку.

Матеріали та методи

Експерименти проводили відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) і положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експе-

and development, tissue differentiation, activate erythropoiesis and synthesis of many structural proteins, *etc.* Therefore, the content of TSH and THs in BS may be an informative index of the body state and its adaptive abilities, in particular, during aging and exposure to various endo- and exogenous factors.

It is known that circadian (daily) regulation is the basis of most behavioral, physiological and molecular rhythms of the body. The inconsistency of the central biorhythm pacemaker, located in the suprachiasmatic nuclei of hypothalamus, with the peripheral ones results in desynchronization development [8]. People in today's world are constantly or temporarily faced with the factors, contributing to desynchronization occurrence, *i. e.* transcontinental flights, shift work or night shift, social jet lag, *etc.* Under these conditions, the aspect of aging is of great interest.

With a long-term effect of desynchronization, the functioning of almost all body systems is disturbed and a number of diseases may develop. A short-term incoherence in biorhythm pacemakers is usually manifested by fatigue, apathy, digestive and sleep disorders, deterioration in mental activity and ability to work [7–9, 14]. Most mechanisms of these disorders have still poorly understood, and the current methods to correct the desynchronization consequences are ineffective, quite difficult and may cause side effects.

Recently, the methods of the whole body cryostimulation (WBC) [5, 6, 12] and the application of cryopreserved components of human cord blood (CB) [3, 4, 17], in particular, its nucleated cells (NCs) [5], have become widespread in fundamental, clinical, sport and rehabilitation medicines to correct and treat many pathological states. We hypothesized that a preventive administration of WBC and CB components may be helpful in avoiding the desynchronization consequences.

The research aim was to study the state of the pituitary-thyroid system under initiation of circadian desynchronization against the background of preventive administration of cryopreserved cord blood, whole-body cryostimulation at -120°C and their combined effect in rats of various ages.

Materials and methods

The experiments were carried out in accordance with the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals Against Cruelty' (No. 3447-IV of February 21, 2006) and the provisions of the 'European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific



риментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та були схвалені комітетом із біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків).

Роботу виконували на 6- і 18-місячних самцях білих безпородних щурів, яких до експерименту утримували в умовах віварію з контрольованим світловим режимом (світло/темрява 12:12; світловий період починався о 09.00 і закінчувався о 21.00).

Циркадний внутрішній десинхроноз (ЦД) моделювали шляхом одноразового збільшення тривалості світлового періоду на 12 годин [16]. За добу до ініціації ЦД щурам протягом 90 с проводили ЗКС у кріокамері для охолодження дрібних лабораторних тварин за температури -120°C [1]. Деконсервовану суспензію ЯВК КК людини (концентрація стовбурових CD34^{+} -клітин $2,4 \times 10^5$ [2]) вводили у 1,0 мл аутологічної плазми одноразово внутрішньочеревно у дозі $1,0 \times 10^5 \text{CD34}^{+}$ на 1 кг маси тварини за тиждень до проведення ЗКС або ініціювання ЦД.

Забір крові, як і фрагментів інших тканин для біохімічних і морфологічних досліджень, проводили після декапітації тварин. Зразки крові центрифугували при 5000 g за температури 22°C протягом 15 хв на центрифугі MPW-311 (Mechanika Precyzyjna, Польща), потім відокремлювали СК і зберігали до аналізу при -18°C .

Вміст ТТГ, Т4, Т3 та їхніх вільних форм (Т4в і Т3в) визначали методом імуноферментного аналізу (ІФА) за допомогою стандартних наборів (ХЕМА, Київ): ТТГ-ІФА, Т4-ІФА, Т3-ІФА, вТ4-ІФА та вТ3-ІФА згідно з інструкціями виробника. Оптичну щільність вимірювали на фотометрі аналізаторі імуноферментному «Humanreader» (Human, Німеччина). Для системної діагностики стану ГТС розраховували індекс периферичної конверсії (ІПК) ($\text{ІПК} = \text{T4}/\text{T3}$) та інтегральний тиреоїдний індекс (ІТІ) ($\text{ІТІ} = (\text{T3в} + \text{T4в})/\text{ТТГ}$) [6].

Щури кожного віку були розділені на групи ($n = 5$ у кожній): інтактні щури — контроль; введення ЯВК; ініціювання ЦД; проведення ЗКС; ініціювання ЦД на тлі ЗКС (ЦД + ЗКС); ініціювання ЦД на тлі введення ЯВК (ЦД + ЯВК); сполучена дія ЯВК та ЗКС (ЯВК + ЗКС) та група тварин із розвитком ЦД на тлі сполученої дії ЯВК та ЗКС (ЯВК + ЗКС + ЦД).

Статистичний аналіз результатів проводили за методом непараметричної статистики Крускала-Волліса з використанням програмного забезпечення «Statistica 6.0» (MatStat Inc., США). Дані представлені у вигляді $Me (q1; q3)$ (медіана та квартилі).

Purposes' (Strasbourg, 1986) and were approved by the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine (Kharkiv).

The research was performed in 6- and 18-month-old white outbred male rats, housed before the experiment in the animal facility with a controlled light regimen (12:12 light/dark; light period began at 09:00 and ended at 21:00).

