

Трансформація еритроцитів крові молодих і старих щурів після загальної кріостимуляції

В.В. Ломако, О.В. Шило, І.Ф. Коваленко

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків;
e-mail: victoria0regia@gmail.com

Резюме. Методом малокутового розсіювання світла вивчали динаміку трансформації еритроцитів у крові молодих (6-7 міс) і старих (18-20 міс) щурів після загальної кріостимуляції (ЗКС). Використовуючи певні співвідношення дискоцитів, оборотно і необоротно змінених форм еритроцитів розраховували індекси трансформації. Здійснювали ЗКС в експериментальній кріокамері для охолодження дрібних лабораторних тварин: температура становила -120 °С, вплив тривав 90 с, загалом було 3 сеанси (раз на добу з інтервалом 24 год). Порівнюючи контрольні групи тварин виявили, що у крові старих щурів кількість дискоцитів, особливо їх сплюснених форм, що високо резистентні до факторів гемолізу, на відміну від молодих, була більшою (на 17,3 нормоцитів та 43,5% сплюснених), а змінених форм еритроцитів – стоматоцитів і сфероцитів, навпаки, меншою (на 38,4 та 23,5% відповідно); більшість вивчених індексів трансформації були нижчими, особливо індекс оборотності (більш ніж у 7 разів). Після ЗКС спрямованість і вираженість змін популяційного складу і трансформації еритроцитів щурів залежали від віку, кількості сенсів (1, 2 або 3) і термінів спостереження (через добу або тиждень). Зростала гетерогенність популяції еритроцитів, оскільки збільшувався відсоток як оборотно, так і необоротно змінених форм; індекси трансформації еритроцитів у обох груп щурів знижувалися практично на всіх етапах експерименту.

Ключові слова: еритроцити; загальна кріостимуляція організму; вік; щури.

ВСТУП

Кріостимуляція всього тіла (аерокріотерапія) останніми роками знайшла широке застосування в спортивній і відновлювальній медицині, проте її використання не завжди є безпечним і оснований на даних фундаментальних досліджень, як і обґрунтованість кількості і частоти сеансів впливу [1]. До того ж показано, що місцеве використання льоду або занурення у холодну воду надають зрівняного з кріотерапією, яка дорого коштує, фізіологічного і клінічного ефекту [2, 3]. Сеанс кріотерапії складається з короткочасних впливів, що проводяться в спеціальній кріокамері, де температура повітря підтримується у діапазоні від -60 до -160 °С і зазвичай триває 2–3 хв (10–20 процедур) [1, 2, 4]. Відомо, що холодові впливи сприяють активації системи терморегуляції, а їх повторне застосування прискорює адаптацію

організму до холоду. Реакції на вплив кріотерапії пов'язані з реорганізацією кровотоку в шкірі і підшкірних тканинах, а також з модуляцією рівня активності певних ланок задіяних функціональних систем, зокрема системи крові. Остання відіграє значну роль у підтримці гомеостазу і визначенні ефективності перебігу фізіологічних процесів в організмі; її високоспеціалізовані транспортні клітини еритроцити мають двовгнуту форму дискоцита, що забезпечує високу ступінь деформації і еластичності. Популяція еритроцитів неоднорідна за формою, розміром, віком, стійкістю до несприятливих факторів і біохімічними параметрами; вони можуть піддаватися різним оборотним і необоротним трансформаціям [5, 6]. Еритроцити визначають реологію крові, перебіг імунологічних процесів та беруть участь у підтримці гомеостазу організму. Зміна їх форми є раннім не-

специфічним діагностичним індикатором [6, 7], а дослідження вікових особливостей динаміки структурно-функціональної організації еритроцитів, зокрема під час екстремальних впливів, крім теоретичного, може мати прогностичне значення для оцінки здатності організму до адаптації.

Метою нашого дослідження було вивчення динаміки трансформації еритроцитів у крові молодих і старих щурів одразу після дії загальної кріостимуляції та на етапах відновлення (через добу і тиждень).

МЕТОДИКА

Експерименти проведені відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) з дотриманням вимог Комітету з біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, погоджених з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Робота проведена в осінньо-зимовий період на молодих (6-7 міс) і старих (18-20 міс) самцях білих безпородних щурів, яких до початку експерименту утримували в умовах віварію за природного світлового режиму та на стандартному раціоні *ad libitum*.

Загальну кріостимуляцію (ЗКС) здійснювали в кріокамері для охолодження дрібних лабораторних тварин [8]. Тривалість холодного впливу за -120°C становила 90 с, загалом проводили 3 сеанси (раз на добу) з інтервалом у 24 год. Для вимірювання температури тіла (ТТ) використовували таровану мідь-константанову термопару і електронний вольтметр В7-21 з наступним перерахунком показників вольтметра (мікроВольт) у градуси Цельсія за допомогою програми «Excel» («Microsoft», США).

