

Холодовой стресс как фактор коррекции функциональной архитектуры гематоэнцефалического барьера старых крыс.

1. Фрактальный анализ

UDC 612.015.3:615.014.41:57.084

V.G. BABIYCHUK, V.S. MARCHENKO*, G.A. BABIYCHUK

Cold Stress as Corrector of Functional Architecture of Blood Brain Barrier in Aged Rats.

Part 1. Fractal Analysis

Применяя радиоизотопную методику, методы электронной микроскопии и фрактальной морфометрии, изучали функциональную архитектуру ГЭБ 24-месячных крыс. Показано, что болевые и периодические холодовые воздействия низкой положительной и сверхнизкой отрицательной температурой имеют структурно-функциональные особенности реагирования элементов ГЭБ, которые достоверно выявляются по показателям фрактальной размерности (D). При болевых и экстремальных криовоздействиях D эндотелия капилляров мозга монотонно возрастает до $\sim 1,5$. При периодическом воздействии гипотермии ΔD имеет выраженную ритмику (антиперсистентные периоды лежат между персистентными), что свидетельствует о повышении пластичности, но сохранении устойчивости структуры. При охлаждении повышается проницаемость ГЭБ для норадреналина (если $D \sim 1,3$) и ацетилхолина (при $D \sim 1,7$).

Ключевые слова: гипотермия, криотерапия, старение, гематоэнцефалический барьер, ультраструктура, фрактальная морфометрия.

Застосовуючи радіоізотопну методику, методи електронної мікроскопії і фрактальної морфометрії, вивчали функціональну архітектуру гематоенцефалічного бар'єра (ГЕБ) 24-місячних щурів. Показано, що больові і періодичні холодові впливи низькою позитивною і наднизькою негативною температурою мають структурно-функціональні особливості реагування елементів ГЕБ, які достовірно виявляються за показниками фрактальної розмірності (D). При больових і екстремальних кріовпливах D ендотелію капілярів мозку монотонно зростає до $\sim 1,5$. При періодичній дії гіпотермії ΔD має виражену ритміку (антиперсистентні періоди лежать між персистентними), що свідчить про підвищення пластичності, але збереженні стійкості структури. При охолодженні підвищується проникність ГЕБ для норадреналіну (якщо $D \sim 1,3$) і ацетилхоліну (при $D \sim 1,7$).

Ключові слова: гіпотермія, старіння, гематоенцефалічний бар'єр, ультраструктура, фрактальна морфометрія.

Applying radioisotope methods, those of electron microscopy and fractal morphometry the functional architecture of blood brain barrier (BBB) of 24 month-old rats has been studied. It has been shown that pain and periodic cold effects of low positive and ultralow negative temperatures have structural and functional features of the response of BBB elements which are statistically and significantly found with the indices of fractal dimension (D). At pain and extreme cryoeffects the ΔD value of brain capillary endothelium monotonously increases up to ~ 1.5 . At periodic effect of hypothermia ΔD is of manifested rhythmicity (anti-persistent periods are found between persistent ones), testifying to a rise in plasticity, but preservation of structure resistance. When cooling the BBB permeability is increased for noradrenalin (if $D \sim 1.3$) and acetyl choline (at $D \sim 1.7$).

Key words: hypothermia, cryotherapy, ageing, blood brain barrier, ultrastructure, fractal morphometry.

Не вызывает сомнения, что при стрессах разного генеза повышается проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) [4, 5, 13]. Поэтому оправданно ввести в современные концепции общего адаптационного синдрома представления о функциональной системе ГЭБ. При некоторых естественных состояниях организма по ряду параметров, сходных с хроническим стрессом (например в динамике старения), свойства барьера нарушаются настолько, что существенно изменяется его проницаемость для многих биологически активных ве-

There is no doubt that under stresses of different genesis the permeability of blood brain barrier (BBB) increases [4, 5, 13]. Therefore the adding of the notions on BBB functional system to current concepts of general adaptation syndrome is reasonable. In some natural states of an organism on the parameters similar to chronic stress (e.g. in ageing dynamics), the barrier properties are impaired in such extent that its permeability for many biologically active substances alters, that may cause both pathological reactions and the triggering of regulatory mechanisms in cardiovascular

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

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

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Перяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-30-07, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта: marchik@list.ru

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3007, fax: +380 57 373 3084, e-mail: marchik@list.ru

ществ, что может вызвать как патофизиологические реакции, так и запуск регуляторных механизмов в сердечно-сосудистой и центральной нервной системах путём изменения фрактальных характеристик их функциональной границы – ГЭБ [5, 8, 11]. Компенсаторные реакции ГЭБ играют особенно важную роль при непродолжительных, но интенсивных и/или ритмически организованных сенсорных, прежде всего холодовых воздействиях [1, 6, 7]. По нашему мнению, именно эта особенность ГЭБ может быть основой лечебного действия так называемой криотерапии, при которой организм подвергается кратковременному общему воздействию сухим воздухом с температурой ниже – 100°C. В последние годы возобновился интерес к практическому использованию этого метода, однако по-прежнему крайне мало фундаментальных исследований механизмов действия на организм теплокровных экстремально низкой температуры [1, 6]. Так, важной нерешённой остаётся проблема специфичности холодовых воздействий, анализа действия разных методов лечебных режимов охлаждения по сравнению с течением неспецифического адаптационного синдрома – стресса [1, 7].

Цель работы – выявить структурно-функциональные особенности реагирования ГЭБ 24-месячных крыс на экстремально низкую температуру (–120°C) по сравнению с болевыми и гипотермическими (12°C) воздействиями.

Материалы и методы

Все эксперименты выполнены на 12- и 24-месячных белых крысах-самцах в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными IV Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2010) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Ритмические экстремальные криовоздействия (РЭКВ) осуществляли в криокамере «Крио-спейс» (ФРГ), конструктивно улучшенной ЗАО «Холод» (Украина). Однократный сеанс РЭКВ проводили на наркотизированном животном при температуре воздушной среды –120°C в течение 1,5 мин; 3РЭКВ – три последовательных сеанса РЭКВ, перерыв между криовоздействиями 5 мин при 22°C; 6РЭКВ – два сеанса 3РЭКВ (второй сеанс через сутки после первого); 9РЭКВ – сеанс 6РЭКВ и через сутки 3РЭКВ.

