

12. Кудрин О.А., Громова К.М. *Микроэлементы в иммунологии и онкологии*. М.: ГЭОГАР Меди», 2007. [Kudrin O.A., Gromova K.M. *Microelements in immunology and oncology*. M.: GEOGAR Media, 2007. (In Russ.)]
13. Mamoru Haratake, Masafumu Hongoh. Thiol-dependent membrane transport of selenium through an integral protein of the red blood cell membrane. *Inogr. Chem.*, 2009, vol. 48, pp. 7805-7811.
14. Ханич Р. Происхождение трех субкомпонентов P_{III} в изолированной сетчатке. В кн.: *Мат. II симпозиума по физиологии сенсорных систем «Физиология зрения»*. 27 сентября - 3 октября, Л, 1973, с. 29. [Khanich R. Origin of three subcomponents P_{III} in isolated retina. In: *proceedings of II Symposium on physiology of sensor systems "Physiology of vision"*. St. Petersburg, 27 September-3 October, 1973, p.29. (In Russ.)]
15. Богословский А.М., Жданов В.К., Ковальчук Н.А., Мильджанс Г.Б. и др. В кн.: *Мат. II симпозиума по физиологии сенсорных систем «Физиология зрения»*. 27 сентября - 3 октября, Л, 1973, 27 с. [Bogoslovskiy A.M., Jdanov V. K., Kovalchuk N. A., Mildjans G. B. etc. In: *proceedings of II Symposium on physiology of sensor systems "Physiology of vision"*. St. Petersburg, 27 September-3 October, 1973, p.27. (In Russ.)]

ТЕМПЕРАТУРНЫЙ АНАЛИЗ КИНЕТИКИ ИНТЕНСИВНОСТИ СВЕРХСЛАБОГО СВЕЧЕНИЯ ТКАНЕЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЗАМОРАЖИВАНИЯ-ОТТАИВАНИЯ

Джафаров А.И.¹, Джафарова Н.А.²

¹Национальная академия наук Азербайджана
пр. Г. Джавида, 33, г. Баку, AZ1143, Азербайджан
e-mail: cafarov.haqverdi@mail.ru

²Детская клиническая больница им. А.Караева
ул. С. Вургун, квартал. 956, г. Баку, AZ1110, Азербайджан
e-mail: c.narmina@yahoo.com

Аннотация. Исследована особенность изменения интенсивности сверхслабого свечения тканей (хемилюминесценция) при различных режимах замораживания и оттаивания. Впервые установлены вспышки сверхслабого свечения тканей при температурах, при которых свежесыврепарованные ткани не излучают. После замораживания оттаивания при $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$ вспышки ХЛ печени возникали при $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$, мышцы – $+8\text{ }^{\circ}\text{C}$, кожи – $+10\text{ }^{\circ}\text{C}$. После замораживания оттаивания при $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ у образцов ткани также появлялись вспышки ХЛ, но, во-первых, при более высокой температуре, а, во-вторых, амплитуда их была значительно ниже, чем у замороженных при $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$: вспышка ХЛ после замораживания оттаивания при $+196\text{ }^{\circ}\text{C}$, у печени появлялась при $+8\text{ }^{\circ}\text{C}$, мышцы – $+12\text{ }^{\circ}\text{C}$, кожи – $+14\text{ }^{\circ}\text{C}$. Смещение температурной точки вспышки ХЛ при различных режимах замораживания оттаивания связывали с механическим и осмотическим повреждением структуры тканей. Нами установлено, что в амплитуде вспышек важную роль играет действие окислительного стресса. Учитывая это, тканевые образцы перед замораживанием и оттаиванием обрабатывались раствором Эрла, содержащим 10 % раствор глицерина и 0,2 % фенозана калия. После такой обработки температура вспышки ХЛ тканей переходило на более высокую – печени на $+11\text{ }^{\circ}\text{C}$, мышцы - $+13\text{ }^{\circ}\text{C}$, кожи – $+15\text{ }^{\circ}\text{C}$, а также защитный раствор резко уменьшал амплитуду вспышки. На основании полученных данных составлено представление о механизме защиты от повреждения тканей, предназначенных для пересадки после замораживания-оттаивания.

Ключевые слова: сверхслабое свечение (спонтанная хемилюминесценция), замораживание-оттаивание, защитные вещества.

