



И.М.ГИТЕЛЬЗОН • В.П.НЕФЕДОВ • В.А.САМОЙЛОВ

КУЛЬТУРА
ИЗОЛИРОВАННЫХ
ОРГАНОВ

612
Г517

А К А Д Е М И Я Н А У К С С С Р
НАУЧНЫЙ СОВЕТ ПО КОМПЛЕКСНЫМ ПРОБЛЕМАМ ФИЗИОЛОГИИ
ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

МЕТОДЫ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

И. И. ГИТЕЛЬЗОН, В. П. НЕФЁДОВ,
В. А. САМОЙЛОВ

КУЛЬТУРА
ИЗОЛИРОВАННЫХ
ОРГАНОВ



ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»
ЛЕНИНГРАДСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ЛЕНИНГРАД 1977

Илл.

Культура изолированных органов. Гиттельзон И. И., Нефёдов В. П., Самойлов В. А. В серии: Методы физиологических исследований. Л., «Наука», 1977. 196 с.

Цель монографии — описание современного состояния метода культивирования органов. Рассматривается история этого направления в физиологии, узловые проблемы, методы кондиционирования среды для изолированных органов, способы анализа их состояния и сохранности функций, области применения этого мощного инструмента физиологических исследований, нерешенные задачи. Описаны технические устройства для перфузии изолированных органов, анализируются различные варианты решений; дано описание автоматизированной системы перфузии, разработанной авторами. Изложены практические приемы подготовки системы перфузии, животных-доноров, оперативная техника и организация эксперимента. Особое внимание уделено культивированию кроветворной ткани, на примере которой рассмотрены возможности использования культуры изолированных органов для анализа межорганных взаимодействий и механизма внутриорганизменной регуляции. Лит. — 461 назв., ил. — 93, табл. 5.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ СЕРИИ «РУКОВОДСТВО ПО ФИЗИОЛОГИИ»
И «МЕТОДЫ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ»:

Н. П. Бехтерева (зам. отв. редактора), *В. А. Кисляков*, *Г. П. Конради*,
П. Г. Костюк, *К. А. Ланге* (отв. секретарь), *Б. Ф. Ломов*, *В. И. Медведев*,
А. Л. Поленов, *Т. Н. Турнаев*, *А. М. Уголев*, *В. Н. Черниговский*
(отв. редактор), *А. И. Шаповалов*, *М. М. Хананашвили*

Ответственный редактор тома
академик АМН СССР *С. В. Аничков*

ПРЕДИСЛОВИЕ

Метод культуры изолированных органов имеет своим предшественником метод переживания изолированных органов, история которого начинается со второй половины прошлого века.

От своего первоисточника метод культивирования изолированных органов отличается тем, что жизнедеятельность изолированного органа искусственно поддерживается в течение длительного периода, во время которого продолжают функцию органа и обмен веществ его тканей с соблюдением равновесия катаболических и анаболических процессов, а также с достаточной регенерацией элементов, неизбежно погибающих при жизни.

Культивирование клеток и ткани по Каррелю свидетельствует о том, что такая длительная жизнедеятельность вне организма возможна. Однако для поддержания жизнедеятельности целого органа нельзя просто погрузить его в питательную жидкость, как это делается при культивировании маленького кусочка ткани или популяции клеток. Для культуры целых изолированных органов необходима перфузия крови или жидкости, ее заменяющей, через сосудистую систему органа. При этом возникает ряд методических трудностей, связанных с необходимостью поддержания постоянных параметров перфузионной жидкости. Поэтому методика культуры изолированных органов требует соблюдения особых условий и применения специальных приспособлений. Авторы настоящей книги на основании обширного современного литературного материала и собственных опытов описывают экспериментальные приемы, обеспечивающие постоянство главных параметров состава перфузионной жидкости и ее протекания по сосудистой системе органа.

В заключение дается подробное описание прибора и метода, разработанных самими авторами и обеспечивающих оптимальные условия для культуры изолированного органа.

По своему существу метод культуры изолированных органов не может претендовать на решение основных физиологических проблем синтетического плана, требующих исследований целого организма, но для задач аналитических, направленных на изуче-

ние процессов органного уровня и их местной регуляции, метод культуры изолированных органов имеет первостепенное значение.

Следует подчеркнуть, что материалы, представленные авторами, и обширная библиография дадут читателю возможность не только воспроизвести описанные методы, но и успешно совершенствовать новые создаваемые методы культуры изолированных органов. Книга И. И. Гительсона, В. П. Нефёдова и В. А. Самойлова несомненно будет встречена с одобрением физиологами, биохимиками и фармакологами, ведущими свои исследования на органном уровне.

Акад. С. В. Аничков

ВВЕДЕНИЕ

Вся история физиологии — это история драматической коллизии между стремлением понять организм в его гармоническом единстве и неизбежностью расчленения этого единства ради возможности разобраться в сложности деталей, составляющих организм, и законах их взаимодействия.

Логика развития науки такова, что наибольшие результаты в изучении организма как целого достигались тогда, когда удавалось углубиться в детали. Достаточно сослаться на успех современной биохимии, родившейся в сущности из физиологической химии прошлого века, осмелившейся опустить рассмотрение физиологических процессов до молекулярного уровня. Наиболее поразительным даже на фоне самых блестящих достижений биохимии остается обнаружение того, как много физиологических явлений можно воспроизвести вне организма.

Между двумя вершинами физиологии — интегративным подходом к целому организму и редукционизмом на уровне молекулярных реакций — лежит область, гораздо менее изученная и понятая. Это область промежуточных уровней организации — клеточного, тканевого, органного и, наконец, уровня функциональных систем. Можно проследить, как падает ясность понимания принципов регуляции по мере продвижения по этой иерархической лестнице структур от низших — молекулярных и верхних — организменных к промежуточным, так что наименее освещенными остаются средние ступени. Поясним наше утверждение конкретным примером. Хорошо изучена реакция целого организма на недостаток кислорода. Известно, что гипоксия вызывает вспышку кроветворения. Однако известно также, что гипоксия самого костного мозга не стимулирует эритропоэза. Внутренние регуляторные пути, с помощью которых организм, испытывающий недостаток кислорода, заставляет кроветворную ткань усиленно размножаться и дифференцироваться в сторону красного ряда, известны лишь фрагментарно. Проследим ту же линию от молекулярного конца. Известен специфический гормон — эритропоэтин, но нет ясности в механизме его действия на клетки-мишени, не говоря уже о том, что существования эритропоэтина недостаточно для объяснения всей сложности регуляции эритропоэза, включающей

управление направленностью и скоростью дифференцировки клеток, скоростью их выхода в русло и гибелью, а также развитием экстрamedуллярного кроветворения.

Анализируя изученность других функциональных систем, мы встречаемся с аналогичным положением — относительной ясностью на крайних ступенях иерархии и нарастающей неопределенностью — на промежуточных. Устойчивая повторяемость такой ситуации не позволяет считать ее случайной. В чем же причина? На наш взгляд, она кроется в методе, в возможностях исследования. Еще И. П. Павлов говорил, что наука движется толчками, в зависимости от успехов, делаемых методикой. В приложении к рассматриваемой задаче анализа механизмов управления функциональной деятельностью в организме методические возможности образуют двухвершинную кривую, совпадающую с двухвершинным распределением успехов физиологии.

Для изучения системы любой сложности ее необходимо вычленивать из еще более сложных отношений с системами, стоящими над ней в иерархическом ряду, но так, чтобы не потерять основной, образующий систему фактор, который определяет ее специфические свойства. Для целого организма этот основной методологический принцип удовлетворяется сравнительно легко — достаточно вести исследования в адекватных условиях среды. Широки методические возможности и для низшего уровня: культура клеток хорошо развита и технически довольно проста. Сложности круто нарастают по мере подъема к более высоким уровням организации — тканевому и в особенности органному и системному. Орган — чрезвычайно сложная и специализированная конструкция, которая, как правило, очень интенсивно выполняет одну или несколько специфических метаболических функций, обеспечивая потребность всего организма в них. Зато другие функции органа полностью зависят от организма и обеспечиваются им. Эта специализированность и интенсивность метаболизма делает поддержание жизни изолированного органа, и тем более их системы, технически весьма сложным. Вычлененному органу необходимо возместить те обменные взаимодействия, которые обеспечивал ему организм. Это должен сделать исследователь с помощью технического устройства, принимающего на себя функции организма по отношению к изолированному органу. Понятно, что создание таких устройств требует определенного уровня методических возможностей физиологии, до достижения которого сама постановка такой задачи была фантастической.

Перспективность изучения физиологии изолированных органов и межорганных взаимодействий осознана давно. Однако в XIX в. Клод Бернар о ее возможностях мог только мечтать. И. П. Павлов понимал значение этого подхода. Он поручил П. Я. Чистовичу разработку сердечно-легочного препарата (Чистович, 1883). Каррель и Линдберг (Carrell, Lindberg, 1938) в своей книге о культуре органов с поразительной прозорливостью рассмотрели возможные

перспективы использования этого метода в физиологии и клинической медицине. С помощью великолепного механика Линдберга Каррелю удалось преодолеть множество технических трудностей и достичь в методике культивирования органов прогресса, удивительного при ограниченности технических средств и материалов, трудно вообразимого для современного исследователя. Возможно, что методические трудности вместе с превратностями разразившейся вскоре мировой войны приостановили развитие этих работ, и переживающие органы, снабженные простейшим устройством циркуляции, в дальнейшем использовались почти исключительно как тест-объекты в фармакологии и эндокринологии.

Мощный стимул к развитию культуры органов дали современные отрасли клинической медицины — трансплантология и экстракорпоральное кровообращение. За эти же годы смежные, а иногда и далекие области науки создали условия для культивирования изолированных органов на совершенно новом методическом уровне. В микробиологии развивалась техника непрерывного культивирования одноклеточных. Проникновение в эту область идей кибернетики привело к созданию биолого-технических систем, представляющих собой некий аналог организма, в котором живая масса клеток поддерживается в состоянии непрерывного биосинтеза и размножения техническими устройствами. Анализаторы следят за состоянием клеток и их среды, а эффекторы по поступающим от анализаторов сигналам компенсируют изменения среды, вызываемые метаболизмом клеток. Эту же задачу решает организм для поддержания жизни каждого из своих органов. В случае выделения органа ее должны взять на себя технические устройства.

Чрезвычайно расширились возможности слежения за состоянием органов и их метаболизмом с помощью устройств непрерывного действия, переводящих первичные сигналы в форму электрических импульсов, удобную для регистрации, запоминания и обработки вычислительными машинами. Гнотобиологическая техника и набор антибиотиков широкого спектра действия сделали возможным поддержание стерильности в течение достаточно длительных экспериментов. Наконец, химия полимеров может обеспечить потребности в материалах с практически любыми биологическими и техническими свойствами, нужными для создания биолого-технических систем культивирования изолированных органов.

Ничего этого не было в распоряжении Карреля и Линдберга. Со времени публикации книги Карреля в развитии культуры изолированных органов прошла целая эпоха, по крайней мере в методических возможностях.

Основываясь на анализе литературы и собственном опыте, мы попытались в этой книге изложить современное состояние метода, рассмотреть возможные области его применения и выделить задачи, требующие решения.

ИСТОРИЯ И ЗАДАЧИ МЕТОДА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
ИЗОЛИРОВАННЫХ ОРГАНОВ

Р а з д е л 1. ИСТОРИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ОРГАНОВ

Истоки экспериментального подхода к ответу на вопрос, как функционирует живой организм и его отдельные части, возможно, выходят к вивисекторам древней Александрии. Но реальные предпосылки для таких исследований появились только в 1628 г., когда Уильям Гарвей (Harvey, 1628) опубликовал свою знаменитую работу, в которой впервые доказывалась замкнутость кровообращения. Потребовалось еще около 200 лет, прежде чем был поставлен вопрос: «Можно ли считать, что кровь, взятая из разных сосудов, одинакова?», принадлежащий ученику Лавуазье, молодому французскому физиологу Легаллуа (Legallois, 1801). Для того чтобы ответить на этот вопрос, Легаллуа исследовал кровь отдельных органов и тем самым изучал их функцию. Позднее, может быть, под влиянием трагической гибели своего учителя (Лавуазье был гильотинирован) Легаллуа (Legallois, 1812, 1813) высказал мысль о сохранении жизни любой части организма путем перфузии, даже если она отделена от тела. Так впервые была выдвинута концепция искусственного кровообращения. Первая искусственная циркуляция венозной крови была осуществлена Кеем (Kay, 1828), который показал, что таким путем можно восстановить раздражимость изолированной мышцы млекопитающего.

Впервые провел перфузию почки Лобелл (Loebell, 1849). Броун-Секкар (Brown-Sequard, 1858) в своих исследованиях показал необходимость оксигенации крови, используемой в качестве перфузата. Нагнетая с помощью шприца в артерии кровь, оксигенированную путем встряхивания, он наблюдал восстановление некоторой рефлекторной активности мозга в изолированной голове собаки. Лаборду (Labord, 1885) принадлежат эксперименты с перфузией голов гильотинированных преступников, где было показано появление признаков жизни при перфузии, оксигенированной аутокровью.

Людвиг и Шмидт (Ludwig, Schmidt, 1868) описали аппарат для перфузии, где артериальная кровь под давлением нагнеталась из резервуара в изолированные органы. Ими же было впервые

обнаружено, что лучший эффект перфузии достигался при флуктуирующем давлении, с помощью которого И. Ф. Цион (1868) поддерживал сердце лягушки в бьющемся состоянии в течение 48 час. Позднее Ционом было доказано, что при перфузии печени происходит образование мочевины. Шмидеберг (Schmiedeberg, 1882) предложил производить оксигенацию крови барбатированием воздуха через венозную кровь, а Фрей и Грубер (Freu, Gruber, 1885) создали аппарат для перфузии со специальным устройством для непрерывной оксигенации крови, в котором венозная кровь растекалась по внутренней поверхности вращающегося наклонного цилиндра. Это устройство можно рассматривать как первое искусственное легкое. В данном аппарате проводился также анализ газов крови в экстракорпоральном круге кровообращения.

Несомненно, предпосылкой для дальнейшей разработки искусственной циркуляции явились общие достижения в области физиологии кровообращения и физиологии газообмена, которые определили пути совершенствования искусственных легких. Важную роль в развитии метода перфузии изолированных органов сыграли также работы по созданию солевых физиологических растворов Рингера (Ringer, 1883), Локка (Locke, 1895), Тироде (Tyrode, 1910).

Дальнейшую разработку техники искусственного кровообращения изолированных органов осуществил Хамел (Hamel, 1888), создавший аппарат, где движения маятника периодически перекрывали ток крови к тканям, превращая постоянное давление в прерывистое. Якоби (Jacoby, 1890) разработал сложный перфузионный аппарат, в котором пульсирующее давление создавалось путем сжатия резинового баллона, помещенного в артериальную коммуникацию.

Броди (Brodie, 1903) опубликовал расчет круга насоса-оксигенатора, более совершенного, чем многие ранее примененные. Он также отметил преимущества использования для перфузии аутокрови, позволяющей избежать трудности, связанные с применением искусственных и гетерологических сред.

Хукер (Hooker, 1910) создал аппарат для перфузии, где пульсовая волна могла меняться по амплитуде и тем самым имела сходство с нормальным пульсом. Этот аппарат в дальнейшем был использован Белтом с сотр. (Belt et al., 1920).

Многочисленные опыты по оживлению сердца теплокровных животных путем искусственного кровообращения провел А. А. Кулябко (1902а, 1902б). Он наблюдал восстановление деятельности изолированного сердца через 5, а в отдельных случаях и через 7 суток после смерти животного, при хранении органа на холоде. Им же было произведено первое в мире оживление сердца ребенка спустя 20 час. после смерти, наступившей от воспаления легких. Кулябко принадлежат также опыты по оживлению голов рыб путем их перфузии локковским раствором.

Н. П. Кравков (1911) широко применял перфузию изолированных органов в фармакологических исследованиях. Он впервые в 1904 г. использовал для перфузии изолированных органов Рингер-локковскую жидкость с целью изучения реакций сосудов, а также гладкомышечных органов и эндокринных желез. Кравковым применялись также и изолированные органы человека: пальцы, сердце, почки, селезенка. Метод перфузии изолированных органов использовали и ученики Кравкова — Курдиновский (матка), Бочаров (сердце), Аничков, Шкавера (палец), Закусов (почка), Иванов (печень) и др. В фармакологических исследованиях этот метод применялся в тот период и в других странах Броди, Диксаном, Лангендорфом, Винтербергом, Хедбайном, Лобелем, Хукманом и др. (цит. по: Кравков, 1911).

Большое влияние на совершенствование перфузионной техники оказали работы в области переливания крови. Были созданы специальные насосы для перекачивания крови без значительной ее травматизации (Bekey, 1934; Henry, Jouvalet, 1934).

Затем были выполнены работы С. С. Брюхоненко и С. И. Чечулина (1926, 1928) по созданию аппарата искусственного кровообращения с использованием для оксигенации естественного легкого и впервые было осуществлено кровообращение по замкнутому кругу. Заданное кровяное давление поддерживалось в аппарате автоматически. Аппарат, названный авторами «автожектором», был использован в опытах с перфузией изолированной головы собаки, а также применялся для полной перфузии с целью оживления организма. Это было первое искусственное кровообращение, осуществленное у теплокровных животных. Н. Н. Теребинский (1930) применил автожектор для проведения на животных операций, в которых создавал и устранял пороки на открытом сердце. В 1937 г. С. С. Брюхоненко и В. Д. Янковский (1964) заменили в автожекторе естественные легкие искусственными. Таким образом был создан первый прототип современных аппаратов «сердце—легкие».

В этот период искусственное кровообращение применялось и для изучения гемодинамики Фирро (Figgog, 1930), Гибсом (Gibs, 1930) и др. Исследованию функциональных возможностей различных органов и систем, а также механизмов их нейрогуморальной регуляции были посвящены работы В. Д. Янковского и др. (1941), Томас (Thomas, 1939). Были сконструированы аппараты для физиологических исследований А. Н. Макарычевым с сотр. (1939). Методы культивирования органов с помощью перфузии были применены для поддержания жизни плода, изъятых из матки животного. Первые опыты в этом направлении выполнены Винтерштейном (Winterstein, 1914) и Томасом с сотр. (Thomas, 1948; Thomas et al., 1948). Аппаратом, сходным с помпой Линдберга, Томас проводил перфузии плодов большого размера и органов весом в несколько килограммов. В качестве перфузата использовалась как плазма, так и цельная или разведенная кровь.

Новым этапом развития метода искусственного кровообращения стали первые попытки проведения в эксперименте хирургических вмешательств на выключенном из кровообращения сердце. Н. Н. Тереминский (1930) с помощью автожектора Брюхоненко доказал на большом экспериментальном материале возможность устранения пороков сердца под контролем зрения на сухом сердце.

Начиная с 1937 г. в клинике Мейо (США) интенсивную разработку модели выключения сердца с помощью перфузионных аппаратов предпринял Гиббон (Gibbon, 1937). В результате весьма длительной экспериментальной работы ряда ученых (Bjork, 1948a; Dennis et al., 1951; Clark et al., 1952; Gibbon, 1954) были созданы различные модели аппаратов для общей перфузии, пригодные в клинических условиях.

Дальнейшее развитие метода искусственного кровообращения и применение его в хирургии хорошо известно и подробно описано в ряде работ (Extracorporeal circulation, 1960; Galletti, Brecher, 1962; Искусственное кровообращение, 1962; Баллюзек, Фаршатов, 1965; Вишневский, Харнас, 1968; Осипов, 1976, и др.).

Новой областью применения перфузии, тесно связанной с успехами хирургии, стало поддержание жизни-изолированных органов для последующей трансплантации. Пионером в этой области был Каррель (Carrel, Lindbergh, 1938). Им были предприняты первые попытки культивирования органов человека в стерильных условиях и выдвинута концепция об использовании перфузии для реплантации органов.

В книге Мура (Moore, 1973), посвященной истории пересадки органов, особое место уделяется сохранению последних перед пересадкой с помощью перфузии в сочетании с гипотермией. Это направление дало уже большой экспериментальный материал: А. Г. Лапчинским (1957) были поставлены опыты с перфузией изолированной конечности собаки, Бельцером (Belzer et al., 1968a, 1968b, 1968c) — с изолированной почкой и т. д. И тем не менее тот же Мур указывает, что «банк тканей» для длительного их сохранения все еще остается мечтой трансплантологов, а на данном этапе реалистической задачей является поддержание жизнеспособности тканей в течение 24 час. с полной гарантией пригодности для пересадки. Для этого важно разработать тесты для проверки жизнеспособности органов, находившихся в «банке» перед пересадкой. Применяемые методы пока еще далеки от совершенства.

Проблема «банка» органов вызвана к жизни успехами хирургической техники пересадок. В. П. Демиховым (1960) разработаны многочисленные варианты операций пересадки жизненно важных органов на животных. Он осуществил операции пересадок сердца у высших млекопитающих, а также другие операции, такие как пересадка дополнительной головы. Этот внешне очень впечатляющий эксперимент имеет большую ценность, так как доказывает, что даже такой орган, как головной мозг, может длительное время

(опыты длились около месяца) жить в условиях обеспечения гуморального гомеостаза с помощью другого организма.

В настоящее время в клинике делают операции пересадки сердца, легких, поджелудочной железы, печени, успешно реплантируются конечности, а люди с пересаженной почкой живут многие годы. Имеется прогресс и в преодолении такого трудного барьера, стоящего перед трансплантологией, как иммунологическая несовместимость тканей (Medavar, 1963; Burnet, 1969, и др.). На фоне этих успехов задача поддержания жизни взятых у доноров и сохраняемых в «банке» органов путем адекватной перфузии становится особенно заманчивой.

Возможность культивирования изолированных органов представляет большой интерес для фундаментальной физиологии. Их история идет от Клода Бернара (цит. по: Carrel, Lindbergh, 1938). Для исследований в области физиологии использовался метод поддержания изолированного сердца и легких (сердечно-легочный препарат), предложенный в 80-х годах прошлого столетия И. П. Павловым (1949) и разработанный под его руководством Н. Я. Чистовичем (1883), который в дальнейшем усовершенствовал Старлинг (Starling, 1912). В 1907 г. И. П. Павлов (1949) в статье «Живосечение» писал: «Как высшее выражение аналитической тенденции изучить каждый орган вне влияния других является метод полного удаления органа из организма и создание для него условий, способствующих его жизни. Выработка и широкое применение этого метода есть заслуга людвиговской лаборатории. До настоящего времени этот метод применялся к нервам, центральной нервной системе, скелетным мускулам, сердцу, желудку, кишкам, матке, легким, печени, почкам и слюнной железе. . . Чтобы они могли продолжительно функционировать, нужно установить через сосуды их искусственное кровообращение и самих их поместить в пространстве с известной определенной температурой. Кровь, дефибрированная, цельная или разведенная физиологическим раствором, проводится под известным постоянным давлением и известной температурой. В некоторых случаях в видах лучшего сохранения жизнеспособности органов оказывается полезным постоянное давление заменить ритмическим, т. е. еще более приблизиться к натуральным условиям. Метод этот в особенности часто неизбежен в фармакологии. . . В сложных запутанных случаях только опыт на изолированных органах и может разрешить вопрос о прямом или косвенном действии» (с. 175).

И, действительно, в этот период метод культуры перфузируемых органов уже широко применялся в физиологических и фармакологических исследованиях (Langendorf, 1888; Кулябко, 1902а, 1902б; Кравков, 1922; Аничков, 1925; Брюхоненко, Чечюлин, 1926, и др.). Позднее метод перфузии позволил исследовать рефлекторные регуляции ряда гуморально изолированных, но сохранивших нервные связи органов, в частности роли интерорецепторов в регуляции вегетативных реакций (Черниговский, 1943; Неу-

mans, Neil, 1958). Каррель (Cargel, Lindbergh, 1938), опираясь на свои эксперименты с длительной перфузией различных органов, окончательно подтвердил реальность идей Клода Бернара о возможности такого аналитического подхода к организму и выдвинул ряд задач органной биологии. Так, например, в опытах с перфузией щитовидной железы Каррель получил в культуре образование коллоидного зоба и добился корреляции этой патологии с изменением состава перфузата. Им же была выдвинута задача исследования ауторегуляции кроветворения с использованием перфузируемого кроветворного органа.

В 1938 г. была опубликована книга Карреля и Линдберга (Cargel, Lindbergh, 1938) «Культура органов», обобщающая их многолетние исследования по созданию «перфузионной помпы» — аппарата для культивирования органов, и описаны результаты многочисленных опытов по длительному, в течение нескольких недель, культивированию многих внутренних органов млекопитающих без патологических изменений.

