

А. Е. КАРАПЕТЯН, В. Б. ПОТАПОВА, Г. А. МАНУКЯН

ВЛИЯНИЕ ГЛИЦЕРИНА И ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДА НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ И СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ЭКСПЛАНТАТОВ ЭМБРИОНАЛЬНОГО МИОКАРДА

Длительная консервация органов является одним из узловых вопросов современной органозамещающей хирургии. Внимание исследователей привлекает возможность глубокого замораживания органов под прикрытием криостатических агентов [5, 8, 13, 14]. Известно, что эти агенты существенно влияют на характер и скорость кристаллизации воды, находящейся внутри и вне клеток, снижают процент вымерзающей свободной воды и уменьшают величину образующихся кристаллов [9, 11, 12, 19].

В единичных исследованиях, посвященных криорезистентности миокарда [3, 5, 14—18, 20], показано, что жизнеспособность эмбрионального сердца и изолированных миокардиальных клеток и эксплантатов может быть сохранена при $t = -196^\circ$ под защитой эндоцеллюлярных криоагентов. Вместе с тем в литературе имеется довольно скудная информация относительно изолированного влияния криопротекторов на жизнеспособность миокардиальных клеток [10, 14], хотя известно, что криоагенты в силу своих физико-химических свойств уже в относительно небольших концентрациях способны взаимодействовать с клеточными макромолекулами и вызывать изменения в их структуре [11, 13]. Поскольку эти изменения могут оказать существенное влияние на конечные результаты замораживания клеток, мы решили изучить действие внутриклеточных криоагентов—глицерина и диметилсульфоксида (ДМСО) на некоторые структурные и функциональные показатели состояния эксплантатов эмбрионального миокарда.

Материал и методика. Сердце 7—8-дневного куриного эмбриона разрезали на кусочки размером 1 мм и тщательно промывали в растворе Эрла. Кусочки эксплантировали в камеры из органического стекла [1] при $t + 37^\circ$ с питательной средой, состоящей из 85% 199-й среды и 15% лошадиной сыворотки. Обычно после 45—60-минутной инкубации эксплантаты начинали ритмично сокращаться. После графической записи исходных пульсаций [2] эксплантаты в различные сроки пропитывали раствором криофликтика на питательной среде. Глицерин и ДМСО использовали в концентрациях 10,30 и 10, 15, 30% соответственно. Экспозицию осуществляли при t 23 и 37° . Для восстановления сократительной активности эксплантаты после воздействия криоагента трижды промывали раствором Хенкса и инкубировали при $t + 37^\circ$ в свежей питательной среде.

Для оценки сократительной функции миокардиальных эксплантатов изучали также реакцию их на введение адреналина в концентрации $1 \cdot 10^{-6}$. Если последний в течение первой минуты после введения увеличивал частоту и амплитуду сокращений не менее, чем на 30 и 20% соответственно, то эксплантаты считались функционально нормальными.

Электронномикроскопическому исследованию были подвергнуты эксплантаты, обработанные 30% раствором глицерина и 15% ДМСО при $+23^\circ$ в течение 30 мин. и 3 час. Часть эксплантатов после 30-минутного контакта с криоагентом фиксировали без предварительной промывки, другую часть перед фиксацией промывали. Для этого либо эксплантаты переносили непосредственно в питательную среду, либо последнюю по каплям добавляли к опраждающему раствору, постепенно снижая его концентрацию. Контролем служили кусочки ткани, фиксированные после предварительного пребывания в нормальной питательной среде при $+23^\circ$. Материал фиксировали 1% раствором четырехоксида осмия (1,5 часа при $+4^\circ$), обезживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали смесью бутил-метилметакрилата с 1% раствором перекиси бензоила. Образцы разрезали на ультратоме LKB и изучали в электронном микроскопе УЭМВ-100Б при ускоряющем напряжении 75 кв.

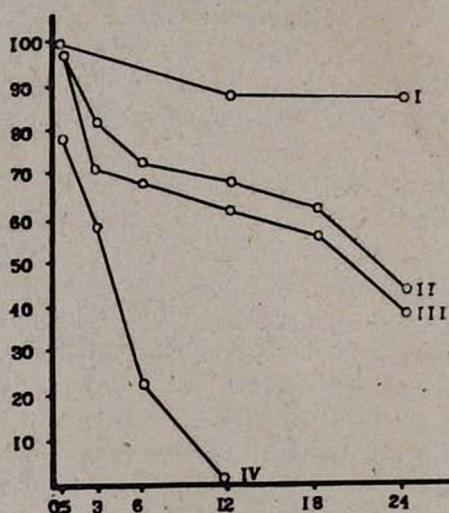


Рис. 1. График зависимости частоты сокращений эксплантатов от длительности экспозиции с криоагентами при $+23^\circ\text{C}$. Горизонтальная ось — продолжительность экспозиции криоагента (часы); вертикальная ось — изменение частоты сокращений (%); I — контроль, II — 15% ДМСО, III — 30% глицерин; IV — 30% ДМСО.