Ритмические гипотермические воздействия (РГВ) проводили при помощи промышленного гипотермогенератора «Холод 2Ф» (СССР). Холодный воздух ((10...12) ± 2°C) поступал в индивидуальные пластиковые камеры с животными на протяжении

and central nervous systems by changing the fractal characteristics of their functional border: BBB [5, 8, 11]. Compensatory reactions of BBB play an especially important role at not prolonged but intensive and/or rhythmically organized sensory, first of all cold effects [1, 6, 7]. We believe that namely this feature of BBB may be the base of therapeutic effect of so-called cryotherapy, during which an organism is subjected to short-term general effect with dry air at temperature below –100°C. Recently the interest to practical use of this method has been renewed, however, there is still a small number of fundamental studies of the mechanisms of the effect of extremely low temperature on homoiothermal organism [1, 6]. So, unsolved important problem is specificity of cold effects, analysis of the effect of different methods of therapeutic cooling regimens if compared with the course of non-specific adaptation syndrome, stress [1, 7].

The research aim was to reveal structural and functional peculiarities of BBB response in 24-month-old rats to extremely low temperature (–120°C) if compared with pain and hypothermic (12°C) effects.

Materials and methods

All the experiments have been performed in 12- and 24-month-old white male rats in accordance with General principles of the experiments on animals, approved by the 4th National Congress in Bioethics (Kiev, 2010) and coordinated with the notions of European Convention on the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Purposes (Strasbourg, 1986).

Rhythmic extreme cryoexposures (RECE) were performed in cryochamber CryoSpace (Germany), advanced by Kholod Ltd. (Ukraine). Single session of RECE was performed for non-narcotized animals at air temperature of –120°C for 1.5 min; 3 RECE – three consequent sessions of RECE, break between the cryoeffects was 5 min at 22°C; 6 RECE – two sessions of 3 RECE (the second session in 24 hrs after the first one); 9 RECE – session of 6RECE and in 24 hrs – 3 RECE.

Rhythmic hypothermic effects (RHE) were performed by means of industrial hypothermogenator Kholod 2F (USSR). Cold air ((10...12) ± 2°C) entered to individual plastic chambers with the animals during 120 min (6 one second cold stimuli per 1 min).

The chosen cooling regimens caused body temperature variations in non-narcotized rats within the limits of 1°C.

Threshold pain effects (TPE) were applied to limbs of the rats placed into special chamber by means of electric current with individual for each animal volt-ampere characteristics up to the first behavioral signs

120 мин (6 односекундных холодовых стимулов в 1 мин).

Выбранные режимы охлаждения вызывали колебания температуры тела у ненаркотизированных крыс в пределах 1°C.

Пороговые болевые воздействия (ПБВ) нанесли на конечности крыс, помещённых в специальную камеру, электрическим током с индивидуальными для каждого животного вольт-амперными характеристиками до первых поведенческих признаков реакции избегания (3 сеанса ПБВ в течение 10 и 20 дней – 10 и 20 ПБВ соответственно).

Образцы ткани мозга для трансмиссионной электронной микроскопии ультратонких срезов препарировали согласно общепринятым методам [2]. Просмотр и фотографирование осуществляли в электронном микроскопе ПЭМ-125К («SELMI», Украина) при ускоряющем напряжении 75 кВ. При морфометрической обработке данных использовали разработанную нами компьютерную систему анализа FRAM [1]. Реализуя известный математический аппарат [10, 12], рассчитывали фрактальную размерность (D) как тангенс угла наклона графика линейной аппроксимации логарифмической зависимости площади поверхности перепадов яркости изображений от стороны квадрата, который ее ограничивает. При интерпретации данных учитывали положения теории обобщенного броуновского движения, в которой фигурирует величина H , связанная в нашем случае с D простым соотношением: $H = 2 - D$ [6]. Считается, что при $H = 1$ система линейна и детерминирована; при $H = 0,5$ – она случайна. В остальных случаях: $1 > H > 0,5$ – система персистентна (самоподдерживающаяся, стабильная, положительно коррелированная), $0 < H < 0,5$ – антиперсистентна (отрицательно коррелированная, имеет тенденцию к перестройкам).

Проницаемость ГЭБ для ^3H -норадреналина (^3H -НА) и ^3H -ацетилхолина (^3H -АХ) определяли радиоизотопным методом, применяя локальную суперфузию мозга при помощи канюли push-pull, соединенной с перистальтическим насосом KB 2115 (Швеция). Меченый нейромедиатор вводили в кровяное русло и одновременно со сбором перфузата брали кровь из хвостовой вены животного. Аликвоты элюата собирали в специальные флаконы и заливали сцинтилляционной жидкостью (ЖС-8). Эффективность счета определяли методом отношения каналов на сцинтилляционном счетчике LS-7800 («Beckman», США), при этом рассчитывали коэффициент проницаемости (КП) как отношение радиоактивности ткани мозга к радиоактивности крови.

Статистическую обработку полученных результатов проводили по методу Стьюдента-Фишера.

of avoiding reaction (3 sessions of TPE for 10 and 20 days – 10 and 20 TPE correspondingly).

The brain tissue samples for transmission electron microscopy of ultra-thin sections were treated according to traditional methods [2]. The viewing and imaging were performed with electron microscope PEM-125K (SELMI, Ukraine) at accelerating voltage of 75 kV. Morphometric processing of the data there involved the designed by us computer analysis software FRAM [1]. Implementing the known mathematical methods [10, 12] there was calculated the fractal dimension (D) as the slope of the curve of logarithm dependence linear approximation of the surface area of picture brightness differential on the square side limiting it. When interpreting the data there were taken into account the notions of the theory of the generalized Brownian motion, wherein is the value H associated here with value D by means of simple ratio: $H = 2 - D$ [6]. It is believed that at $H = 1$ the system is linear and determined; at $H = 0.5$ it is random. In the rest of cases: $1 > H > 0.5$ the system is persistent (self-maintaining, stable, positively correlated), $0 < H < 0.5$ it is anti-persistent (negatively correlated, tends to rearrangements).

BBB permeability for ^3H -noradrenaline (^3H -NA) and ^3H -acetylcholine (^3H -AC) was found by radio isotope method by applying the local superfusion of brain by push-pull cannula, connected to peristaltic pump KB 2115 (Sweden). Labeled neuromediator was introduced into blood channel and simultaneously with the collection of perfusate the blood from tail vein of an animals was taken. The aliquots of eluate were collected into special flasks and poured in with scintillation liquid (ZhS-8). The efficiency of counting was examined by the method of the ratio of the channels of scintillation counter LS-7800 (Beckman, USA), herewith there was calculated the permeability coefficient (PC) as the ratio of brain tissue radioactivity to the one of blood.

The obtained results were statistically processed according to Student-Fisher's method.

Results and discussion

The main regularity of ageing of nervous system at all the levels of organization is its decreased structural and functional lability. Recently in biology there was been formed a new scientific trend allowing a quantitative estimation of the most general level of order or chaos of the lability of an organism functional systems according to characteristic values and dynamics of changes in fractal dimension [3, 8].