Забір біологічного матеріалу проводили після декапітації тварин одночасно для біохімічних, морфологічних та інших до-

сліджень. Щури були розділені на 9 груп (по 5 тварин у кожній): 1-ша – контроль, 2-4-та групи – після 1-3-го сеансів ЗКС відповідно, 5-7-ма – через 24 год після 1-3-го сеансів ЗКС відповідно, 8-9-та – через 1 тиждень після 1-го та 2-го сеансів ЗКС відповідно.

Динаміку трансформації еритроцитів оцінювали методом малокутового розсіювання світла на приладі НПФ «Кріокон» (Україна), розробленому в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України [9]. Вивчали залежність інтенсивності розсіювання світла (під кутом 90° у напрямку до падаючого променя) суспензією еритроцитів від кількості клітин у ній. У вимірювальну ємність, що містить 3,0 мл розчину NaCl різної концентрації (від 0,15 до 0,05 моль/л), вносили 30 мкл еритромаси, отриманої після відстоювання крові та аспірації плазми. Всі дослідження проводили при 20°C . Визначали частку збережених клітин. Розподіл еритроцитів за індексом сферичності (ІС) обчислювали з залежностей осмотичної крихкості за допомогою фізико-математичної моделі гіпотонічного гемолізу еритроцитів у розчині непроникаючої речовини [9]. Значення ІС прямо пропорційні поверхнево-об'ємному співвідношенню (S/V) і характеризують форму клітин. Переважаючі форми еритроцитів відповідали наступним інтервалам ІС: (1 – 1,3) сфероцити, (1,3 – 1,7) стоматоцити, (1,7 – 2,1) нормальні та (2,1 – 3) сплюснені дискоцити.

Використовуючи певні співвідношення нормальних (дискоцити), оборотно і необоротно змінених форм еритроцитів розраховували інтегральні показники – індекси трансформації еритроцитів, а саме: індекс трансформації – (ОД+НД)/Д; індекс оборотної трансформації – (ОД/Д), індекс незворотної трансформації – (НД/Д), індекс оборотності – (ОД/НД), де Д – відсоток дискоцитів; ОД – відсоток оборотно деформованих еритроцитів і НД – відсоток необоротно деформованих еритроцитів.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою методів варіаційної ста-

тистики з використанням непараметричного критерію Манна-Уїтні, виражали у вигляді $M \pm SE$. Вірогідність одержаних результатів оцінювали на рівні значущості не менше ніж 95 % ($P < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз отриманих результатів показав, що після ЗКС у старих тварин (порівняно з контрольною групою) частка нормальних дискоцитів зменшувалася на всіх етапах спостереження, особливо відразу та через 24 год після

3-го сеансу, а сплосчених – також після 3-го сеансу та через тиждень (майже вдвічі; табл. 1). У крові молодих щурів після ЗКС частка нормальних дискоцитів змінювалася залежно від кратності впливу та термінів спостереження: зменшувалася після 1- та 2-го, через 24 год після 1-го та через тиждень, збільшувалася через 24 год після 2- і 3-го сеансів. Частка ж сплосчених дискоцитів збільшувалася після 3-го сеансу (більш ніж у 2 рази) і через 24 год після 2- і 3-го (див. табл. 1).

Динаміка змінених форм еритроцитів була такою: частка стоматоцитів (оборотно зміне-

Таблиця 1. Популяційний склад еритроцитів у крові молодих і старих щурів після загальної кріостимуляції ($M \pm SE$)