Circadian internal desynchronosys (CD) was simulated by one-time increase in light period duration by 12 hrs [16]. A day before the CD initiation, the rats were subjected to WBC for 90 sec in the cryochamber for cooling small laboratory animals at -120°C [1]. A warmed suspension of human CB NCs (CD34^{+} stem cell concentration was 2.4×10^5 [2]) was administered in 1.0 ml of autologous plasma once intraperitoneally at a dose of 1.0×10^5 of CD34^{+} per 1 kg of animal weight one week before the WBC application or CD initiation.

Blood samples, as well as the fragments of other tissues for biochemical and morphological studies, were collected after decapitation of animals. Blood specimens were centrifuged at 5000 g at 22°C for 15 min with MPW-311 centrifuge (Mechanika Precyzyjna, Poland), then the BS was separated and stored at -18°C until the analysis was done.

The content of TSH, T4, T3 and their free forms (FT4 and FT3) was measured by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using standard kits (ХЕМА, Kyiv): TSH-ELISA, T4-ELISA, T3-ELISA, FT4-ELISA and FT3-ELISA according to the manufacturer's instructions. The optical density was assessed using the 'Humanreader' enzyme immunoassay photometer (Human, Germany). For systemic diagnosis of PTS state, the peripheral conversion index (PCI) ($\text{PCI} = \text{T4}/\text{T3}$) and the integral thyroid index (ITI) ($\text{ITI} = (\text{FT3} + \text{FT4})/\text{TSH}$) were calculated [15].

Rats of each age were divided into the following groups ($n = 5$ each): control (intact rats); NCs administration; CD initiation; WBC exposure; CD initiation against the background of WBC (CD + WBC); CD initiation against the background of NCs administration (CD + NCs); combined effect of NCs and WBC (NCs + WBC) and a group of animals with CD development against the background of combined effect of NCs and WBC (NCs + WBC + CD).

Results were statistically processed using the non-parametric Kruskal-Wallis statistic method with Statistica 6.0 software (MatStat Inc., USA). Data are presented as $Me (q1; q3)$ (median and quartiles).



Таблиця 1. Вміст ТТГ та тиреоїдних гормонів у сироватці крові 6-місячних щурів, *Me (q1; q3)*
Table 1. Content of TSH and thyroid hormones in blood serum of 6-month-old rats, *Me (q1; q3)*

Умови експерименту Experiment conditions	Показники Indices				
	ТТГ, мМО/л TSH, mIU/L	Т3 нМоль/л T3 nmol/L	Т4 нМоль/л T4 nmol/L	Т3в, пМоль/л FT3, pmol/L	Т4в, пМоль/л FT4, pmol/L
Контроль Contol	5,07 (4,41; 6,01)	1,34 (1,26; 1,42)	25,85 (13,40; 36,75)	7,05 (6,62; 7,25)	12,00 (10,62; 13,55)
ЯВК NCs	2,35* (2,20; 2,50)	1,32 (1,26; 1,38)	21,75 (19,37; 24,12)	5,95* (5,87; 6,02)	13,25* (11,62; 14,87)
ЦД CD	1,47* (1,43; 1,51)	1,39 (1,36; 1,42)	26,50 (24,75; 28,25)	6,20* (6,15; 6,25)	13,35* (12,67; 14,02)
ЗК WBC	3,28* (3,17; 3,44)	1,38 (1,31; 1,56)	29,60 (22,92; 35,60)	6,25* (6,15; 6,50)	15,95* (13,65; 17,77)
ЗК + ЦД WBC + CD	6,00 (3,53; 6,42)	1,26 (1,26; 1,35)	15,50* (15,25; 16,50)	5,90* (5,85; 6,10)	10,00* (9,50; 10,20)
ЯВК + ЦД NCs + CD	1,31* (1,03; 1,59)	1,44 (1,41; 1,47)	16,25* (15,62; 16,87)	5,30* (4,95; 5,65)	13,40* (12,80; 14,00)
ЯВК + ЗК NCs + WBC	4,15* (2,43; 5,88)	1,27 (1,24; 1,30)	16,60* (16,35; 16,65)	6,60* (6,45; 6,75)	10,95* (10,27; 11,62)
ЯВК + ЗК + ЦД NCs + WBC + CD	0,80* (0,69; 1,01)	1,50 (1,43; 1,50)	25,10 (25,05; 32,05)	6,26* (6,23; 6,29)	13,00* (11,75; 13,70)

Примітка: * — відмінності значущі порівняно з контрольною групою, $p < 0,05$.

Note: * – differences are significant if compared with the control group, $p < 0.05$.

Результати та обговорення

У роботі R.P. Peeters [14] відзначається, що у сироватці крові відбувається залежне від віку зниження рівнів ТТГ і Т3в, тоді як концентрація Т4в не змінюється. Результати наших експериментів показали, що рівень ТТГ у СК інтактних 18-місячних щурів майже втричі нижчий порівняно з таким у 6-місячних тварин, Т3в також знижений, вміст Т3, Т4 та Т4в значуще не змінювався (табл. 1, 2). Значення ПК були нижчими у 18-місячних щурів, а ІПІ — у 6-місячних (табл. 3).