Интересно отметить, что ранние работы Карреля относятся к области экспериментальной хирургии и культуры тканей *in vitro*. Он является автором сосудистого шва-анастомоза, открывшего путь для пересадок органов. За эту работу Каррель был удостоен Нобелевской премии в 1912 г. Каррель — один из основателей метода пересадки почки. Он подошел к культивированию тканей как к хирургической операции и внес фундаментальный вклад в развитие этого метода. Им было показано, что клетки организма могут расти неограниченно долго. Наглядным примером служит 34-летний опыт, в течение которого у штамма клеток сердца куриного эмбриона сохранялась способность активного размножения. При этом он использовал очень трудоемкие методы поддержания стерильности, так как антибиотиков тогда еще не было. В 1913 г. Каррель выполнил эксперимент с «висцеральным организмом», в котором извлеченные внутренние органы в течение 12 час. перфузировались собственным сердцем при интубационном искусственном дыхании легких. Этот эксперимент был им задуман с целью культивирования органов. Однако значительная трудоемкость методики заставила отказаться от этого пути, и в дальнейшем он выбрал аппаратную перфузию. Таким образом через 125 лет идея Легаллуа (Legallois, 1812) была экспериментально реализована.

Своим успехом Каррель в значительной степени обязан прогрессу техники перфузии, достигнутому благодаря сотрудничеству с человеком выдающегося технического дарования и сложной судьбы — знаменитым в свое время летчиком Ч. Линдбергом, впервые перелетевшим через Атлантику. Каррелю принадлежит также заслуга развития основных идей культуры органов: в 1938 г. он сформулировал задачи, которые в дальнейшем решала эта область физиологии. Предсказанные им перспективы разносторонних применений культуры изолированных органов теперь начи-

нают осуществляться. Метод перфузии органов стал классическим в эндокринологических исследованиях (Clegg, Clegg, 1971), а в области гематологии он был широко использован для изучения регулирующего влияния гормонов на кроветворную ткань (Remmel, 1963) и при исследовании эритропоэтина (Gordon, 1959; Kuratovska et al., 1961; Dornfest et al., 1962; Erslev et al., 1965; Fisher, 1965).

Успехи в трансплантологии в значительной мере зависят от возможностей консервирования органов, поэтому методы поддержания их жизнедеятельности в искусственных системах, являющиеся одним из способов консервирования органов, усиленно развиваются трансплантологами. В 1975 г. опубликованы монографии В. И. Шумакова, Е. Ш. Штейнгольца, Н. А. Опищенко «Консервация органов» и Ю. М. Лопухина, Э. М. Когана «Критерии жизнеспособности органов и тканей перед трансплантацией», посвященные анализу двух узловых вопросов этой проблемы — способам пролонгирования времени умирания органов и методам прогностической оценки их жизнеспособности.

За рубежом в последние годы появились две сводные работы по культивированию органов: в США в 1968 г. изданы обширные материалы конференций за 1967 и 1968 гг., посвященных физиологическим и клиническим аспектам перфузии и сохранения органов под общим заглавием «Перфузия и консервация органов». В 1973 г. вышла монография английских хирургов Ритчи и Хардкастла (Ritche, Hardcastle, 1973) «Перфузия изолированных органов», в которой общие вопросы перфузии органов рассмотрены главным образом на примере опыта авторов по перфузии органов желудочно-кишечного тракта.

Заключая наш краткий исторический обзор, заметим, что в специальной литературе по перфузии получил распространение некий лабораторный жаргон. Упомянем три часто встречающиеся термина, употребляемые в не вполне общепринятом значении. Термин «мониторинг» используется для обозначения всей совокупности тестов слежения за состоянием перфузируемого органа как непрерывными методами, что соответствует точному смыслу слова, так и любыми другими — микроскопией, биохимическими анализами и т. д. Термин «priming volume», который может быть переведен как начальный или стартовый объем, заимствован у хирургов и обозначает минимальный объем перфузата, необходимый для заполнения системы перед ее запуском. Наконец, термин «кавитация» применяется для обозначения отрицательного давления в пульсирующих насосах и их присасывающего действия на кровь, что также не соответствует строгому физическому определению этого термина.

Р а з д е л 2. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ОРГАНОВ: ДОСТИЖЕНИЯ И УЗЛОВЫЕ ЗАДАЧИ, ПОДЛЕЖАЩИЕ РЕШЕНИЮ

Проблемы культивирования органов в свете современных представлений теории регулирования можно определить как задачу создания биотехнической системы автоматического управления, в которой рабочим телом является изолированный орган, окруженный комплексом датчиков его состояния и состояния среды. По командам датчиков действуют регуляторы, обеспечивающие гомеостаз среды для органа и компенсацию изменений в ней, вызываемых собственным метаболизмом органа. Цель такой системы — создание для изолированного органа условий, максимально приближающихся к организменным, при этом техническая часть системы берет на себя с различной степенью полноты функции других органов и систем, взаимодействие с которыми обеспечивало взятому органу гомеостаз среды в организме.

Критерием эффективности системы управляемого культивирования органов является степень адекватности создаваемых ею условий организменным. В этом смысле такая система может быть уподоблена организму по функциям, хотя в современном виде она еще бесконечно далека от него по совершенству их выполнения. Однако для исследователя искусственное культивирование представляет одно решающее преимущество, которого не дает организм: вычлененный орган открыт по всем своим метаболическим связям и доступен для изучения и экспериментального воздействия.

В рассматриваемой с этих позиций задаче культивирования органов можно увидеть далеко идущую аналогию с интенсивно развивающейся в настоящее время областью микробиологии — методом непрерывного культивирования (рис. 1—3). В приложении к популяциям одноклеточных организмов этот подход получил в последние годы интенсивное развитие и привел к созданию устойчиво действующих и надежно управляемых систем непрерывного культивирования (Управляемое культивирование микроводорослей, 1964; Гительзон и др., 1965а, 1965б; Управляемый биосинтез, 1966; Непрерывное управляемое культивирование микроорганизмов, 1967). Задача культивирования изолированного органа может решаться на той же принципиальной основе, но, конечно, она много сложнее. Главная трудность обусловлена тем, что в отличие от гомогенных культур клеток органная культура представляет собой гетерогенную систему. Большая сложность культуры органа заключается еще в том, что в популяции одноклеточных организмов вся программа взаимодействия со средой заложена в геноме каждой клетки, и от внешней системы культивирования требуется лишь управление параметрами среды, орган же в многоклеточном организме обеспечен не только адекватной средой, но и управляющими сигналами, в которых он, по-видимому, нуждается для согласованной деятельности составляющих его клеток.

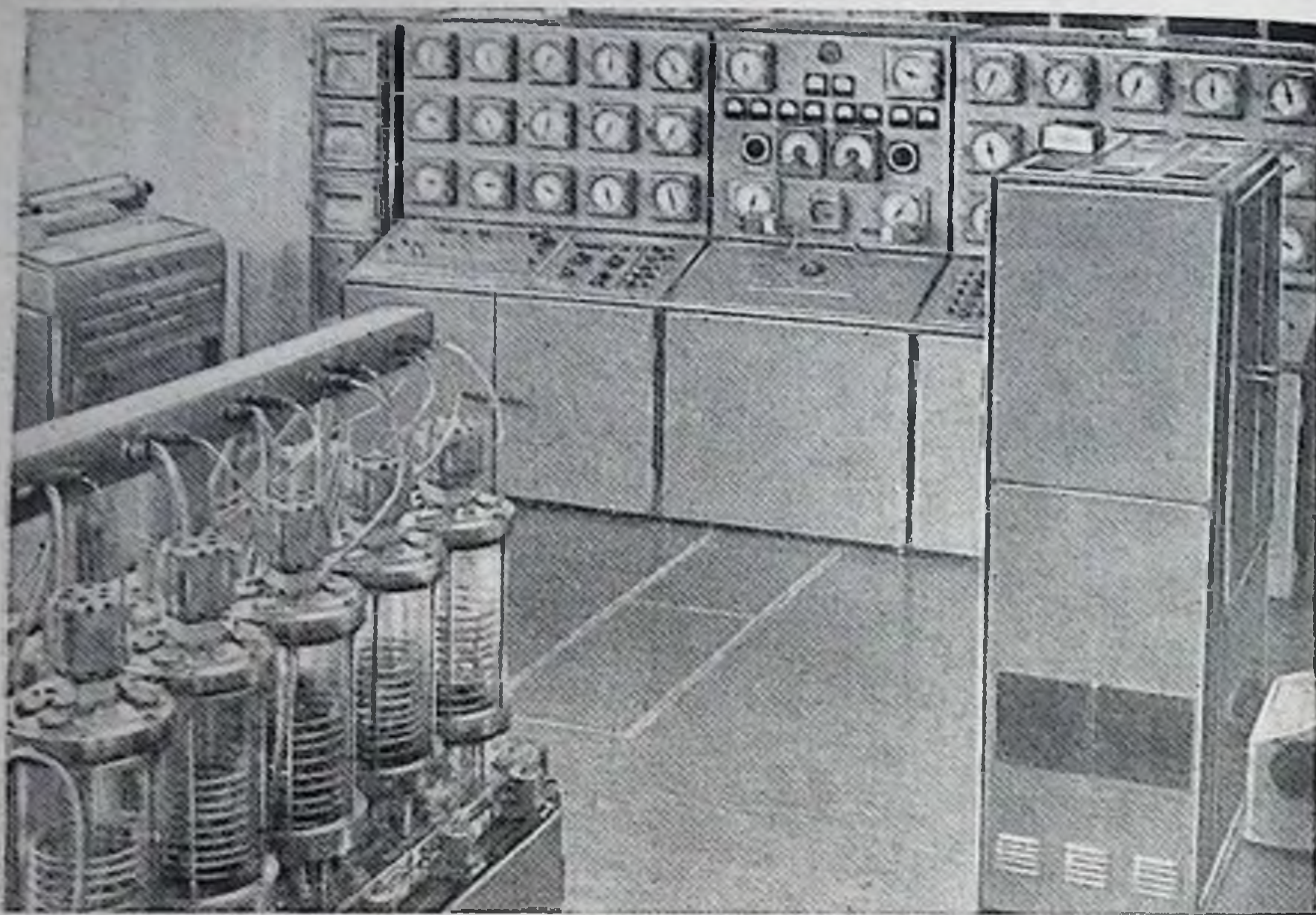


Рис. 1. Установка для непрерывного культивирования гетеротрофных микроорганизмов — «Биостенд».

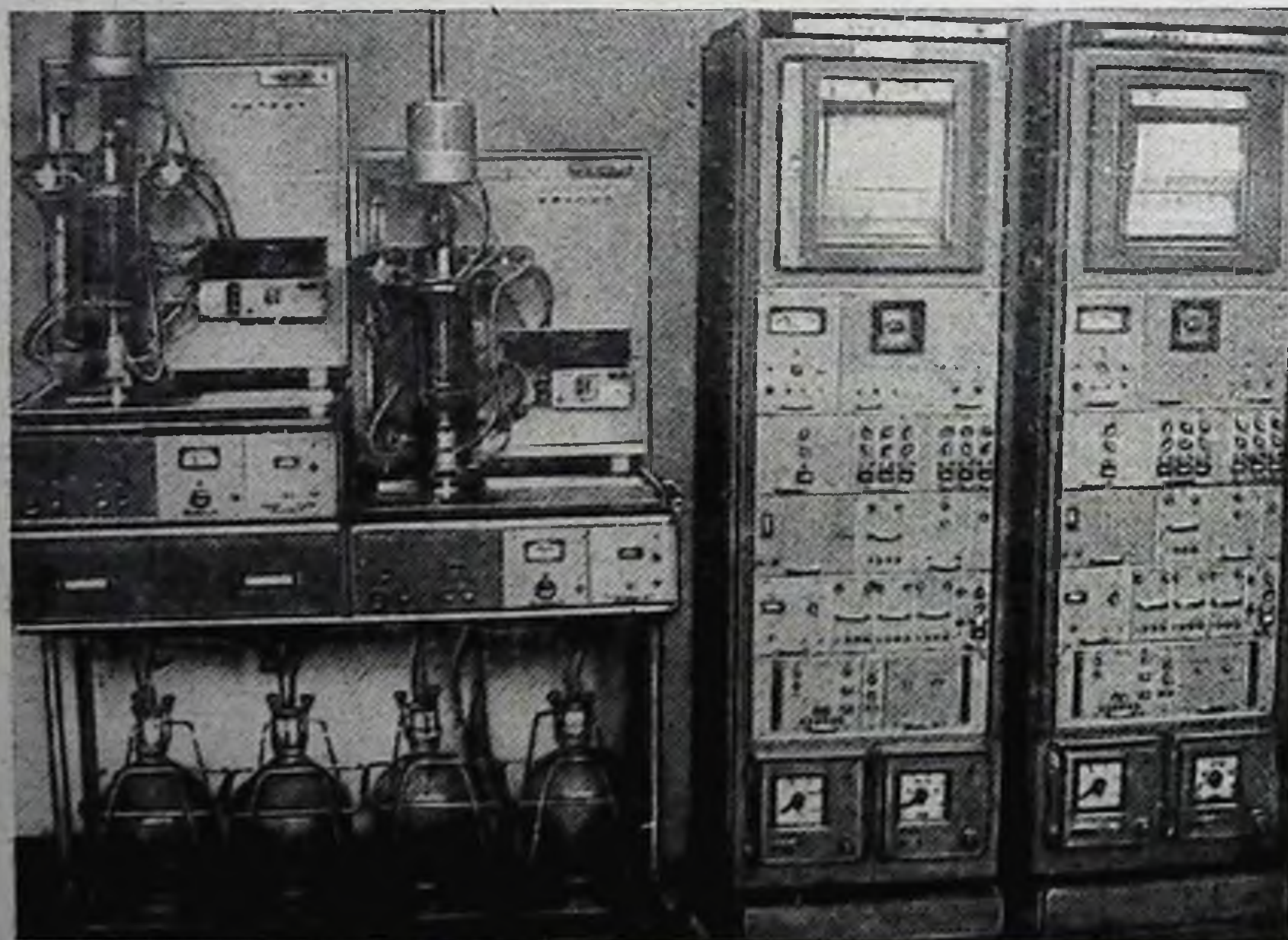


Рис. 2. Установка для непрерывного культивирования гетеротрофных микроорганизмов — «Анкум-2».

Однако, несмотря на эти различия, многие достижения непрерывной культуры микроорганизмов и главное сама методология этого направления могут послужить отправной базой для развития метода управляемого культивирования органов. В проблеме создания управляемой культуры органов на современном этапе ее развития можно выделить ряд узловых задач, решение

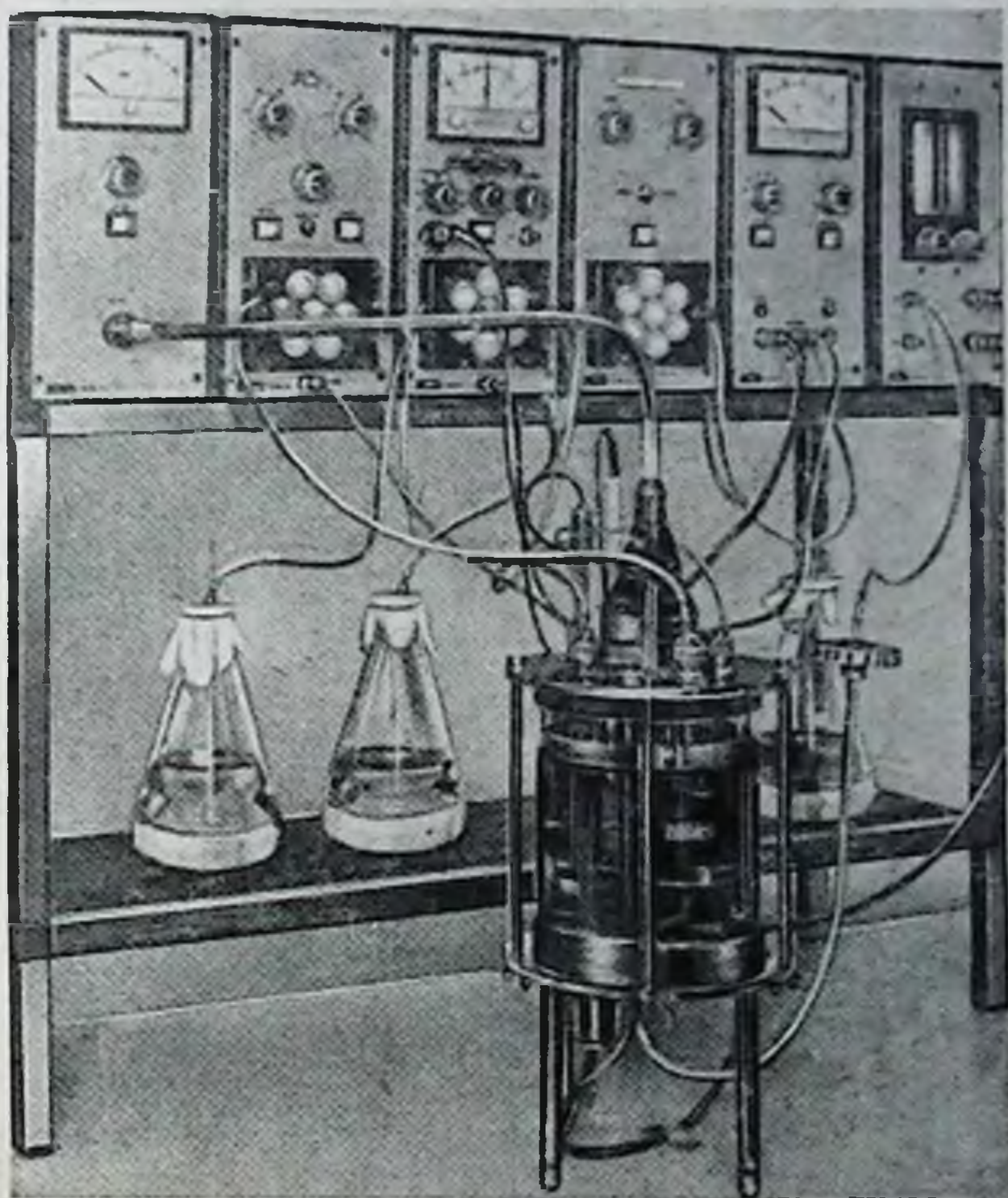


Рис. 3. Приборная панель LP-100 с лабораторным ферментером (Швеция).

которых определяет прогресс всей области. Ключевой задачей является обеспечение адекватной перфузии для поддержания нормального метаболизма. В связи с разработкой за последние десятилетия аппаратов искусственного кровообращения и оксигенации гемодинамические проблемы стали предметом глубоких исследований гидродинамиков и биофизиков, и в этой области имеются уже значительные успехи (Хаютин, 1964; Ковради, 1973; Москаленко и др., 1975, и др.). Развита методика перфузии, имитирующая естественные параметры гемодинамики (Вайнриб, 1958; Мушегян, 1962); создана группа аппаратов типа ИСЛ и АИК, ИСХФ для общей и регионарной перфузии отечественного производства (рис. 4—6), аппарат американской фирмы — 7381, японской

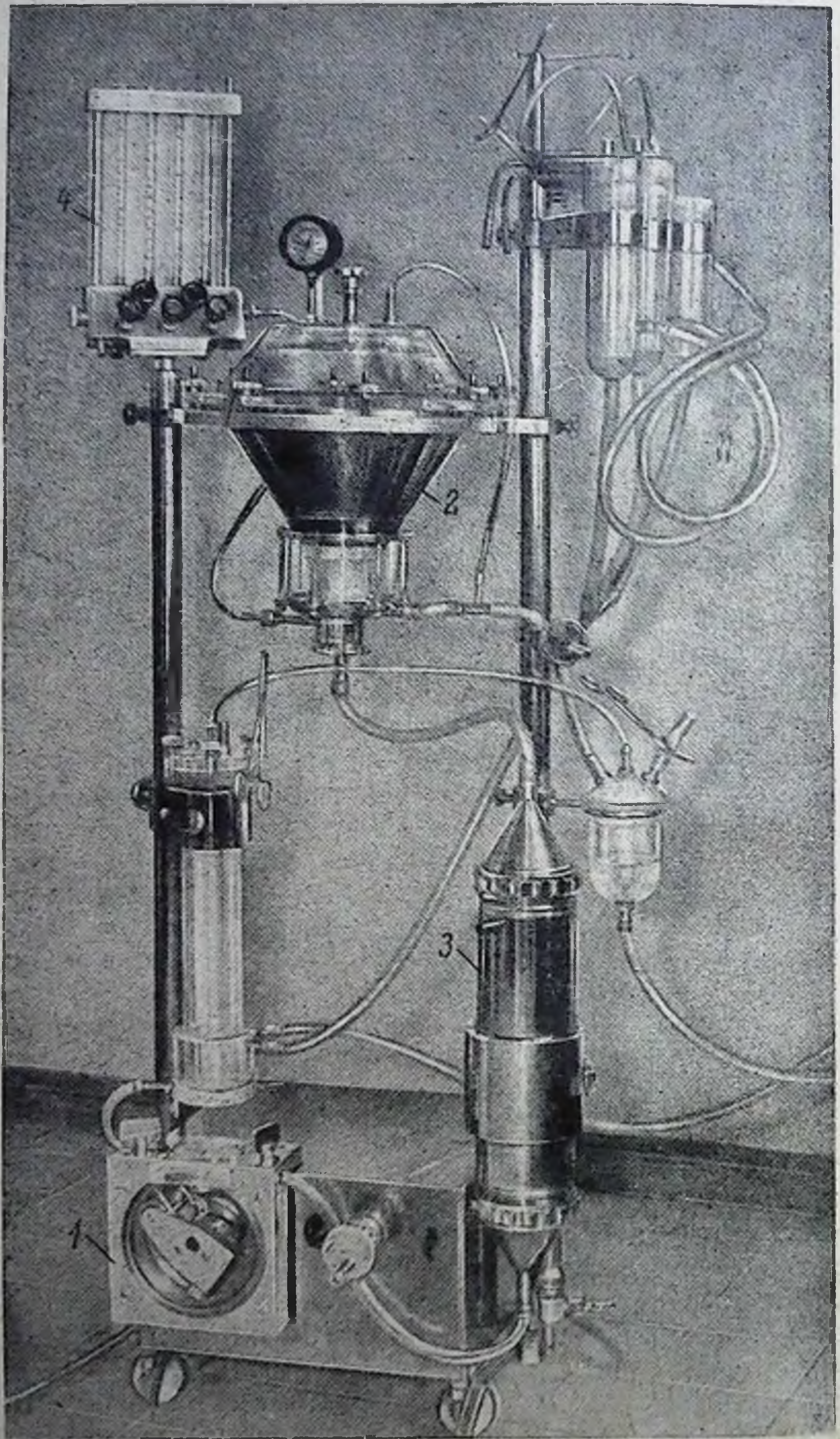


Рис. 4. Аппарат искусственного кровообращения. Модель ИСХФ-3.

1 — роликовый насос; 2 — оксигенатор; 3 — теплообменник; 4 — расходомеры газов.

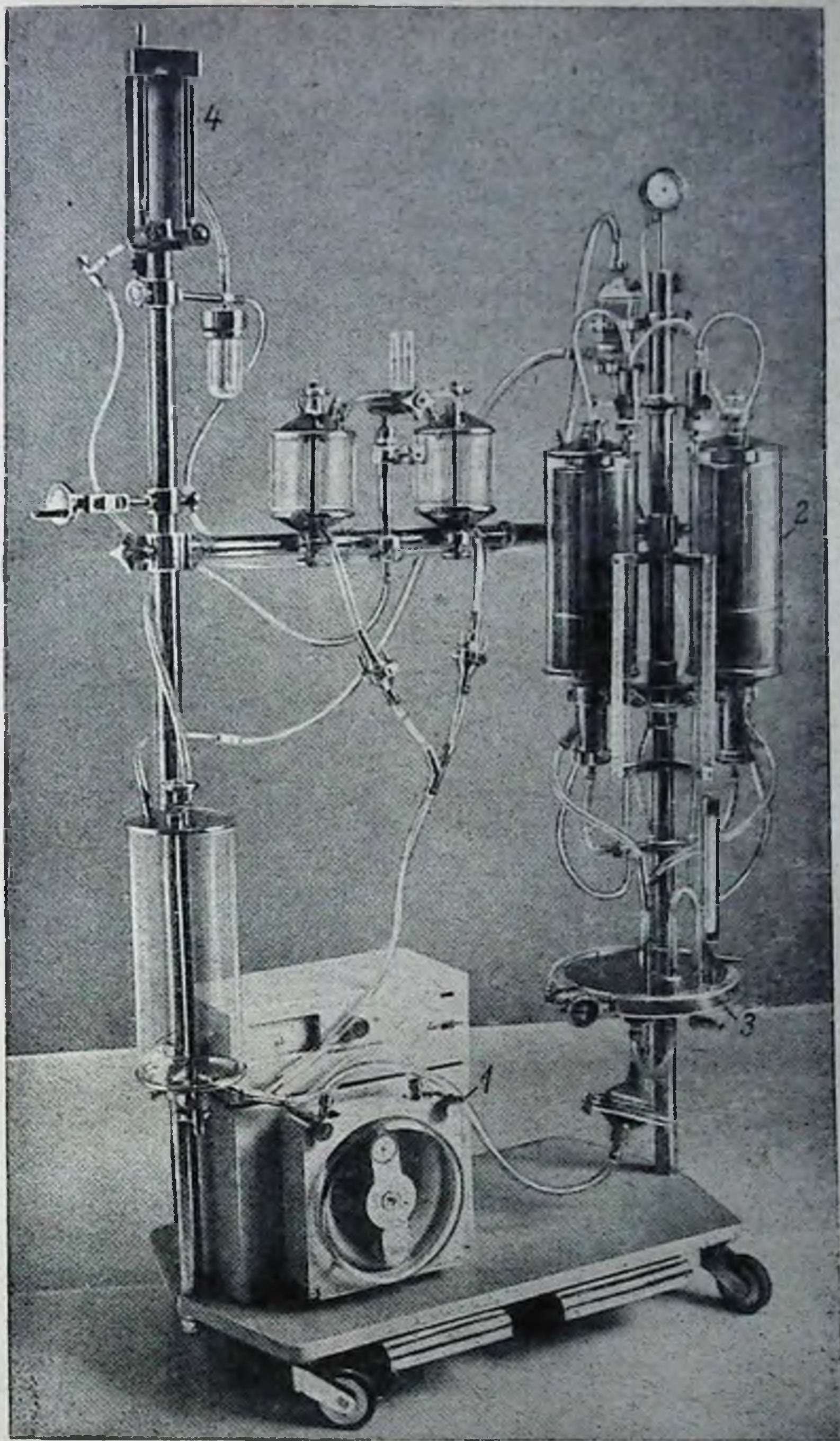


Рис. 5. Аппарат искусственного кровообращения. Модель ИСХФ-4.