Групи тварин	Форми еритроцитів за індексом сферичності, %			
	Дискоцити		Стоматоцити (1,3-1,7)	Сфероцити (1-1,3)
	сплосчені (2,1-3)	нормальні (1,7-2,1)		
	Контроль			
Молоді щури	4,70 ± 0,66	50,83 ± 1,91	43,84 ± 2,31	1,02 ± 0,29
Старі щури	10,77 ± 2,49**	61,42 ± 1,12	27,03 ± 1,40*, **	0,78 ± 0,50
	1-й сеанс			
Молоді щури	6,60 ± 1,06	44,52 ± 2,74*	47,66 ± 1,65	1,20 ± 0,59
Старі щури	9,32 ± 1,15**	56,14 ± 3,18*, **	34,0 ± 3,59*, **	0,52 ± 0,52
	2-й сеанс			
Молоді щури	5,37 ± 0,53	43,96 ± 1,43*	46,37 ± 1,46	4,275 ± 0,55*
Старі щури	12,47 ± 2,01**	47,40 ± 2,76*	35,47 ± 5,06*, **	4,70 ± 0,67*
	3-й сеанс			
Молоді щури	10,22 ± 2,82*	48,94 ± 3,19	40,42 ± 4,45	0,46 ± 0,46*
Старі щури	4,98 ± 0,48*, **	43,30 ± 2,12*	51,43 ± 2,06*, **	0,15 ± 0,15*
	24 год після 1-го сеансу			
Молоді щури	3,67 ± 0,39	45,78 ± 1,61*	45,3 ± 1,78	5,228 ± 0,69*
Старі щури	7,00 ± 2,12**	50,42 ± 1,19*, **	41,22 ± 2,48*	1,38 ± 0,32**
	24 год після 2-го сеансу			
Молоді щури	8,17 ± 1,01*	55,87 ± 2,29*	30,65 ± 1,49*	5,35 ± 1,68*
Старі щури	14,23 ± 3,50**	49,30 ± 2,6*, **	35,40 ± 6,42*	1,10 ± 0,57**
	24 год після 3-го сеансу			
Молоді щури	7,44 ± 0,97*	55,67 ± 1,79*	34,34 ± 2,38*	2,56 ± 0,62*
Старі щури	7,82 ± 1,15	44,40 ± 2,86*, **	44,63 ± 1,73*, **	3,12 ± 0,85*
	1 тиж після 1-го сеансу			
Молоді щури	2,35 ± 0,50*	39,92 ± 5,37*	54,87 ± 7,20*	2,92 ± 1,59*
Старі щури	8,09 ± 1,51**	53,77 ± 1,75*, **	34,61 ± 2,17*, **	3,5 ± 0,69*
	1 тиж після 3-го сеансу			
Молоді щури	1,37 ± 0,38*	36,21 ± 2,12*	58,23 ± 2,42*	4,22 ± 0,63*
Старі щури	3,68 ± 0,74*, **	52,22 ± 3,62*, **	39,25 ± 3,2*, **	4,83 ± 1,39*

Примітка тут і в табл. 2: * $P < 0,05$ порівняно з контролем; ** $P < 0,05$ порівняно з молодими щурами

на форма) у крові старих тварин значно збільшувалася після ЗКС порівняно з контролем на всіх етапах спостереження. Частина сфероцитів (необоротно змінена предгемолітична форма еритроциту) збільшувалася після 2-го сеансу, через 24 год після 3-го сеансу та через тиждень після ЗКС. У молодих щурів порівняно з контролем частка стоматоцитів одразу після впливу не змінювалась, через 24 год після 2- і 3-го сеансів – зменшувалась, а через тиждень, навпаки, значно збільшувалася (див. табл. 1).

Порівняння контрольних груп тварин різного віку виявило, що у крові старих щурів популяція еритроцитів була більш гомогенною, ніж у молодих: кількість дискоцитів, особливо їх сплоснених, високорезистентних до факторів гемолізу форм, була більшою (на 17,3 нормоцитів та 43,5% сплоснених), а змінених форм – стоматоцитів і сфероцитів, навпаки, меншою (на 38,4 та 23,5% відповідно; див. табл. 1).

Після ЗКС частка сплоснених дискоцитів у старих щурів порівняно з молодими була значно вищою на всіх етапах експерименту, окрім значень одразу (була нижчою) і через 24 год (була подібною) після 3-го кріовпливу; частка нормальних дискоцитів також була вищою після 1-го та через 24 год і тиждень спостереження, нижчою – через 24 год після 2- та 3-го впливів, подібною – після 2- та 3-го. Відсоток стоматоцитів був меншим ніж у молодих щурів після 1-, 2-го впливу та через тиждень, більшим – одразу та через 24 год після 3-го сеансу ЗКС і подібним – через 24 год після 1- та 2-го кріовпливів. Зміни кількості сфероцитів були односпрямованими в обох вікових групах: після 3-го впливу та через 24 год після 1- та 2-го вона зменшувалася, на інших етапах – не відрізнялася (див. табл. 1).

Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності є об'єктивною характеристикою стану крові та використовується для оцінки особливостей відповідної реакції організму на вплив різних фізичних факторів. У крові за нормальних умов спостерігається

фізіологічний пойкилоцитоз, тобто істотно переважає кількість дискоцитів (нормоцитів) правильної форми, решту клітин складають змінені форми еритроцитів (ехіноцити, стоматоцити, еліпсоцити, кодоцити, сфероцити тощо) [6, 7]. Посилена елімінація низькорезистентних, старих і дефектних клітин з кров'яного русла є адаптивною реакцією системи на будь-який стрес або вплив ендотекзогенних факторів, спрямованою на стимуляцію еритропоезу [6, 7, 10]. Порушення останнього, зміна рН, електролітного балансу крові, концентрації метаболітів призводять до підвищення кількості оборотно (ехіноцити і стоматоцити) і необоротно (сфероцити, еліпсоцити, кодоцити та інші) змінених форм еритроцитів. Такі форми клітин можуть з'являтися і як перехідні в процесі їх старіння [7].