За ініціювання ЦД у щурів обох вікових груп зменшувався вміст ТТГ у крові (у 3,4 і 1,8 раза відповідно), рівень зв'язаних та вільних Т3 і Т4 не змінювався, ІПІ підвищувався у 6-місячних щурів майже у 3,5 раза, а ПК не змінювався (табл. 1–3).

Введення ЯВК 6-місячних щурам викликало зменшення (майже вдвічі) вмісту ТТГ, а у 18-місячних, навпаки, — збільшення у 2,8 раза, вміст

Results and discussion

As reported by R.P. Peeters [13], an age-dependent decrease in TSH and FT3 levels occurred in blood serum, whereas the concentration of FT4 remained unchanged. Our findings showed the TSH level in BS of intact 18-month-old rats to be almost three times lower than in 6-month-old animals, the FT3 was also reduced, and the content of T3, T4 and FT4 did not change significantly (Tables 1, 2). The PCI values were lower in 18-month-old rats, but the ITI ones – in 6-month-old animals (Table 3).

Under CD initiation, the content of TSH in blood decreased in rats of both age groups (by 3.4 and 1.8 times, respectively), the level of bound and free T3 and T4 did not change, the ITI increased in 6-month-old rats by almost 3.5 times, but the PCI remained unchanged (Tables 1–3).

The NCs administration to 6-month-old rats induced a decrease (almost twice) in the TSH content, but in 18-month-old animals, on the contrary, it caused an increase by 2.8 times, the THs content



Таблиця 2. Вміст ТТГ та тиреоїдних гормонів у сироватці крові 18-місячних щурів, *Me (q1; q3)*
Table 2. Content of TSH and thyroid hormones in blood serum of 18-month-old rats, *Me (q1; q3)*

Умови експерименту Experiment conditions	Показники Indices				
	ТТГ, мМО/л TSH, mIU/L	Т3 нМоль/л T3 pmol/L	Т4 нМоль/л T4 pmol/L	Т3в, пМоль/л FT3, pmol/L	Т4в, пМоль/л FT4, pmol/L
Контроль Contol	1,41 (1,27; 5,53;)	1,39 (1,26; 1,51)	20,05 (16,75; 23,50)	5,92 (5,82; 6,15)	10,20 (8,92; 11,62)
ЯВК NCs	4,02* (2,46; 5,58)	1,24 (1,20; 1,27)	18,25 (15,37; 21,12)	6,40* (6,35; 6,45)	9,80 (9,76; 9,85)
ЦД CD	0,81* (0,75; 0,81)	1,43 (1,40; 1,47)	22,00 (21,25; 22,75)	5,80 (4,80; 5,80)	9,65 (9,53; 9,77)
ЗКС WBC	1,60 (1,25; 3,04)	1,28 (1,24; 1,40)	15,85* (15,12; 16,42)	6,30 (5,30; 7,07)	7,20* (6,60; 8,55)
ЗКС + ЦД WBC + CD	1,91 (1,85; 1,95)	1,29 (1,24; 1,33)	15,80* (12,70; 18,90)	5,44 (5,41; 5,47)	9,65 (9,12; 10,17)
ЯВК + ЦД NCs + CD	1,84 (1,77; 1,91)	1,43 (1,38; 1,47)	18,35 (18,17; 18,52)	5,47 (5,39; 5,54)	9,60 (9,45; 9,75)
ЯВК + ЗКС NCs + WBC	2,05 (2,00; 2,10)	2,37* (2,25; 2,48)	16,10* (14,19; 17,30)	5,41* (5,30; 5,15)	6,65* (6,32; 6,97)
ЯВК + ЗКС + ЦД NCs + WBC + CD	2,49* (2,27; 2,71)	1,51 (1,48; 1,53)	26,75* (21,12; 32,37)	6,25 (6,02; 6,47)	8,60* (7,90; 9,30)

Примітка: * — відмінності значущі порівняно з контрольною групою, $p < 0,05$.

Note: * – differences are significant if compared with the control group, $p < 0.05$.

ТГ не змінювався, крім збільшення Т3в у 18-місячних тварин, ІТІ підвищувався тільки у 6-місячних (табл. 1–3).

Після проведення ЗКС у 6-місячних щурів зменшувався вміст ТТГ, при цьому вміст ТГ не змінювався, крім підвищення Т4в, а ІТІ збільшувався; у 18-місячних тварин спостерігалось зниження рівня Т4, Т4в та значень обох індексів, вміст ТТГ не змінювався (табл. 1–3).

Ініціація ЦД на тлі ЗКС у крові тварин обох вікових груп не впливала на вміст ТТГ, але вміст ТГ і значення індексів зменшувалися або мали тенденцію до зменшення (табл. 1–3).

Моделювання ЦД на тлі попереднього введення ЯВК приводило у 6-місячних щурів до зменшення вмісту ТТГ, Т4 та Т3в і збільшення Т3 та Т4в (тенденція), у 18-місячних тварин, навпаки, вміст ТТГ мав тенденцію до збільшення за незміненого рівня ТГ (див. табл. 1, 2), ІПК знижувався у тварин обох вікових груп, ІТІ зростав у 6-місячних щурів, а у 18-місячних, навпаки, зменшувався (тенденція) (табл. 3).

Існує думка, що сполучена дія охолодження та введення компонентів КК має взаємопотен-

did not change, excepting the FT3 rise in 18-month-old animals, and the ITI was elevated in 6-month-old rats only (Tables 1–3).