Результаты экспериментов показали, что криоагенты уже в относительно небольших концентрациях подавляют сократительную активность эксплантатов миокарда. Так, при введении ДМСО в концентрации 10% в камеру с сокращающимся эксплантатом пульсации быстро прекращаются, но при отмывании криоагента сейчас же восстанавливаются. Глицерин в аналогичных условиях вызывает постепенное снижение амплитуды и частоты сокращений и полное прекращение их на 4—5-й мин. После замены питательной среды пульсации постепенно восстанавливаются.

Как видно из рис. 1, частота сокращений уменьшается с увеличением сроков экспозиции криоагентов. Нетрудно заметить, что экспозиция 30% глицерина при $t+23^\circ$ вызывает более выраженное снижение сократительной активности, чем адекватное по защитному эффекту количество (15%) ДМСО. Одновременно с уменьшением частоты сокращений наблюдается и заметное снижение амплитуды (табл. 1).

При сроках экспозиции 12 час. и более, как правило, регистрируются слабые нерегулярные пульсации, трудно поддающиеся стимулирующему влиянию адреналина. После 6-часовой экспозиции криоагента количество эксплантатов, нормально реагирующих на адреналин, резко уменьшается (табл. 1).

Таблица 1

Криоагент	Температура экспозиции	Длительность экспозиции	Количество эксплантатов	Частота сокращений в 1 мин. $M \pm m$		Амплитуда сокращений (в см). $M \pm m$		Выжившие эксплантаты	Эксплантаты с норм. реакц. на адреналин
				до экспозиции	после экспозиции	до экспозиции	после экспозиции		
ПА-13576. Глицерин 30% Диметилсульфоксид 15% Питательная среда без криоагента (контроль)	23°	0,5	10	65 $\pm$ 3,2	64 $\pm$ 3,4	1,4 $\pm$ 0,03	1,4 $\pm$ 0,03	10	10
		3	10	43 $\pm$ 2,5	30 $\pm$ 2,2	1,5 $\pm$ 0,06	1,3 $\pm$ 0,03	19	6
		6	10	48 $\pm$ 3,4	33 $\pm$ 3,5	1,5 $\pm$ 0,06	1,0 $\pm$ 0,18	10	4
		12	10	57 $\pm$ 3,3	35 $\pm$ 3,6	1,6 $\pm$ 0,12	0,9 $\pm$ 0,14	9	1
		18	11	71 $\pm$ 4,2	39 $\pm$ 1,7	1,6 $\pm$ 0,09	0,6 $\pm$ 0,06	9	1
		24	12	61 $\pm$ 5	23 $\pm$ 2,6	1,6 $\pm$ 0,07	0,4 $\pm$ 0,04	8	—
	23°	0,5	9	74 $\pm$ 3,7	73 $\pm$ 3,9	1,4 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,08	9	9
		3	12	76 $\pm$ 3,4	61 $\pm$ 3,4	0,8 $\pm$ 0,09	0,7 $\pm$ 0,08	12	8
		6	9	65 $\pm$ 3,7	46 $\pm$ 4,3	1,5 $\pm$ 0,08	1,1 $\pm$ 0,08	9	4
		12	13	56 $\pm$ 4	38 $\pm$ 3	1,3 $\pm$ 0,035	0,8 $\pm$ 0,03	13	2
		18	9	65 $\pm$ 7	40 $\pm$ 4,6	1,6 $\pm$ 0,07	0,9 $\pm$ 0,04	8	1
		24	13	56 $\pm$ 3,2	23 $\pm$ 2,2	1,7 $\pm$ 0,06	0,7 $\pm$ 0,04	10	—
	37°	24	16	65 $\pm$ 3,8	24 $\pm$ 1,6	1,4 $\pm$ 0,037	0,4 $\pm$ 0,03	9	—
	23°	0,5	8	46 $\pm$ 3	45 $\pm$ 4	1,5 $\pm$ 0,04	1,5 $\pm$ 0,04	8	8
		12	9	51 $\pm$ 5,3	44 $\pm$ 5	1,4 $\pm$ 0,06	1,3 $\pm$ 0,045	9	9
		24	8	64 $\pm$ 4	55 $\pm$ 4	1,3 $\pm$ 0,05	1,1 $\pm$ 0,07	8	8

Наши эксперименты показали, что токсичность криоагентов повышается с увеличением их концентрации (см. рис. 1). После 12-часовой экспозиции с 30% ДМСО спонтанная сократительная активность эксплантатов не восстанавливается, тогда как в те же сроки все эксплантаты, пропитанные 15% ДМСО, восстанавливают сокращения, средняя частота которых по сравнению с исходной составляет 67%.