У наших дослідженнях відсоток нормальних дискоцитів у старих щурів не збільшувався після ЗКС на жодному з етапів експерименту, а, навпаки, тільки зменшувався, що відбувалося на фоні підвищення змінених форм еритроцитів. У молодих щурів цей показник збільшувався тільки через 24 год після 2-го та 3-го сеансів (див. табл. 1).

Зміна форми еритроцитів є енергетично-температурозалежним процесом, визначається за станом фосфоліпідних компонентів мембрани, її поверхневих та інтегральних білків, а також співвідношенням активності про- та антиоксидантних процесів [11, 12]. На початкових фазах дії холоду оксидативний стрес імовірно викликає деградацію певних протеїнів і активує антиоксидантну систему [13]. В цих умовах мембрани еритроцитів можуть модифікуватися, що впливає на їх трансформацію та популяційний склад у крові. Можливі механізми та фактори, що залучені у процеси трансформації еритроцитів та впливають на їх форму, детально обговорюються [5–7, 10, 14, 15]. Гетерогенні популяції еритроцитів більш чутливі до дії осмотичного фактора, зміни рН тощо [5–7]. Збільшення кількості сфероцитів у крові свідчить про патологічні порушення в орга-

нізмі, або такі, що виявляються внаслідок дії екстремальних факторів [6].

При посиленні еритропоезу в кров починають надходити молоді клітини еритроїдного ряду (ретикулоцити, поліхроматофільні еритроцити), що мають більш високу резистентність і для яких характерна трохи сплюснена дископодібна форма [5, 6]. Тенденцію до збільшення їх частки (див. табл. 1), а також появу поліхроматофільних клітин у мазках крові спостерігали одразу та через 24 год після 2-го сеансу ЗКС у старих щурів.

У праці Kulis і співавт. [16] показано, що застосування ЗСК у літніх жінок знижує еластичність еритроцитів, але позитивно впливає на зміни параметрів їх агрегації. При гострому холодному стресі підсилення функціональної активності еритроцитів зумовлено індукцією різкого гормонального зсуву, що призводить до підвищення в сироватці крові концентрації тригліцеридів, холестерину тощо [4, 17]. Одночасно можуть змінюватися властивості самої мембрани клітин. Жирнокислотний склад мембран еритроцитів у спортсменів змінюється залежно від кількості сеансів ЗСК і термінів спостереження: вміст загального холестерину знижується через 24 год після 1-го; після 12-го вміст насичених жирних кислот майже вдвічі збільшується, а поліненасичених і трансжирних кислот, навпаки, зменшується; змінюється також їх співвідношення [4]. Слід також враховувати й значні внутрішньопопуляційні відмінності за ступенем холодової стійкості організму, що можуть визначатися особливостями метаболізму, зокрема, ліпідів. Реагування організму здорових людей на ЗКС залежить від статі й індивідуальних антропометричних показників [18].

Крім того, відповідні реакції клітин крові зумовлюються як змінами ТТ, так й інтенсивністю та тривалістю холодового впливу. Отже, раніше було показано, що у крові щурів, незалежно від способу досягнення гіпотермії (краніоцеребральна й імерсійна гіпотермія та загальна гіпотермія на тлі наростання

гіпоксії-гіперкапнії) і ступеня зниження ТТ (32, 27 та 17 °С відповідно) спостерігаються оборотні, подібні за спрямованістю, але різні за вираженістю зміни співвідношення форм еритроцитів. Зменшується кількість дискоцитів на тлі збільшення частки змінених форм (стоматоцитів і сфероцитів) [14], але через 24 год, коли ТТ у тварин відновлюється, спостерігається тенденція до їх збільшення за рахунок сплюснених форм; частка змінених форм еритроцитів зменшується. Неперервний тривалий холодний вплив у щурів (протягом 30 діб за 5 °С) сприяє підвищенню у крові кількості сплюснених дискоцитів і сфероцитів на тлі зменшення стоматоцитів; ритмічні холодні впливи з температурою -12 і +10 °С викликають у щурів збільшення частки змінених форм еритроцитів і сплюснених дискоцитів відповідно [19].