In 6-month-old rats, after WBC application, the TSH content decreased, whereas the THs content did not change, excepting the FT4 rise, but the ITI increased; in 18-month-old animals, the reduction of T4, FT4 levels and the values of both indices was observed, and the TSH content remained unchanged (Tables 1–3).

The CD initiation against a single WBC session did not affect the TSH content in blood of animals of both age groups, but that of THs and the values of indexes reduced or tended to decrease (Tables 1–3).

The CD simulation at the background of preliminary administration of NCs resulted in a decreased content of TSH, T4 and FT3 and increased values of T3 and FT4 (a tendency) in 6-month-old rats, but in those of 18 months old, on the contrary, the TSH content tended to rise at unchanged level of THs (See Tables 1, 2), the PCI was reduced in animals of both age groups, the ITI augmented in 6-month-old rats, but in those of 18 months old it diminished (tendency), on the contrary (Table 3).



Таблиця 3. Значення індексу периферичної конверсії та інтегрального тиреоїдного індексу у щурів різного віку, *Me (q1; q3)*
Table 3. Values of peripheral conversion index and integral thyroid index in rats of different ages, *Me (q1; q3)*

Умови експерименту Experiment conditions	Групи тварин Animal groups			
	6-місячні 6-month-old		18-місячні 18-month-old	
	ІПК PCI	ІТІ	ІПК PCI	ІТІ
Контроль Control	19,29 (10,23; 27,99)	3,86 (2,99; 4,71)	14,88 (12,88; 16,33)	11,03 (4,59; 11,72)
ЯВК NCs	16,22 (15,19; 17,24)	8,49* (7,22; 9,75)	14,50 (12,59; 16,41)	10,13 (6,19; 14,07)
ЦД CD	18,93 (18,04; 19,81)	13,26* (13,12; 13,41)	15,40 (14,53; 16,28)	19,08* (18,93; 19,23)
ЗКС WBC	23,19 (17,96; 25,99)	6,19* (6,11; 6,55)	11,47* (10,66; 12,39)	8,65 (4,36; 12,35)
ЗКС + ЦД WBC + CD	11,90* (11,29; 12,89)	2,40 (2,28; 8,81)	11,97* (9,98; 13,95)	7,97 (7,49; 8,45)
ЯВК + ЦД NCs + CD	11,34* (10,67; 12,01)	17,66* (13,70; 21,63)	12,87* (12,58; 13,15)	8,12 (7,61; 8,62)
ЯВК + ЗКС NCs + WBC	13,05 (12,73; 13,36)	12,46* (7,49; 17,43)	6,96* (6,11; 7,80)	6,12* (6,04; 6,20)
ЯВК + ЗКС + ЦД NCs + WBC + CD	18,25 (17,49; 22,12)	21,02* (18,88; 27,11)	17,49* (14,05; 20,92)	6,02* (5,86; 6,18)

Примітка: * — відмінності значущі порівняно з контрольною групою, $p < 0,05$.

Note: * – differences are significant if compared with the control group, $p < 0.05$.

ціюючий ефект [4], тому було також вивчено стан ланок ГТС за ініціювання ЦД на тлі поєднаного впливу ЗКС і введення ЯВК.

У 6-місячних щурів після сполученого впливу ЯВК та ЗКС спостерігали тільки зниження рівня тироксину та вільних форм ТГ, у 18-місячних — збільшення вмісту ТТГ та Т3 на тлі зменшення Т4 та вільних форм ТГ (див. табл. 1, 2); у 6-місячних щурів підвищувався ІТІ, у 18-місячних обидва індекси зменшувалися (табл. 3).

Розвиток ЦД на тлі превентивного сполученого введення ЯВК і впливу ЗКС у 6-місячних щурів призводив до зменшення вмісту ТТГ (у 6,3 раза) і до підвищення Т4 порівняно з контролем, у 18-місячних тварин ТТГ, навпаки, збільшувався, Т4 також підвищувався, але Т4в зменшувався. За цих умов у 6-місячних щурів ІТІ збільшувався, а у 18-місячних зменшувався, ІПК підвищувався тільки у 18-місячних (табл. 1–3).

Значущі розбіжності у зміні вмісту ТТГ із віком (див. табл. 1, 2) можуть бути результатом підвищеної чутливості тиреоїдних тканин до Т4, але при цьому не можна виключити вплив ін-

A combined effect of cooling and CB component administration is widely believed to have a mutually potentiating effect [11], therefore, the state of PTS links when initiating CD against the background of a combined effect of WBC and NCs introduction, was studied as well.

In 6-month-old rats, after a combined effect of NCs and WBC, only a decrease in the level of thyroxine and free THs forms was observed, but in 18-month-old animals, there was an increase in TSH and T3 contents against the background of reduced T4 and free forms of THs (See Tables 1, 2); the ITI augmented in 6-month-old ones, and both indices decreased in those of 18 months old (Table 3).