In the first part of the research we are considering the average D value of endothelial chain of BBB, and in the second one we will be discussing the distribution

Результаты и обсуждение

Основной закономерностью старения нервной системы на всех уровнях организации является снижение её структурно-функциональной лабильности. В последние годы в биологии формируется новое научное направление, позволяющее количественно оценивать наиболее общий уровень упорядоченности или хаотичности по сути, лабильности функциональных систем организма по характерным значениям и динамике изменений фрактальной размерности [3, 8].

В первой части работы мы рассмотрим усреднённые D эндотелиального звена ГЭБ, а во второй – распределение значений D по ультраструктурным компонентам барьера.

Расчёт средних значений D препаратов неокортекса и гипоталамуса контрольных животных, показал, что в широком масштабе величин ($\times 120$ – 12000) геометрия изученных структур мозга особенно вблизи капилляров имеет ярко выраженные фрактальные свойства. У 24-месячных крыс по сравнению с 12-месячными ультраструктура прикапиллярного нейропиля характеризуется низким уровнем лабильности, но остаётся персистентной (самоподдерживающейся) (рис. 1).

По критерию D при РГВ, РЭКВ и ПБВ у 12- и 24-месячных крыс происходит существенная перестройка тонких механизмов нейроглиально-эндотелиальных взаимоотношений при сохранении общей архитектоники мозговой ткани. Фрактальная размерность при РГВ отличается волнообразной динамикой, периоды антиперсистентности (отрицательной корреляции взаиморасположения микрочастиц биообъекта, ведущей к их перегруппировке) на 40- и 80-й минутах РГВ лежат между периодами персистентности (положительной корреляции расположения микрочастиц биообъекта) на 10, 60 и 120-й минутах РГВ (рис.1, А, С). Такая динамика изменения фрактальной размерности при РГВ свидетельствует об общей устойчивости функциональной геометрии изученных структур мозга при существенном повышении пластичности триады: нейрон-глия-капилляр. Необходимо отметить, что изменения ультраструктуры более выражены в переднем отделе гипоталамуса (ПГТ) по сравнению с задним отделом гипоталамуса (ЗГТ).

В сенсомоторной коре (СМК) не обнаружено достоверных отличий от контрольных значений. При РЭКВ также происходят кардинальные перестройки интимных ультраструктурных взаимодействий (рис.1, В, D). Динамика D менее ритмична по сравнению с РГВ, без резких перепадов (нет точки перехода в область линейных отношений эвклидовой геометрии, как на 20-й минуте РГВ) и менее устойчива (D находится в опасной близости к зоне несогласованных, случайных изменений).

of the values D on ultrastructural components of the barrier.

The calculation of average D values for neocortex and hypothalamus preparations of the control animals has shown that in a wide range of values ($\times 120$ – $12,000$) the geometry of the studied brain structures especially near the capillaries has manifested fractal properties. In 24-month-old rats if compared with 12-month-old ones the ultrastructure of near-capillary neuropil is characterized with low level of lability but remains persistent (self-maintaining) (Fig. 1).

On criterion D at RHE, RECE and TPE in 12- and 24-month-old rats there is a significant re-arrangement of fine mechanisms of neuro-glia-endothelial interactions when preserving a general architecture of brain tissue. Fractal dimension at RHE is differed by wave-like dynamics, the periods of anti-persistence (negative correlation of co-location of bioobject microparticles, leading to their re-grouping) at the 40th and 80th min of RHE are between the periods of persistence (positive correlation of bioobject microparticles location) at 10, 60 and 120th min of RHE (Fig. 1 A, C). Such a dynamics of changes in fractal dimension at RHE testifies to general resistance of functional geometry of the studied brain structures at significant rise in plasticity of triad: neuron-glia-capillary. It should be noted that the changes in ultrastructure are more manifested in anterior hypothalamus (AH) if compared with the posterior one (PH).

In sensomotor cortex (SC) no statistically significant differences versus the control values were found. At RECE strong re-arrangements of intimate ultrastructural interactions also take place (Fig. 1 B, D). Dynamics of D values is less rhythmic if compared with RHE with no sharp differentials (no transition point into the area of linear relationships of Euclidean geometry as it was at the 20th min of RHE) and less resistant (D is in a dangerous vicinity to the zone of non-coordinated, random changes).

An increased fractalization of ultrastructural elements is kept after 9 RECE, including all hypothalamus and sensomotor area of brain cortex. According to criterion D the elements of ultrastructure after RECE are in an increased readiness to transformations (values D do not come to the norm and remain in anti-persistent zone).

At TPE the means of D alter slightly in 12- and 24-month-old rats (Fig. 1, B, D).

The most significant changes are found by us in the ultrastructure of endotheliocytes and surrounding the vessel basal membrane.

To the 10th min of RHE the width of basal membrane reduces, to the 60th min this index increases and to the 120th it exceeds the control values by 30–40%. It is important to be noted that in AH capillaries the width

Повышенная фрактализация элементов ультраструктуры сохраняется после 9РЭКВ, охватывая весь гипоталамус и сенсомоторную область коры головного мозга. По критерию D элементы ультраструктуры после РЭКВ находятся в состоянии повышенной готовности к трансформациям (значения D не возвращаются к норме и остаются в антиперсистентной зоне).

При ПБВ средние значения D изменяются незначительно у 12- и 24-месячных крыс (рис. 1, В, D).

Наиболее существенные изменения отмечены нами в ультраструктуре эндотелиоцитов и окружающей сосуд базальной мембраны.

На 10-й минуте РГВ уменьшается толщина базальной мембраны, на 60-й минуте этот показатель увеличивается и к 120-й на 30–40% превышает контрольные значения. Важно отметить, что в капиллярах ПГТ толщина базальной мембраны увеличивается несколько больше, чем в капиллярах ЗГТ (рис. 2, А). Аналогичные изменения претерпевают линейные параметры базальной мембраны мозговых капилляров после 3, 6 и 9 сеансов РЭКВ, при ПБВ отсутствуют достоверные различия по сравнению с контролем (рис. 2, В).

Специфика действия РГВ, РЭКВ и ПБВ выявляется при фрактальном анализе. По критерию фрактальной размерности после 3РЭКВ базальная мембрана становится более жесткой ($D < 1,1$), после 6РЭКВ она приближается со стороны персистентности к зоне броуновского движения (D порядка 1,45) и переходит в антиперсистентную область (D порядка 1,55) после 9РЭКВ, тогда как при ПБВ значения D остаются в персистентной области (рис. 2, D).

При РГВ обнаруживается иная, в большей части противоположная динамика: от антиперсистентной геометрии к персистентной и евклидовой (рис. 2, С).