Существенное значение имеет и температурный режим экспозиции криоагентов. Так, после 24-часового контакта с 15% ДМСО при $t+23^\circ$ восстанавливают спонтанную сократительную активность 10 из 13 эксплантатов, а при $t+37^\circ$ —9 из 16.

При изучении тонкой структуры эксплантатов изменения обнаруживались уже в случае их фиксации непосредственно после 30-минутного

контакта с опраждающим веществом без последующего его отмывания. В отличие от контроля, контуры цитоплазматических мембран здесь стерты, ядерная оболочка нечетко вырисовывается, везикулы и каналы цы эндоплазматического ретикулула плохо контурированы [рис. 2, 3].

После отмывания криоагентов субмикроскопическое строение клеток нормализуется (рис. 4). Мембраны четко контурируются. В цитоплазме хорошо видны элементы саркоплазматического ретикулула и аппарата Гольджи. В ряде клеток обнаруживаются локальные нарушения целостности сарколеммы и наружной ядерной оболочки. Следует отметить, что при обработке ДМСО восстановление ультраструктуры не зависит от способа отмывания криоагента, тогда как в случае применения глицерина тонкое строение клеток лучше сохраняется при его медленном отмывании. Быстрая промывка глицеринизированных эксплантатов приводит к вакуолизации цитоплазмы, нарушению целостности мембранных структур, набуханию митохондрий с отрывом и частичным лизисом крист.

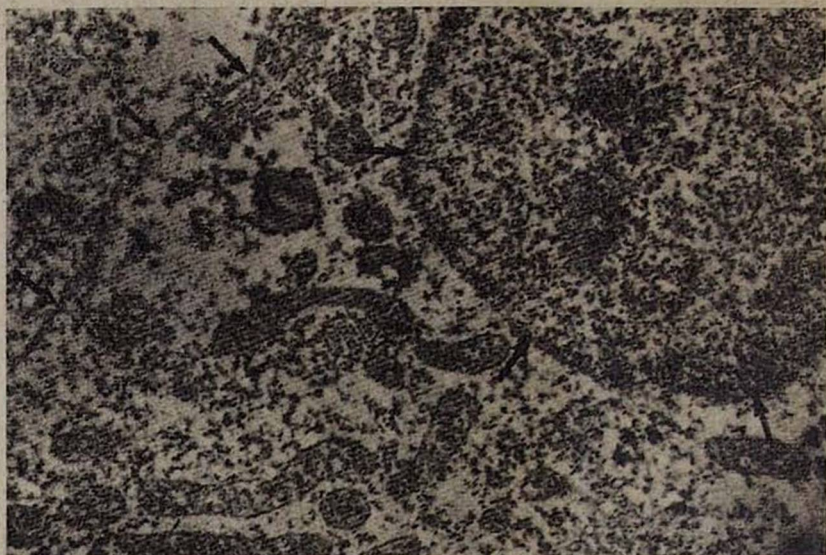


Рис. 2. Часть миокардиальной клетки после 30-минутного контакта с 30% раствором глицерина без последующего его отмывания. Сарколемма и ядерная оболочка плохо контурированы (стрелки).

Удлинение сроков пребывания эксплантатов в растворах глицерина и ДМСО (3 часа при $+23^{\circ}$) усиливает их повреждающее действие на клетки миокарда (рис. 5). Целостность сарколеммы нарушается на сравнительно больших участках. При обработке глицерином границы между соседними клетками определяются лишь по десмосомоподобным образованиям. На ядерной мембране часто обнаруживаются глубокие вдавления, резко меняющие форму ядра. Наружная ядерная оболочка частично разрушается, что особенно четко видно в участках с расширен-

ным перинуклеарным пространством. Хроматиновая субстанция разрыхляется. Митохондрии набухают, большая часть крист фрагментируется и приобретает форму мелких пузырьков. В миофибриллах наблюдается разволокнение и частичное разрушение протофибрилл и деформация линий. Количество цитопранул уменьшено. В околоядерной цитоплазме обнаруживается много крупных капель жира и плотные осмиофильные гранулы типа лизосом.



