

УДК 615.776+612.017

А. Л. АКОПОВА, Н. Н. ТЕР-МИНАСОВА,
М. С. МЕЛКОНЯН, А. Р. МУРАДЯНОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛИЦЕРИНА В КРОВИ ОХЛАЖДЕННЫХ
КРЫС И ЕГО ЗАЩИТНЫЙ ЭФФЕКТ

Широкий интерес к глицерину как защитному средству при действии минусовых температур на клетки и ткани ставит вопрос о необходимости всестороннего его изучения.

Согласно современным литературным данным [1, 3, 5, 6, 8, 9], криофилактические свойства глицерина можно объяснить его способностью связывать воду и препятствовать тесному контакту белковых молекул между собой в результате замерзания воды. Глицерин уменьшает размеры и скорость распространения кристаллов, обладает способностью свободно проникать в ткани и клетки, и, что очень важно, он не токсичен, даже при действии относительно высоких концентраций. Так, по мнению Р. Анджуса и др. [1], глицерин обеспечивает эффективную защиту сердца плода при глубоком его замораживании (-20°C). Л. Рэ [5] удавалось сохранить живой сердечную ткань куриного эмбриона при температуре -196° , предварительно пропитав ее 25—30%-ным глицерином. В результате большого числа опытов О. Смит [6] удалось восстановить жизнеспособность золотистых хомячков, которые до замораживания были обработаны 10—20%-ным раствором глицерина. Однако, как отмечено, исследования по выявлению защитных свойств глицерина проводились в условиях замораживания и переохлаждения тканей.

Исходя из того, что сообщения об использовании глицерина при общей гипотермии организма отсутствуют, мы нашу работу посвятили следующим вопросам: определению содержания глицерина в крови белых крыс, изучению динамики холодового воздействия на организм гомойотермных животных, выявлению чувствительности крыс к пролонгированному введению глицерина.

С целью определения уровня глицерина в крови животных нами проведены три серии экспериментов: в первой (24 опыта) животным вводился 30%-ный раствор глицерина в условиях нормотермии; во второй (36 опытов) инъекция глицерина производилась в условиях гипотермии; в третьей серии (27 опытов) животные охлаждались без введения глицерина.

Исследование глицерина у крыс первых двух серий производилось через 30 мин. после инъекции (1 мг на 100 г веса тела) микрометодом Бейлея в модификации П. М. Маршева [4]. В центрифужную пробирку вносят 0,9 мл дистиллированной воды, добавляют 0,1 мл крови и при осторожном встряхивании для осаждения белков прибавляют 0,25 мл насыщенного раствора Ва (ОН)₂. После перемешивания в течение трех минут вносят в пробирку 0,25 мл 5%-ного раствора ZnSO₄ в 4%-ном растворе MgSO₄; затем тщательно перемешивают и центрифугируют в течение 10 мин. при 5000 об/мин.

Прежде чем перейти к основным сериям эксперимента, мы определяли содержание глицерина у интактных (контрольных) крыс. Было выявлено, что количество глицерина у данной группы животных в среднем равно 3,1 мг%.

Как показано на рис. 1, в условиях нормотермии, спустя 30 мин. после введения глицерина, по сравнению с контрольной величиной, наблюдается увеличение его количества в исследуемой крови—5,2 мг%; через 60 мин. содержание глицерина доходит до 8,5 мг%. Количество глицерина достигает максимума на 90-й мин. инъекции—10,7 мг%. Затем наблюдается тенденция к уменьшению его содержания, и, спустя 210 мин. после введения глицерина, его содержание приближается к исходной величине—3,2 мг%. Отсюда следует, что наиболее выраженное

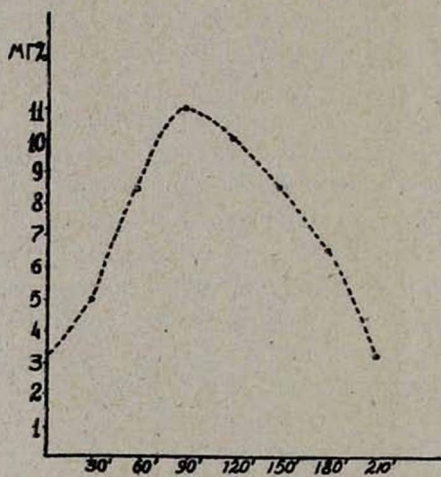


Рис. 1.

увеличение содержания глицерина наблюдалось через 90 мин. с момента инъекции. Вместе с тем наши эксперименты обнаружили, что, по сравнению с исходной цифрой, в сроки от 30 до 180 мин. в условиях нормотермии количество глицерина значительно повышено.