In 6-month-old rats, the CD development together with a preventive combined administration of NCs and WBC exposure resulted in a decrease in TSH content (by 6.3 times) and the T4 increase vs. the control, but in 18-month-old animals, on the contrary, the TSH augmented, T4 was also increased, but FT4 reduced. Under these conditions, the ITI enhanced in 6-month-old rats, but lowered in those aged 18 months, and the PCI was in-



ших факторів, зокрема зниження секреції гіпоталамусом тиреотропного рилізінг-гормону. Незважаючи на те, що зниження рівня ТТГ у літньому віці призводить до пригнічення секреції Т4 щитовидною залозою, концентрація загального та вільного тироксину не змінюється, оскільки з віком зменшується його розпад [14].

Добові коливання секреції ТТГ у щурів добре вивчені [10], тоді як наявність циркадного ритму вмісту ТГ у крові залишається остаточно не визначеною. У роботі J. Fahrenkrug та співавторів [10] визначається, що рівні гіпофізарного та кров'яного ТТГ змінюються у протилежних напрямках — максимальний вміст ТТГ у гіпофізі співпадає з мінімальним вмістом ТТГ, Т4 і Т3 у крові і, навпаки. Крім того, встановлено, що за три тижні перебування щурів в умовах інвертованого світлового режиму (зсув на 12 годин) усі піки вмісту гормонів також зміщуються на 12 годин, що вказує на чутливість ГТС до змін світлового режиму. Зокрема, ритмічність змін вмісту циркулюючих у крові ТГ зникає після видалення гіпофізу, тобто їхній добовий патерн регулюється не локальним тиреоїдним водієм ритму, а сигналами з супрахіазматичних ядер гіпоталамуса через ритмічну секрецію ТТГ у гіпофізі [10]. Слід зазначити, що рівень ТТГ також модулюється циклом сон-неспанья [12], який за умов ЦД порушується в першу чергу, а ЗКС покращує якість сну після фізичних навантажень [9]. Що стосується кордової крові, то вона містить компоненти як з відомими, так й ще з невизначеними властивостями [2, 5, 8], що можуть впливати як на функціонально-структурну організацію самої щитоподібної залози, так й на її периферійний та центральний водії ритму, а також на стан циклу сон-неспанья.

Відомо, що ІПК є показником тканинного перетворення Т4 у його більш біологічно активний метаболіт Т3 (показник периферійного тканинного дейодування). Необхідно підкреслити, що період напіввиведення Т4 становить 6,5 доби, а Т3 — 1,5 доби. Однак, незважаючи на більш тривалий період циркуляції Т4 порівняно з Т3, вміст Т4 зменшувався у СК щурів обох вікових груп за умов ініціації ЦД на тлі ЗКС. Із віком ІПК значуще не змінювався, але мав тенденцію до зниження (табл. 1–3). Це може вказувати на пригнічення за таких умов функціональної активності щитовидної залози, оскільки вміст Т4, який є продуктом секреції самої залози, зменшувався, а вміст Т3, що є продуктом периферійної конверсії Т4 в інших органах (зокрема у печінці, нирках та жировій тканині), не змінювався. Однак у 18-місячних щурів за умов

creased in 18-month-old animals only (Tables 1–3).

Significant differences in a change in TSH content with age (See Tables 1, 2) may be the result of an increased sensitivity of thyroid tissues to T4, but the impact of other factors, in particular, a decline in hypothalamic secretion of thyrotropin-releasing hormone cannot be excluded. Despite the fact that a decrease in TSH level in old age entails the suppression of T4 secretion by the thyroid gland, the concentration of total and free thyroxine remains unchanged, since its decay reduces with age [13].

Daily fluctuations of TSH secretion in rats are well understood [7], whereas the presence of a circadian rhythm of TSH content in blood has not been finally defined yet. As reported by J. Fahrenkrug *et al.* [7], the levels of pituitary and blood TSH are changed in opposite directions, *i. e.* the maximum content of TSH in the pituitary coincides with the minimum content of TSH, T4 and T3 in blood and *vice versa*. In addition, it was established the fact, that during three weeks of rats' stay under inverted light regime (shift by 12 hrs), all the peaks of hormone content were also shifted by 12 hrs, which indicated the sensitivity of PTS to changes in the light regime. In particular, the rhythmicity of changes in THs content, circulating in blood disappears after pituitary gland removal, *i. e.* their daily pattern is regulated not by the local thyroid pacemaker, but the signals from suprachiasmatic nuclei of hypothalamus via rhythmic secretion of TSH in pituitary gland [7]. Notably, that the TSH level is also modulated by the sleep-wake cycle [10], which is disturbed first under CD, and the WBC improves the quality of sleep after physical activities [6]. As for cord blood, it contains the components with both known and unknown features [2, 4, 5], which may affect functional and structural organization of thyroid gland itself and its peripheral and central pacemakers, as well as the sleep-wake cycle.

The PCI is known as the index of T4 tissue conversion to its more biologically active metabolite T3 (index of peripheral tissue deiodination). It should be emphasized that the half-life of T4 is 6.5 days, and 1.5 days for T3. However, despite the longer circulation period of T4 as compared with T3, the T4 content decreased in BS of rats of both age groups under CD initiation against the WBC application. With age, the PCI did not change significantly, but tended to reduce (Tables 1–3). This might indicate the suppression of functional activity of the thyroid gland under these conditions, since the content of T4, being the secretory product of the gland itself, decreased, but the content of T3,



розвитку ЦД на тлі превентивної сполученої дії ЯВК і ЗКС (див. табл. 2) концентрація Т4 зростала, тобто, навпаки, могла відбуватися активація щитовидної залози.