1 — роликовый насос; 2 — оксигенатор; 3 — теплообменник; 4 — устройство для дозирования газов.

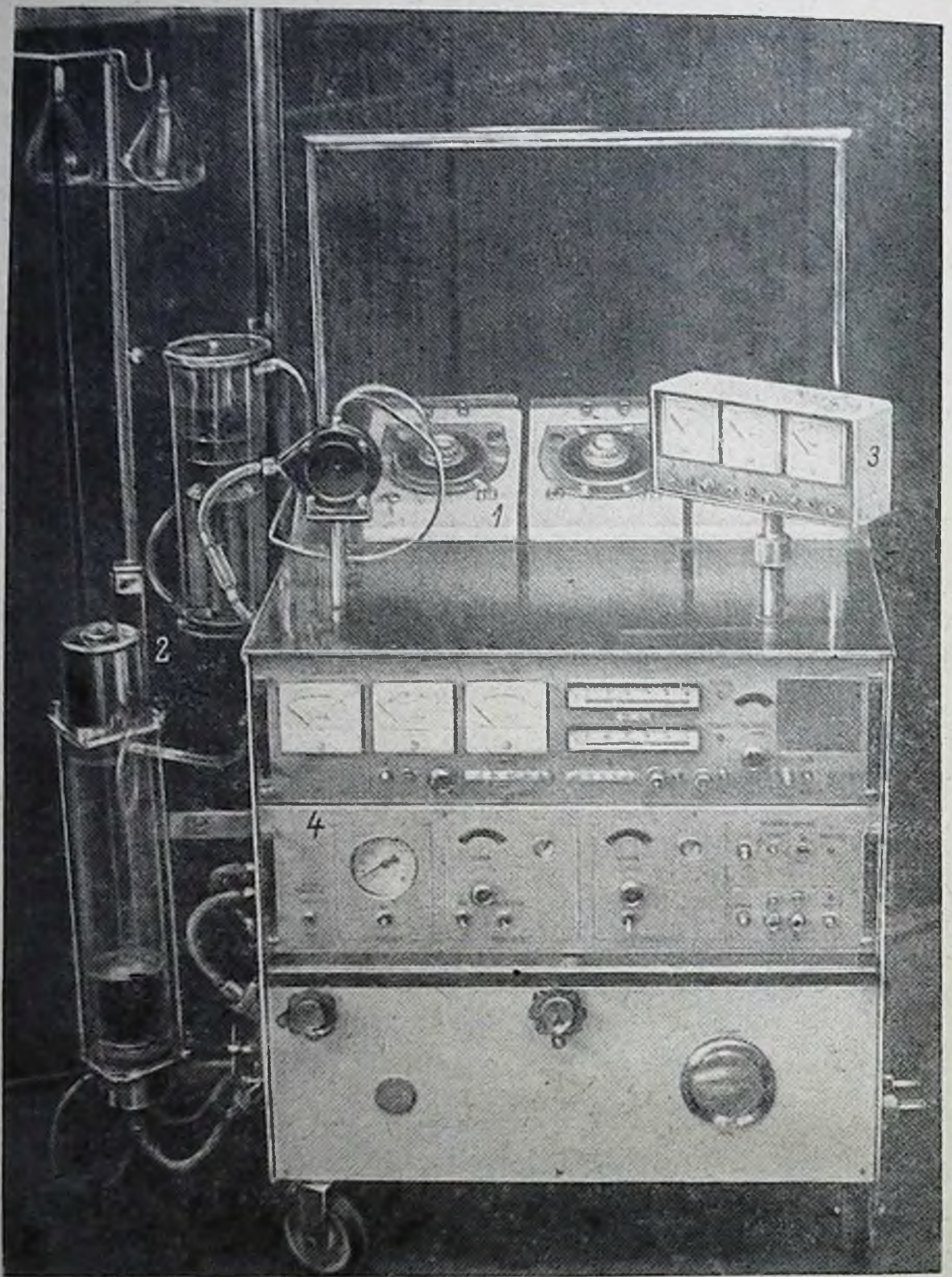


Рис. 6. Аппарат искусственного кровообращения многоцелевого назначения. Модель АИК-7.

1 — роликовый насос; 2 — оксигенатор; 3 — блок контрольных приборов; 4 — пульт управления.

фирмы — DV-2D (рис. 7) и др., имеющие насосы и оксигенаторы; разработаны совершенные конструкции насосов-желудочков совместно с системой кардиосинхронизатора и блоками автоматического регулирования (Баллюзек, Фаршатов, 1970) и др.

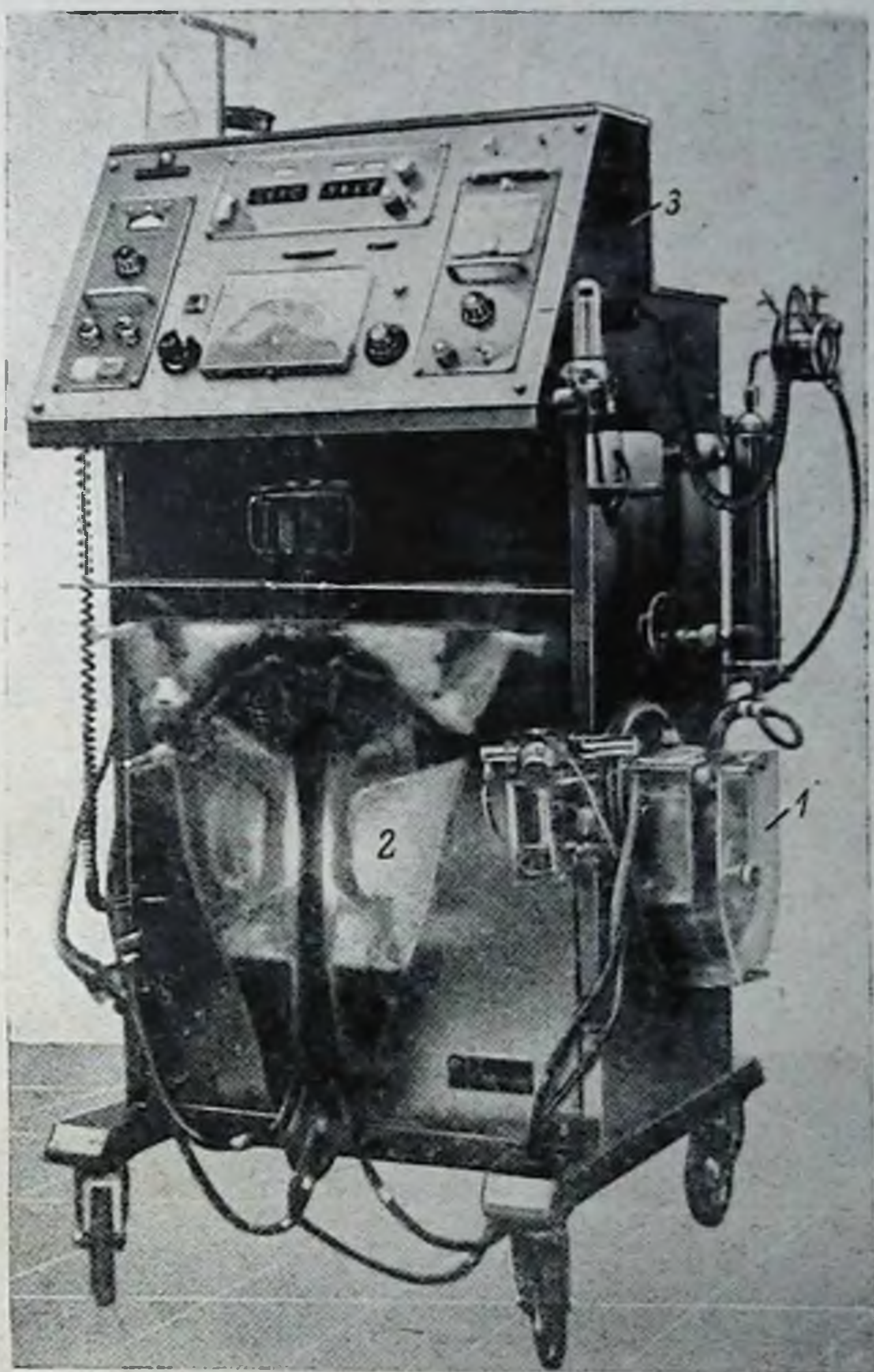


Рис. 7. Аппарат искусственного кровообращения. Модель DV-2D (Япония).

1 — роликовый насос; 2 — оксигенатор; 3 — пульт управления.

Создан также ряд перфузионных аппаратов для поддержания жизнедеятельности изолированных органов. Из отечественных устройств этого типа следует отметить аппарат АСЖО-01 (рис. 8), разработанный Всесоюзным научно-исследовательским и испытательным институтом медицинской техники Минздрава СССР, ко-

торый позволяет сохранять изолированный орган перед трансплантацией 5—6 час. Уровень развития зарубежной техники в этой области могут характеризовать аппараты для консерва-

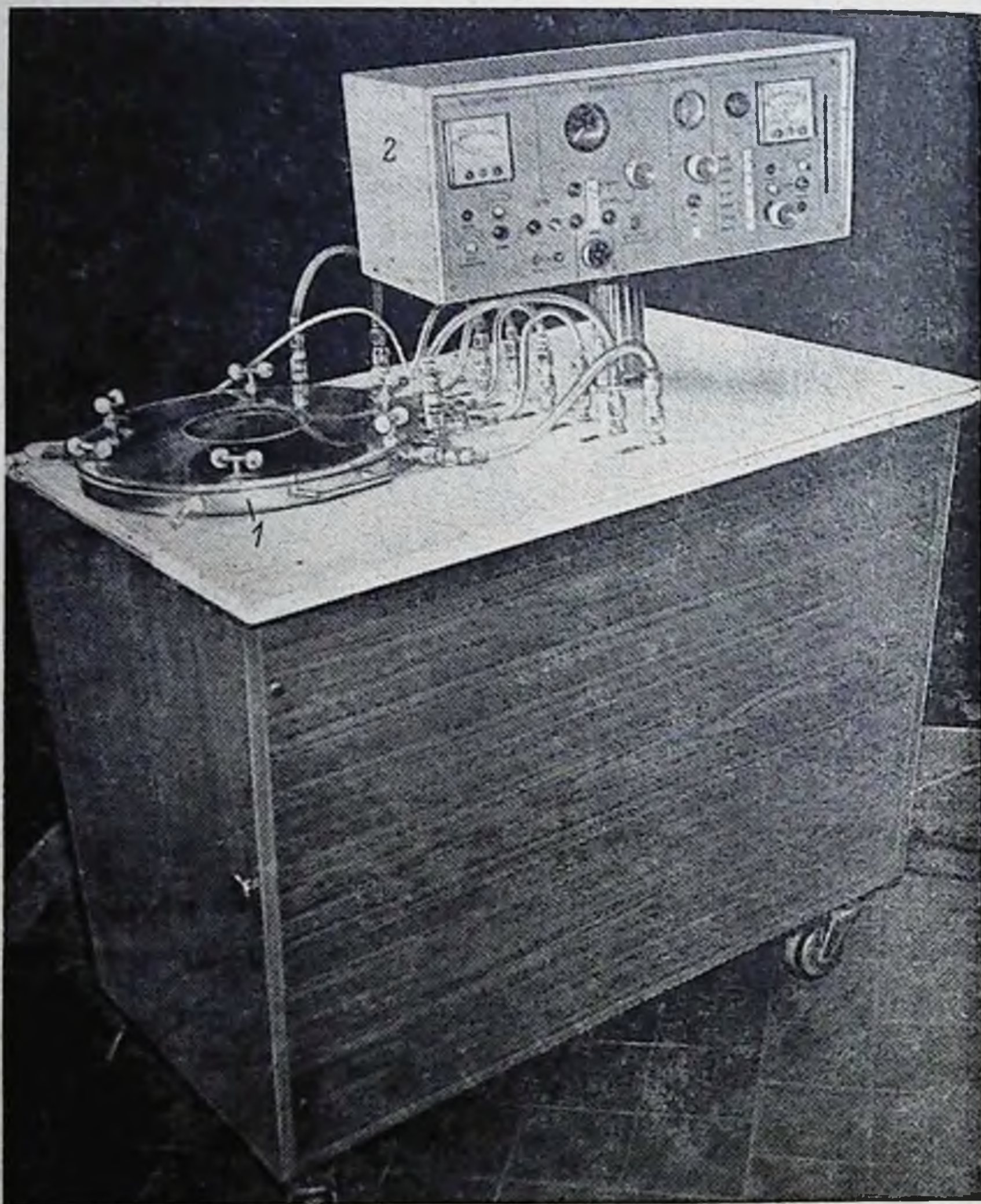


Рис. 8. Аппарат для сохранения и поддержания жизнедеятельности изолированных органов АСЖО-01.

1 — съемный контейнер для органов; 2 — пульт управления.

ции почек. С помощью этих аппаратов осуществлены успешные пересадки на людях с сохранением почки в течение 17 час. при гипотермии до 10°C (Belzer et al., 1968a, 1968b). Габариты аппарата позволяют транспортировку органа. Аппарат для консервации почки методом нормотермической перфузии (Pegg, 1970)

имеет систему автоматической регистрации рН, P_{O_2} , скорости кровотока, артериального давления, температуры и веса органа.

Конструкции систем искусственного кровообращения с контролем и автоматическим управлением среды, а также консервации органов с анализатором жизнеспособности описаны Арденом и Бёме (Arden, Böhme, 1971), В. И. Шумаковым и др. (1970, 1975), В. Б. Волковым (1971) и др.

Установки «Гомеостат-1» и «Гомеостат-2» сконструированы и построены в лаборатории биофизики Института физики СО АН СССР (Нефедов с сотр., 1969, 1971; Самойлов с сотр., 1970, 1973; Терсков с сотр., 1972; Гительзон, Нефедов, 1973). Установка «Гомеостат-2» включает в себя устройство гемодинамики, позволяющее одновременно в независимых режимах перфузировать четыре изолированных органа. Имеется система для контроля и регулирования параметров среды при перфузии. Кроме того, в установке имеется две герметичные камеры, соединенные шлюзом. Одна из камер предназначена для культивирования изолированных органов в стерильных условиях, другая служит операционной. Перед этими основными камерами расположены две соединенные последовательно камеры, выполняющие роль предварительного шлюза. Герметизация камер, подача в них стерильного воздуха и облучение бактерицидными ультрафиолетовыми лампами предназначены для обеспечения стерильных условий выделения и последующего культивирования органов в течение длительных экспериментов (рис. 9.)

Наряду с отмеченными достижениями имеется много вопросов, требующих дальнейшей разработки. Несмотря на предложенные многочисленные конструкции насосов — «искусственных сердец», они все еще далеки от совершенства и непригодны для длительного применения. Помимо того что в них затруднена плавная регулировка частоты пульсации, амплитуды и величины ударного объема, все еще значительными остаются травма эритроцитов и гемолиз. Не получили пока широкого распространения мембранные оксигенаторы вследствие их эксплуатационной сложности и дороговизны. Другие их типы основаны на непосредственном контакте перфузата с газом, что также вызывает дополнительный гемолиз эритроцитов. Большинство современных аппаратов искусственного кровообращения непригодно для длительной перфузии.

Другая узловая задача — обеспечение мягкой минимально травмирующей техники вычленения органа и введения его в систему. Здесь многое может быть заимствовано в трансплантологии. Современные способы введения наркоза, применение релаксантов и интубационного эндотрахеального дыхания позволяют производить операции в наиболее физиологических условиях. Аппаратное сшивание сосудов танталовыми скобками и аллопластика искусственными протезами из полимерных материалов (нейлон, иволон, допрон, тефлон и др.), микрососудистая хирургия обеспечивают надежное присоединение органа для перфузии. Эти дости-

жения хирургии оказывают сильное влияние на современную технику перфузии органов.

Важнейшая задача — обеспечение стерильности длительной культуры. Для перфузий продолжительностью до 5—6 час. термическая стерилизация системы, видимо, необязательна. Ритчи и Хардкастл (Ritchy, Hardcastl, 1973) получали устойчивые результаты при перфузиях такой продолжительности органов желудочно-кишечного тракта после достаточно тщательной промывки

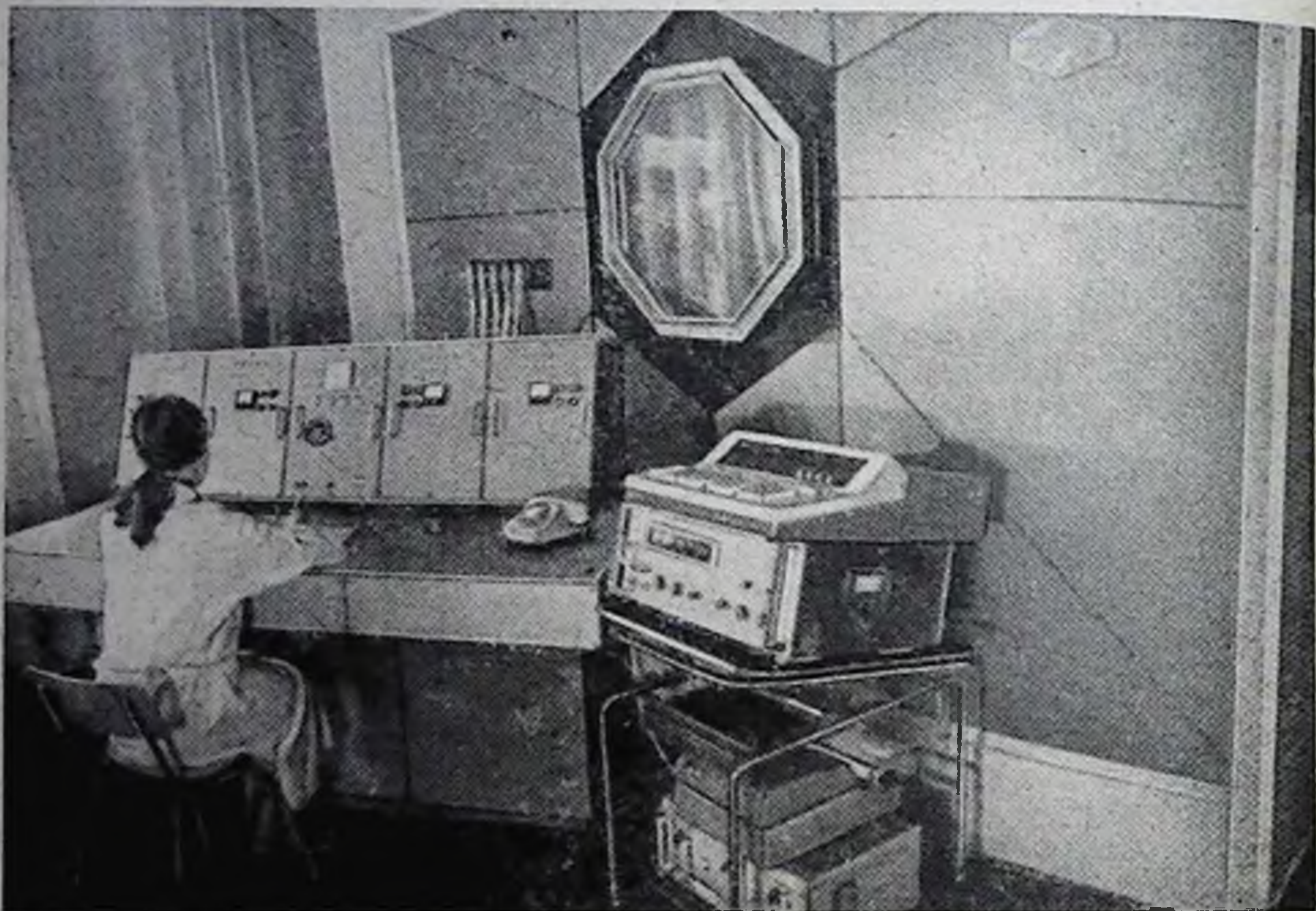


Рис. 9. Установка для управляемого культивирования изолированных органов «Гомеостат-2» Института физики СО АН СССР.

системы последовательно детергентами, перекисью водорода, дистиллированной водой и чистым перфузатом. Наш опыт перфузии грудины, конечностей, почки, печени и селезенки позволяет подтвердить возможность нестерильного эксперимента такой продолжительности. Но с нарастанием длительности опытов, что является современной тенденцией в этой области, гарантированная стерилизация системы и поддержание стерильности в ходе перфузии становятся совершенно необходимыми. Трудности этой задачи, которые Каррелю три десятка лет назад удавалось обходить только благодаря виртуозной экспериментальной технике и изобретательности, в наше время радикально облегчены появлением антибиотиков. Кроме того, расширен диапазон современных химических препаратов (табл. 1) и физических антисептиков, таких как иони-

звующее и ультрафиолетовое излучения. Имеется большой опыт гнотобиологических исследований, разработана техника стерильных микробиологических процессов и стерильных производств. Все это позволяет считать задачу поддержания длительной стерильной культуры органов методически обеспеченной.

Таблица 1

Эффективные режимы стерилизации изделий медицинского назначения из термолабильных пластмасс и резины растворами химических препаратов при температуре 18—20° С (по: Вашков и др., 1974)

Препарат	Концентрация препарата, %	Экспозиция, мин.	Число тестов		Эффективность стерилизации, %
			всего	стерильных	

Изделия из пластмасс

Надуксусная кислота . . .	1	20	600	597	99.99
		30	600	600	100
Надмуравьиная кислота . .	1	20	600	595	99.99
		30	600	600	100
Йодонат	1	40	600	594	99.99
		50	600	600	100
Глутаровый ангидрид . . .	2	75	600	598	99.99
		90	600	600	100
Перекись водорода	6	80	600	598	99.99
		90	600	600	100

Изделия из резины

Надуксусная кислота . . .	1	30	790	788	99.99
		45	790	790	100
Надмуравьиная кислота . .	1	35	790	786	99.99
		45	790	790	100
Йодонат	1	45	790	787	99.99
		60	790	790	100
Глутаровый альдегид . . .	2	45	790	788	99.99
		70	790	790	100
Перекись водорода	6	330	750	748	99.99
		360	750	750	100

За последние годы устранено еще одно затруднение, которое испытывал Каррель. Химия полимеров представила достаточно разнообразных нетоксичных и биологически нейтральных материалов для решения конструкторских задач, а развитие аллопластики в хирургии позволило накопить большой опыт их применения в контакте с живыми тканями.

Относительно новой является задача создания системы слежения за параметрами среды и автоматического управления ими. Понимание ключевого значения этой задачи возникло на основе идей кибернетики и теории автоматического управления, особенно важную роль сыграло математическое моделирование биологиче-

ских систем управления. Здесь возможно использование методов, развитых в технологии непрерывных химических и микробиологических процессов — таких, например, как электрохимическое измерение рН, гН, концентрации кислорода, углекислоты, оптические измерения концентрации клеток и т. п. Однако для большинства специфических проявлений жизнедеятельности органов методы слежения должны быть созданы специально.