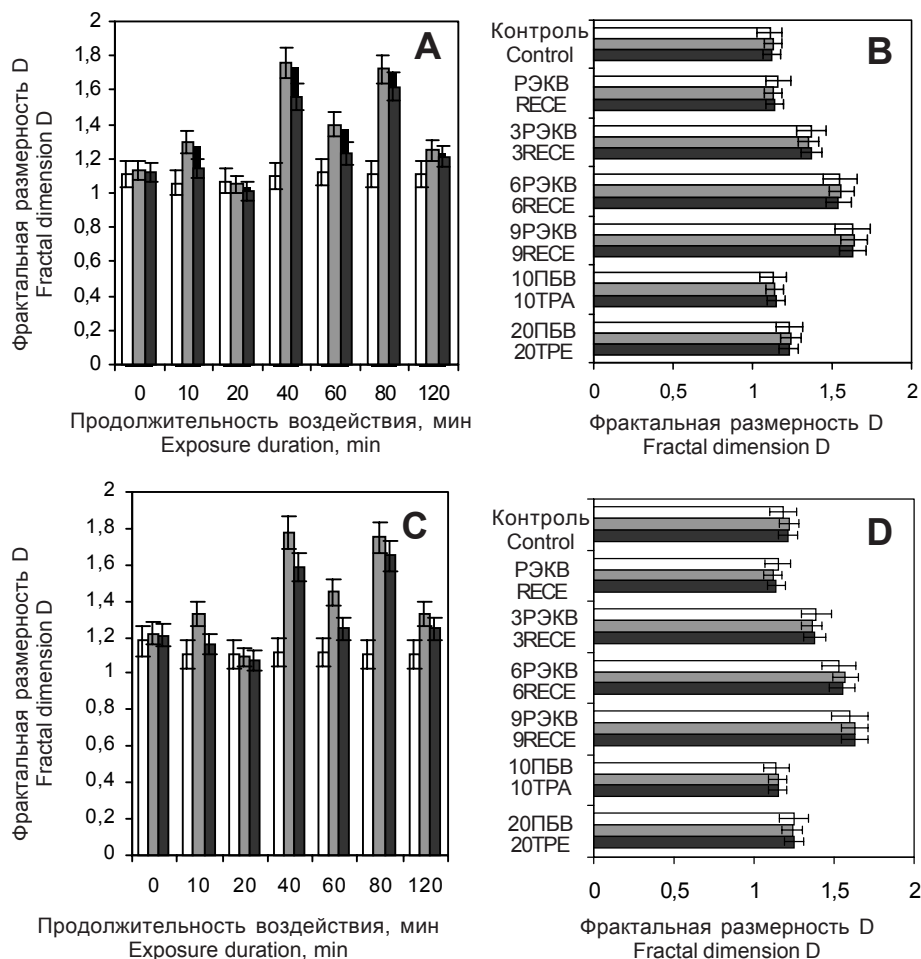


Рис. 1. Фрактальная размерность (D) структур мозга крыс при холодовых и болевых воздействиях: А – РГВ (24-месячные); В – РЭКВ и ПБВ (24-месячные); С – РГВ (12-месячные); D – РЭКВ и ПБВ (12-месячные); □ – CMK; ■ – ПГТ; ■ – ЗГТ.

Fig. 1. Fractal dimension (D) of rat brain structures at cold and pain effects: A – RHE (24-month-old); B – RCE and TPE (24-month-old); C – RHE (12-month-old); D – RECE and TPE (12-month-old); □ – SC; ■ – AH; ■ – PT.

of basal membrane increases somewhat bigger than in PH ones (Fig. 2 A). Linear parameters of brain capillary basal membrane are subjected to the same changes after 3, 6 and 9 sessions of RECE, at TPE no statistically significant differences if compared to the control were seen (Fig. 2B).

Specificity of the effect of RHE, RECE and PTE is revealed during fractal analysis. On the criterion of fractal dimension after 3 RECE the basal membrane becomes more rigid ($D < 1.1$), after 6 RECE it approaches from the side of persistence to the Brownian motion zone (D about 1.45) and transforms into anti-persistent area (D about 1.55) after 9 RECE, while at TPE the values D remain in a persistent area (Fig. 2D).

At RHE there is found a different, mainly opposite dynamics: from anti-persistent geometry to persistent and Euclidian one (Fig. 2C).

Гель базальной мембраны, образованный глюкозаминогликанами, создает молекулярный и электростатический фильтр, обеспечивающий селективную проницаемость мембраны для отрицательно заряженных молекул. Кроме того, её протеогликаны обладают осмотической активностью, которая также регулирует проницаемость. Все это позволяет рассматривать базальную мембрану как дополнительный регулятор функциональной активности ГЭБ. Вариации площади базальной мембраны, по нашему мнению, могут отражать изменение степени полимеризации глюкозаминогликанов и влиять на уровень проницаемости ГЭБ.

Можно предположить, что высокий уровень фрактализации ($D \sim 1,6$) отражает состояние пониженной адгезии эндотелиальных клеток к базальной мембране. В этом состоянии, возможно, разрушаются жесткие молекулярные структуры базального слоя, например, рвутся дисульфидные связи в жесткой крестообразной конструкции ламинина, которая выявляется электронно-микроскопически [9]. На некоторых препаратах мы наблюдали отслоение базальной мембраны, проникновение из ее дубликатуры отростков перицитов и образование контактов с эндотелиоцитами капилляров (рис. 3, А). По нашему мнению, эти ультраструктурные особенности способствуют повышению селективной проницаемости ГЭБ в направлении мозг-кровь [10].

Персистентный уровень фрактализации ($D \sim 1,3$) сопровождается образованием многочисленных полидубликатур базального слоя, направленных к отросткам астроцитов, реактивным состоянием ор-