Відношення гормонів щитовидної залози до їхнього гіпофізарного регулятора ТТГ характеризує ІТІ, підвищення/зниження якого є найбільш ранніми ознаками гіпер- або гіпотиреозу [6]. У 6-місячних щурів ІТІ підвищувався в усіх групах, окрім групи розвитку ЦД на тлі ЗКС. У 18-місячних тварин ІТІ знижувався або мав таку тенденцію також у всіх групах, окрім ініціації ЦД (підвищувався), і був вищим порівняно з 6-місячними щурами (табл. 3). Але стверджувати про розвиток гіпер- або гіпотиреозу у щурів недоречно, до того ж термін спостереження надто невеликий. Можна зробити припущення про відповідні активацію/пригнічення функціональної активності щитовидної залози за описаних вище умов.

Отже, розвиток ЦД як у 6-місячних, так і 18-місячних щурів призводив до зменшення вмісту у крові ТТГ на тлі незміненого рівня ТГ, ІТІ підвищувався тільки у 6-місячних тварин, а ІПК не змінювався.

За умов ініціації ЦД на тлі превентивної ЗКС вміст ТТГ у крові щурів обох вікових груп зберігався на вихідному рівні, але зменшувалися концентрація ТГ та значення обох індексів або мали таку тенденцію. За ініціювання ЦД на тлі ін'єкції ЯВК у 6-місячних тварин знижувався рівень ТТГ, Т4, Т3в та збільшувався Т4в, зменшувався ІПК і різко підвищувався ІТІ. У 18-місячних щурів вміст ТТГ та ТГ відповідав вихідному рівню, а обидва індекси знижувалися. Розвиток ЦД на тлі ЗКС у тварин обох вікових груп не впливав на вміст ТТГ, але рівень ТГ і значення індексів зменшувалися або мали тенденцію до зменшення. За умов моделювання ЦД на тлі сполученої дії ЯВК і ЗКС у 6-місячних щурів вміст ТТГ істотно зменшувався, а ІТІ різко збільшувався, у 18-місячних усі показники стану ГТС підвищувалися або мали таку тенденцію, ІПК збільшувався, а ІТІ, навпаки, зменшувався.

Висновки

Активність центральної ланки ГТС (за вмістом ТТГ у сироватці крові) у щурів із віком знижується, як і за ініціювання десинхронозу. Превентивна ЗКС і у 6-місячних, і у 18-місячних щурів із моделлю ЦД приводить до відновлення її активності. Розвиток ЦД на тлі попереднього введення ЯВК та сполученого впливу ЯВК і ЗКС у 6-місячних щурів супроводжується

which was the product of peripheral conversion of T4 in other organs (in particular, liver, kidneys and adipose tissue) remained unchanged. However, in 18-month-old rats, under CD development together with a combined preventive effect of NCs and WBC (See Table 2), the concentration of T4 increased, *i. e.* on the contrary, the activation of thyroid gland could occur.

The ITI characterizes the relationship of thyroid hormones to their pituitary regulator, the increase/decrease of which is the earliest sign of hyper- or hypothyroidism [15]. In 6-month-old rats, the ITI augmented in all the groups, excepting that of CD development together with WBC application. In 18-month-old animals, the ITI reduced or had such a tendency in all the groups, excepting the CD initiation (it increased) and was higher as compared with the 6-month-old rats (Table 3). But it is inappropriate to state about hyper- or hypothyroidism development in rats, and besides, the observation period was too short. A corresponding activation/suppression of functional activity of the thyroid gland under the described above conditions may be assumed.

Thus, the CD development in both 6- and 18-month-old rats resulted in a decrease in TSH content in blood against the background of unchanged THs level, the ITI increased in 6-month-old animals only, but the PCI remained unchanged.

Under the CD initiation together with a preventive WBC application, the TSH content in blood of rats of both age groups remained at the initial level, but the THs concentration and the values of both indices reduced or had such a tendency. When initiating CD against the NCs injection, the 6-month-old animals showed a decrease in TSH, T4, FT3 levels and rise of FT4, the PCI was lowered and the ITI was sharply increased. In 18-month-old rats, the content of TSH and THs corresponded to the initial level, and both indices were decreased. The CD development against the WBC application in animals of both age groups did not affect the TSH content, but the THs level and the values reduced or had a tendency to decrease. When simulating the CD at the background of a combined effect of NCs and WBC, the 6-month-old rats showed a significant reduction of TSH content, but the ITI was sharply increased. In the 18-month-old animals, all the indices of PTS state augmented or had such a tendency, the PCI increased, and the ITI diminished, on the contrary.

Conclusions

The activity of the central link of PTS (by the TSH content in blood serum) decreased in rats



ся пригніченням цієї ланки і не викликає її змін у 18-місячних.