Быстрый прогресс современных аналитических возможностей биохимии и биофизики обеспечивает достаточную базу для создания таких методов. Особая задача биокибернетики — сведение сигналов отдельных датчиков в обобщенную систему сбора информации о культивируемом органе, создание алгоритмов ее обработки и преобразования в команды, управляющие действиями эффекторов, которые поддерживают параметры культивирования.

Наиболее трудной и, пожалуй, наименее развитой является задача создания и поддержания в процессе культивирования адекватной питательной среды. Очевидно, что ни аутокровь, ни синтетические среды, разработанные для малоинтенсивной культуры тканей, не решают этой задачи в случае длительного культивирования органов с их интенсивным обменом веществ. Еще не определены лимитирующие питательные вещества и накапливающиеся метаболиты, обладающие наибольшим ингибирующим действием, не разработаны специальные среды, соответствующие специфике метаболизма разных органов. Важным направлением регенерации среды для изолированных органов является включение в перфузионные аппараты узлов, выполняющих функции экскреторных органов (Баллюзек, Фаршатов, 1970). Этими авторами испытан вариант параллельного гемодиализа с помощью искусственной почки. Перспективным они считают также использование естественных органов — почки, печени, включаемых в контур перфузии.

Наконец, совсем еще не ставилась задача компенсации нервных и гуморальных сигналов, которых лишается орган при вычленении из организма. Спектр, дозы и должный ритм появления в крови гормонов, управляющих функционированием различных органов, пока не выяснены.

Можно ожидать, что, сталкиваясь с этими вопросами, метод культуры изолированных органов будет способствовать их выяснению.

Предварительный обзор узловых задач, определяющих успех культивирования, позволяет заключить, что многие из них преодолены прогрессом биологической и медицинской техники последних десятилетий, для решения других созданы достаточные предпосылки в смежных областях знания, наконец, для решения третьих сам метод культуры изолированных органов может послужить эффективным инструментом.

Глава II

ТЕХНИКА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ ОРГАНОВ

Раздел 1. ЗАДАЧА СОЗДАНИЯ СИСТЕМЫ УПРАВЛЯЕМОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ОРГАНОВ

Биологические объекты — это сложные системы, для описания принципов организации которых целесообразно пользоваться языком общей теории организации. Эшби (Ashby, 1959) говорит, что достоинство кибернетики состоит в том, что она предлагает метод научного исследования систем, сложность которых слишком велика и существенна, чтобы ее можно было игнорировать.

Сложное адаптивное поведение биологических объектов обусловлено наличием множественных цепей обратной связи, образующих иерархию. Существенные переменные биологических систем зачастую трудно измерить, регулировать или даже определить. Изоляция систем почти всегда оказывается неполной, так что данные биологических исследований характеризуются довольно низкой величиной отношения сигнала к шуму. Применение при исследовании биологических систем такого раздела кибернетики, как теория автоматического регулирования, оправдано прежде всего тем, что сама постановка задачи требует точной идентификации и строгого определения понятий. Такой подход облегчает выявление существенных зависимостей. Цель теории, по выражению Гродинза (Grodins, 1966), «заключается в том, чтобы дать язык, на котором можно разговаривать о системе, и дать удобную схему, в рамках которой можно расшифровать происходящие с ней явления» (с. 10).

Не останавливаясь на основных понятиях, которыми оперирует теория автоматического регулирования (с ними можно познакомиться по подробным, написанным в применении к биологическим задачам, руководствам: Ashby, 1959; Grodins, 1966; Milsum, 1968; Биологическая кибернетика, 1972, и др.), рассмотрим возможности использования этой теории при создании системы управляемого культивирования органов. В этом случае исследователь сталкивается с задачей поддержания гомеостаза. Многие биологические механизмы гомеостаза представляют собой системы управления и содержат один или несколько контуров обратных связей, с помощью которых система определяет отклонение действительного

ее состояния от требуемого. Модели общей структуры системы регулирования в живом организме предложены различными авторами.

Так, например, С. Н. Брайнес и В. Б. Свечинский (1967) рассматривают структуру, состоящую из трех уровней (рис. 10). Локальные системы, обеспечивающие в норме постоянство физиологических параметров, образуют I уровень; II уровень оптимизирует работу I, изменяя его гомеостатические режимы в соответствии с условиями существования целостной системы. Основная задача II уровня — поиск оптимального режима. III уровень вступает в действие лишь тогда, когда во внешней среде возникает ситуация, требующая активной перестройки работы нижележащих уровней. При этом, по-видимому, изменяются и режим поиска, и предельные значения параметров. Такая система регулирования обеспечивает нормальную работу биологических систем в меняющейся среде. Теми же авторами предложена структурная схема, демонстрирующая принцип организации I уровня регулирования (рис. 11), где внутренняя среда организма W является объектом регулирования, а X_1, X_2, \dots, X_n — регулируемые параметры, измеряемые органом M_i . Результаты измерения поступают в сравнивающее устройство C_i для получения сигнала рассогласования путем сложения с сигналом воздействия по возмущению f_i , через рецепторы F_i и заданным значением регулируемой величины X^0 , вводимой из II уровня управления. Сигнал рассогласования направляется к регулирующим органам R_i , которые вырабатывают корректирующие воздействия для его компенсации. Внутренние обратные связи, изображенные *прерывистыми линиями* на рис. 11, стабилизируют работу системы регулирования. С аналогичных методологических позиций подходят В. И. Шумаков с сотр. (1975) и авторы настоящей книги к задаче искусственного гомеостаза для изолированных органов путем создания обратной связи между системой слежения за состоянием органа и исполнительными устройствами, кондиционирующими его среду.

Рассматривая проблему искусственного поддержания гомеостаза, следует отметить, что построение физической модели такой системы, имитирующей ее структуру, сравнительно легко осуществимо. Создание реального искусственного гомеостаза наталкивается на значительные технические трудности. В первую очередь — это отсутствие устройств, непрерывно следящих за основными параметрами среды, которые определяют физиологические условия для жизнедеятельности органа.

Известно, что жизнедеятельность любой биологической единицы — от клетки до особи — подчинена закономерности лимитирования метаболизма. На уровне клеток, например, эта закономерность иллюстрируется кривой роста клеточной популяции в несменяемой среде (рис. 12, 13). Фазы роста (лаг-фаза и т. д.), характерные для культур клеток, отражают состояние отдельных

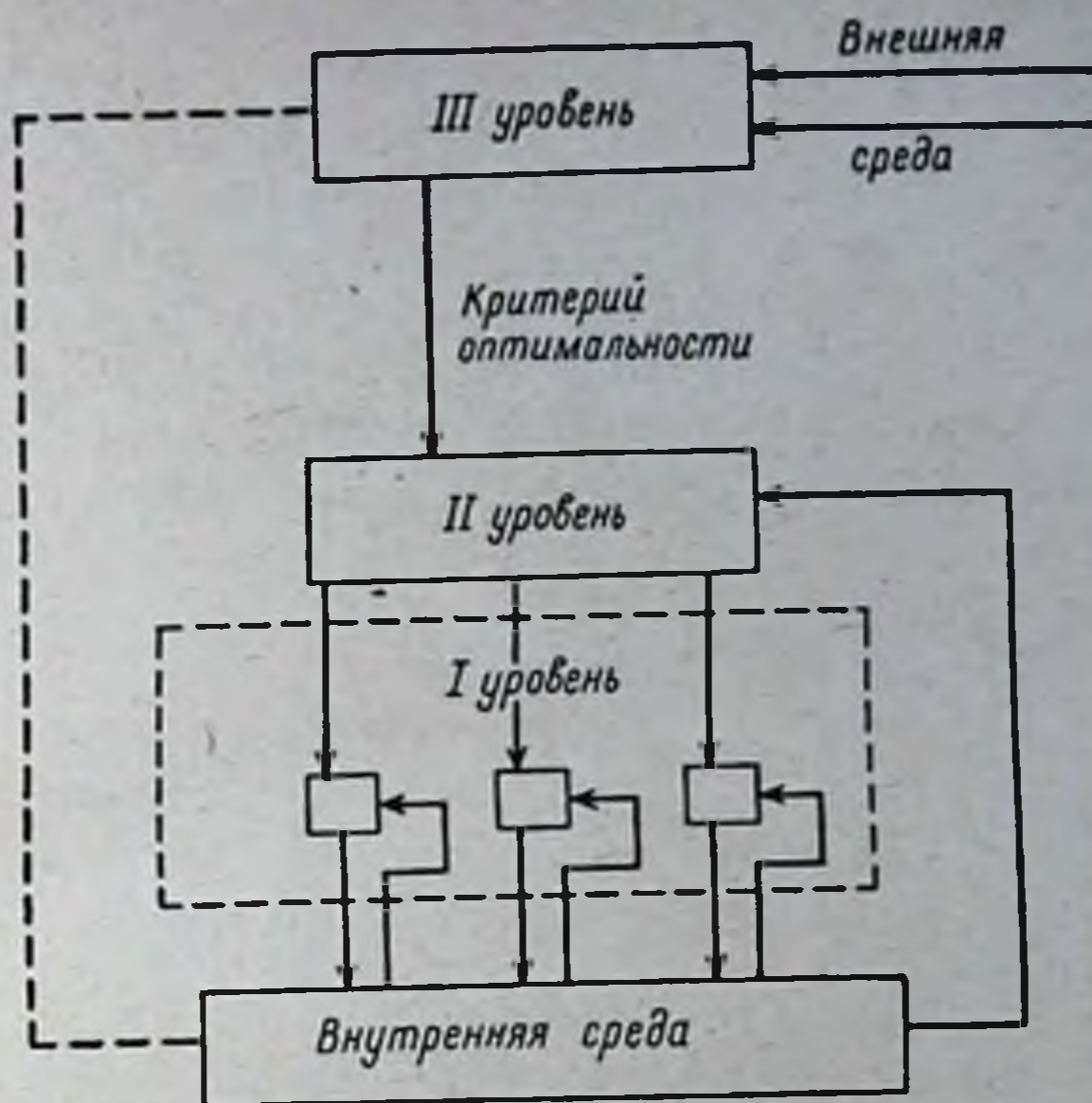


Рис. 10. Иерархическая структура управляющей системы (по: Брайнес, Свечинский, 1967).

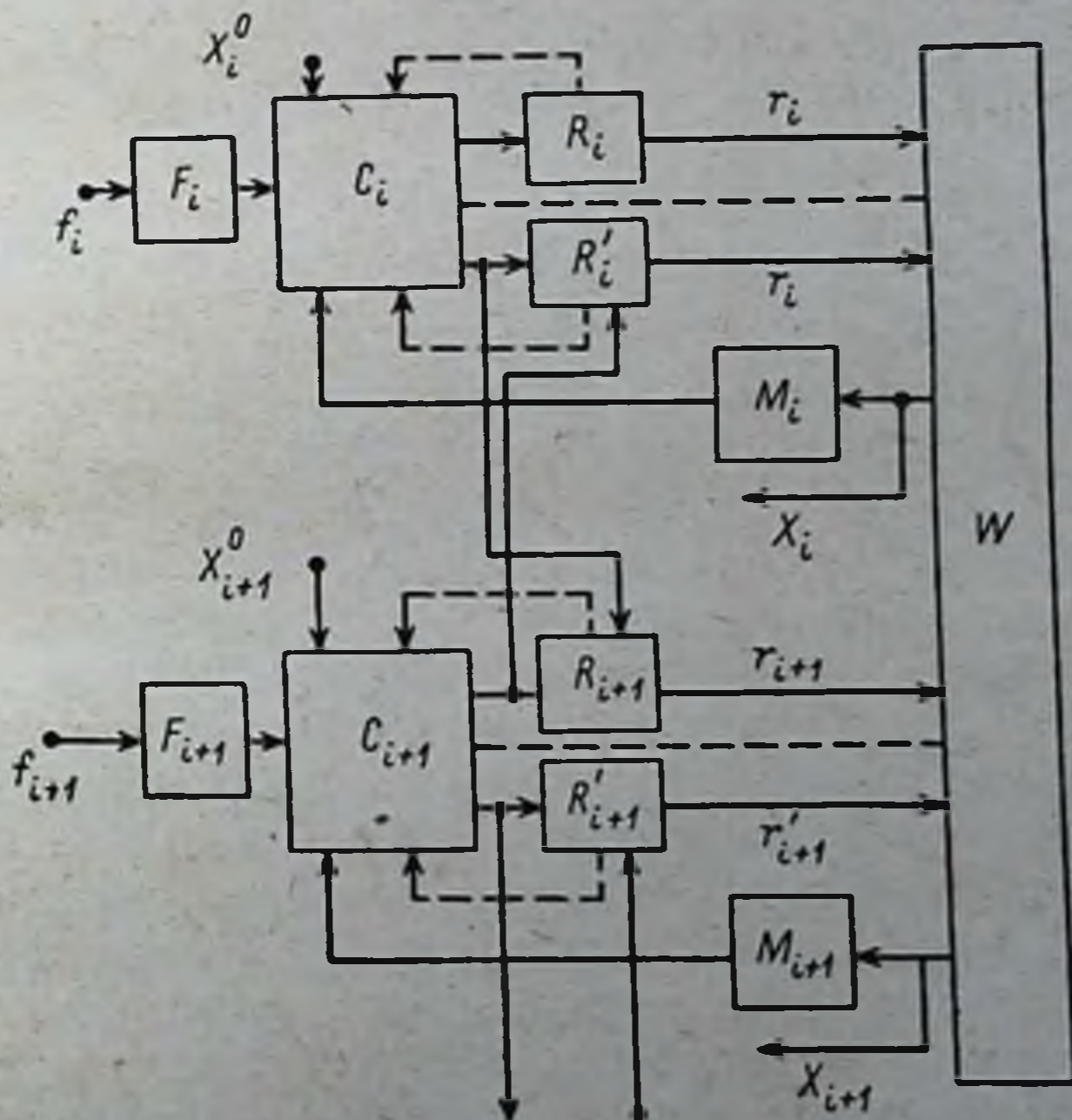


Рис. 11. Общая структурная схема гомеостаза (по: Брайнес, Свечинский, 1967).

Объяснение в тексте.

особей (рис. 14). Эти закономерности детально изучены на примере микробных культур, а также на более высоких уровнях организации (популяции животных и т. д.). Для этих далеко стоящих друг от друга уровней организации найдено много общих черт. Некоторые закономерности роста животных клеток в различного типа культурах (особенно суспензионных) уже в определенной степени изучены, в них выявлены черты сходства с ростом микробных популяций. Основные принципы непрерывного культивирования микробных популяций, такие как принцип турбидостата и

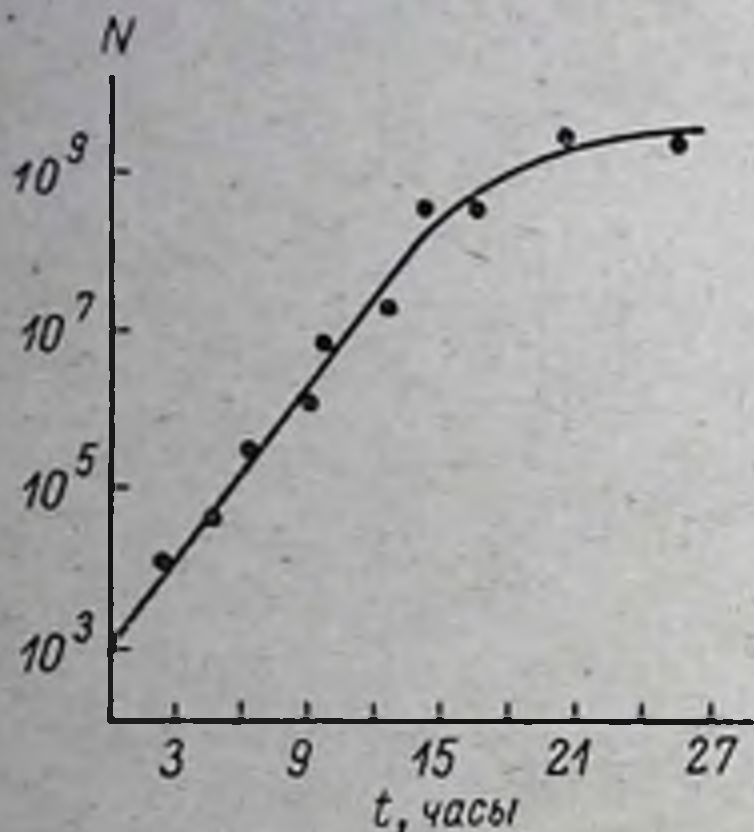


Рис. 12. Рост *E. coli* на минимальной среде как функция времени (по: Setlow, Pollard, 1964).

По оси ординат — число бактериальных клеток в 1 мл среды ($N=1.2 t/t_0$, где t_0 — продолжительность жизни поколения); по оси абсцисс — время.

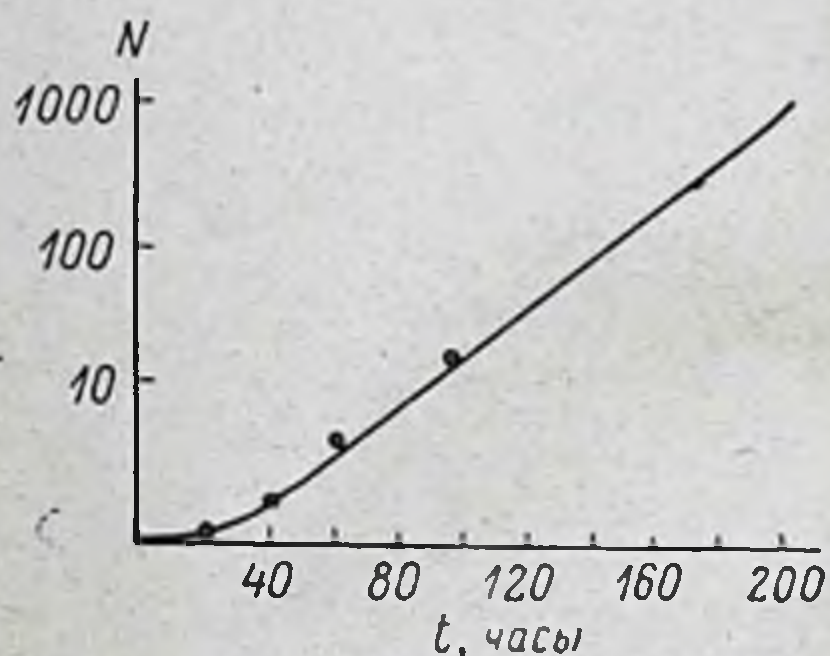


Рис. 13. Рост клеток HeLa в культуре ткани (по: Setlow, Pollard, 1964).

По оси ординат — число клеток HeLa в колонии (N), по оси абсцисс — время.

хемостата, оказались приложимы и к непрерывному культивированию животных клеток (Cooper et al., 1959; Bjorclung et al., 1961, и др.).

Можно допустить, что существование животных клеток в тканях также подчинено закономерностям непрерывного проточного культивирования (Иерусалимский, 1963; Терсков, Гительзон, 1967, и др.). Поэтому для первоначальной оценки скоростей метаболических процессов и лимитирующих факторов (а они, как известно, и являются определяющими) можно использовать уравнение Михаэлиса—Ментена и др. Но это большое упрощение, достижимое лишь для модельных построений. Асинхронность физиологических процессов, функциональная и структурная гетерогенность популяций клеток в органах, микроциркуляция, диффузионные и направленные потоки метаболитов и взаимоотношения со стромальными тканями намного усложняют взаимодействие клеток в органе. Таким образом, принцип непрерывного культивирования микроорганизмов можно лишь в определенной степени распространить и на экспериментальные системы — «изолированная часть организма — среда», которыми являются перфузируемые органы.

Задача адекватной перфузии в первом приближении может быть решена путем эмпирического подбора требуемых величин параметров, на основании которых строится соответствующая матрица. По данной матрице строится как модель всей системы, так и конструкция системы управления. Система органичного гомеостаза в естественных условиях является многосвязной. Но полной модели такой системы в силу ее сложности построить пока не удалось. Поэтому на практике при работе с этими системами оставляют ограниченное количество существенных переменных и стремятся к развитию регулирующих контуров. После этого система регулирования уже представляет собой отдельные контуры и развязывающие цепочки между ними.

Одной из первых задач, решаемых с такой системой, может быть задача адаптации системы к требованиям объекта управления (орган \Rightarrow перфузат). Она решается путем «обучения» машины. Без использования ЭВМ это осуществляется проведением факторных экспериментов с вводными параметрами с целью поиска лучшего

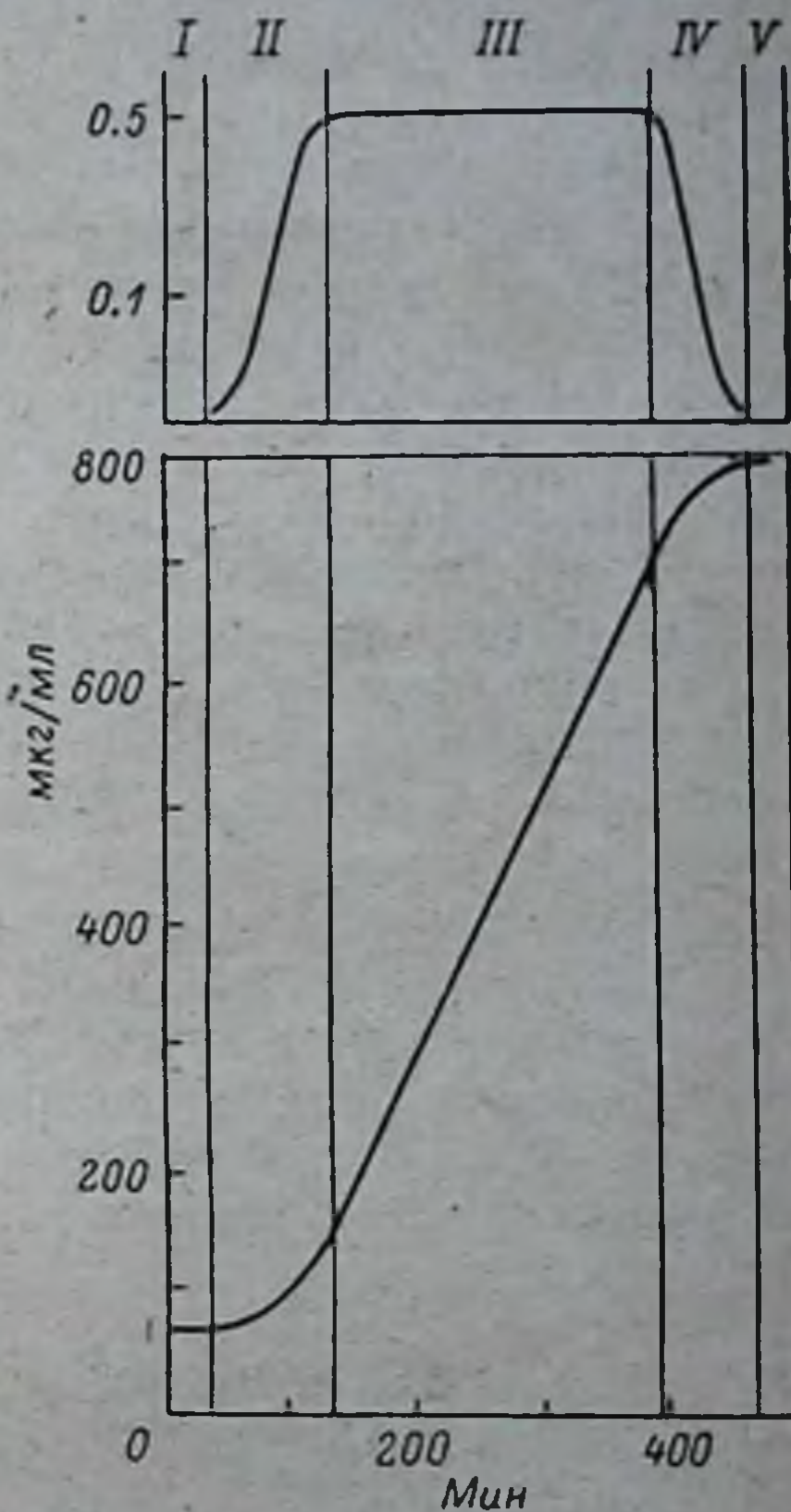


Рис. 14. Кривая роста бактериальной культуры (по: Loewy, Siekevitz, 1971).

Внизу — увеличение бактериальной массы во времени; сверху — изменение удельной скорости роста (выражена числом удвоений за 100 мин.). I — лаг-фаза; II — период возрастания скорости роста; III — экспоненциальная фаза; IV — период уменьшения скорости роста; V — стационарная фаза.

выходного показателя. Задача может быть еще более детализирована: например, стабилизация параметров и достижение их оптимальных уровней в минимальное время и т. д.

Поскольку орган является объектом регулирования, то на выходе может быть использован такой комплексный показатель, как состояние органа, диагностируемое на основании суммы показателей. Отсюда может быть определен ряд состояний органа и построена система управления, которая может обеспечить достижение и поддержание заданного состояния органа.