Здатність еритроцитів до трансформації має адаптаційно-приспосувальне значення, а розрахунок індексів трансформації еритроцитів, в основі якого лежать певні співвідношення дискоцитів, оборотно і необоротно змінених форм еритроцитів, дає змогу розширити уявлення про процеси їх трансформації. Динаміка індексів трансформації еритроцитів після ЗКС представлена у табл. 2. Зниження індексу трансформації та збільшення індексу оборотної трансформації вказують на ригідність еритроцитарної системи за рахунок посилення елімінації нестійких форм еритроцитів. Така динаміка відображає адаптаційні реакції системи еритроциту. Однак після ЗКС, коли ТТ не знижувалася нижче за 37 °С (нижня межа нормальної ТТ у щурів), зміни індексів трансформації мали іншу спрямованість. Так, індекс оборотної трансформації еритроцитів у старих щурів був підвищеним на всіх етапах експерименту, починаючи з 2-го сеансу, однак й індекс трансформації також підвищувався. У молодих тварин ці індекси починали змінюватися тільки через 24 год після 2-го сеансу ЗКС, а індекс необоротної трансформації на половині етапів спостереження або не змінювався,

або підвищувався. Індекс оборотності у них за більшістю етапів, навпаки, знижувався, окрім як одразу та через 1 тиждень після 1-го сеансу, коли тварин розподілили на 2 підгрупи: із незміненим (на рівні контролю) та зниженим його значеннями (див. табл. 2).

У старих інтактних щурів порівняно з молодими індекси трансформації та оборотної трансформації змінювалися односпрямова-

но: були більш низькими практично на всіх етапах експерименту, окрім як після 3-го сеансу ЗКС (вище) та через 24 год після 2-го сеансу (не відрізнялися). Індекс необоротної трансформації у старих щурів знижувався одразу після 3-го, через 24 год після 1- та 2-го сеансів ЗКС та підвищувався через тиждень після 1-го порівняно з молодими. Індекс оборотності у них був істотно нижчим

Таблиця 2. Індекси трансформації еритроцитів крові молодих і старих щурів після загальної кріостимуляції (M ± SE)

Групи тварин	Індекс			
	Трансформації	Оборотної трансформації	Необоротної трансформації	Оборотності
	Контроль			
Молоді щури	0,85 ± 0,09	0,94 ± 0,11	0,02 ± 0,01	30,6 ± 7,64
Старі щури	0,39 ± 0,03**	0,38 ± 0,03**	0,01 ± 0,01	4,20 ± 2,67**
	1-й сеанс			
Молоді щури	0,96 ± 0,07	0,94 ± 0,07	0,02 ± 0,01	18,98 ± 10,18
Старі щури	0,54 ± 0,08* **	0,53 ± 0,08**	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,02*, **
	2-й сеанс			
Молоді щури	1,04 ± 0,06*	0,95 ± 0,06	0,09 ± 0,01	12,13 ± 1,62*
Старі щури	0,66 ± 0,11**	0,65 ± 0,12*,**	0,08 ± 0,01*	0,15 ± 0,04*, **
	3-й сеанс			
Молоді щури	0,73 ± 0,14	0,73 ± 0,13	0,01 ± 0,01	4,2 ± 4,2*
Старі щури	1,09 ± 0,09* **	1,06 ± 0,10*, **	0,003 ± 0,003* **	0,003 ± 0,003*, **
	24 год після 1-го сеансу			
Молоді щури	1,03 ± 0,07*	0,92 ± 0,06	0,11 ± 0,01*	9,95 ± 1,75*
Старі щури	0,76 ± 0,08*, **	0,73 ± 0,08*, **	0,03 ± 0,01*, **	0,04 ± 0,01*, **
	24 год після 2-го сеансу			
Молоді щури	0,58 ± 0,09*	0,49 ± 0,05*	0,09 ± 0,03*	7,81 ± 1,88*
Старі щури	0,65 ± 0,16	0,63 ± 0,16*	0,01 ± 0,01*, **	0,05 ± 0,03*, **
	24 год після 3-го сеансу			
Молоді щури	0,60 ± 0,08*	0,56 ± 0,07*	0,04 ± 0,01*	14,42 ± 3,40*
Старі щури	0,95 ± 0,09*, **	0,87 ± 0,08*, **	0,07 ± 0,02*	0,07 ± 0,01*, **
	1 тиждень після 1-го сеансу			
Молоді щури	1,27 ± 0,41	1,45 ± 0,41*	0,03 ± 0,02	18,58 ± 12,84
Старі щури	0,65 ± 0,06*, **	0,57 ± 0,06*, **	0,57 ± 0,01*, **	12,01 ± 3,52*
	1 тиждень після 3-го сеансу			
Молоді щури	1,71 ± 0,16*	1,65 ± 0,16*	0,11 ± 0,02*	17,13 ± 4,81*
Старі щури	0,66 ± 0,16* **	0,74 ± 0,1*, **	0,09 ± 0,03*	7,22 ± 2,28*, **

(іноді на декілька порядків) практично на всіх етапах спостереження. У контрольних групах більшість вивчених індексів були нижчими у старих тварин, особливо індекс оборотності (більш ніж у 7 разів; див. табл. 2).