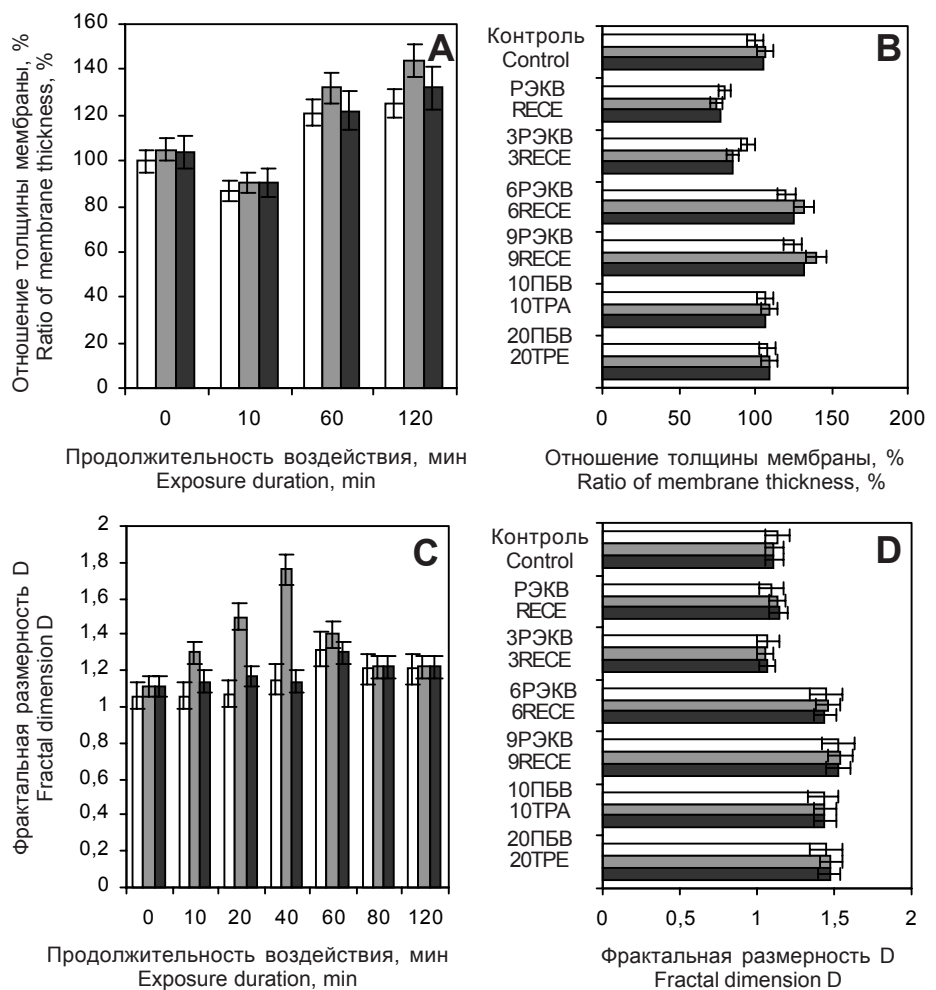


Рис. 2. Морфометрические показатели базальной мембраны капилляров мозга 24-месячных крыс при холодовых и болевых воздействиях: А – относительная толщина базальной мембраны капилляров головного мозга крыс, в динамике РГВ; В – относительная толщина базальной мембраны капилляров головного мозга крыс при РЭКВ и ПБВ (за 100% принята средняя толщина базальных мембран СК в контроле, т. е. до начала воздействия); С – фрактальная размерность базальной мембраны при РГВ; D – фрактальная размерность базальной мембраны при РЭКВ и ПБВ; □ – СК; ■ – ПГТ; ■ – ЗГТ.

Fig. 2. Morphometric indices of brain capillary basal membrane of 24-month-old rats at cold and pain effects: А – relative width of basal membrane of rat brain capillaries in RHE dynamics; В – relative width of basal membrane of rat brain capillaries at RECE and TPE (mean width of SC basal membrane in the control is assumed as 100%, i. e. before the procedure); С – fractal dimension of basal membrane at RHE; D – fractal dimension of basal membrane at RECE and TPE; □ – SC; ■ – AH; ■ – PT.

Basal membrane gel is formed by glucosaminoglycans and creates a molecular and electrostatic filter providing selective permeability of membrane for negatively charged molecules. In addition, its proteoglycans possess osmotic activity also regulating permeability. All this allows the considering of basal membrane as additional regulator of BBB functional activity. Variations of basal membrane area can apparently reflect the change in the polymerization degree of glucosaminoglycans and affect the level of BBB permeability.

ганелл перицитов, в частности комплекса Гольджи (рис. 3, В), что характерно для секреторного состояния. Описанные изменения ультраструктуры элементов ГЭБ приводят к D -зависимому противофазному повышению проницаемости ГЭБ для ^3H -НА (если $D \sim 1,3$) и ^3H -АХ (при $D \sim 1,7$) в направлении кровь-мозг (рис. 3, С).

При ПБВ также происходит D -зависимое повышение проницаемости ГЭБ. Однако этот процесс количественно и качественно отличается от действия РГВ. Коэффициенты проницаемости для ^3H -НА, ^3H -АХ и D увеличиваются синхронно и остаются в 2 раза ниже значений при РГВ (рис. 3, D).

Отмеченные закономерности и предположения определяют структурно-функциональные особенности механизмов действия изучаемых способов ритмических холодовых воздействий. Противоположные эффекты РГВ и РЭКВ могут стать основой для разработки новых режимов, сочетанных схем разных способов лечебной гипотермии.

Определённые изменения при болевых и холодовых воздействиях обнаруживают и собственно эндотелиоциты. Характерной особенностью РГВ и РЭКВ является появление в капиллярном эндотелии большого количества эндоцитозных везикул различных размеров, возрастает фрактализация областей с повышенной везикуляризацией цитоплазмы. Однако, как правило, данные изменения нивелируются в конце сеанса РГВ и РЭКВ оставаясь на несколько повышенном уровне, как при ПБВ. На люминальном контуре эндотелиоцитов появляются и обычно остаются после сеансов охлаждения многочисленные впячивания, увеличивается количество микровиллей. В результате этого увеличивается общая длина люминальной мембраны капилляров (рис. 4, А, В), что приводит к соответствующему изменению фрактальной размерности (рис. 4, С, D) и может свидетельствовать о повышении функциональной активности ГЭБ.

Наблюдаемые изменения поверхности эндотелиоцитов вместе с увеличением количества эндоцитозных везикул свидетельствуют о развитии процессов пиноцитоза в эндотелиоцитах капилляров. На электронных микрофотографиях мы наблюдали все этапы формирования пиноцитозных везикул, начиная с инвагинации люминальной мембраны и заканчивая прикреплением везикул к аблюминальной мембране с последующей рециклизацией.

На разных этапах охлаждения организма (в меньшей степени при болевом стрессе) происходят быстрые адаптационные преобразования, в том числе на субклеточном уровне в эндотелии капилляров, приводя к периодическому изменению структурно-функциональной активности ГЭБ, оптимизации со-

One may suppose that a high level of fractalization ($D \sim 1.6$) reflects the state of reduced adhesion of endothelial cells to basal membrane. In this state rigid molecular structures of basal layer are likely destroyed, e.g. disulphide bonds in rigid crest-like construct of laminin, which is revealed by electron microscopy, are broken [9]. In some slices we have observed exfoliation of basal membrane, penetration from its duplicatura of outgrowings of pericytes and formation of the contacts with capillary endotheliocytes (Fig. 3A). We believe these ultrastructural peculiarities testify to a selective permeability of BBB towards brain-blood [10].