После анализа общих предпосылок обратимся к рассмотрению технических средств поддержания жизни изолированных органов.

Создание технического устройства, обеспечивающего адекватные условия жизнедеятельности изолированных органов, включает

в себя в качестве основного исполнительного механизма устройства для пульсирующей циркуляции жидкости — искусственное сердце. В соответствии с этим насос, выполняющий роль искусственного сердца, должен быть управляемым по ударному объему перфузата, амплитуде и частоте пульсации. С работой насоса также связан блок управления давлением артериального перфузата. Регулируемое взаимодействие ударного объема, амплитуды, частоты пульсации и артериального давления обеспечивает адекватную скорость кровотока в тканях органа. При этом биоуправление перфузией должно обеспечиваться системой слежения за состоянием органа, соединенной обратными связями с исполнительными устройствами. Система слежения за состоянием органа осуществляет контроль за рядом физических и физико-химических переменных. Прежде всего — это вес органа, температура в различных участках ткани, импеданс и реография, напряжение кислорода и скорость его потребления, артерио-венозная разница по P_{O_2} , HbO_2 , pH , P_{CO_2} .

Поскольку не все характеристики объекта и параметры среды могут быть в настоящее время измерены автоматически, необходима дополнительная система анализов. Так, например, измеряются осмотическое и онкотическое давления, содержание в перфузате макро- и микроэлементов, свободных аминокислот, углеводов, липидов и других продуктов обмена.

Таким образом, система управляемого культивирования органов должна содержать комплекс биолого-технических гомеостатов, что позволяет обеспечить жизнедеятельность органов при различных режимах культивирования, осуществлять поиск неизвестных параметров, а также изучать условия естественной ауторегуляции в условиях стационарного состояния или при его нарушениях.

Раздел 2. ВЫБОР ПАРАМЕТРОВ РЕГУЛИРОВАНИЯ ДЛЯ СИСТЕМЫ УПРАВЛЯЕМОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ОРГАНОВ

1. Транспорт кислорода

При всем различии строения и функций специализированных органов и тканей они обладают рядом общих черт, одной из которых является замыкание их биоэнергетических цепей на кислород. Поэтому обеспечение постоянного транспорта кислорода к клеткам органа есть необходимое условие поддержания его жизнедеятельности. Для создания искусственной системы, обеспечивающей жизнедеятельность органа, полезно рассмотреть механизмы, осуществляющие транспорт кислорода в организме.

В условиях организма перенос кислорода выполняется системами внешнего дыхания и крови. Кислород атмосферы поступает в легкие, где происходит переход молекул кислорода из газо-

образной фазы через мембраны альвеол в омывающую их кровь. Поскольку этот процесс осуществляется путем диффузии, требуется большая площадь активной поверхности: например у человека эта величина достигает 200 м². Попадая в капилляры, кислород аккумулируется в эритроцитах, образуя комплекс с гемоглобином (HbO₂), и в меньшей степени — в плазме в виде свободно растворенного газа. Затем кровь, попадая в артериальное русло большого круга кровообращения, транспортирует кислород к тканям всего организма. Последним этапом переноса кислорода в организме является передача его тка-

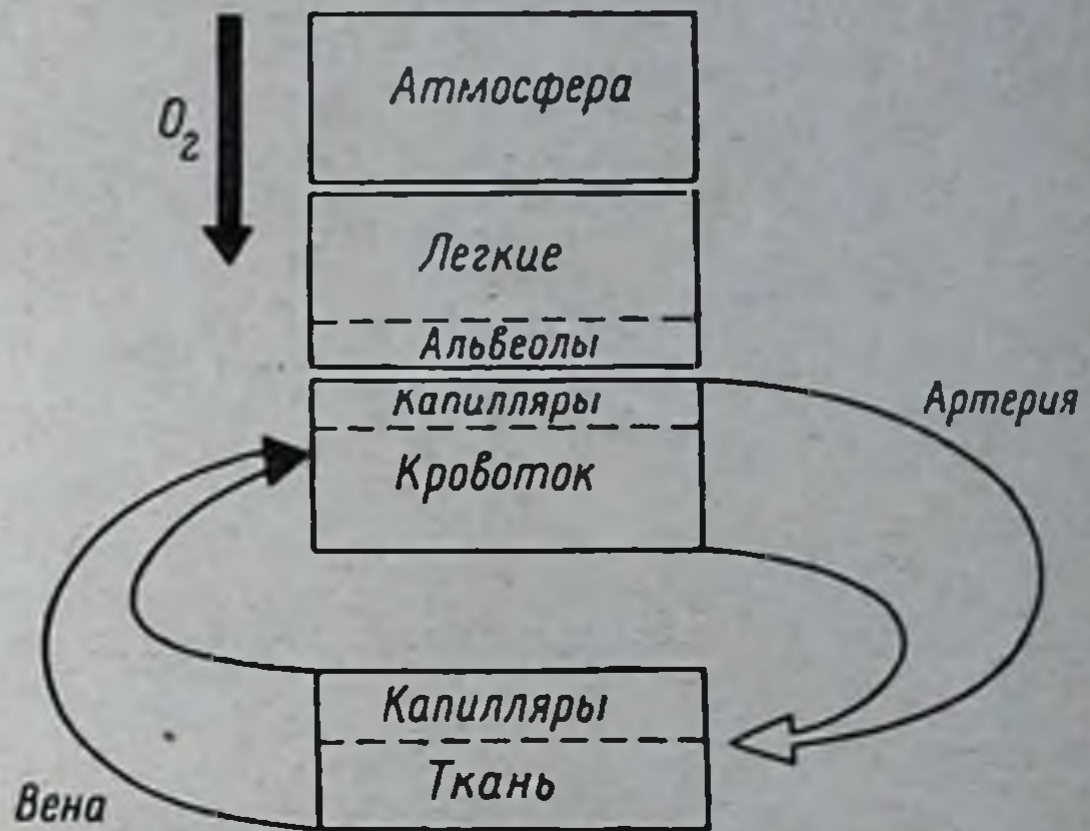


Рис. 15. Схема транспорта кислорода в организме.

ням, что именно этот последний процесс — связывание кислорода в клетках — единственный двигатель потока кислорода по каскаду концентраций. В этом проявляется высокая адаптивность системы транспорта кислорода — скорость его потока в ткани определяется скоростью потребления. Только после исчерпания всех резервных возможностей транспортной системы может возникнуть ситуация, когда скорость поступления кислорода отстает от скорости потребления клетками — развивается тканевая гипоксия.

Для создания искусственной системы адекватного транспорта представляет интерес рассмотрение функциональной мобильности отдельных звеньев цепи передачи кислорода и принципов управления транспортом кислорода в организме.

Как было известно еще Баркрофту (Barcroft, 1925), при снижении концентрации кислорода в среде увеличивается частота сердечных сокращений и вентиляция легких. Согласно Асмуссену и Чиоди (Asmussen, Chiodi, 1941), Алверду и Броди (Alverdy, Brody, 1948), Бернталу с сотр. (Bernthal et al., 1951), повышение частоты сердечных сокращений при гипоксии возникает как рефлекторно, вследствие возбуждения каротидных телец, так и в результате влияния аортальных хеморецепторов.

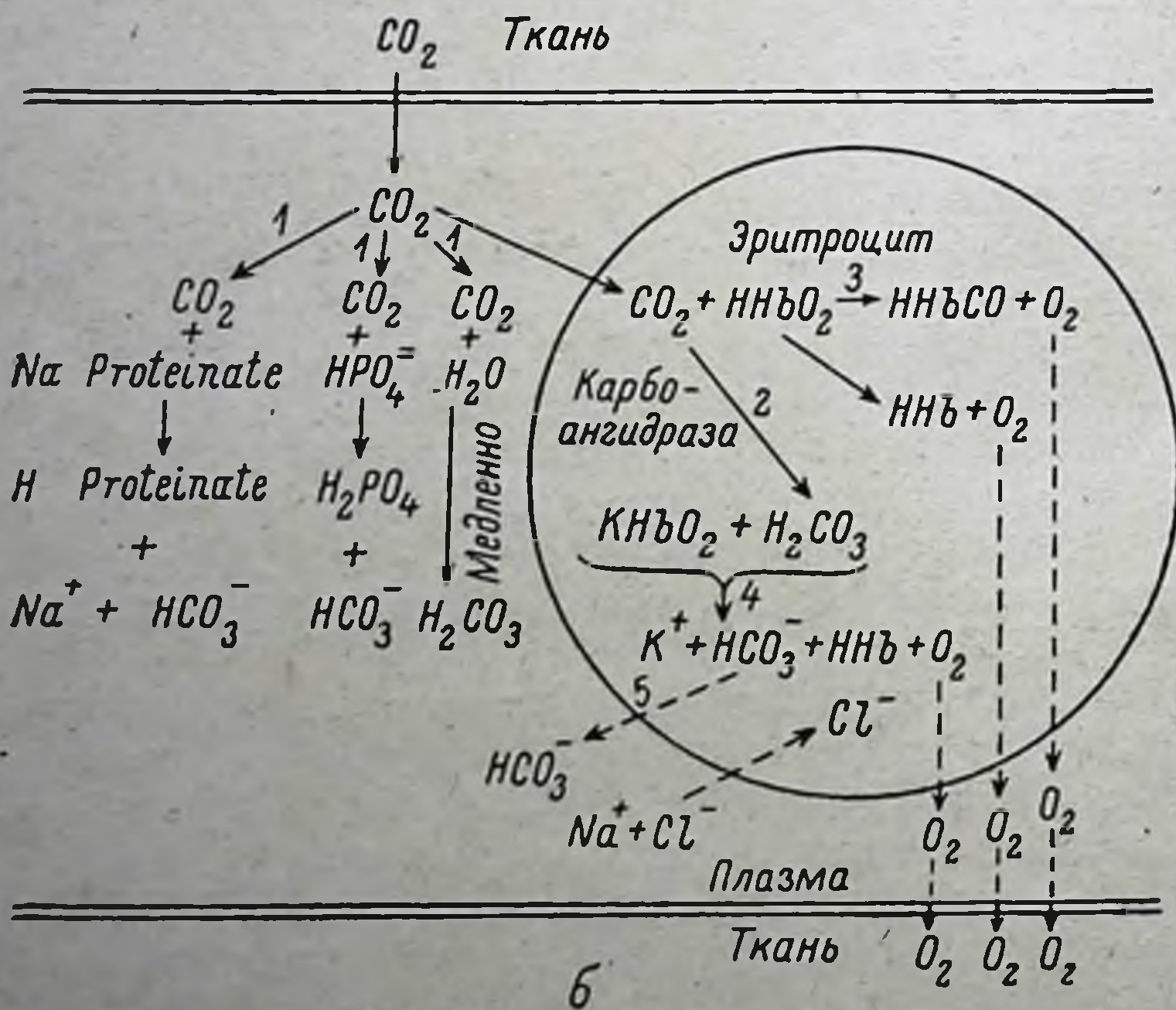
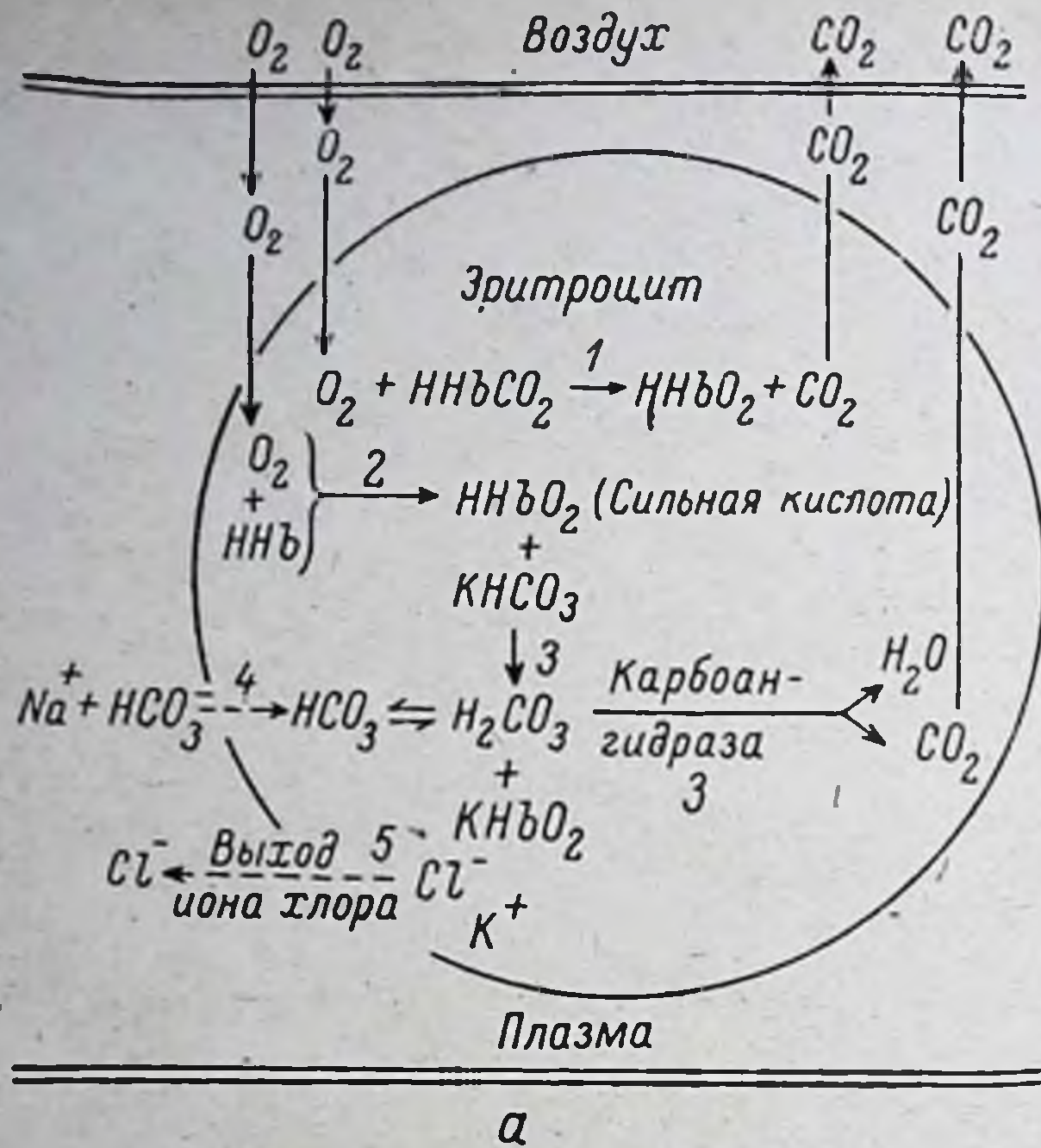


Рис. 16. Химические изменения в капиллярах альвеол (а) и тканей (б) при транспорте O_2 и CO_2 (по: Kugelmass, 1959).

1—5 — последовательность реакций.

Регуляция дыхания осуществляется также рефлекторно и гуморально, причем в случае гипоксии наиболее отчетливо проявляется гуморальный механизм действия на дыхательный центр (Сергиевский, 1968). Корректирующее воздействие поступает от хеморецепторов каротидных синусов и дуги аорты (Сомгое, 1939; Маршак, 1961; Аничков и Беленький, 1962; Сергиевский, 1968, и др.), а также чувствительных элементов, расположенных в мозговых венах, в диафрагме и мышцах грудной клетки (Маршак, 1961, и др.). Наряду с этим обнаружено влияние различных отделов мозга на дыхательный центр (Сергиевский с сотр., 1973).

При воздействии на организм гипероксии также происходит изменение активности систем внешнего дыхания и кровообращения. Так, при дыхании чистым кислородом снижается частота сердечных сокращений (Сорокин, 1958, 1964; Daly, Bonduvant, 1962; Жиронкин и др., 1965, и др.), уменьшается величина минутного объема дыхания за счет снижения его глубины (Иванов, 1958), понижается частота дыхательных движений (Жиронкин, 1956; Жиронкин и др., 1965, 1966; Трошихин, 1967, и др.).

Имеются данные, указывающие на регуляцию передачи кислорода на уровне альвеоло-артериального барьера (Чарный, 1961; Cole, Bishop, 1963, 1967, и др.). Одним из механизмов, обеспечивающих изменение переноса газов на этом участке, является шунтирование капилляров легочных альвеол и попадание венозной крови непосредственно в артериальное русло (Науек, 1940; Рывкинд, 1948).

Важная роль в обеспечении тканей кислородом, согласно их запросу, принадлежит регуляции периферического кровотока. Он изменяется в соответствии со сдвигом потребления кислорода тканями. Такой характер гемодинамики выявлен для скелетных мышц, находящихся в покое или активном состоянии (Fales et al., 1960; Bass, 1962), а также для сердца (Кисин, 1964; Rodbard et al., 1964). Важную роль в осуществлении этих сосудистых реакций, регулирующих кислородный режим тканей, выполняют появляющиеся в крови вазоактивные вещества. Так, при ишемии почки в эксперименте кровь, оттекающая от органа, расширяет сосуды подключаемой конечности (Scott et al., 1965), а коронарная кровь увеличивает кровоток в легких в условиях сердечно-легочного комплекса при ишемии сердца (Nelemans, 1951). В пользу возникновения в таких случаях специфических веществ, а не простого снижения уровня кислорода, говорят данные о сохранении вазоактивных свойств крови анемизированных животных и при дополнительной ее оксигенации (Rothei, Selkurt, 1961). Результаты исследований с гипероксией указывают на то, что кислород обладает сосудосуживающим действием (Barnes et al., 1956; Соловова, 1967, и др.).

В настоящее время выявлен широкий спектр веществ, влияющих на тонус периферических сосудов. Установлено, что таким действием обладают метаболиты энергетического обмена: угле-

кислота, молочная, пировиноградная кислоты и компоненты цикла Кребса (Molnar et al., 1962; Rapela et al., 1963; Seber, Schwinghamer, 1965; Frohlich, 1965). Одним из возможных механизмов их воздействия на тонус сосудов является влияние метаболитов на щелочной резерв и связанную с ним величину рН. Снижение этого параметра в крови вызывает расширение, а возрастание — сужение сосудов (Левтов, 1967). Наряду с этим регулирующее воздействие на кровоток оказывает ряд специфически активных вазодилататоров и вазоконстрикторов.

Необходимо указать на различную степень участия разных участков русла в регуляции кровотока, так как реактивность гладких мышц сосудов не везде одинакова. Наибольшая чувствительность к нервным и химическим влияниям отмечается в артериолах и венулах. Они способны к более быстрой вазоконстрикции и дилатации. В то же время артерии диаметром 200 мкм и больше выполняют в основном транспортную функцию и не играют существенной роли в изменении периферического сопротивления сосудов. Все это необходимо учитывать, решая задачу создания адекватного кровотока в изолированном органе.

Для изучения кислородного режима организма или органа важно определение динамической характеристики транспорта кислорода. Один из приемов — расчет каскада парциальных давлений кислорода в транспортной системе (Коваленко, 1966, 1973; Лауэр, Колчинская, 1966, и др.) (рис. 17). Применение в качестве основного показателя парциального давления кислорода обосновывается тем, что главным фактором, лимитирующим поступление газов в организм, служит диффузионный процесс, а напряжение газов характеризует диффузионную проникающую способность для молекул данного газа. Этот методический прием дает возможность определять роль каждой ступени каскада в лимитировании кислородного потока. Он чувствителен к перестройкам в схеме транспорта кислорода при изменении условий среды или потребности в нем.

Согласно закону Фика, количество вещества dm , диффундирующего за время dt через площадь S пропорционально изменению концентрации на единицу расстояния или градиенту концентрации

$$\frac{dm}{dt} = DS \left(\frac{dc}{dx} \right), \quad (1)$$

где D — коэффициент диффузии.

Основными факторами, определяющими интенсивность диффузионных процессов в организме, являются градиенты концентрации переносимых компонентов, число функционирующих в ткани капилляров, скорость кровотока в них, а также проницаемость стенок капилляров для газов. В настоящее время известны значения P_{O_2} для всех участков транспорта кислорода в организме, включая клеточный уровень. Если P_{O_2} в капилляре соответствует 45 мм рт. ст., то для межклеточного пространства этот показатель резко

снижается до 1—10 мм рт. ст. (Wright, Sonnenschein, 1965; Whalen, Nair, 1970; Коваленко, 1973, и др.). Согласно Хиллу (Hill, 1928), взаимосвязь между P_{O_2} в ткани и расстоянием исследуемой точки от капилляра с учетом коэффициента диффузии выражается формулой

$$P_{O_2} = \frac{K}{4D} (r^2 - r_c^2) - \frac{2K}{4D} r_c^2 \ln \frac{r}{r_c} + P, \quad (2)$$

где K — потребление кислорода тканью; D — коэффициент диффузии кислорода в ткани; r — расстояние от капилляра до исследуемой точки; r_c — радиус капилляра; P — парциальное давление кислорода в капилляре.

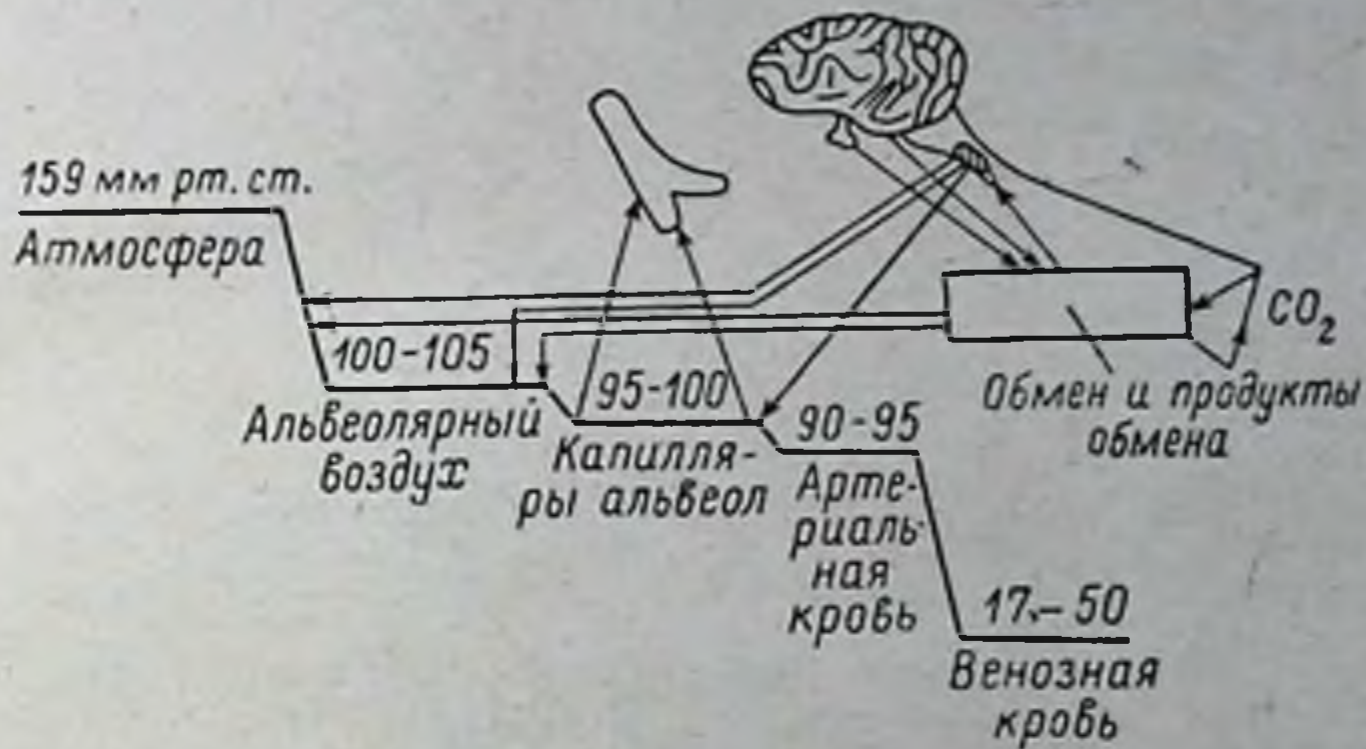


Рис. 17. Схема каскада парциальных давлений кислорода при поступлении его в организм (по: Коваленко, 1973).

дуемой точки; r_c — радиус капилляра; r_d — радиус границы диффузии (P); P_{O_2} — парциальное давление кислорода в капилляре.

На основании предположения, что на поверхности капилляра P_{O_2} равен 45 мм рт. ст., r_c равен 3 мкм, а K постоянно и не зависит от P_{O_2} , был определен радиус границы диффузии для скелетных мышц. Он оказался равным 110—115 мкм (Whalen, Nair, 1970). Характер изменения P_{O_2} с увеличением расстояния от центра капилляра показан на рис. 18.