Оскільки нормальною реакцією організму на холод є активація як скорочувального, так і нескорочувального термогенезу, дія екстремально низьких температур (до -160°C) при ЗКС організму також може сприяти збільшенню продукції тепла порівняно з умовами відносного спокою. Крім того, реакцією на ЗКС є також різка вазоконстрикція судин шкіри та м'язів [3] задля збереження нормального рівня температури ядра тіла, що може призводити до механічного пошкодження еритроцитів. На думку Lombardi і співавт. [1], вираженість зсуву гематологічних показників (зокрема вміст гемоглобіну, кількість еритроцитів) у спортсменів під час кріостимуляції залежить від базового профілю, індивідуальних параметрів та виду спорту, але ці питання ще потребують більш ретельного вивчення. Початкові фази кріостимуляції сприяють підсилению гемолізу, який в свою чергу стимулює виділення еритропоетину [20]. Відзначені після ЗКС зміни пов'язують з перерозподілом кровотоку в шкірі і під нею, а також із динамікою активності певних ланок ендокринної та ензиматичної систем. Після кріостимуляції у спортсменів збільшувався діапазон розподілу еритроцитів за формою, що вказує на зростання їх анізоцитозу [21]. Skrzep-Poloczek і співавт. [22] визначили залежність змін ензиматичної та неензиматичної антиоксидантних систем щурів від температури ЗКС: вплив -60°C підвищує активність антиоксидантних ензимів, а -90°C , навпаки, знижує; водночас активність процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) має протилежну спрямованість, знижуючись у разі -60°C та підвищуючись при -90°C . У праці Stanek і співавт. [23] показано, що кріостимуляція в умовах температури нижче за -100°C взагалі знижує параметри оксидативного стресу у здорових чоловіків.

Екзогенні впливи, незалежно від їх природи, викликають розвиток загальних адаптаційних неспецифічних реакцій через активацію ПОЛ, структурну перебудову білкових молекул, посилення потужності антиоксидантної системи, які спрямовані на захист організму від шкідливого чинника. У той самий час мембранодеструктивний ефект активації ПОЛ викликає нестабільність мембран і сприяє швидкому руйнуванню нестійких форм еритроцитів. Напруження неспецифічних адаптаційних реакцій призводить до збільшення кількості змінених форм еритроцитів. Згідно з даними Гаркаві і співавт. [24], процеси адаптації, розвиток яких проходить з напругою і можливим виснаженням, за певних умов можуть стати такими, що тренують. Крім того, за висновками Пшенникової [25], будь-які адаптивні реакції набувають пошкоджуючого характеру, якщо сила подразника або тривалість його впливу перевищує резервні можливості організму.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що ЗКС (-120°C) організму щурів викликає зміни популяційного складу і трансформації еритроцитів у крові, спрямованість і вираженість яких залежить від віку, кількості кровопливів і термінів спостереження. Популяція еритроцитів стає більш гетерогенною, оскільки підвищується частка як оборотно (стоматоцити), так і необоротно (сфероцити) змінених форм.

2. Розрахунок індексів трансформації еритроцитів вказує на зниження індексу оборотності після ЗКС та підвищення у старих щурів індексів трансформації та оборотної трансформації.

3. У крові контрольних груп тварин популяція еритроцитів була більш гомогенною (вищий відсоток дискоцитів, особливо високорезистентних сплющеної форми) у старих щурів порівняно з молодими.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial

relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

В.В. Ломако, А.В. Шило, И.Ф. Коваленко

ТРАНСФОРМАЦИЯ ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ МОЛОДЫХ И СТАРЫХ КРЫС ПОСЛЕ ОБЩЕЙ КРИОСТИМУЛЯЦИИ

Методом малоуглового рассеяния света изучали динамику трансформации эритроцитов в крови молодых (6-7 мес) и старых (18-20 мес) крыс после общей криостимуляции (ОКС) организма. Используя определенные соотношения дискоцитов, обратимо и необратимо измененных форм эритроцитов рассчитывали индексы их трансформации. Проводили ОКС в экспериментальной криокамере для охлаждения мелких лабораторных животных при температуре -120 °C в течение 90 с, всего было 3 сеанса (раз в сутки) с интервалом в 24 ч. При сравнении контрольных групп животных оказалось, что в крови старых крыс количество дискоцитов, особенно их уплощенных, высокорезистентных форм, было большим (на 17,3 нормоцитов и 43,5% уплощенных), а измененных форм эритроцитов – стоматоцитов и сфероцитов, напротив, меньшим (на 38,4 и 23,5% соответственно); индексы трансформации эритроцитов старых крыс были ниже, чем у молодых, особенно индекс обратимости (более чем в 7 раз). Направленность и выраженность изменений популяционного состава и трансформации эритроцитов у крыс после ОКС зависели от возраста, количества сеансов (1, 2 или 3) и сроков наблюдения (через сутки или неделю). Возрастала гетерогенность популяции эритроцитов в крови крыс, поскольку увеличивалось количество как обратимо, так и необратимо измененных форм клеток; индексы трансформации эритроцитов у обеих групп крыс снижались практически на всех этапах эксперимента.