TEMPERATURE ANALYSIS OF KINETICS OF SUPERWEAK LUMINESCENCE INTENSITY OF TISSUES UNDER FREEZING-THAWING EFFECT

Jafarov A.I.¹, Jafarova N.A.²

¹Institute of Physics of Azerbaijan National Academy of Sciences
H. Javid av., 33, Baku, AZ1143, Azerbaijan
e-mail: cafarov.haqverdi@mail.ru

²Child Clinical Hospital of A. Karayev
S. Vurgun str., quarter 956, Baku, AZ1110, Azerbaijan
e-mail: c.narmina@yahoo.com

Abstract. The features of variation in super weak luminescence intensity of tissues have been studied under different regimes of freezing and thawing. For the first time, super weak luminescence (hemiluminescence-HL) outbreaks of tissues were established at the temperature conditions under which fresh-steamed tissues don't radiate. After freezing- thawing at $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$, HL outbreaks of liver, muscular and skin tissues were occurred at $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $+10\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectively. After freezing-thawing at $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, HL outbreaks in the samples were occurred at relatively high temperatures and their amplitude were significantly lower than the amplitudes in the samples frozen at $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$. HL outbreaks after freezing-thawing at $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ in liver, muscular and skin tissues were occurred at $+8\text{ }^{\circ}\text{C}$, $+12\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $+14\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectively. Shifting in temperature point of HL outbreaks at different freezing-thawing regimes is associated with both mechanical and osmotic destructions of tissue structure. It was established that oxidative stress plays significant role in the amplitude of outbreak. Taking this into account, before the freezing-thawing process tissue samples were treated with a solution containing 10 % glycerin and 0,2 % potassium-phenozone solutions. After such

treatment, the temperatures of HL outbreaks were increased as following: in liver tissue by +11 °C, in muscular tissue by +12 °C and in skin tissue by +15 °C, and the protective solution significantly decreased the outbreaks amplitude. The data derived from experiments formed an idea about the mechanism of tissue preservation intended for transplantation after freezing-thawing.

Keywords: super weak luminescence, spontaneous hemiluminescence, freezing-thawing, protective substances

В настоящее время бурное развитие трансплантологии и использование различных тканей донора в качестве трансплантата во многих областях клинической медицины делает проблему исследования жизнеспособности изолированных переживающих тканей весьма актуальной.

Однако, ткани донора после взятия по объективным причинам часто подвергаются консервации, замораживанию, хранению, перевозке, что приводит к изменениям их свойств и жизнеспособности [1, 2]. И неточность в оценке свойств и функционального состояния тканей, подлежащих имплантации, чревата такими последствиями как неприживание, преждевременное отторжение трансплантатов, приводящими к необходимости повторной пересадки [3, 4]. В связи с этим возникает необходимость разработки качественно новых, высокочувствительных и неинвазивных методов исследования, позволяющих объективно оценить прижизненные свойства тканей, предназначенных к пересадке. Из анализа, накопленных в последнее время фактических материалов следует, что таким требованиям может удовлетворять метод регистрации сверхслабого свечения спонтанной хемилуминесценции (ХЛ) [5]. Кроме этого, определение спектрального состава спонтанного излучения (высвечивания) тканей донора даст ценную информацию о механизмах повреждения тканей. В связи с изложенным выше, возникает настоятельная необходимость изучения особенностей температурной кинетики изменения интенсивности ХЛ тканей, подвергнутых различным режимам замораживания-оттаивания.

Материалы и методы. Опыты проводились на самцах белых крыс линии Вистар весом 200-250 г. Подопытные крысы декапитировались под нембуталовым наркозом. Для исследования использовались свежеснятые печень, мышцы и кожа. При исследовании спонтанной ХЛ печени, для удаления из нее пигмента, проводили ее перфузию раствором Эрла. Спонтанная ХЛ регистрировалась на квантометрической установке. В качестве детектора использовали фотоэлектронный умножитель ФЭУ-85, работающий в режиме без охлаждения. Фон установки был 190 имп/с. На приведенных рисунках все величины интенсивности ХЛ означают превышение над фоном. В работе при изучении влияния холода на интенсивность спонтанной ХЛ свежеснятые тканевые образцы замораживались при 3-х режимах: до -8 °C, до -79 °C, до -196 °C. При замораживании тканевых образцов при -8 °C исследуемые ткани помещали в тонкостенные пробирки из дюралюминия, закрывали ставили в контейнер с раствором сухого льда в этиловом спирте при температуре -8 °C. Установленная температура поддерживалась термостатированием.