В состоянии покоя соотношение открытых и закрытых капилляров составляет 1 : 15 (Krogh, 1919; Stainsby, Otis, 1964). Однако при определении этого показателя с учетом скорости кровотока и содержания в ней кислорода было получено отношение 1 : 1 (Wright, Sonnenschein, 1965).

Важная роль в обеспечении эффективного обмена газов между кровью и тканью принадлежит проницаемости капилляров. Для определения этого показателя производится измерение обмена инертного вещества в изолированной ткани при контроле величины кровотока (Renkin, 1959; Renkin, Rosell, 1962). Зависимость обмена инертного элемента между кровью и тканью от проницае-

мости капилляров и скорости перфузии выражается в общем виде следующей формулой (Kety, 1951):

$$C = \dot{Q} (C_a - C_v) / (C_a - C_t) = \dot{Q} [1 - \exp(-PS/\dot{Q})], \quad (3)$$

где \dot{Q} — кровоток; P — проницаемость капилляра; S — поверхность мембраны; C — капиллярный отток; C_a — концентрация вещества в крови артерии; C_v — концентрация вещества в крови вены; C_t — концентрация вещества в ткани.

Это уравнение применимо для растворов, которые остаются химически неизменными в крови и ткани. Требования, предъявляемые этим методом, заключаются в обеспечении постоянства во

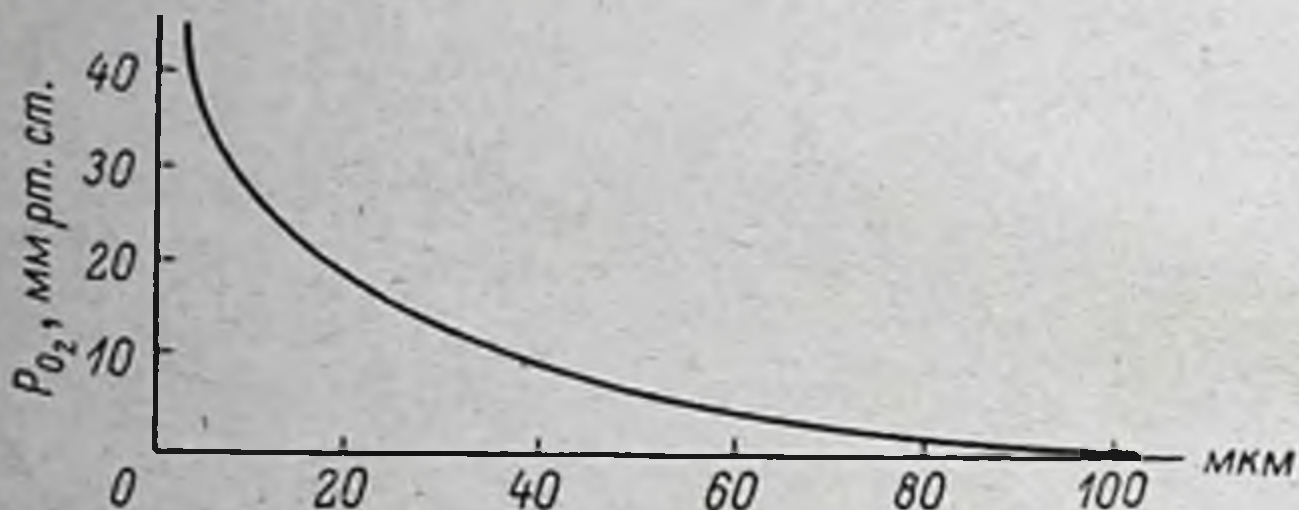


Рис. 18. Значение P_{O_2} в области капилляра (по: Whalen, Nair, 1971).

По оси абсцисс — расстояние от центра капилляра.

времени параметров C_a и C_v . Уравнение неприменимо для покоящихся систем, где показатели концентрации приближаются к равновесию, так как в этом случае ошибка для C будет много больше, чем для C_a , C_v , C_t . Однако при неустановившихся значениях концентрации инертного вещества это уравнение характеризует проницаемость капилляра, его можно использовать для оценки соответствующего вклада перфузии крови и диффузии при ограниченной скорости обмена инертного элемента между кровью и тканью (Renkin, 1959; Landis, Parrenheimer, 1962).

Кровоснабжение тканей осуществляется густой сетью капилляров. Согласно Крогу (Krogh, 1921), в 1 см^3 мозга белых крыс общая длина капилляров составляет около 1000 м, в работающей мышце — 6000 м, а в сердце — 11 000 м. При этом установлено отличие магистральных сосудов и капилляров не только по величине диаметра, но и по строению оболочки (Шахламов, 1967). Соотношение между площадью поперечного сечения, скоростью кровотока и величиной кровяного давления в различных отделах сосудистой системы дано на рис. 19. Среднее время нахождения эритроцита в капилляре, согласно экспериментальным данным, соответствует величине, определенной по падению P_{O_2} от артериального до венозного конца капилляра (Comroe et al., 1961) и равно в среднем 0.7 с.

Таким образом, транспорт кислорода к ткани является много-стадийным процессом, состоящим из цепи фазовых переходов и пространственных перемещений. Он обладает свойством, характер-

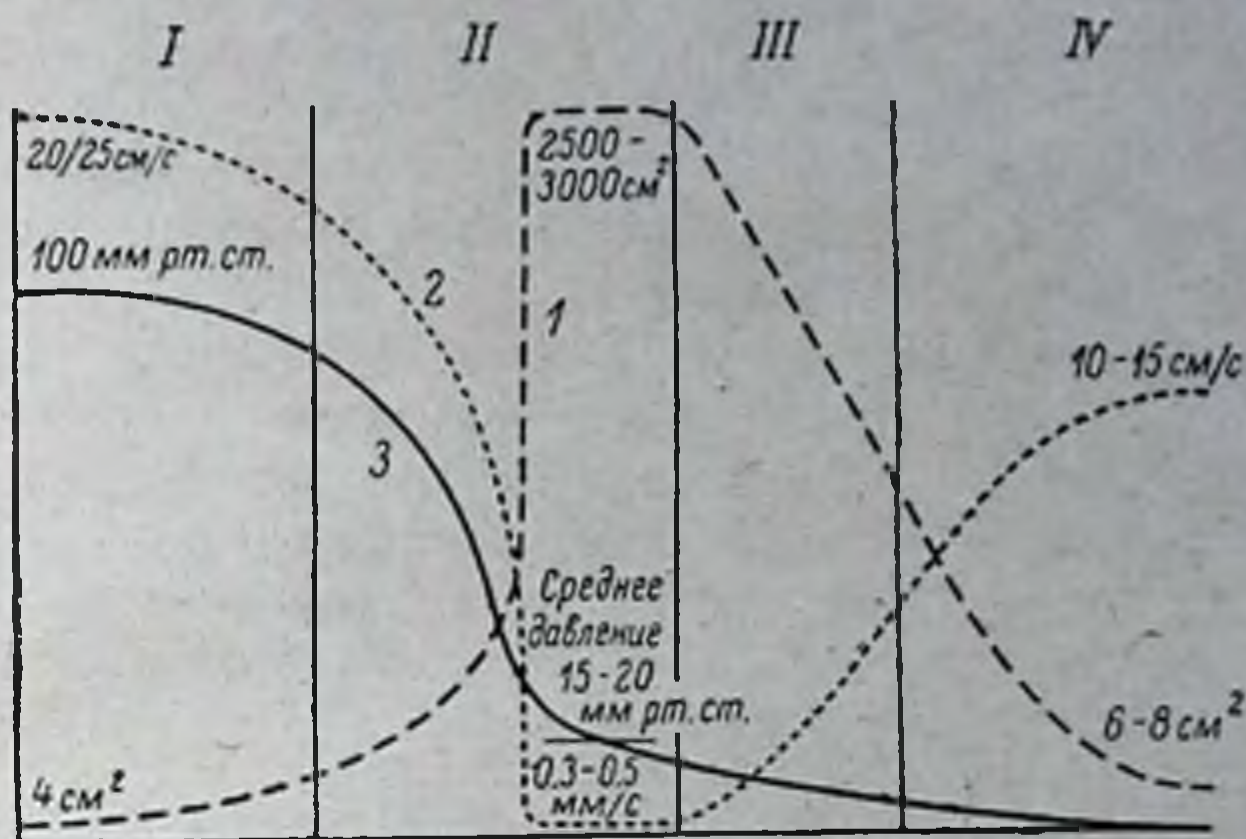


Рис. 19. Зависимость между общей площадью поперечного сечения (1), средней линейной скоростью кровотока (2) и величиной кровяного давления (3) в разных последовательных отделах системного сосудистого ложа в покое (по: Folkow, Neil, 1976).

I — отрезок аорта → артерии; II — артериолы → капилляры; III — венулы; IV — вены → полые вены.

ным для сложных реакций: эффективность всей системы зависит от интенсивности работы отдельных ее элементов и в конечном счете определяется скоростью реакции в лимитирующем звене.

Методы измерения содержания и скорости потребления кислорода в тканях

В условиях организма непосредственная оксигенация тканей осуществляется плазмой, однако количество растворенного в ней кислорода относительно невелико (0.31 мл O_2 в 100 мл крови). Основная роль в запасании кислорода и переносе его к тканям принадлежит эритроцитам. Наличие в них гемоглобина позволяет резко повысить эффективность аккумуляции кислорода. Содержание гемоглобина в крови в среднем составляет 16 г %. Каждый грамм гемоглобина связывает примерно 1.33—1.34 мл кислорода (коэффициент Гюфнера (Hüfner, 1894)).

Вычисление кислородной емкости гемоглобина выполняют по формуле

$$= \frac{\text{Кислородная емкость крови, в об. \%}}{\text{Гемоглобин, в г \%}} \cdot \text{Кислородная емкость гемоглобина} = \quad (4)$$

Однако величина кислородной емкости непостоянна и изменяется в различных условиях, обеспечивая в определенной степени компенсаторную реакцию. В норме она составляет около 23 об.%. Впервые содержание газов в крови было исследовано И. М. Сеченовым (1890). Так, им было найдено, что содержание кислорода в артериальной крови равно 21.6 об.%. В 1900 г. Холден предложил использовать химический способ для освобождения кислорода из крови с помощью феррицианида калия $K_3[Fe(CN)_6]$. Позднее этот метод был разработан Баркрофтом (Barcroft, 1925) для малых количеств крови (1—0.1 мл). В дальнейшем большое распространение получило манометрическое определение газов крови в аппарате Ван-Слайка, в основе которого лежит сочетание указанных физического и химического методов (Сыркина, 1956). Определив в аппарате Холдена содержание кислорода в крови, расчет парциального давления проводят по формуле

$$\begin{aligned} & \text{Парциальное давление газа} = \\ & \text{Количество газа, в об. \% (Атмосферное давление —} \\ & \text{давление водяных паров)} \\ & = \frac{\quad}{100} \end{aligned} \quad (5)$$

Количество поглощаемого кровью кислорода пропорционально количеству гемоглобина и парциальному давлению кислорода. Существенно отметить, что содержание кислорода в венах в норме не падает ниже 16 об.%. Таким образом, артерио-венозная разница по кислороду составляет 5—8 об.%, и в среднем равна 6 об.%. Только эта часть переносимого кислорода используется клетками. Остальная (большая) часть служит для обеспечения градиента давления, необходимого для диффузии кислорода, и является резервом.

Процент насыщения кислородом артериальной и венозной крови определяется отношением содержания кислорода данного объема крови к ее полной кислородной емкости. Величина этого показателя для артериальной крови у большинства животных и человека при нормальных условиях в состоянии относительного покоя и атмосферном давлении лежит в пределах 95—98%. Для оценки эффективности обеспечения тканей кислородом Крог (Krogh, 1919) ввел понятие коэффициента утилизации (КУ):

$$КУ = \frac{\text{Артерио-венозная разница по кислороду}}{\text{Кислородная емкость венозной крови}} \quad (6)$$

Наибольшее распространение получил предложенный Эппингером процент подсчета утилизации кислорода (ПУ):

$$ПУ = \frac{\text{Артерио-венозная разница по кислороду} \times 100}{\text{Содержание кислорода в артериальной крови}} \quad (7)$$

Этот показатель хорош тем, что для доставки кислорода тканям большее значение имеет истинное его содержание в артериаль-

ной крови в конкретном случае, а не возможная емкость крови вообще (Георгиевская, 1960).

Применение манометрического способа позволяет определить основные показатели транспорта и потребления кислорода в тканях организма. Однако этот метод обладает рядом недостатков: трудоемкостью, продолжительностью анализов, а также необходимостью выделения и гомогенизации ткани в случае изучения тканевого дыхания. Эти отрицательные стороны в значительной степени устраняются при использовании полярографического метода.

В основе полярографии лежит зависимость рода вещества, восстанавливаемого на индикаторном электроде, от потенциала последнего. При этом величина регистрируемого тока пропорциональна концентрации определяемого вещества. С 1922 г., когда Гейровским (цит. по: Neugovsky, Kuta, 1965) были заложены основы полярографического анализа, границы его применения резко расширились. Разработка метода для твердых электродов позволила использовать этот методический прием в физиологических исследованиях для определения P_{O_2} и дыхания тканей биологических объектов. Развитие микроэлектродной техники сделало возможным создание индикаторных электродов с диаметром рабочей поверхности до долей микрона. Открылась возможность проводить исследования миграции кислорода в организме на клеточном уровне. Было обнаружено близкое соседство в ткани областей с резкими различиями уровня P_{O_2} , изменяющегося от единиц до десятков миллиметров ртутного столба (Whalen, Nair, 1970). В связи с этим среднее значение P_{O_2} принято измерять с помощью микроэлектродов на больших участках ткани — «кислородных полях» или получать усредненные величины этого параметра с помощью электрода, имеющего диаметр около 1 мм (Коваленко, 1973). Широкое применение получили полярографические электроды также в разнообразных экспериментах *in vitro*. Подробно основы метода, классификация электродов и подготовка их к измерениям рассмотрены в ряде работ (Clark et al., 1953; Neugovsky, Kuta, 1965; Clark, Sacks, 1968; Гуланян и др., 1973; Руководство по изучению биологического окисления, 1973; Коваленко с сотр., 1975).

Задачи перфузии для обеспечения адекватного транспорта кислорода в клетки изолированного органа

Одним из основных условий достижения адекватной перфузии органа является осуществление оксигенации циркулирующей крови в системе искусственного гомеостаза в условиях, максимально приближающихся к организменным. Нарушение режима насыщения крови кислородом может приводить к изменению газового баланса в перфузате, отклонению кислотно-щелочного равновесия среды, преждевременному износу клеток крови и необратимому окислению гемоглобина в метгемоглобин.

В условиях организма регуляция транспорта кислорода осуществляется на всех уровнях его переноса от альвеол до капилляров. Важно осуществить этот принцип и в системе искусственного кровообращения. Эта задача решается автоматическим поддержанием на физиологическом уровне основных параметров перфузии: P_{O_2} , pH, артериального давления, вязкости, осмолярности и температуры крови или перфузата. Возникает задача выбора критерия, позволяющего осуществлять слежение за состоянием органа в процессе перфузии, а также оценивать уровень кислородного запроса его тканей. Решение этой задачи делает возможным коррекцию режима кровообращения органа согласно уровню активности тканей, т. е. реализацию в условиях искусственного гомеостаза автоматической регуляции потока кислорода к культивируемому органу, что при сохранении других параметров на физиологическом уровне обеспечивает высокую степень приближения условий перфузии к организменным.

Методы и приборы для оксигенации крови

Оксигенация при искусственном кровообращении. Учитывая характер связи между интенсивностью основного обмена и весом тела (рис. 20), Кларк (Clark, 1960a, 1960b) показал зависимость

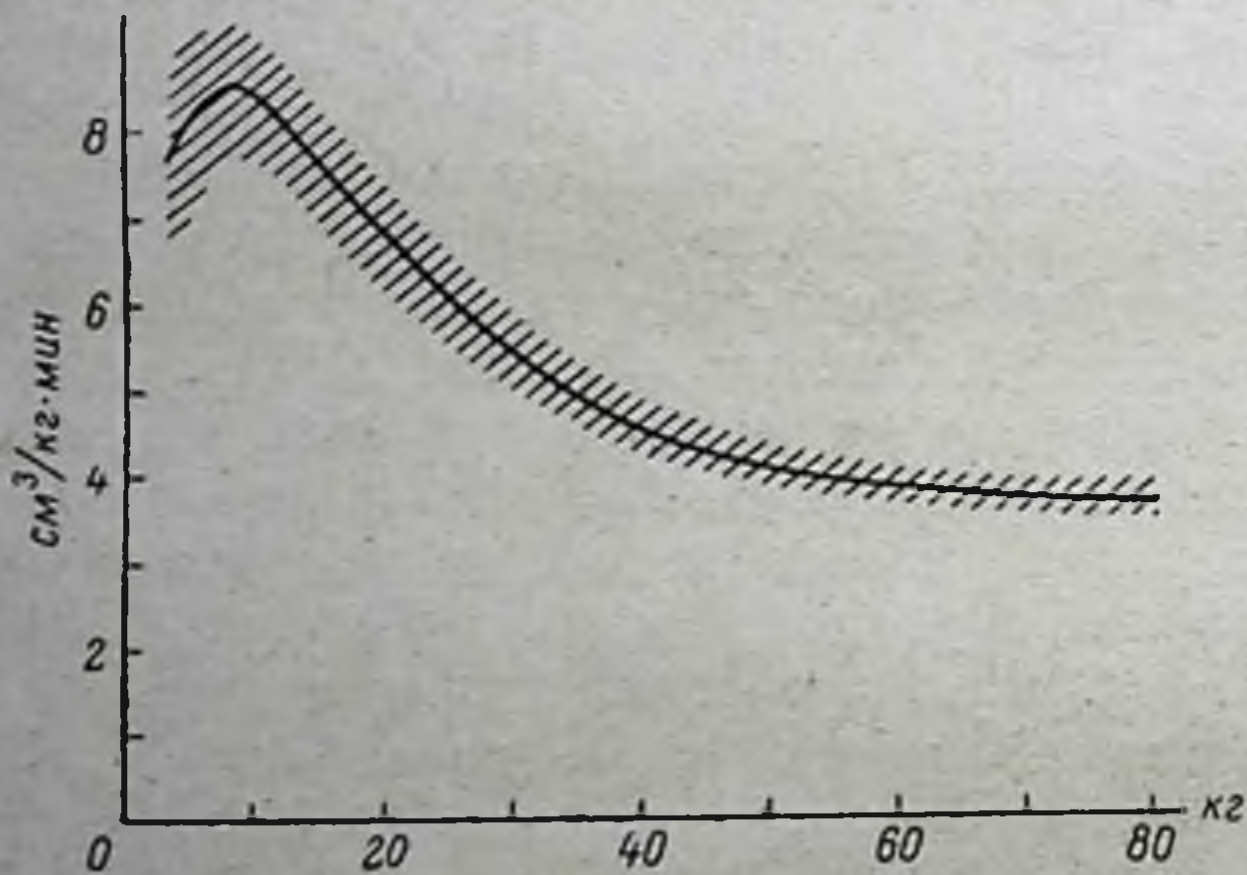


Рис. 20. Зависимость потребности в кислороде (по оси ординат) от веса тела (по оси абсцисс) у человека (по: Clark, 1960).

Заштрихованная область включает разброс данных 80% здоровых людей.

должной объемной скорости перфузии и содержания гемоглобина от веса тела (рис. 21). Резкое повышение объемной скорости перфузии наблюдается в диапазоне 5—20 кг веса.

Адекватность искусственного кровообращения в значительной степени определяется наличием эффективной системы искусствен-

ного внешнего дыхания и обеспечением оптимальных параметров гемодинамики.

Известны различные модификации оксигенаторов, однако среди них можно выделить основные типы: пузырьковый, пленочный и мембранный. В первых двух приборах подаваемый газ непосредственно контактирует с кровью, в третьем — циркулирующая кровь отделена от газовой фазы тонкой пленкой, пропущенной для кислорода. Этим последний способ в большей степени приближается к условиям организма. Но все типы оксигенаторов значительно менее эффективны, чем легкие. Кроме того, в окси-

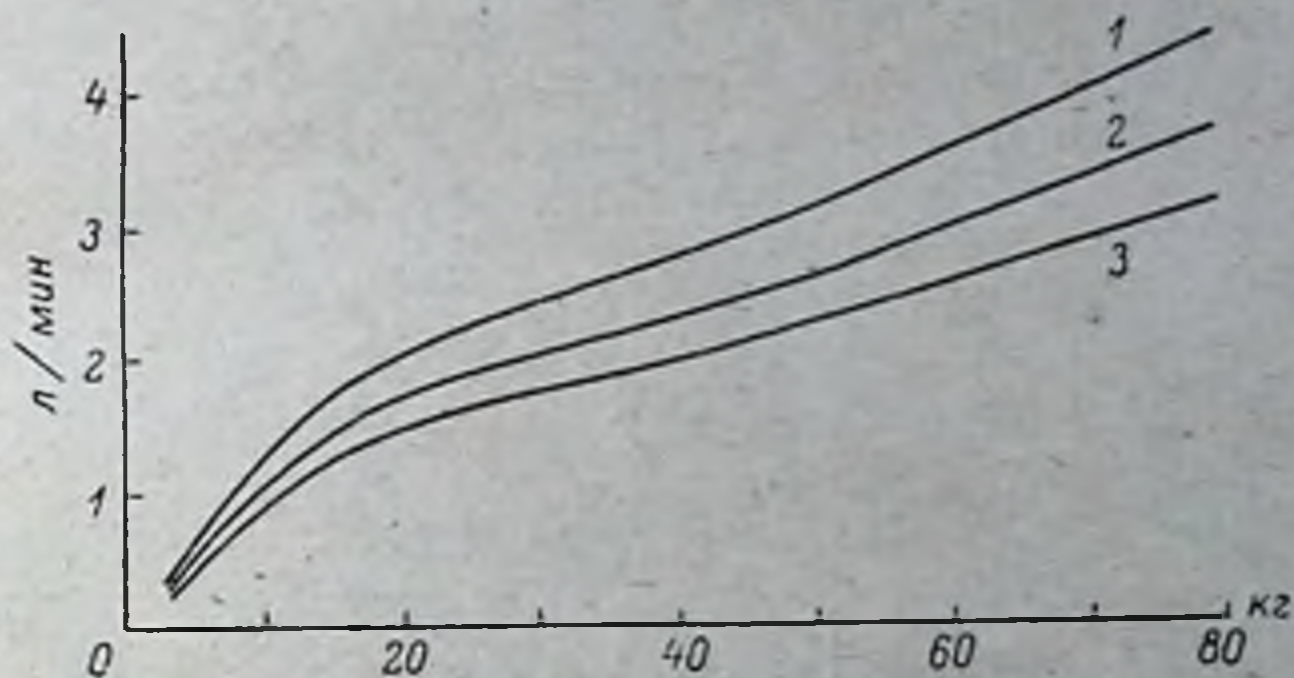


Рис. 21. Номограмма объемных скоростей перфузий (по оси ординат) в зависимости от веса тела и концентрации гемоглобина (по: Clark, 1960).

По оси абсцисс — вес. Концентрация гемоглобина, в г%:
1 — 10; 2 — 12; 3 — 14.

генаторах происходит усиленный гемолиз и ускоренное старение эритроцитов, что обусловлено нефизиологичными условиями аэрации крови в искусственных легких.

Различия между условиями оксигенации крови в организме и при общем искусственном кровообращении были рассмотрены Галлетти и Бричером (Galletti, Brecher, 1966). На рис. 22 показана гистограмма барьеров при газообмене в легких и оксигенаторе, составленная на основании данных Ронгтона и Раппа (Rongton, Rapp, 1958). В первом случае большое сопротивление движению газа к эритроцитам оказывает мембрана капилляров альвеол, тогда как тонкий слой плазмы в капиллярах легких вызывает сравнительно небольшое торможение. В условиях искусственных легких оксигенации подвергается относительно толстый слой крови в 20—60 слоев эритроцитов, и основным препятствием при поступлении кислорода к эритроцитам служит путь в плазме. В связи с тем что скорость всех процессов, участвующих в переносе кислорода к эритроцитам, может быть повышена увеличением парциального давления, с целью достижения максимальной эффективности в этом звене системы искусственного кровообращения

в оксигенатор в большинстве случаев подают газ, содержащий до 95—100% кислорода.