Persistent level of fractalization ($D \sim 1.3$) is accompanied by the formation of numerous polyduplicaturas of basal layer, directed to the growings of astrocytes, by reactive state of organelles of pericytes, in particular Golgi apparatus (Fig 3B), which is characteristic for secretory state. The described changes in ultrastructure of BBB elements lead to D -dependent anti-phase rise in BBB permeability for ^3H -NA (if $D \sim 1.3$) and ^3H -AC (at $D \sim 1.7$) towards blood-brain (Fig. 3C).

At TPE there is also D -dependent rise in BBB permeability. However this process quantitatively and qualitatively differs from the effect of RHE. Permeability coefficients for ^3H -NA and ^3H -AC and D increase synchronously and remain 2 times lower the values at RCE (Fig 3D).

The found regularities and suppositions determine structural and functional peculiarities of the mechanisms of effect of the studied rhythmic cold effects. Opposite effects of RHE and RECE can be common base for designing new regimens, combined protocols of different methods of therapeutic hypothermia.

Certain changes in pain and cold effects reveal the endotheliocytes themselves as well. The feature of RHE and RECE is the appearance in capillary endothelium of a big number of endocytic vesicles of different sizes, fractalization of the areas with an increased vascularization of cytoplasm enhances. However as a rule these changes are levelled at the end of the session of RHE and RECE remaining at slightly increased level as well as at TPE. On luminal contour of endotheliocytes numerous invaginations appear and usually remained after cooling sessions, the number of microvilli increases. As a result a total length of luminal membrane of capillaries enhances (Fig. 4A, B), leading to corresponding change in fractal dimension (Fig. 4C, D) and may testify to a rise in BBB functional activity.

The observed changes of endotheliocytes surface along with a rise in the number of endocytic vesicles testify to the development of pinocytosis processes in capillary endotheliocytes. In electron microphotos we have observed all the stage of formation of pinocytic

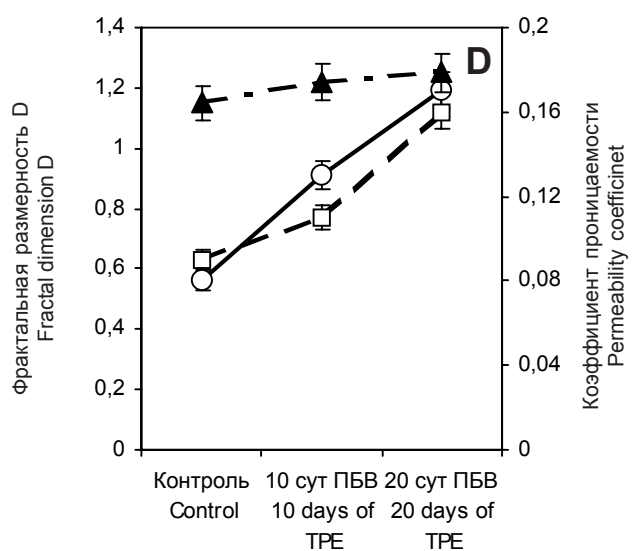
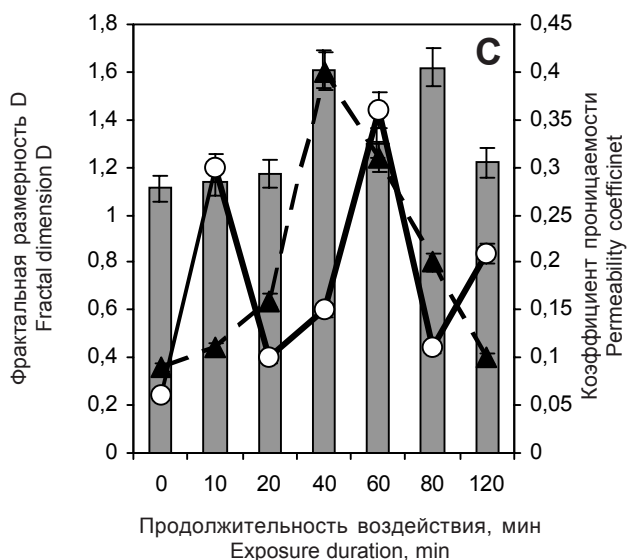
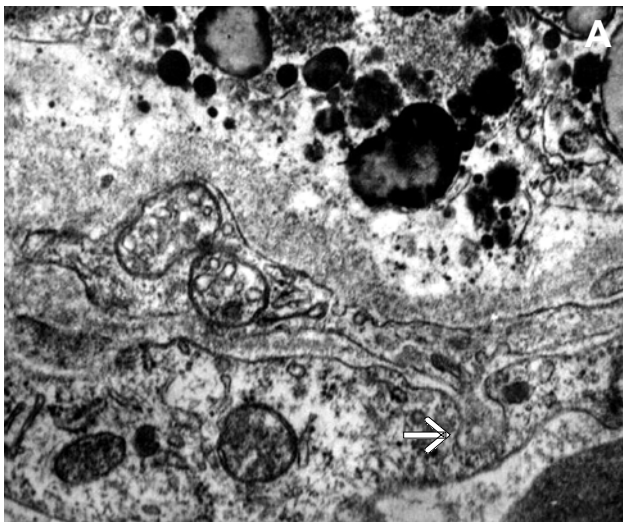


Рис. 3. Параметры структурно-функционального состояния ультраструктурных компонентов ГЭБ 24-месячных крыс при болевых и холодовых воздействиях: А – электронограмма фрагмента эндотелиоцита после 6РЭКВ, стрелка указывает на отросток перицита ($\times 150000$); В – электронограмма фрагмента эндотелиоцита капилляра ПГТ на 60-й минуте РГВ, стрелка указывает на комплекс Гольджи перицита ($\times 30000$); С – фрактальная размерность эндцитозных компартментов эндотелиоцитов капилляров головного мозга крыс (\square , левая шкала) и проницаемость ГЭБ ПГТ для ^3H -НА и ^3H -АХ (правая шкала) при РГВ; D – фрактальная размерность эндотелиоцитов капилляров головного мозга крыс (левая шкала) и проницаемость ГЭБ ПГТ для ^3H -НА и ^3H -АХ (правая шкала) при ПБВ.

Fig. 3. Parameters of structural and functional state of BBB ultrastructural components of 24-month-old rats at pain and cold effects: A – electronogram of endotheliocyte fragment after 6 RECE the arrow points to the pericyte process ($\times 150000$); B – electronogram of the fragment of AN capillary endotheliocytes at the 60th min of RHE, the arrow points to Golgi apparatus of pericyte ($\times 30000$); C – fractal dimension of endocytic compartments of endotheliocytes of rat brain capillaries (\square , left scale) and BBB permeability of AN for ^3H -NA and ^3H -AC (right scale) at RHE; D – fractal dimension of endotheliocytes of rat brain capillaries (left scale) and BBB permeability of AN for ^3H -NA and ^3H -AC (right scale) at TPE.