Ключевые слова: эритроциты; общая криостимуляция организма; возраст; крысы.

V.V. Lomako, O.V. Shylo, I.F. Kovalenko

TRANSFORMATION OF ERYTHROCYTES IN YOUNG AND OLD RATS' BLOOD AFTER THE WHOLE BODY CRYOSTIMULATION

The dynamics of the transformation of erythrocytes in young (6-7 months) and old (18-20 months) rats after the whole body cryostimulation (WBC) was studied by the method of low-angle light scattering. The specific ratios of discocytes, reversibly and irreversibly modified forms of the erythrocytes were used for their transformation indices calculation. The WBC (at a temperature -120 °C, the duration was 90 sec and 3 sessions were conducted with an interval of 24 hs) was carried out in an experimental cryochamber designed for cooling of small laboratory animals. The number of discocytes, espe-

cially their flattened shapes (highly resistant to the factors of hemolysis) was higher (by 17.3 of normocytes and 43.5% of flattened forms) in the blood of control old rats. In the contrary, the number of altered forms of the erythrocytes (stomatocytes and spherocytes) was lower in the blood of old (by 38.4 and 23.5%, respectively) than in young rats. The indices of erythrocytes transformation were lower in old rats; especially of the index of reversibility transformation (more than 7 times). The direction and manifestation of changes of the erythrocyte population composition and transformation after the WBC were depended on the age, number of cryoexposures (1, 2 or 3) and the observation time (after a day or week). The WBC led to the higher heterogeneity of the erythrocytes population: the parts of reversibly and irreversibly altered cell forms increased in the blood. The indices of erythrocytes transformation decreased almost at all the stages of the experiment both in young and old rats.

Key words: erythrocytes; whole body cryostimulation; age; rats.

Institute for problems of cryobiology and cryomedicine of the NAS of Ukraine, Kharkov;

e-mail: victoria0regia@gmail.com

REFERENCES

1. 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 2017 Dec 09]; 8: Article 258. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5411446/> DOI: 10.3389/fphys.2017.00258.
2. Bleakley CM, Bieuzen F, Davison GW, Costello JT. Whole-body cryotherapy: empirical evidence and theoretical perspectives. *Open Access J Sports Med*. 2014 Mar 10; 5: 25-36. DOI: 10.2147/OAJSM.S41655.
3. Mawhinney C, Low DA, Jones H, Green DJ, Costello JT, Gregson W. Cold water mediates greater reductions in limb blood flow than whole body cryotherapy. *Med Sci Sports Exerc*. 2017; 49(6): 1252-60. DOI: 10.1249/MSS.0000000000001223.
4. Kepinska M, Gdula-Argasinska J, Dabrowski Z, Szarek M, Pilch W, Kreska-Korus A, Szygula Z. Fatty acids composition in erythrocyte membranes of athletes after one and after a series of whole body cryostimulation sessions. *Cryobiology*. 2017 Feb; 74: 121-5. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2016.11.005.
5. Mohandas N, Gallagher PG. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*. 2008; 112(10): 3939-48. DOI: 10.1182/blood-2008-07-161166.
6. Novoderzhkhina YK, Shishkanova ZG, Kozinets IG. Configuration and surface of blood cells in norm and pathology. Moscow: Triad-farm; 2004. [Russian].
7. Kozinets GI, Pogorelov VM, Shmarov DA, Boev SF, Sazonov VV. Blood cells and modern technologies for their analysis. Moscow: Triad-farm; 2002. [Russian].
8. Babiichuk VG, Kozlov AV, Lomakin II, Babiichuk GA, inventors; Institute for Problems of Cryobiology and