Рис. 3. Контроль. Поперечный срез миокарда 7-дневного куриного эмбриона после 30-минутного пребывания в питательной среде без криоагента при $+23^{\circ}$. Тонкое строение клеток не нарушено. М—митохондрии, МФ—миофибриллы, Ср—саркоплазматический ретикулум, Г—гликоген, РНП—рибонуклеопротеид.

Результаты наших исследований свидетельствуют об определенных изменениях в структуре и функции миокардиальных эксплантатов под влиянием глицерина и ДМСО, выраженность которых зависит от концентрации, температуры и длительности экспозиции криоагентов. Указанные нарушения, по всей вероятности, обусловлены частичной дегидратацией клетки вследствие взаимодействия криоагентов с водой и клеточными макромолекулами [11, 13].

Сравнительный анализ действия изученных опраждающих сред свидетельствует об однотипности вызываемых ими изменений, хотя в случае применения глицерина они носят более выраженный характер. Это, по-видимому, связано с меньшей способностью и скоростью прохождения глицерина через клеточную мембрану [7], на что косвенно указывает и тот факт, что ответная реакция эксплантатов на ДМСО появляется значительно раньше, чем на глицерин. По-видимому, задержка

глицерина в дегидратированных клетках миокарда при быстрой промывке экплантатов приводит к нарушению осмотического равновесия клеток с окружающей средой и развитию отека ткани. Электронномикроскопическими проявлениями последнего являются описанные выше вакуолизация цитоплазмы, набухание митохондрий и нарушение целостности мембранных структур клетки.

Таким образом, для предупреждения отрицательного воздействия криоагентов на ткани необходимо предельно допустимое укорочение сроков экспозиции, снижение температуры и обеспечение оптимальных условий их отмыwania.



Рис. 4. Часть миокардиальной клетки после 30-минутной экспозиции с 15% ДМСО с последующим его отмыванием. Имеются локальные нарушения целостности сарколеммы и наружной ядерной оболочки (стрелки). Я—ядро, АГ—аппарат Гольджи, ЛИП—капли жира, Л—лизосомы.

Этот тест использовался нами в качестве вспомогательного способа оценки их жизнеспособности. Так как действие адреналина обусловлено его взаимодействием со специфическими молекулярными рецепторами, расположенными на клеточных мембранах [4], то соответствующая реакция экплантатов на этот препарат может свидетельствовать о сохранении или разрушении (возможно блокировании) указанных механизмов.

В заключение следует отметить, что хотя ДМСО и глицерин в примененных концентрациях и кратковременной экспозиции (30 мин.) не вызывают существенных изменений в структуре и функции миокардиаль-

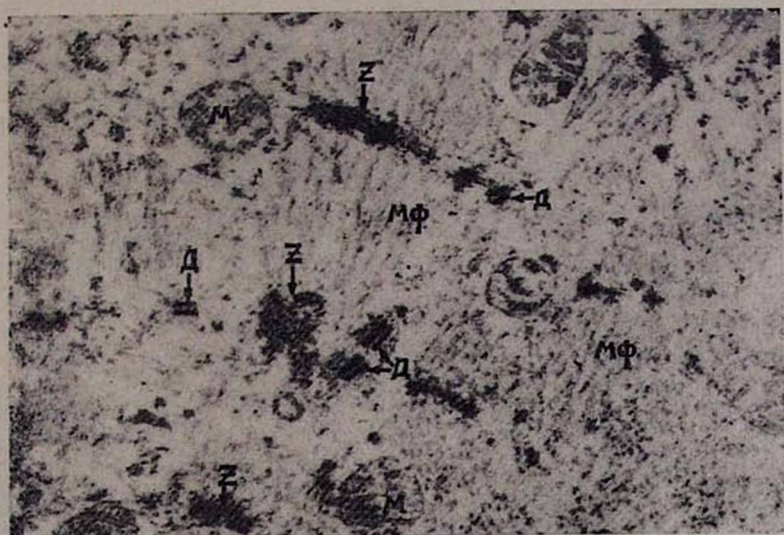


Рис. 5. Часть миокардиальной клетки после 3-часового пребывания в 30% растворе глицерина при +23°. Границы между соседними клетками прослеживаются по десмосомальным образованиям (Д). Митохондрии (М) набухшие, целостность наружной мембраны нарушена, кристы фрагментированы. Миофиламенты (МФ) разволокнены и частично разрушены, линии деформированы.