держания мессенджеров, действие которых интегрируется на уровне цитолеммы и цитоскелетного комплекса эндотелиоцитов. При этом изменяется их фрактальный рисунок, который может быть объективным количественным индикатором структурно-функционального состояния ГЭБ. Благодаря избыточной робастности фрактальное функциони-

vesicles starting from invagination of luminal membrane and finishing by the adherence of the vesicles to abluminal membrane with following recyclization.

At different cooling stages of an organism (in less extent at pain stress) there are rapid adaptation transformations, including those at subcellular level in capillary endothelium, resulting in periodic changes in

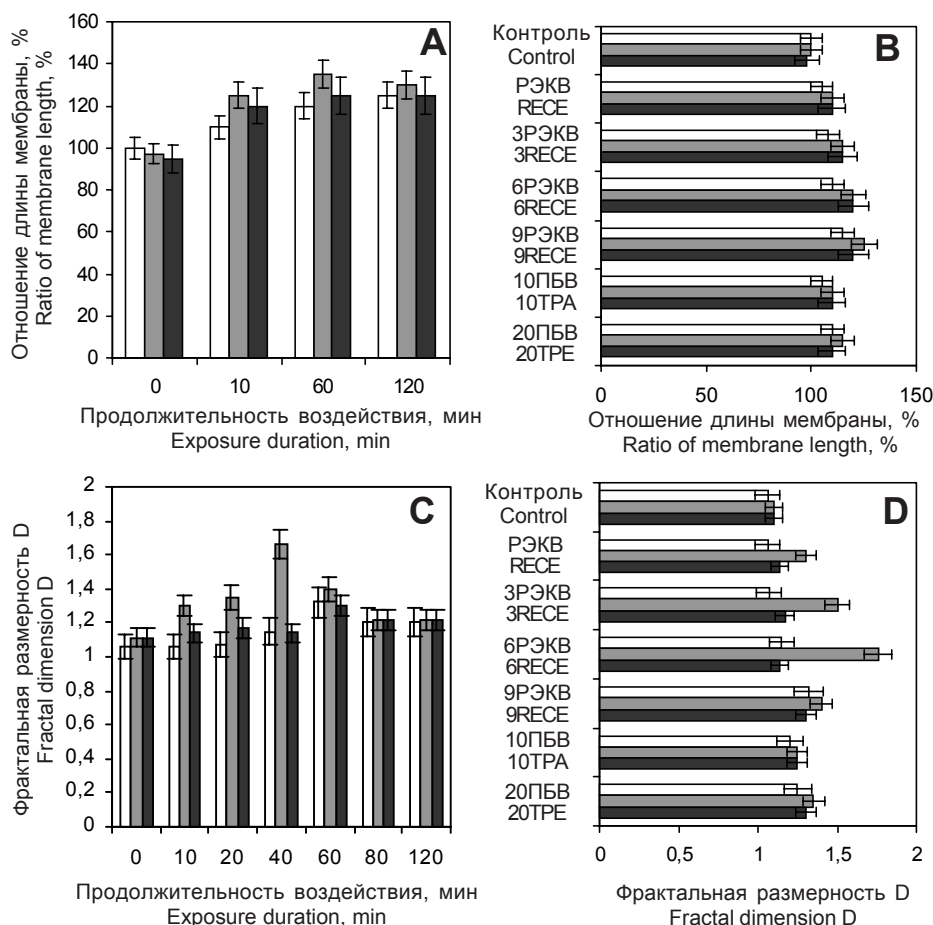


Рис. 4. Морфометрические показатели люминальной мембраны капилляров мозга 24-месячных крыс при холодных и болевых воздействиях: А – относительная длина люминальной мембраны капилляров при РГВ; В – относительная длина люминальной мембраны капилляров при РЭКВ и ПБВ (за 100% принята средняя длина люминальных мембран СК в контроле); С – фрактальная размерность люминальной мембраны при РГВ; Д – фрактальная размерность люминальной мембраны при РЭКВ и ПБВ.

Fig. 4. Morphometric indices of capillary luminal membrane of 24-month-old rats at cold and pain effects: A – relative length of luminal membrane of capillaries at RHE; B – relative length of luminal membrane of capillaries at RECE and TPE (mean length of luminal membranes of SC in the control is assumed as 100%); C – fractal dimension of luminal membrane at RHE; D – fractal dimension of luminal membrane at RECE and TPE.

рование должно повышать адаптационные возможности организма при стрессах разного генеза, интенсивности и продолжительности.

Выводы

1. Расчёт средних D препаратов нейропила неокортекса и гипоталамуса 24-месячных крыс показал, что в широком масштабе величин ($\times 120-12000$) геометрия мозга особенно вблизи капилляров имеет ярко выраженные фрактальные свойства, но характеризуется низким по сравнению с 12-месячными животными уровнем лабильности с персистентной (самоподдерживающейся) динамикой.

2. Болевые и периодические холодные воздействия низкой положительной и сверхнизкой отрицательной температурой имеют структурно-функциональные особенности реагирования элементов ГЭБ, которые достоверно выявляются по показателям фрактальной размерности.

3. При болевых и ритмических экстремальных криовоздействиях фрактальная размерность эндотелия капилляров мозга монотонно возрастает до $D \sim 1,5$ (ультраструктура переходит в зону слабо

structural and functional activity of BBB; optimization of the content of messengers, the effect of which is integrated at the level of cytolemma and cytoskeletal complex of endotheliocytes. Herewith their fractal pattern, being likely an objective quantitative indicator of structural and functional state of BBB, changes. Owing to surplus robustness the fractal functioning should increase adaptation abilities of an organism at the stresses of different genesis, intensity and duration.

Conclusions

1. Calculation of mean D for neuropile slices assays of neocortex neuropil and hypothalamus of 24-month-old rats has shown that in a wide range of the values ($\times 120-12000$) the geometry of brain near capillaries has vividly manifested fractal properties, but is characterized with low versus the 12-month-old animals level of lability with persistent (self-supporting) dynamics.

2. Pain and periodic cold effects of low positive and ultralow negative temperature have structural and functional peculiarities of responding the BBB elements, which are statistically and significantly found by the indices of fractal dimensions.

согласованных, случайных изменений), повышается их структурная лабильность, но за счёт некоторой общей дезорганизации.

4. При ритмическом воздействии гипотермии ΔD имеет выраженную ритмику. Антиперсистентные периоды лежат между персистентными, что свидетельствует о повышении пластичности, но сохранении устойчивости структуры.