Однако это приводит к изменению физиологического соотношения парциальных давлений газов крови и практической замене их каскада на P_{O_2} , достигающее 760 мм рт. ст. (Clark et al., 1953). Такое решение задачи максимального переноса кислорода имеет ряд отрицательных сторон. Так, в связи с нарушением при искусственном кровообращении газового баланса возможны спастиче-

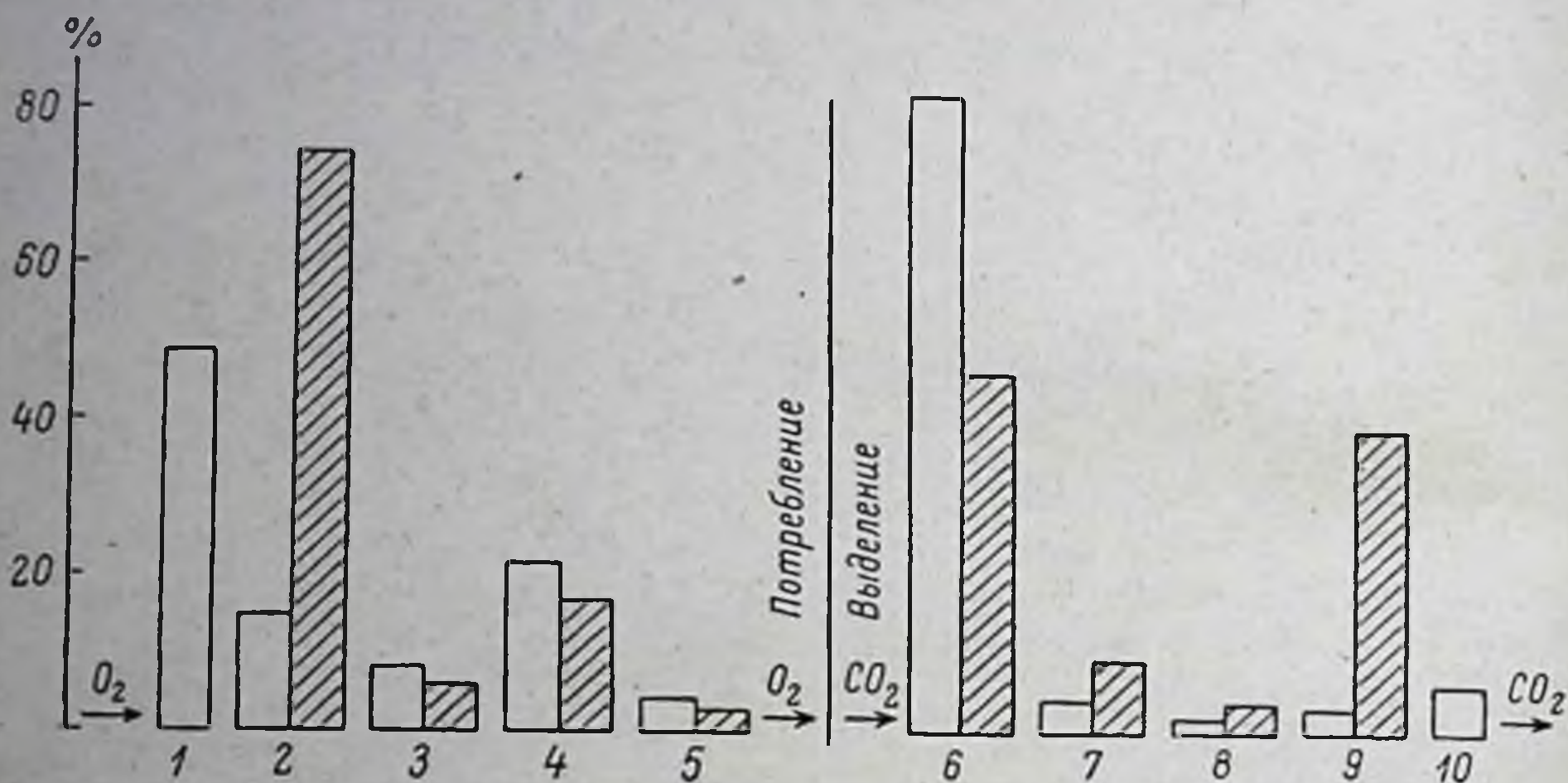


Рис. 22. Характеристика процессов скорости прохождения кислорода и углекислого газа в легких (светлые столбики) и в оксигенаторе (заштрихованные столбики).

По вертикальной оси — резистентность последовательных процессов. 100% соответствует сумме высот прямоугольников 1—5 или 6—10 (для легких или оксигенатора). 1 — прохождение кислорода через мембрану капилляра; 2 — диффузия в плазме; 3 — диффузия через мембрану эритроцита; 4 — прохождение внутрь эритроцита; 5 — реакции гемоглобина и O_2 в эритроците; 6 — реакции гемоглобина с CO_2 в эритроците; 7 — прохождение CO_2 из середины к поверхности эритроцита; 8 — выход CO_2 из эритроцита через его мембрану; 9 — диффузия CO_2 в плазме; 10 — прохождение CO_2 через мембрану капилляра. Стрелки — направление прохождения газов.

ские реакции сосудов, вспенивание крови в русле и возникновение эмболии, образование перекисных соединений и т. д. (Баллюзек, Скорик, 1962).

Большими преимуществами обладает метод использования естественных легких. Однако применение этого органа в системах искусственного кровообращения ограничено относительной непродолжительностью его функционирования (2—4 часа), что в значительной степени обусловлено отличием условий жизнедеятельности легких в системе от организменных (Брюхоненко, 1929; Erslev et al., 1965, и др.). Таким образом, создание адекватного легким оксигенатора все еще остается нерешенной проблемой. Разработанные в связи с развитием техники искусственного кровообращения оксигенаторы, хотя и представляют собой последнее достижение медицинской техники в этой области, рассчитаны на

сравнительно кратковременное поддержание искусственного кровообращения. При культивировании органов мы вынуждены их использовать за неимением лучших.

Рассмотрим устройство основных видов современных оксигенаторов. Применяемые в аппаратах экстракорпорального кровообращения оксигенаторы делятся на группы по принципам артериализации крови. Оксигенирование венозной крови методом пропускания (барботирования) через нее мелких пузырьков кислорода или смеси газов впервые предложил Шредер (Schroder, 1882). При пропускании пузырьков газа через кровь образуется устойчивый пенный столб благодаря высокому поверхностному натяжению плазмы, обусловленному входящими в ее состав белками и липидами. С момента подъема пены и до ее разрушения происходит интенсивный газообмен крови с воздушной средой. В этой фазе площадь поверхности крови, контактирующей с подводимым в оксигенатор газом, максимальна за счет большого количества мелких пузырьков газа. Кровь быстро насыщается кислородом и отдает углекислый газ.

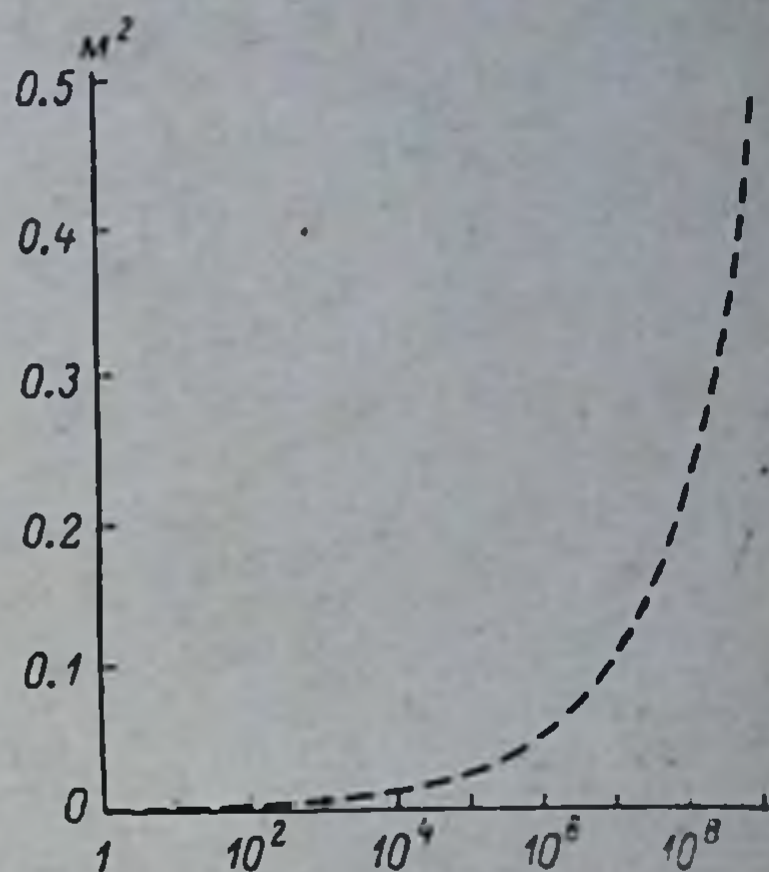


Рис. 23. Зависимость суммарной площади поверхности пузырьков (по оси ординат) от количества пузырьков (по оси абсцисс), образующихся из 1 мл газа (по: Galletti, Brecher, 1966).

Т а б л и ц а 2

Зависимость площади поверхности пузырьков газа от их размеров и количества в оксигенаторе (Galletti, Brecher, 1966)

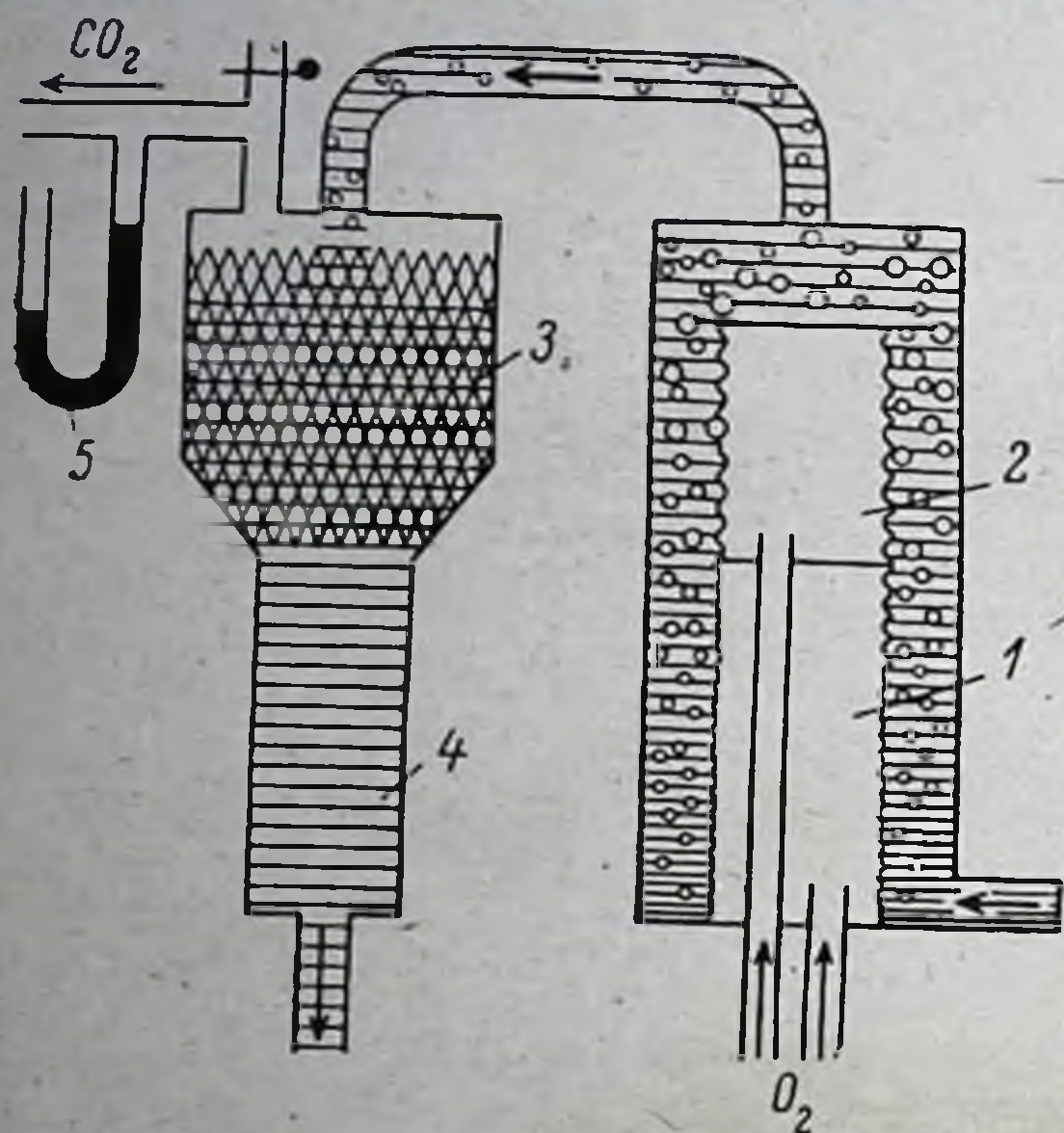
Количество пузырьков	Общая площадь, см ²	Диаметр, мм
1	4.8	12.4
10 ¹	10.4	5.8
10 ²	22.4	2.7
10 ³	48.3	1.2
10 ⁴	104.0	0.58
10 ⁵	224.0	0.27
10 ⁶	483.0	0.12
10 ⁷	1040.0	0.058
10 ⁸	2240.0	0.027
10 ⁹	4830.0	0.012

Так как с уменьшением радиуса пузырька его объем уменьшается быстрее, чем поверхность (рис. 23; табл. 2), размер пузырька для оксигенации крови должен быть минимальным (Clark, 1960). Крупные пузырьки эффективны для удаления углекислоты, а мелкие, увеличивающие контактную поверхность, — для насыщения крови кислородом. Компромиссное решение определяется эмпирически. Регулировку соотношения крупных и мелких пузырьков можно осуществлять тремя способами: 1) увеличением потока кислорода через пористый материал, контактирующий с кровью, при этом растет число крупных пузырьков; 2) понижением напряжения на поверхности между кровью и пористым ма-

териалом, при этом растет число крупных пузырьков; 2) понижением напряжения на поверхности между кровью и пористым ма-

терналом — растет число мелких пузырьков; 3) применением в конструкции пенообразователей крупнопористого и мелкопористого материала с разделенными потоками кислорода.

Оксигенатор пузырькового типа изображен на рис. 24 (Clark et al., 1950a, 1950b). Внутри стеклянной камеры расположены два изолированных друг от друга цилиндра из стекла (мелкопористого) с отдельными линиями кислорода. Пеногаситель и отстойник



крови расположен в другой стеклянной камере. Выполнение оксигенатора из двух последовательно соединенных камер упрощает конструкцию, но устройство теряет компактность. Применение отдельных линий подачи газа позволяет регулировать рН крови изменением остаточного количества углекислоты в газообменнике.

Широкое распространение за рубежом получил оксигенатор пузырькового типа конструкции Уолла (Wall et al., 1956). Модель проста по устройству и хорошо сочетается в себе технику пенообразования с пеногашением. Оксигенатор эффективен, несложен в регулировании, мало чувствителен к колебаниям уровня перфузата и

Рис. 24. Пузырьковый оксигенатор Кларка (по: Galletti, Brecher, 1966).

1 — стеклянный цилиндр, образующий мелкие пузыри; 2 — стеклянный цилиндр, образующий крупные пузыри; 3 — пеногасительная камера; 4 — осадочная камера (отстойник); 5 — манометр ртутный.

заполняется небольшим количеством крови. Он представляет собой вертикально расположенную трубку, в которую подается газ и венозная кровь. Вспениваясь, кровь поднимается вверх — в цилиндр большого диаметра, расположенный наклонно. Внутренняя поверхность этого цилиндра покрыта пеногасящим веществом, при соприкосновении с которым происходит разрушение пены. Артериальная кровь стекает вниз по длинной спиральной трубке, в которой кровь освобождается от мелких неразрушенных пузырьков. На выходе из отстойника расположен фильтр. Существует большое количество модификаций оксигенатора Уолла с улучшенной пеногасительной камерой и видоизмененным резервуаром артериализованной крови. Некоторые из них выполняются из пластика для одноразового употребления. Принцип пузырьковой или пенной оксигенации использовал также Джордан (Jordan, 1958), изготовив последовательный пузырьковый оксигена-

тор из двух труб разных диаметров, соединенных общей противопенной камерой. Кислородораспределительный диск выполнен из нержавеющей стали и имеет 250 отверстий.

Простое газообменное устройство из пластика было предложено Хьюманом (Hуman, 1959). Оксигенатор имеет стерильную упаковку, он рассчитан на короткие перфузии: после 60—90 мин эффективность пеногашения падает вследствие истощения пеногасителя. Модификацией газообменника Хьюмана является пластиковый сумчатый оксигенатор Ригга—Кувзгаарда (Rygg, Kuvsgaard, 1956), обеспечивающий перфузию продолжительностью до 10 час.

Объединение пузырьковой и пеногасящей камер в одну привело к созданию концентрических пузырьковых оксигенаторов. Они компактны и обладают меньшими теплопотерями. Такую конструкцию оксигенатора (рис. 25) предложил Голлан (Gollan, 1959) для перфузии малых объемов в гипотермических условиях. Оксигенатор имеет газораспределитель, выполненный из стеклянных фильтров, позволяющих значительно уменьшать размер пузырьков. Пузырьковая камера представляет собой стеклянный цилиндр, внутри которого проходит стеклянная спираль с циркулирующей тепло-хладообменной жидкостью, что позволяет термостабилизировать процесс оксигенации крови на заданном уровне. Пеногасительная камера имеет пластическую фибру, покрытую антипенным веществом. В целом модель проста, легко монтируется и эффективна в отношении насыщения крови кислородом. Однако углекислый газ удаляется плохо из-за преобладания мелких пузырьков при пенообразовании, поэтому она применяется в основном для гипотермических перфузий, хотя существует ряд модификаций этой конструкции и для нормотермии.

Из отечественных пузырьковых оксигенаторов наибольшее распространение получили модели, предложенные Ф. В. Баллюзеком (1962а, 1962б), Ф. В. Баллюзеком и М. Н. Фаршатовым (1965), Н. М. Амосовым и сотр. (1962) и А. А. Писаревским (1967). В оксигенаторе, имеющем небольшой объем первичного заполнения, примененном в аппарате искусственного кровообращения ИСХФ-1, А. А. Писаревский оригинально совместил процесс оксигенации с теплообменником. Своеобразное решение схемы газообмена при искусственном кровообращении найдено в конструкции аппарата «сердце—легкие» (модель ИСХФ-4; рис. 5),

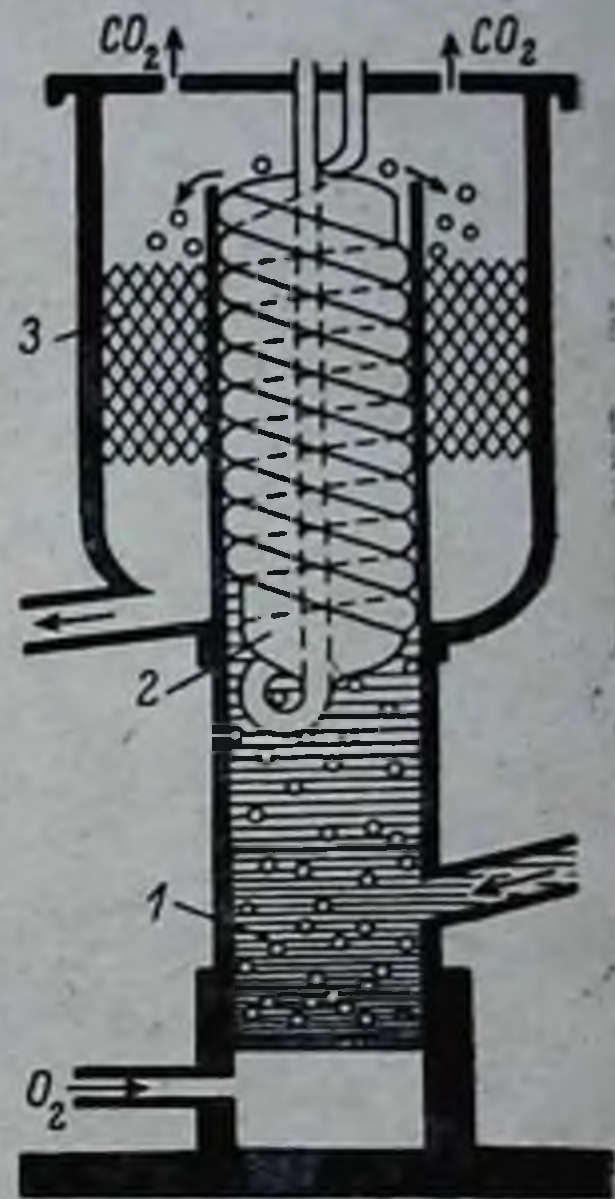


Рис. 25. Концентрический пузырьковый оксигенатор (по: Galletti, Brecher, 1966).

1 — пузырьковая камера;
2 — теплообменник;
3 — пеногасительная камера.

разработанного и изготовленного Институтом химической физики АН СССР совместно с Институтом сердечно-сосудистой хирургии

АМН СССР. В нем использован принцип непультсующего нагнетания крови в сосудистое русло под повышенным давлением кислорода до 300 мм рт. ст. (Бражников и др., 1971, 1974). Для создания пульсирующего кровотока возможно применение устройства, перекрывающего артериальное русло с управляемой частотой. Повышение давления в газообменном устройстве позволило увеличить эффективность оксигенации крови и исключить артериальный насос. Производительность газообменника регулируется изменением высоты оксигенатора, газообменная камера которого имеет телескопическую конструкцию и может увеличиваться почти в два раза (рис. 26). В оксигенаторе предусмотрено саморегулирующееся устройство стабилизации заданного уровня артериализованной крови в отстойнике. Соотношение углекислого газа и кислорода в газообменном устройстве поддерживается автоматически. Оксигенатор выполнен из термостойкого стекла и нержавеющей стали, это позволяет стерилизовать его термической обработкой.

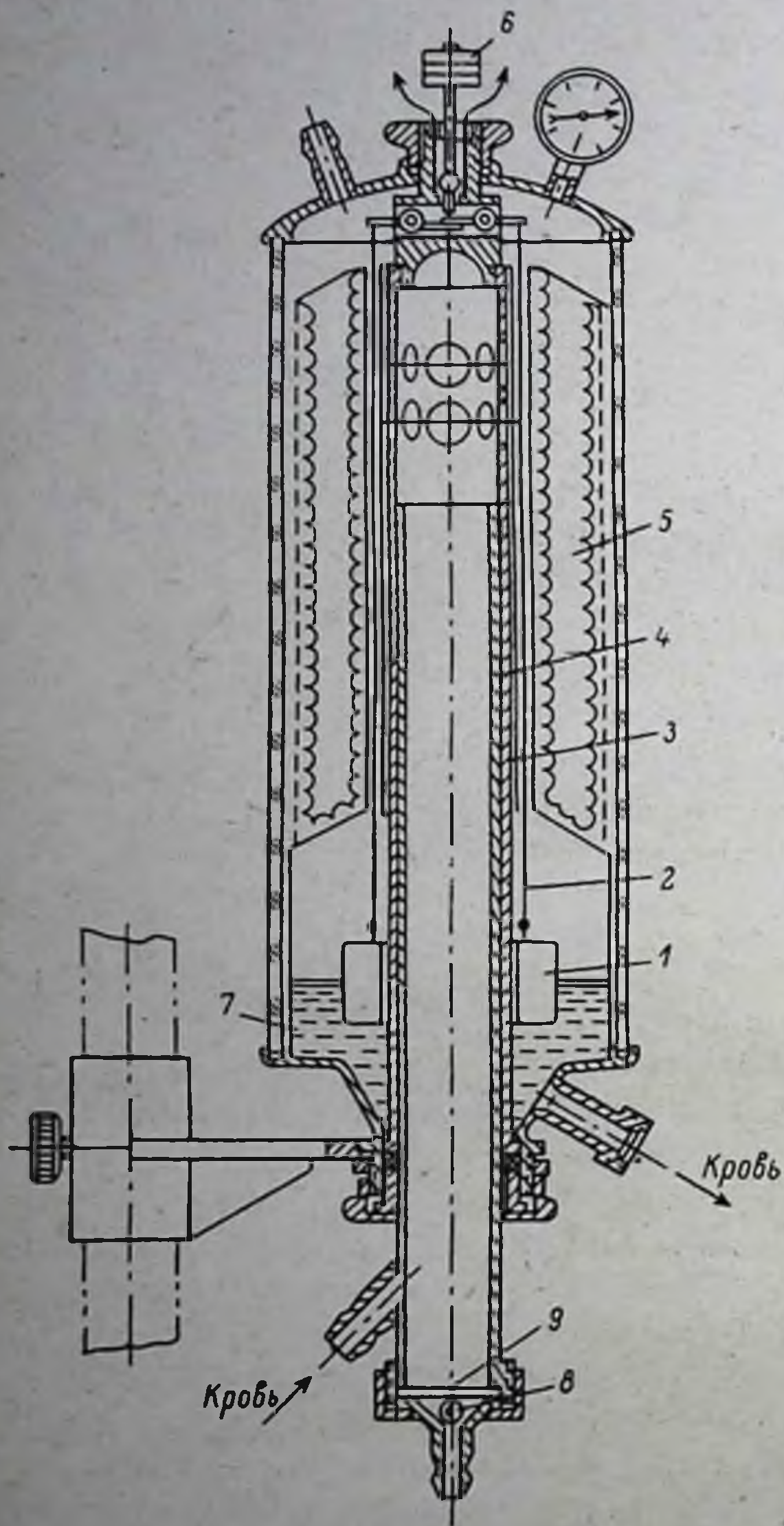


Рис. 26. Оксигенатор пузырькового типа (по: Бражников и др., 1971).