Результаты, полученные в опытах второй серии, представлены на рис. 2. Как видно из этой кривой, через 60 мин. количество глицерина составляло 8,6 мг%, спустя час его содержание увеличивалось до 10,6 мг% (максимальный уровень). Затем, постепенно спадая, к 210-й мин. после инъекции, когда у охлажденных животных отсутствовали

признаки жизнедеятельности, ректальная температура крыс достигала 3—4°C; в таком состоянии латентная жизнь животных продолжалась в сроки, предусмотренные целями опыта. В этот период (рис. 2) содержание глицерина у крыс, по сравнению с контролем (3,1 мг%), было значительно выше. В течение трех часов латентного периода уровень глицерина варьировал в пределах от 6,4 до 5,2 мг%. Результаты второй серии экспериментов также обнаружили подъем содержания глицерина (до 10,6 мг%) с последующим его снижением. Однако, как видно из рис. 2, уменьшение количества глицерина в условиях гипотермии протекает более медленно, чем у животных первой серии опытов.

Кривая, изображенная на рис. 3, отображает результаты исследования крови охлажденных крыс без предварительного введения им 30%-ного раствора глицерина. При изучении данных этой серии опытов не удалось выявить каких-либо существенных изменений в содержании глицерина—на всем протяжении гипотермии количество его было почти стабильным.

Сопоставление приведенных данных показывает, что инъектирование крысам 30%-ного раствора глицерина перед общей гипотермией поддерживает содержание его на высоком уровне.

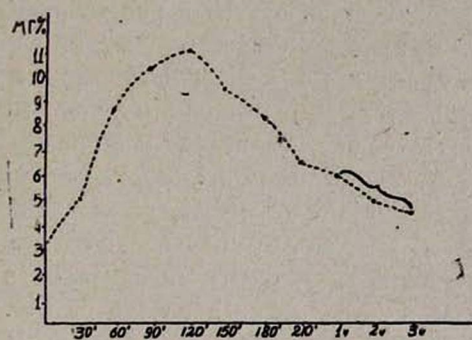


Рис. 2.

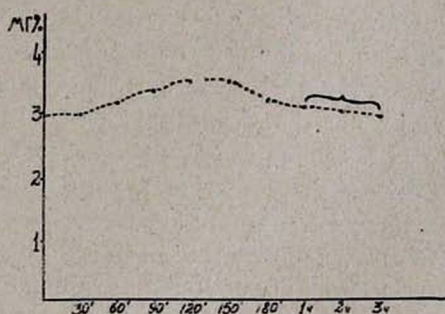


Рис. 3.

С целью определения оптимальной концентрации глицерина для введения животным при общем охлаждении нами исследованы 20-, 30-, 40- и 50%-ные растворы его. Эксперименты выполнены на 256 беспородных белых крысах весом 150—250 г. После инъекции глицерина (в яремную вену или внутрибрюшинно) животные содержались в холодильной камере при температуре —20°C.

Первая группа животных до начала охлаждения получала 20%-ный раствор глицерина. Из 43 крыс этой серии при понижении температуры тела от 15 до 5°C погибло 32 животных. Параллельно снижению температуры животных наблюдалось постепенное исчезновение признаков жизнедеятельности—при температуре 7—8°C не отмечалось дыхания, а ниже 5°C на ЭКГ не производилось регистрации работы сердца. При инъекции животным 30%-ного глицерина после охлаждения из 108 крыс было оживлено 80. В период согревания погибло 16 крыс, остальные 12 погибли при ректальной температуре 10—

5°C. После введения крысам 40- и 50%-ного глицерина (50 крыс) большинство (27 крыс) погибло в течение первого часа после инъекции от клонических и тетанических судорог. Остальные животные погибли в разные сроки после помещения в холодильную камеру, и только у трех крыс удалось восстановить жизнеспособность.

При инъекции животным 20%-ного раствора глицерина было оживлено 14% охлажденных крыс, при введении 30%-ного раствора жизнеспособность удалось восстановить у 74% животных, при введении 40- или 50%-ного раствора было оживлено всего 12% животных. Вышеописанное подтверждает целесообразность и эффективность охлаждения животных на фоне 30%-ного раствора глицерина.

Как отмечалось выше, одной из задач наших исследований являлось выявление реактивной способности животного при длительной инъекции глицерина, в связи с чем была поставлена реакция бластотрансформации лимфоцитов периферической крови *in vitro* и нефелометрическая реакция помутнения Уанье. Для проведения указанных экспериментов 55 крысам в течение 20 дней вводили 30%-ный раствор глицерина из расчета 1 мл на 100 г веса тела, и, начиная с 3-го дня инъекции, кровь бралась на исследование.