Для замораживания до -79 °C тканевые образцы помещали в маркированные стеклянные флаконы и насаживали в термосы с сухим льдом. При замораживании до температуры жидкого азота тканевые образцы расправляли и закрепляли в металлические рамки, которые плотно обертывали станиолом и погружали в жидкий азот. Тканевые образцы при всех режимах замораживания выдерживались при заданных температурах в течение 5 часов, а оттаивание проводилось в медленном режиме.

В ряде опытов ткани перед замораживанием обрабатывали раствором Эрла, содержащем 10 % глицерина и 0,02 % фенозана калия.

Для проведения измерений спонтанной ХЛ тканевых образцов их предварительно в течение 10 минут выдерживали при указанных температурах. За температурой объекта в камере следили с помощью полупроводникового термистора типа МТ-54.

Во время опыта необходимой температуры образцов добивались пропуском горячего и холодного воздуха через камеру.

Результаты и их обсуждение. При понижении температуры образцов от 36 °C интенсивность спонтанной ХЛ образцов постепенно ослаблялась прекращалась для тканей печени при +10 °C, мышц при +14 °C, кожи при +17 °C. Дальнейшее понижение температуры до -8 °C, -79 °C и -196 °C к появлению спонтанной ХЛ не приводило. При обратном процессе, т.е. повышении температуры образцов (оттаивании образцов) наблюдалась следующая закономерность: для образцов замороженных до -8 °C, интенсивность спонтанной ХЛ развивалась по той же кинетике, что и для свежеснятых тканей в процессе понижения температуры. Т.е. гистерезис не наблюдался. В этом случае в печени ХЛ появлялась при +10 °C, в мышце при +14 °C, коже при +17 °C. В отличие от этого при повышении температуры тканей, замороженных при -79 °C возникали вспышки ХЛ для печени при +5 °C, на мышце при +8 °C, кожи при +10 °C. Как видно из кинетики спонтанной ХЛ при дальнейшем повышении температуры ее интенсивность резко нарастала и оказывалась намного выше той, что была ранее зарегистрирована у свежеснятых образцов в процессе понижения их температуры. Результаты наших опытов показали, что при указанном режиме замораживания-оттаивания амплитуда вспышки ХЛ печени составляла 60 имп/с, мышц 46 имп/с, а кожи 32 имп/с. У образцов тканей, замороженных при -196 °C при оттаивании также наблюдались вспышки ХЛ, но у всех образцов, подвергшихся действию замораживания при -196 °C, во-первых, вспышка ХЛ появлялась при более высокой температуре, чем для образцов замороженных при -79 °C, во-вторых, амплитуда ее также была значительно ниже, чем замороженных при -79 °C.

Как видно из рисунка 1, после замораживания при -196 °C вспышка ХЛ в печени появлялась при +8 °C, в

мышце при +12 °С, а в коже при +14 °С, с амплитудами соответственно 34 имп/с, 28 имп/с и 22 имп/с, и смещения ее в более высокотемпературную точку при различных режимах замораживания-оттаивания. Это мы связывали с механическим повреждением структуры тканей и осмотическим шоком, степень которого зависела от режима замораживания. При этом, различия в амплитудах вспышек вероятно являются результатом действия окислительного стресса. В связи с этим в ряде опытов тканевые образцы в одном случае перед замораживанием обрабатывались раствором Эрла, а в другом, тем же раствором, но с добавлением 10 % глицерина и 0,2 % фенозана калия. Получены следующие результаты: в образцах, замороженных до -79 °С с предварительной выдержкой в растворе Эрла, но с глицерином, температура выхода вспышки перенеслась на более высокую положительную температуру – для печени +7 °С, мышц +10 °С, кожи +12 °С, а амплитуды вспышек этих тканей были соответственно: 42, 34 и 20 имп/с.