ных эксплантатов и, по данным ряда авторов [3, 17, 18], оказывают удовлетворительное защитное действие при их замораживании, тем не менее для консервации целых объемных органов, требующих более длительного контакта с криоагентами, указанные вещества нельзя считать вполне пригодными. Это обстоятельство указывает на необходимость дальнейших поисков новых эффективных криозащитных средств и разработки оптимальных условий их применения.

Ин-т кардиологии
и сердечной хирургии
МЗ Арм. ССР

Поступило 1.X 1970 г.

У. Б. ЧԱՐԱՊԵՏՅԱՆ, Վ. Բ. ՊՈՏԱՊՈՎԱՆ, Հ. Ա. ՄԱՆՈՒԿՅԱՆ

ԳԼԻՑԵՐԻՆԻ ԵՎ ԴԻՄԵԹԻԼՍՈՒԼՅՈՔՍԻԴԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՍԱՂՄԻ
ՍՐՏԱՄԿԱՆԻ ԿԵԿՈՂԱԿԱՆ ՖՈՒՆԿՑԻՍՆԵՐԻ ԵՎ ՈՒՏՐԱԿԱՌՈՒՑՎԱԾՔԻ ՎՐԱ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ենթաբջջային կրիոստատիկ նյութերը՝ գլիցերինը և դիմեթիլսուլֆոքսիդը, իջեցնում են հալի սաղմի սրտամկանի արտապատրուածան ինքնակամ կծկողական ակտիվությունը և փոփոխություններ են առաջացնում սրտամկանի բջջային ուլտրակառուցվածքում: Այդ փոփոխությունների արտահայտվածության աստիճանը կախված է կրիոազնեոի բնույթից, նրա համակենտրոնացումից, շերտաստիճանից և ազդան տևողությունից:

A. E. KARAPETIAN, V. B. POTAPOVA, G. A. MANOUKIAN

THE EFFECT OF GLYCERIN AND DIMETHYL SULPHOXIDE ON THE ULTRASTRUCTURE AND THE CONTRACTIVE ACTIVITY OF EXPLANTS OF THE EMBRYONAL MYOCARDIUM

Summary

Intracellular cryostatic agents (glycerin and dimethyl sulphoxide) reduce the spontaneous contractive activity of explants of the chicken embryonic myocardium and cause disturbances in the ultrastructure of myocardial cells.

The degree of prominence of those changes depends on the nature of the cryoagent, its concentration, the temperature and duration of exposure with the explants of the myocardium.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карапетян А. Е., Алексанян М. Г. Цитология, 1969, 4, 530—532.
2. Карапетян, А. Е., Геворкян Р. А., Львов М. В., Манукян Г. А. Бюлл. exper. биол., 1969, 9, 124—126.
3. Карапетян А. Е., Потапова В. Б., Манукян Г. А. Матер. V всесоюз. конф. по пересадке органов и тканей. Горький, 1970, 443.
4. Поликар А., Бесси М. В кн. «Элементы патологии клетки» М., 1970, 205.
5. Andjus R. K., Rajevski et Pavlovic- Hournac M. J. de Physiologie, 1962, 2, 272—273.
6. Angell W. W. and Shumway N. E. Surg. Forum, 1966, 17, 224—226.
7. Bickls I. J., Kazaks K., Finn J. J., Handerson I. W. D. Cryobiology, 1967, 4 (1), 1—10.
8. Childs J. W., and Lower R. R. Progr. Cardiovasc. Dis., 1969, 12, 149—163.
9. Farrant J. J. Pharmacol., 1964, 16 (17), 472—483.
10. Hobbs E. F., Huggins C. E. Cryobiology, 1969, 6 (3), 239—245.
11. Huggins C. E. Fed Proc., 1965, 24, 2, Pt. 111, S 190—195.
12. Karow A. J. Pharm. Pharmacol., 1969, 21 (4), 209—228.
13. Karow A. Cryobiology, 1965, 2 (3), 99—108.
14. Karow A. et Carrier O. Surgery Gynecology and Obstetrics, 1969, March; 571—583.
15. Luyet B. J. Biodynamica, 1968, 10, 211—218.
16. Luyet B. J. Cryobiology, 1969, 6 (3), 246—248.
17. Luyet B. J. and Gonzales F. Biodynamica, 1952, 7, 101—105.
18. Offerijns F. G., Freud G. E., Krijnen H. W. Nature, 1969, 222, 21, 1174—1175.
19. Rowe A. W. Cryobiology, 1966, 3 (1), 12—18.
20. Schopf-Ebner E., Gross W. O. and Bucher O. M. Cryobiology, 1968, 4, 200—209.