Известно, что процесс трансформации заключается в постепенном изменении морфологической структуры малых лимфоцитов. Культивирование лейкоцитов периферической крови крыс производилось по методике Н. И. Брауде и И. Л. Гольдмана [2] применительно к условиям наших опытов. Культуру лейкоцитов готовили следующим образом. Для осаждения эритроцитов к 8 мл гепаринизированной крови добавляли 10% раствора желатины в разведении 1:10 и после перемешивания пробирку оставляли в течение 60—90 мин. Затем надосадочный слой плазмы в количестве 4—5 мл, содержащий лейкоциты, переливали в другую пробирку. Лейкоцитарную взвесь готовили на питательной среде 199 в отношении 1:4, прибавляли 100 ед/мл пенициллина и по 2 мл разливали в стерильные пенициллиновые флаконы, на дно которых были положены кусочки покровных стекол. После этого флаконы плотно закрывали резиновыми пробками и помещали в термостат при температуре 37°C. Начиная с 3-го дня культивирования, стекла извлекали из флаконов, подсушивали в струе теплого воздуха, фиксировали метиловым спиртом и красили по Романовскому-Гимза. Ежедневные наблюдения в течение 14 дней за культурами лейкоцитов *in vitro* обнаружили, что как в основной серии, так и у контрольных животных (где культивирование проводилось без введения глицерина) дифференцировка малых лимфоцитов в бласты протекает в одни и те же сроки независимо от присутствия глицерина.

Сущность реакции Уанье [7] заключается в выявлении изменений оптической плотности при последовательном добавлении к исследуемой сыворотке крови возрастающих доз антигена. Проба считается положительной, если при очередном прибавлении антигена вместо ожидаемого просветления сыворотки наступает помутнение среды («плато»),

и при этом показания нефелометра не меняются. В качестве антигена мы применяли различные разведения 30%-ного глицерина, начиная с наибольшего—1:512; 1:256 и т. д. до разведения 1:1. После каждого добавления глицерина отмечали показания ФЭК-56П и строили график (по оси абсцисс—разведения глицерина, по оси ординат—показания оптической шкалы). В наших исследованиях прибавление к сыворотке 30%-ного глицерина вело к постоянному снижению оптической плотности жидкости (рис. 4). При постановке пробы Уанье ни в одном случае не наблюдалось положительной реакции, т. е. сыворотка исследуемой крови не вступала в реакцию с разведениями глицерина. Во всех опытах отмечалось непрерывное снижение оптической плотности сыворотки. Наши эксперименты по выяснению реактивной способности организма свидетельствуют о том, что длительное влияние 30%-ного раствора глицерина не изменяет чувствительности животных.

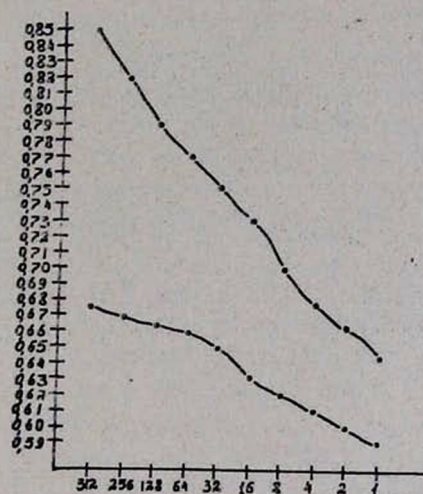


Рис. 4.

Таким образом, обобщение изложенных данных указывает на то, что криопротективная роль глицерина не ограничивается повышением устойчивости тканей к повреждающему воздействию минусовых температур. Видимо, в условиях целостного охлаждения организма присутствие глицерина также имеет положительный эффект.

Ա. Լ. ԱԿՈՊՈՎԱ, Ն. Ն. ՏԵՐ-ՄԻՆԱՍՈՎԱ, Ա. Ռ. ՄՈՒՐԱԴՅԱՆ, Մ. Ս. ՄԵԼԻՔՈՆՅԱՆ

ԳԼԻՑԵՐԻՆԻ ՈՐՈՇՈՒՄԸ ՍԱՌԵՑՐԱԾ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ԱՐՅԱՆ ՄԵՋ
ԵՎ ՆՐԱ ՊԱՇՏՊԱՆՈՂԱԿԱՆ ԷՅԵԿՏԸ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Աշխատանքի նպատակն է եղել որոշել գլիցերինի քանակը սպիտակ առ-
նետների արյան մեջ, տաքարյուն օրգանիզմի վրա ցրտի ազդեցության ուսում-
նասիրությունը և օրգանիզմի զգայնության հայտնաբերումը գլիցերինի եր-
կարատե ներարկումից հետո:

Փորձերը ցույց են տվել, որ 30%-անոց գլիցերինի երկարատե ազդեցու-
թյունը չի փոխում կենդանիների զգայնությունը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Анджус Р., Хозиц Н. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1965, 9, стр. 38.
2. Брауде Н. И., Гольдман И. Л. Известия АН СССР, 1967, 6, стр. 851.
3. Лозино-Лозинский Л. К. В кн.: Теоретические проблемы действия низких темпера-
тур на организм. Л., 1969, стр. 165.
4. Маршев П. М. Лабораторное дело, 1964, 10, стр. 601.
5. Рэ Л. Консервация жизни холодом. М., 1962.
6. Смит О. Биологическое действие замораживания и переохлаждения. М., 1963.
7. Современная практическая аллергология. М., 1963.
8. Ушатинская Р. С. Успехи современной биологии, 1968, 65, 1, стр. 120.
9. Федотенков А. Г., Шишкина И. Д., Алексеева Л. И., Суханова Л. И. Транспланта-
ция органов и тканей. Горький, 1970, стр. 455.