Стан периферичної ланки ГТС (за вмістом ТГ та їхніх вільних форм у сироватці крові) у щурів із віком (окрім зниження вмісту ТЗв) не змінюється, як і за ініціювання ЦД. Превентивні ЗКС у обох вікових групах (окрім зниження рівня Т4 у 18-місячних) та введення ЯВК у 18-місячних щурів за ініціації ЦД не впливають на активність цієї ланки ГТС. У 6-місячних тварин розвиток ЦД на тлі введення ЯВК викликає її розбалансування (зменшується вміст Т4 і ТЗв і підвищується Т3 і Т4в). За ініціювання ЦД після сполученого впливу ЗКС і ЯВК у 6-місячних щурів активність не змінюється, а у 18-місячних спостерігається підвищення активності за рахунок збільшення вмісту Т4 і Т4в.

Крім того, за ініціювання ЦД на тлі ЗКС у 6-місячних щурів збільшується показник периферійного тканинного дейодування ІПК. У 18-місячних ІПК за ініціювання ЦД на тлі введення ЯВК зменшується і збільшується після сполученого впливу ЗКС і введення ЯВК. У 6-місячних щурів ІТІ зростає майже в усіх експериментальних групах (окрім ініціювання ЦД на тлі ЗКС), тобто відбувається активація щитоподібної залози. У 18-місячних щурів ІТІ підвищується за умов розвитку ЦД і знижується у групі ініціації ЦД на тлі сполученого впливу ЗКС і введення ЯВК (активація і пригнічення функції залози відповідно).

Робота виконана в рамках теми № 103, шифр 2.2.6.103 «Формування адаптаційних реакцій організму експериментальних тварин в умовах дії штучного охолодження та криоконсервованих ядромісних клітин кордової крові при старінні і патологічних станах», № держреєстрації 0116U003493.

Література

1. Бабійчук ВГ, Козлов ОВ, Ломакін ІІ, Бабійчук ГО, винахідники; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Кріокамера для експериментального охолодження лабораторних тварин. Патент України № 40168. 25.03.2009.
2. Бабійчук ЛО, Грищенко ВІ, Гуріна ТМ, та ін. винахідники; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб кріоконсервування ядромісних клітин кордової крові, у тому числі стовбурових гемопоетичних клітин. Патент України № 92227. 11.10.2010.
3. Губин ДГ. Молекулярные механизмы циркадных ритмов и принципы развития десинхроноза. Успехи физиологических наук. 2013; 44(4): 65–87.

with age, and under desynchronization initiation as well. Preventive WBC in both 6- and 18-month-old rats with the CD simulation resulted in restoration of its activity. In 6-month-old rats, the CD development against the background of preventive administration of NCs and a combined effect of NCs and WBC was accompanied by suppression of this link, but caused no changes in those of 18 months old.

The state of peripheral link of PTS (by the content of THs and their free forms in blood serum) did not change in rats with age (excepting a decrease in FT3 content), and under CD initiation as well. Preventive WBC in both age groups (excepting the reduction of T4 level in 18-month-old rats) and the NCs administration in 18-month-old animals under CD initiation did not affect the activity of this PTS link. In 6-month-old animals, the CD development against the NCs administration caused its imbalance (T4 and FT3 contents decreased and T3 and FT4 increased). Under CD initiation, after a combined effect of WBC and NCs, the activity remained unchanged in 6-month-old rats, and an increased activity due to an elevated content of T4 and FT4 was observed in 18-month-old animals.

In addition, in 6-month-old rats, under CD initiation against a single WBC session, the rate of peripheral tissue deiodination PCI augmented. In 18-month-old animals, when initiating CD against the NCs administration the PCI decreased, but after a combined effect of WBC and NCs introduction it augmented. In 6-month-old rats, the ITI increased in almost all the experimental groups (excepting the CD initiation against the WBC exposure), i. e. the activation of thyroid gland occurred. In 18-month-old rats, the ITI augmented under CD development and lowered in the group of CD initiation against a combined effect of WBC and NCs administration (activation and inhibition of gland function, respectively).

The research was carried out within the framework of the project No. 103, code 2.2.6.103 entitled as 'Formation of adaptive reactions of the body of experimental animals under the effect of artificial cooling and cryopreserved nucleated cord blood cells in aging and under pathological states', state registration number 0116U003493.

References

1. Babiychuk VG, Kozlov OV, Lomakin II, Babiychuk GO, inventors; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of NAS of Ukraine, assignee. [Cryochamber for experimental cooling of