5. В условиях действия на организм ритмических режимов охлаждения повышается проницаемость ГЭБ для норадреналина (если $D \sim 1,3$) и ацетилхолина (при $D \sim 1,7$), причём вектор проницаемости направлен к мозгу, что характерно для РГВ. При РЭКВ возможно повышение проницаемости ГЭБ в направлении мозг-кровь.

Авторы выражают искреннюю благодарность к.б.н. Марченко Ларисе Николаевне за неоценимую помощь в проведении электронно-микроскопических исследований.

3. At pain and rhythmic extreme cryoeffects the fractal dimension of brain capillary endothelium monotonously increases up to $D \sim 1.5$ (ultrastructure transfers into the zone of weakly coordinated, random changes), their structural lability but due to some general disorganization.

4. At rhythmic effect of hypothermia is of a manifested rhythmic. Anti-persistent periods are between the persistent ones, testifying to a rise in plasticity, but preservation of structure resistance.

5. Under the effect of rhythmic cooling regimens in an organism the BBB permeability for noradrenalin increases (if $D \sim 1.3$) and acetylcholine (at $D \sim 1.7$), moreover the permeability vector is directed to brain which is characteristic for rhythmic hypothermic effect (RHE). At RECE the rise in BBB permeability towards brain-blood is possible.

The authors acknowledge Larisa Marchenko, PhD, for tremendous help in performing electron microscopic studies.

Литература

1. Бабийчук В.Г., Марченко В.С., Марченко Л.Н. Структурно-функциональное состояние гематоэнцефалического барьера при ритмическом действии положительных (12°C) и экстремально низких (-120°C) температур // *Нейронауки: теоретичні та клінічні аспекти.* – 2008. – Т. 4, №1. – С. 68–74.
2. Боголепов Н.Н. Методы электронно-микроскопического исследования мозга. – М.: Медицина. – 1976. – 187 с.
3. Исаева В.В., Чернышев А.В., Шкуратов Д.Ю. Фракталы и хаос в морфологии организма // *Вестник ДВО РАН.* – 2001. – №2. – С. 71–79.
4. Майзелис М.Я. Современные представления о гематоэнцефалическом барьере: нейрофизиологические и нейрохимические аспекты // *Журнал высш. нервн. деятельности.* – 1986. – Т. XXXVI, Вып. 4. – С. 611–626.
5. Марченко В.С., Бабийчук В.Г. Кардиорегуляторная функция гематоэнцефалического барьера при резонансной гипотермии // *Проблемы криобиологии.* – 2001. – №4. – С. 17–29.
6. Марченко В.С., Бабийчук В.Г., Ломакін І.І. та ін. Механізми лікувальної дії інтенсивної кріотерапії // *Клінічна та експериментальна патолофізіологія.* – 2004. – Т. 3, №2, Ч. 2. – С. 491–493.
7. Марченко В.С., Бабийчук Г.О., Марченко Л.М. Структурно-функціональний стан гематоенцефалічного бар'єра при ритмічних та безперервних гіпотермічних впливах на організм щурів // *Проблемы криобиологии.* – 2008. – Т. 18, №3 – С. 386–390.
8. Марченко В.С. Функціональна архітектоніка гематоенцефалічного бар'єра в центральних механізмах терморегуляції при гіпотермії і гібернації // *Наук. вісник НАУ.* – 2008. – №126. – С.88–97.
9. Слуцкий Л.И. Новое о структурных компонентах соединительной ткани и базальных мембран // *Успехи современной биологии.* – 1984. – Т. 97, Вып. 1. – С. 116–130.
10. Фрактальный анализ процессов, структур и сигналов / Под. ред Р.Э. Пашенко. – Харьков, 2006. – 347 с.

References

1. Babiychuk V.G., Marchenko V.S., Marchenko L.N. Structural and functional state of blood brain barrier at rhythmic effect of positive (12°C) and extremely low (-120°C) temperatures // *Neironauki: Teoretychni ta Klinichni Aspekty.* – 2008. – Vol. 4, N1. – P. 68–74.
2. Bogolepov N.N. Methods of electron microscopic study of brain. – Moscow: Meditsyna, 1976. – 187p.
3. Isaeva V.V., Chernyshev A.V., Shkuratov D.Yu. Fractals and chaos in organism morphology // *Vestnik DVO RAN.* – 2001. – N2. – P. 71–79.
4. Maizelis M.Ya. Current notions about blood brain barrier: neurophysiological and neurochemical aspects // *Zhurnal Vysshey Nervnoy Deyatel'nosti.* – 1986. – Vol. XXXVI, Issue 4. – P. 611–626.
5. Marchenko V.S., Babiychuk V.G. Cardioregulatory function of blood brain barrier at resonance hypothermia // *Problems of Cryobiology.* – 2001. – N4. – P. 17–29.
6. Marchenko V.S., Babiychuk V.G., Lomakin I.I. et al. Mechanisms of therapeutic effect of intensive cryotherapy // *Klinichna ta Eksperymentalna Patofiziologiya.* – 2004. – Vol. 3, N2, Part2. – P. 491–493.
7. Marchenko V.S., Babiychuk G.O., Marchenko L.M. Structural and functional state of blood brain barrier at rhythmic and continuous effects on rat's organism // *Problems of Cryobiology.* – 2008. – Vol. 18, N3. – P. 386–390.
8. Marchenko V.S. Functional architecture of blood brain barrier in central mechanisms of thermoregulation at hypothermia and hibernation // *Nauk. Visnyk NAU.* – 2008. – N126. – P. 88–97.
9. Slutskiy L.I. New about structural components of connective tissue and basal membranes // *Uspekhi Sovremennoy Biologii.* – 1984. – Vol. 97, Issue 1. – P. 116–130.
10. Fractal analysis of processes, structures and signals / Ed. by R.E. Paschenko. – Kharkov, 2006. – 347 p.
11. Frolkis V.V. Stress-age-syndrome // *Fiziologicheskij Zhurnal.* – 1991. – Vol. 37, N3. – P. 3–11.
12. Mandelbrot B.B. The fractal geometry of nature. – New York: Freeman, 1983. – 468 p.

11. Фролькис В.В. Стресс-возраст-синдром // Физиологический журнал. – 1991. – Т. 37, №3. – С. 3–11.
12. Mandelbrot B.B. The fractal geometry of nature. – New York: Freeman, 1983. – 468 p.
13. Oztas B., Kaya M., Camurcu S. Influence of profound hypothermia on the blood-brain barrier permeability during acute arterial hypertension // Pharmacil. Res. – 1992. Vol. 26, №1. – P. 75–85.

Accepted 01.11.2011

Поступила 01.11.2011