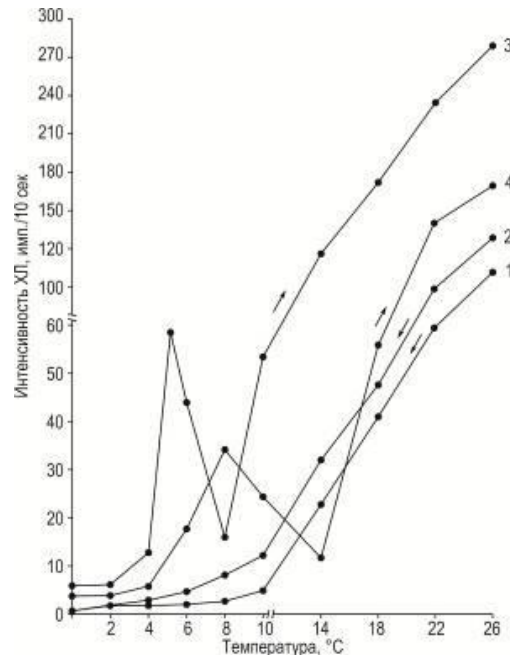


Рисунок 1 – Изменение интенсивности ХЛ печени в зависимости от режима замораживания-оттаивания:
 1 – ХЛ при понижении температура от +26 °С до 0 °С; 2 – ХЛ при понижении температуры от +26 °С до -8 °С;
 3 – ХЛ замороженных до -79 °С с последующим медленным оттаиванием до +26 °С; 4-ХЛ замороженных до -196 °С с последующим медленным оттаиванием до +26 °С

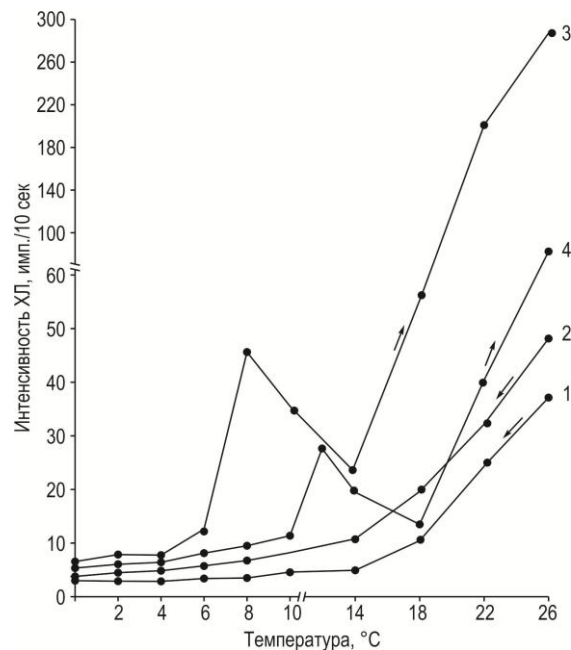


Рисунок 2 – Изменение интенсивности ХЛ мышцы в зависимости от режима замораживания-оттаивания:
 1 – ХЛ при понижении температура от +26 °С до 0 °С; 2 – ХЛ при понижении температуры +26 °С до -8 °С;
 3 – ХЛ замороженных до -79 °С с последующим медленным оттаиванием до +26 °С; 4-ХЛ замороженных до -196 °С с последующим медленным оттаиванием до +26 °С

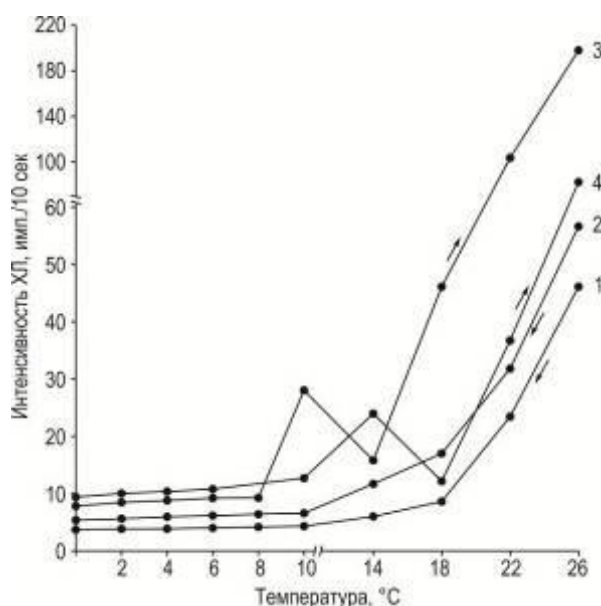


Рисунок 3 – Изменение интенсивности ХЛ кожи в зависимости от режима замораживания-оттаивания:
 1 – ХЛ при понижении температура от +26 °С до 0 °С; 2 – ХЛ при понижении температуры +26 °С до -8 °С;
 3 – ХЛ замороженных до -79 °С с последующим медленным оттаиванием до +26 °С; 4 – ХЛ замороженных до -196 °С с последующим медленным оттаиванием до +26 °С