4. Ломако ВВ, Шило АВ, Бабийчук ГА, Самохина ЛМ. Краниocereбральная гипотермия стимулирует реакции ограниченного протеолиза в тканях крыс. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2016; 26(3): 238–48.
5. Чернявская ЕА, Волина ВВ, Бабийчук ВГ. Структура миокарда молодых крыс с моделью алиментарного ожирения на фоне сочетанного применения ритмических экстремальных холодových воздействий и криоконсервированных ядросодержащих клеток кордовой крови. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2018; 28(2):108–19.
6. Шолохов ЛФ, Колесникова ЛИ, Чудинова ЕЛ, и др. Оценка функционального состояния гипофизарно-тиреоидной системы у женщин репродуктивного возраста, больных острым гепатитом А. Фундаментальные исследования. 2014; (10, Ч. 2): 390–3.
7. Berglund S, Magalhaes I, Gaballa A, et al. Advances in umbilical cord blood cell therapy: the present and the future. *Expert Opin Biol Ther.* 2017; 17(6):691–9.
8. Castellano JM, Mosher KI, Abbey RJ, et al. Human umbilical cord plasma proteins revitalize hippocampal function in aged mice. *Nature.* 2017; 544 (7651): 488–92.
9. Douzi W, Dupuy O, Theurot D, et al. Partial-body cryostimulation after training improves sleep quality in professional soccer players. *BMC Res Notes [Internet].* 2019 15 Mar [cited 20.05.2021]; 12:141. Available from: <https://bmresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13104-019-4172-9>
10. Fahrenkrug J, Georg B, Hannibal J, Jørgensen HL. Hypophysectomy abolishes rhythms in rat thyroid hormones but not in the thyroid clock. *Endocrinol.* 2017; 233(3): 209–16.
11. Hansen J. Night shift work and risk of breast cancer. *Curr Environ Health Rep.* 2017; 4 (3): 325–39.
12. Ikegami K, Refetoff S, Van Cauter E, Yoshimura T. Interconnection between circadian clocks and thyroid function. *Nat Rev Endocrinol.* 2019; 15(10): 590–600.
13. Lombardi G, Ziemann E, Banfi G. Whole-body cryotherapy in athletes: from therapy to stimulation. An updated review of the literature. *Front Physiol [Internet].* 2017 May 2 [cited 20.05.2021]; 8: 258. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2017.00258/full>
14. Peeters RP. Thyroid hormones and aging. *Hormones.* 2008; 7(1): 28–35.
15. Puttonen S, Oksanen T, Vahtera J, et al. Is shift work a risk factor for rheumatoid arthritis? The Finnish Public Sector study. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69(4): 779–80.
16. Sudo A, Miki K. Circadian rhythm of catecholamine excretion in rats after phase shift of light-dark cycle. *Indust Health.* 1995; 33 (2): 57–66.
17. Villeda SA, Plambeck KE, Middeldorp J, et al. Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice. *Nat Med.* 2014; 20(6):659–63.
- laboratory animals]. Ukraine patent № 40168. 2009 March 25. Ukrainian.
2. Babijchuk LO, Grishchenko VI, Gurina TM, et al., inventors; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, assignee. [The method of cryopreservation of nucleated cord blood cells, including hematopoietic stem cells]. Patent of Ukraine N 92227. 11.10.2010. Ukrainian.
3. Berglund S, Magalhaes I, Gaballa A, et al. Advances in umbilical cord blood cell therapy: the present and the future. *Expert Opin Biol Ther.* 2017; 17(6):691–9.
4. Castellano JM, Mosher KI, Abbey RJ, et al. Human umbilical cord plasma proteins revitalize hippocampal function in aged mice. *Nature.* 2017; 544 (7651): 488–92.
5. Chernyavskaya EA, Volina VV, Babiichuk VG. Structure of myocardium of young rats with simulated alimentary obesity following the application of combined rhythmic extreme cold effects and cryopreserved cord blood nucleated cells. *Probl Cryobiol Cryomed* 2018; 28(2): 108–19.
6. Douzi W, Dupuy O, Theurot D, et al. Partial body cryostimulation after training improves sleep quality in professional soccer players. *BMC Res Notes [Internet].* 2019 15 Mar [cited 20.05.2021]; 12:141. Available from: <https://bmresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13104-019-4172-9>
7. Fahrenkrug J, Georg B, Hannibal J, Jørgensen HL. Hypophysectomy abolishes rhythms in rat thyroid hormones but not in the thyroid clock. *Endocrinol.* 2017; 233(3):209–16.
8. Gubin DG. [Molecular basis of circadian rhythms and principles of circadian disruption] *Usp Fiziol Nauk.* 2013; 44(4): 65–87. Russian.
9. Hansen J. Night shift work and risk of breast cancer. *Curr Environ Health Rep.* 2017; 4 (3): 325–39.
10. Ikegami K, Refetoff S, Van Cauter E, Yoshimura T. Interconnection between circadian clocks and thyroid function. *Nat Rev Endocrinol.* 2019; 15(10): 590–600.
11. Lomako VV, Shylo AV, Babijchuk GA, Samokhina LM. Craniocerebral hypothermia stimulates reactions of limited proteolysis in rat tissues. *Probl Cryobiol Cryomed* 2016; 26(3): 238–48.
12. Lombardi G, Ziemann E, Banfi G. Whole-body cryotherapy in athletes: from therapy to stimulation. An updated review of the literature. *Front Physiol [Internet].* 2017 May 2 [cited 20.05.2021]; 8: 258. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2017.00258/full>
13. Peeters RP. Thyroid hormones and aging. *Hormones.* 2008; 7(1): 28–35.
14. Puttonen S, Oksanen T, Vahtera J, et al. Is shift work a risk factor for rheumatoid arthritis? The Finnish public sector study. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69(4): 779–80.
15. Sholohov LF, Kolesnikova LI, Chudinova EL, et al. [Evaluation of the functional state of the pituitary-thyroid system in women of reproductive age with acute hepatitis A]. *Fundamentalnyye issledovaniya.* 2014; (10, Part 2): 390–3. Russian.
16. Sudo A, Miki K. Circadian rhythm of catecholamine excretion in rats after phase shift of light-dark cycle. *Indust Health.* 1995; 33 (2): 57–66.
17. Villeda SA, Plambeck KE, Middeldorp J, et al. Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice. *Nat Med.* 2014; 20(6):659–63.