- Cryomedicine, assignee. Cryochamber for experimental cooling of laboratory animals. Patent of Ukraine № 40168. 2009 Mar 25. [Ukrainian].
9. Gordiyenko OI, Gordiyenko YE, Makedonska VO. Estimation of erythrocyte population state by the spherical index distribution. *Bioelectrochemistry*. 2004 May; 62(2): 119-22. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2003.08.004.
 10. Ryazantseva NV, Novitsky VV, Stepovaya EA, Tkachenko TN. Ultrastructure of erythrocytes in norm and in pathology: morphological phenomena, clinical aspects. *Morphology*. 2004; 126(5): 48-51. [Russian].
 11. Erken G, Erken HA, Bor-Kucukatay M, Kucukatay V, Genc O. The effects of in vivo and ex vivo various degrees of cold exposure on erythrocyte deformability and aggregation. *Med Sci Monit*. 2011 Aug; 17(8): 209-15. DOI: 10.12659/MSM.881899.
 12. Teległów A, Dąbrowski Z, Marchewka A, Tabarowski Z; Bilski J; Jańkiewicz J; Gdula-Argasińska J; Głodzik J; Lizak D; Kepińska M. Effects of cold water swimming on blood rheological properties and composition of fatty acids in erythrocyte membranes of untrained older rats. *Folia Biol. (Krakow)*. 2011; 59(3-4): 203-9.
 13. Gümüşlü S, Sarikçioğlu RB, Şahin E, Yargıçoğlu P, Ağar A. Influences of different stress models on the antioxidant status and lipid peroxidation in rat erythrocytes. *Free Radic Res*. 2002 Dec; 36(12):1277-82. DOI: 10.1080/1071576021000016508.
 14. Lomako VV, Shilo AV, Kovalenko IF, Babiichuk GA. Erythrocytes of hetero- and homoiothermic animals under natural and artificial hypothermia. *J Evol Biochem Physiol*. 2015; 51(1): 58-66. DOI: 10.1134/S0022093015010081.
 15. Lomako VV, Shilo AV, Kovalenko IF. Peripheral blood erythrocytes at various types of hypothermia of homoiothermic organism. *Probl Cryobiol*. 2012; 22(4): 398-409.
 16. Kulis A, Misiorek A, Marchewka J, Głodzik J, Teległów A, Dąbrowski Z, Marchewka A. Effect of whole-body cryotherapy on the rheological parameters of blood in older women with spondyloarthritis. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2017; 66(3): 187-95. DOI: 10.3233/CH-160230.
 17. Neild PJ, Syndercombe-Court D, Keatinge WR, Donaldson GC, Mattock M, Counce M. Cold-induced increases in erythrocyte count, plasma cholesterol and plasma fibrinogen of elderly people without a comparable rise in protein C or factor X. *Clin Sci (Lond)*. 1994 Jan; 86(1): 43-8.
 18. Cuttall S, Hammond L, Langdon D, Costello J. Individualising the exposure of -110°C whole body cryotherapy: The effects of sex and body composition. *J Therm Biol*. 2017 Apr; 65: 41-7. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2017.01.014.
 19. Shylo AV, Lutsenko DG, Ventskovska EA, Kovalenko IF, Babiichuk GA. Effect of different types of cold acclimation on osmotic fragility and sphericity index of rat erythrocytes. *Ros. Fiziol. Zhurn. im. I.M. Sechenova*. 2014; 100(1): 105-11. [Russian].
 20. Szygula Z, Lubkowska A, Giemza C, Skrzek A, Bryczkowska I, Dołęgowska B. Hematological parameters, and hematopoietic growth factors: EPO and IL-3 in response to whole-body cryostimulation (WBC) in military academy students. *PLoS ONE* [Internet]. 2014 Apr 1 [sited 2016 April 10]; 9(4): e93096. Available from <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0093096> DOI: 10.1371/journal.pone.0093096
 21. Lombardi G, Lanteri P, Porcelli S, Mauri C, Colombini A, Grasso D. et al. Hematological profile and martial status in rugby players during whole body cryostimulation. *PLoS ONE* [Internet]. 2013 Feb 1 [sited 2016 May 2]; 8(2). e55803. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0055803> DOI: 10.1371/journal.pone.0055803
 22. Skrzep-Poloczek B, Romuk E, Wiśnowiska B., Owczarek AJ, Choreża P, Sieroń A, Birkner E, Stygar D. Effect of Whole-Body Cryotherapy on Antioxidant Systems in Experimental Rat Model. *Oxid Med Cell Longev*. 2017; 2017: 8158702. DOI: 10.1155/2017/8158702. Epub 2017 Jun 27.
 23. Stanek A, Sieroń-Stożny K, Romuk E, Cholewka A, Wielkoszyński T, Cieślak G, Kwiatek S, Sieroń A, Kawczyk-Krupka A. Whole-Body Cryostimulation as an Effective Method of Reducing Oxidative Stress in Healthy Men. *Adv Clin Exp Med*. 2016; 25(6): 1281-91. DOI: 10.17219/acem/65980
 24. Garkavi LK, Kvakina EB, Ukolova MA. Adaptive reactions and resistance of the organism. Rostov-on-Don; Rostov University Publishing; 1990. [Russian].
 25. Pshennikova MG. The stress phenomenon. Emotional stress and its role in pathology. *Patol Fiziol Eksp Ter*. 2000 Jul-Sep; (3): 20-6. [Russian].

Матеріал надійшов до редакції 17.09.2018