При замораживании при -196 °С с предварительной обработкой раствором глицерина на Эрле, температура возникновения вспышки в образцах ткани печени переходила на 11 °С, мышц на 13 °С, кожи на 15 °С. Амплитуды вспышек этих тканей были 23, 20 и 14 имп/с соответственно. Что касается влияния на параметры вспышки ХЛ предварительной обработки образцов защитным раствором, содержащим глицерин и фенозан калия, установлено: при замораживании печени при -79 °С с предварительной обработкой глицерином + фенозан калия вспышка спонтанной ХЛ возникала при +11 °С амплитудой 25 имп/с. В этих условиях вспышка спонтанной ХЛ мышцы появилась при +13 °С амплитудой 19 имп/с. В условиях замораживания кожи при -79 °С вспышка спонтанной ХЛ имела следующие параметры: выход при 14 °С, амплитуда – 15 имп/с. При замораживании печени при -196 °С с предварительной обработкой глицерином+фенозан калия, вспышка спонтанной ХЛ возникала при +13 °С амплитудой 10 имп/с. При этом вспышка спонтанной ХЛ мышцы и кожи характеризовались следующими параметрами: для мышцы +15 °С и 10 имп/с, для кожи +18 °С и 10 имп/с.

Таким образом, при измерении температурной кинетики ХЛ после замораживания-оттаивания в разных режимах впервые обнаружена вспышка спонтанной ХЛ при таких температурах, при которых свежесрепарированные ткани не излучают. Температурная точка выхода вспышки спонтанной ХЛ и ее амплитуда четко зависят от степени повреждения при замораживании-оттаивании. Это позволяет сделать заключение о том, что структурно-функциональные нарушения замороженно-оттаянных тканей объективно отражаются на интенсивности спонтанной ХЛ и на параметрах вспышки (температура выхода и амплитуда вспышки). Полученные факты указывают на возможность рекомендации метода температурной кинетики интенсивности вспышки спонтанной ХЛ в качестве маркера при определении годности трансплантатов, предназначенных для пересадки.

Список литературы / References:

1. Мантаков М.С. К вопросу консервации биологических объектов для биохимических исследований. *Избранные вопросы судебно-медицинской экспертизы*. Хабаровск, 2013, т. 13, с. 132-133. [Mantakov M.S. To the problem of biological objects conservation for biochemical researches. *Selected issues of forensic medical expertise*, Khabarovsk, 2013, vol. 3, pp. 132-133. (In Russ.)]
2. Laitinen M., Hirn M., Kivikari R. Lipid oxidation may reduce the quality of a fresh-frozen bone allograft. Is the approved storage temperature too high? *Acta Orthop.*, 2006, vol. 77, 418 p.
3. Kelvin G.M. Brokbank and Michael G. Taylor Tissue preservation. *Jun.*, 15, 2006, pp. 173-180.
4. Имамалиев А.С. *Гомопластика суставных концов костей*. М: Медицина, 1975, с. 31-64. [Imamaliyev A.S. *Homoplastics of articulate ends of bones*. М., Medicine, 1975, pp. 31-64. (In Russ.)]
5. Чогошвили А.Г., Джафаров А.М., Бурлакова Е.В., Кольс О.Р. Изменение интенсивности хемилюминесценции гомотрансплантатов при различных условиях хранения. Сверхслабые свечения в медицине и сельском хозяйстве. *Тр. МОИП, МГУ, Москва, 1974, т. 50*. [Chogoshvili A.G., Jafarov A.I., Burlakov E. V., Kols O.P. Variation of hemiluminescencion intensity of homotransplantants under different storage conditions. Super weak luminescence in medicine and agriculture. *Proceedings of MOIP, MSU, Moscow, 1974, vol. 50*. (In Russ.)]