1 — боек; 2 — тяга; 3, 4 — неподвижная и подвижная трубы газообменной камеры; 5 — пеногасительный патрон; 6 — гравитационный пневматический клапан; 7 — отстойник артериализованной крови; 8 — обратный клапан; 9 — газораспределительный диск.

Аппарат искусственного кровообращения ИСЛ-3 для регионарной перфузии (Баллюзек, Фаршатов, 1965) содержит концентрический вертикальный пузырьковый оксигенатор-теплообменник из нержавеющей стали, допускающий стерилизацию паром.

Пенная камера оксигенатора имеет наружную рубашку, в которой циркулирует термостабилизирующая жидкость. В пеногасительной камере находятся перфорированные пластины, покрытые антипенообразователем. Градуированный отстойник, являющийся резервуаром крови и контролирующей ее расход, выполнен отдельно.

В пузырьковых или пенных оксигенаторах кровь и газ подводятся в одном направлении, обычно снизу вверх, и весь объем поступающей крови превращается в пену. В пенно-пленочных оксигенаторах кровь и газ движутся в противоположных направлениях (кислород снизу, а кровь сверху). При этом образуется такой же пенный столб, как в пенном оксигенаторе, но, помимо этого, венозная кровь распределяется в виде капель и растекается по пенному столбу тонкой пленкой. В этом случае газообмен происходит не только в пенной фазе, но и при контакте пленки с газом, чем достигается его большая эффективность. В этих оксигенаторах, в отличие от пузырьковых, постоянно поддерживается необходимый столб пены и разрушается только ее избыток, причем на образование пены уходит небольшая часть крови.

Впервые этот принцип оксигенации применили в 1937 г. С. С. Брюхоненко и В. Д. Янковский (1964) в своем аппарате «Автожектор» (рис. 27). Насыщение венозной крови, поступающей от организма, в искусственных легких ведется подогретым и увлажненным газом (кислородом или воздухом), образующим большую площадь соприкосновения газа с кровью, за счет большого количества мелких пузырьков и тонкой пленки крови поверх пенного столба. Пена гасится парами октилового спирта, обладающего способностью уменьшать поверхностное натяжение. Оксигенатор снабжен автоматическим регулятором отсоса перфузата, что предохраняет от проникновения пузырьков газа в артериальную магистраль. При необходимости это устройство позволяет уменьшать количество крови в системе искусственного кровообращения за счет уменьшения ее запаса в отстойнике — нижней части оксигенатора. Термостабилизация оксигенатора обеспечивается помещением последнего в стеклянный конический сосуд с раствором уксуснокислого свинца, в котором находятся два свинцовых электрода, включенные через реле терморегулятора в сеть переменного электрического тока. Пеногасителем служит верхняя часть оксигенатора, где расположена перфорированная спираль, по которой проходят пары октилового спирта.

Оксигенатор аппарата искусственного кровообращения С. С. Брюхоненко и С. С. Пересторонина (1960) имеет усовершенствованную конструкцию: он герметичен, улучшен распределитель венозной крови, термостабилизация осуществляется нагретым воздухом. Эта модель оксигенатора, помимо прямого назначения — газообменника, выполняет функцию венозного насоса, отсасывая кровь из организма.

Как указывается в монографии Галлетти и Бричера (Galletti, Brescher, 1966), искусственное легкое конструкции М. Г. Ананьева и соавт. (1958) — одно из наиболее интересных достижений в области оксигенаторов этого типа. Он имеет цилиндрическую форму.

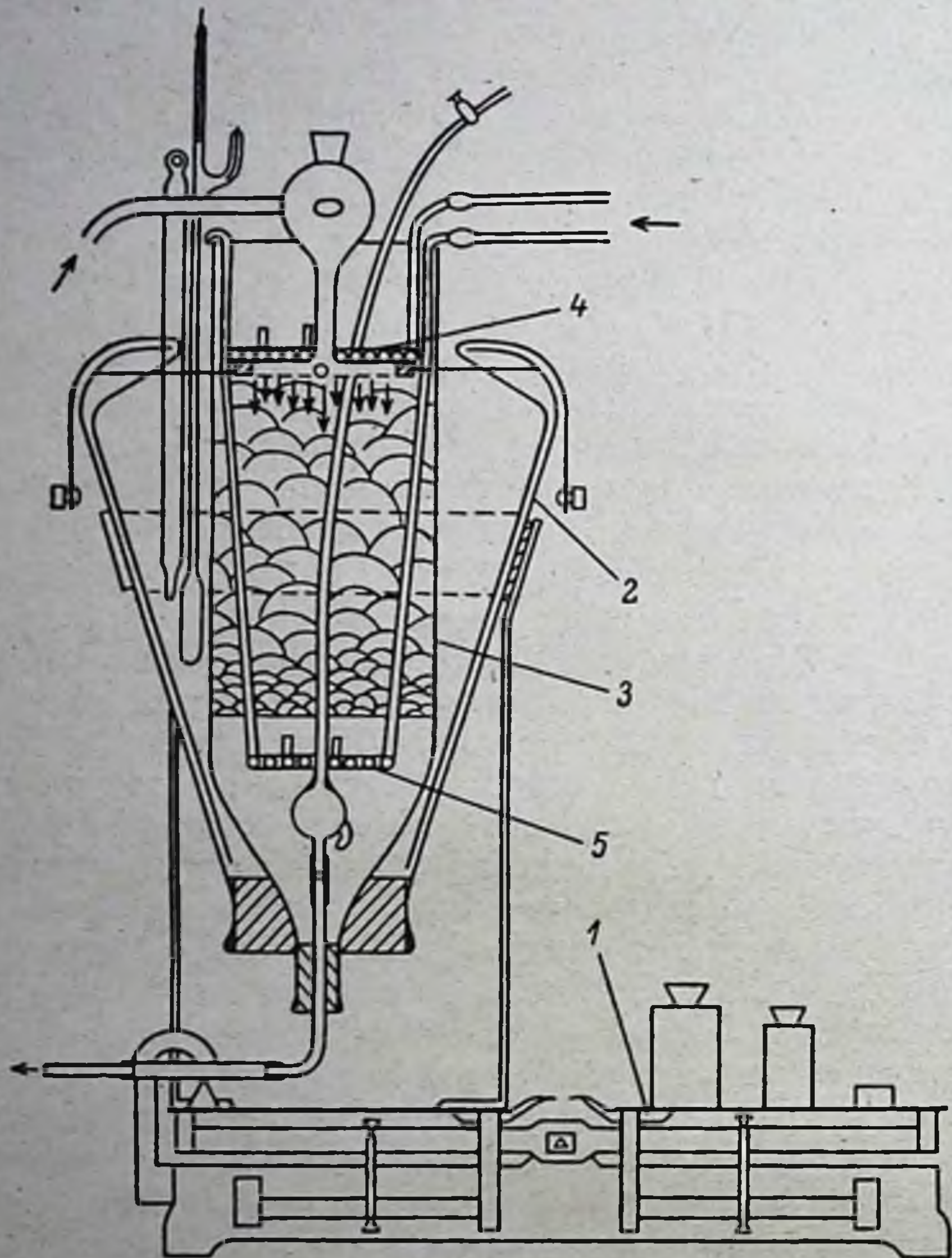


Рис. 27. Пено-пленочный оксигенатор С. С. Брюхоненко и В. Д. Янковского (1937).

1 — весы; 2 — сосуд с раствором уксуснокислого свинца и свинцовыми электродами для термостабилизации; 3 — оксигенатор; 4 — распределитель крови; 5 — газораспределитель.

Эффективная дисперсия крови обеспечивается центрифугическим распределением венозной крови над внутренней стенкой сферической камеры, находящейся между оксигенационной камерой и пеногасителем. В нижней части оксигенатора, перед отстойником крови, расположена мембрана с отверстиями для распределения кислорода. Оксигенатор снабжен устройством регулирования

уровня крови в отстойнике. На том же принципе основаны и другие отечественные аппараты искусственного кровообращения.

Из зарубежных конструкций оксигенаторов пенно-пленочного типа, получивших распространение, следует отметить модели, разработанные Гимбелем и Энгельбергом (Gimbel, Engelberg, 1954), Салбурн (Salisbury, 1956) и др. Пенно-пленочные оксигенаторы эффективнее пузырьковых и требуют меньшего потока газа для оксигенации. На образование пены уходит около 5% поступающей крови.

Малоэффективные средства, применявшиеся до появления кремнеорганических соединений (силиконов), обладающих высокой пеногасящей активностью, сдерживали развитие пенных и пенно-пленочных оксигенаторов. Однако и силиконовые пеногасители не всегда надежно устраняют мелкие пузырьки газа, остающиеся в крови после оксигенации, что создает опасность воздушной эмболии. Увеличение количества пеногасителя также нежелательно из-за возможности эмболии его частицами. Применение фильтра, пенных ловушек и отстойников крови снижает опасность газовой и силиконовой эмболии. Однако при перенасыщении крови кислородом и больших объемных скоростях мелкие пузырьки газа не успевают «всплыть» в отстойнике и увлекаются в артериальное русло.

Снижение степени повреждения крови при прямом контакте с кислородом обеспечивается применением крупных пузырьков, увлажненного и подогретого газа и уменьшением его количества. Стабилизация температурного режима, нанесение силиконовых покрытий и соответствующий подбор материалов конструкции способствуют снижению травмирования крови.

Условием устойчивой работы распределителя газов является превышение давления в камере над суммарным давлением крови (Супер и др., 1970)

$$P > P_1 + P_2. \quad (8)$$

где P — давление газа в камере распределителя газов;
 P_1 — гидростатическое давление столба крови; P_2 — давление пенной структуры, приведенной к жидкой фазе.

По принципу действия оксигенаторы пленочного типа более физиологичны, чем пузырьковые (Левидкая, Супер, 1971). Насыщение венозной крови кислородом и удаление из нее углекислоты в пленочных оксигенаторах происходит при распределении крови тонкой пленкой на поверхности пластин-экранов (стационарные или экранные оксигенаторы) или на вращающихся цилиндрах, дисках, спиралях (ротационные оксигенаторы) в атмосфере кислорода. Фрей и Грубер (Frei, Gruber, 1885) применяли вращающийся цилиндр, в котором венозная кровь растекалась по внутренней поверхности и оксигенировалась за счет контакта с воздухом или кислородом. Артеризованная кровь стекала в камеру и затем поступала в перфузируемые органы.

Успешную перфузию у человека с помощью газообменника с вращающимися цилиндрами первым провел Краффорд с сотр. (Grafford et al., 1957). Были испытаны различные модификации оксигенатора этого типа, однако широкого распространения они не получили, так как поверхность газообмена у них небольшая, а увеличение скорости вращения приводит к гемолизу и пенообразованию.

Использование вращающихся дисков для образования тонкой пленки крови позволило значительно увеличить газообмен оксигенатора. Первым таким оксигенатором является модель Бьёрка

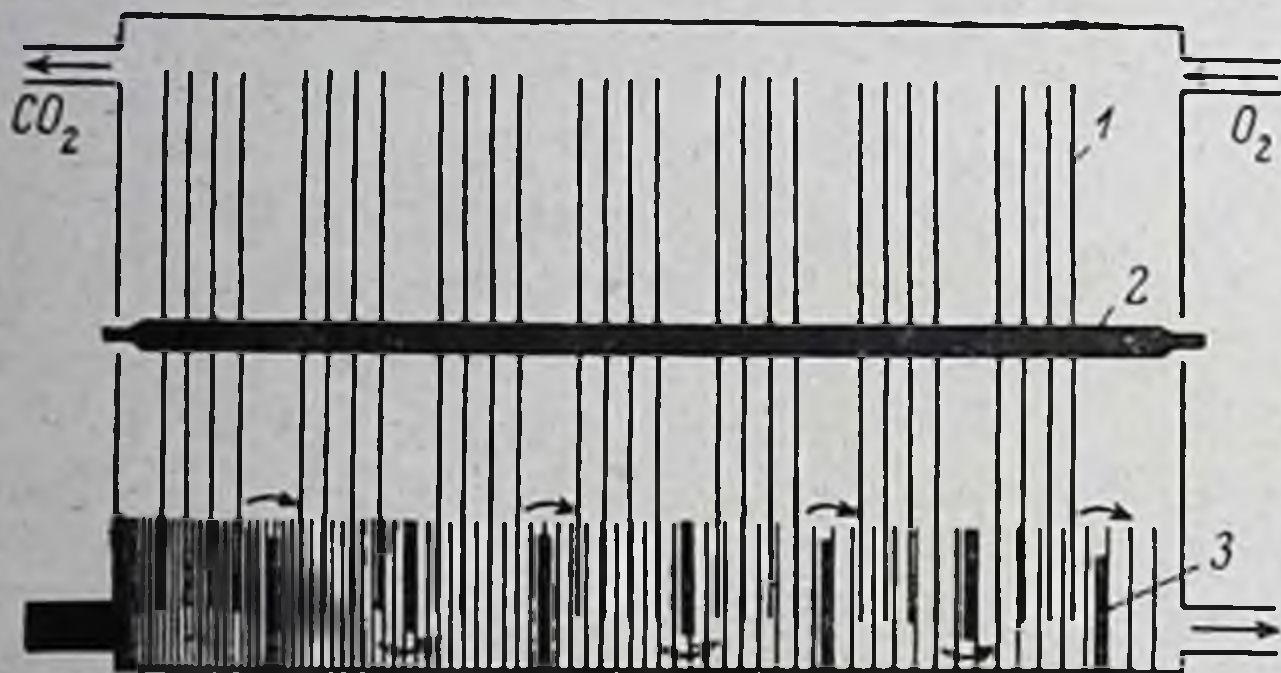


Рис. 28. Дисковый оксигенатор Бьёрка (по: Galletti, Brecher, 1966).

1 — подвижные диски; 2 — ось; 3 — неподвижные сегменты.

(Björk, 1948a, 1948b). Газообменник Бьёрка имеет 40 дисков (рис. 28, 1) из нержавеющей стали, покрытых родием, диаметром 13 см, толщиной 0.5 мм. Диски укреплены на вращающейся оси, расположенной горизонтально. Их нижняя часть погружена в кровь, которая при вращении дисков растекается по ним тонкой пленкой. Диски вращаются со скоростью 120 об./мин, что обеспечивает длительность соприкосновения крови с газом, равную 0.4 сек., а минутная площадь поверхности крови составляет 44 м². Объем крови в оксигенаторе при этом всего 250 мл.

Широкое распространение получил также оксигенатор Бьёрка в модификации Кросса с сотр. (Cross et al., 1956). В нем расширена площадь оксигенации за счет увеличения количества дисков и повышения уровня крови в цилиндре. Увеличение площади погружения диска в кровь исключило разбрызгивание крови и пенообразование, но значительно увеличило объем крови, требуемой для заполнения. Зато оксигенатор стал эффективным и безопасным средством газообмена.

Стационарные экранные оксигенаторы используют проволочный экран вместо гладкой пластины для образования пленки крови, что увеличивает в 8 раз эффективность газообмена за счет

легкого завихрения, вызывающего смещение глубинных слоев пленки крови. Большого распространения они не получили; их конструкции громоздки, неудобны в сборке и очистке, требуют большого объема крови для заполнения. Так, модель Гиббон-Мейо имеет первичный объем заполнения 2.2—3.5 л (Galletti, Brecher, 1966).

Вращающиеся экранные газообменники совмещают принцип вращающегося дискового оксигенатора с экранным. Модели оксигенаторов Денниса (Dennis, 1956), Денниса и Карлсона (Dennis, Karlson, 1958) показали, что газообменник этого типа эффективен, удобен в работе и почти исключает угрозу воздушной эмболии. Первоначальный объем заполнения у них значительно меньше, чем у стационарных экранных.

Пленочные оксигенаторы считаются безопасными — в них отсутствует или мало пенообразование, легко и точно регулируется состав и объемная скорость подводимой смеси газов. К недостаткам пленочных оксигенаторов следует отнести относительную сложность их конструкции и чувствительность к изменению скорости кровотока, при которой меняется толщина пленки, что ведет к изменению скорости газообмена.

Газообменником, наиболее близким к физиологическому, служит мембранный или диффузионный оксигенатор без непосредственного контакта крови с кислородом, в котором использован принцип диффузии газа в кровь через газопроницаемую полимерную пленку, подобно тому, как это происходит в стенке легочных альвеол и капилляров. Первые попытки в этом направлении предприняли Колф и Берк (Kolff, Berk, 1944), подключившие в систему искусственного кровообращения в качестве оксигенатора искусственную почку. При этом они наблюдали, что темная венозная кровь, двигаясь по диализирующей трубке, светлеет. Однако производительность такого устройства была очень низкой. Позднее Колф и Бельцер (Kolff, Balzer, 1955) успешно применили для искусственного кровообращения у собак в качестве газообменника катушку из тонких полиэтиленовых трубок.

В мембранном оксигенаторе Кловс с сотр. (Clowes et al., 1955) использовали листы целлюлозы. Годом позже Кловс с сотр. (Clowes et al., 1956) предложили применять многослойное газообменное устройство, в котором слои газа чередуются со слоями крови, в результате чего достигается большая площадь контакта. Томас (Thomas, 1958) предложил конструкцию вращающегося мембранного оксигенатора, в котором мембраной является стенка вращающегося цилиндра, выполненная из нейлоновой прокладки, армированной микропористой силиконовой пленкой (рис. 29). Кровь распределяется сверху над вращающимся цилиндром, образуя пленку, а на внутреннюю поверхность цилиндра подается кислород. Газообмен происходит через увлажненный силикон путем молекулярной диффузии в системе водяная пленка —

кровь. Оксигенирующая способность газообменника этого типа регулируется скоростью вращения цилиндра. Эта модель объединяет в себе принцип оксигенации пленочных и мембранных газообменников. Она применяется зарубежными клиниками при операциях на сердце (Thomas, Vaysse, 1958, и др.). Однако конструкции таких оксигенаторов громоздки, требуют значительного времени для подготовки к работе, расходуют много крови для первичного заполнения и поэтому распространения не получили.

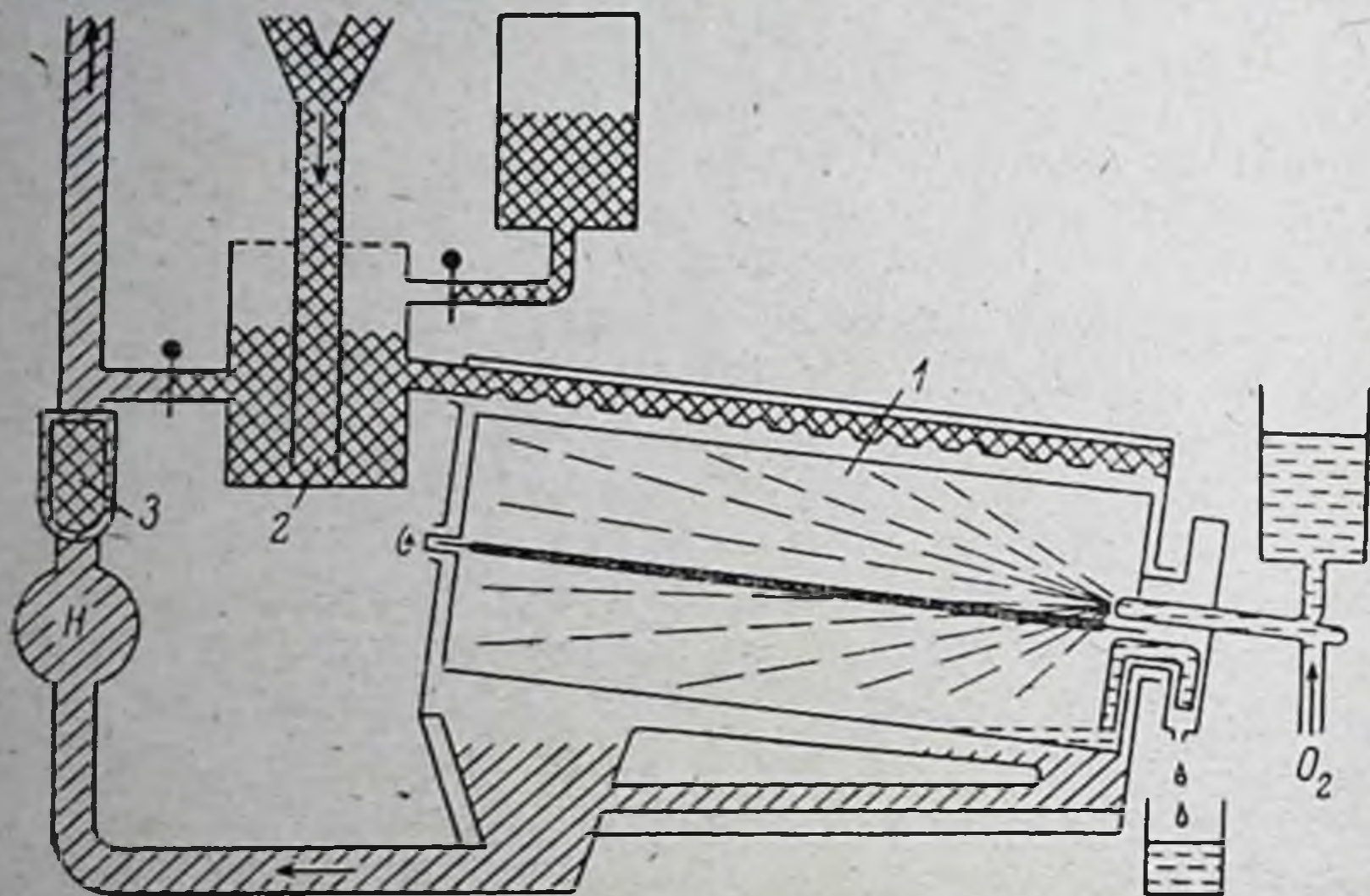


Рис. 29. Мембранный оксигенатор Томаса (по: Galletti, Brecher, 1966).

1 — вращающийся цилиндр, боковую поверхность которого составляет силиконовая мембрана; 2 — резервуар венозной крови; 3 — фильтр для артериальной крови; H — насос.

Большая адекватность оксигенации крови мембранными оксигенаторами по сравнению с пузырьковыми и дисковыми показана при перфузиях изолированных органов Пейджем (Pegg, 1971). Относительно путей совершенствования мембранных оксигенаторов следует отметить высказывание В. И. Шумакова с сотр. (1974) о том, что важным при выборе конструкции мембранного оксигенатора является материал диффузионной пленки и способ кровераспределения на ее поверхности. Наиболее подходят для этой цели армированные пленки на основе силиконовых каучуков, которые могут обеспечить газообмен порядка $200 \text{ мл/мин} \cdot \text{м}^2$, но их показатели прочности колеблются от 40 до 70 $\text{кгс} \cdot \text{см}^2$, что явно недостаточно. Для большей прочности такие пленки армируют тканью или сеткой из стеклоткани, полипропилена и т. д. В настоящее время на основе сополимеризации и синтеза высокомолекулярных соединений могут быть получены пленки с настолько высокой газопроницаемостью, что предел скорости газообмена между кровью и газом будет определяться уже не свойствами мембраны,

а скоростью диффузии газа через плазму или жидкость, заменяющую кровь, так же, как это происходит в организме.

К недостаткам мембранных оксигенаторов следует отнести неравномерность потока крови на поверхности мембраны, а также замедление газообмена вследствие осаждения на поверхности мембраны денатурированных белков плазмы.

Оксигенатор для системы культивирования органов

Анализ рассмотренных типов оксигенаторов приводит к выводу, что в настоящее время наиболее подходящей конструкцией для культивирования органов является пенно-пленочный оксигенатор.

После устранения недостатков оксигенаторы пенно-пленочного типа можно применять для длительного культивирования органов. Существующие стандартные оксигенаторы рассчитаны на обеспечение только коротких перфузий и не приспособлены для автоматического управления параметрами среды и газообмена. Размещение датчиков P_{O_2} в магистралях аппарата искусственного кровообращения значительно увеличивает инерционность регуляторов в связи с малой скоростью потока перфузата через культивируемые органы.

Для управляемого газообмена в системе искусственного кровообращения нами применены такие основные решения: в конструкции газообменного устройства (рис. 30) использован принцип пенно-пленочной оксигенации для адекватной перфузии органа. Оксигенатор выполнен толстостенным из органического стекла, что создает хорошую

теплоизоляцию крови от внешней среды. Рабочая оксигенационная камера (рис. 31, 7) представляет собой цилиндр высотой 190 мм и диаметром 100 мм, в верхней части которого расположена приемная камера с распределителем крови и тремя

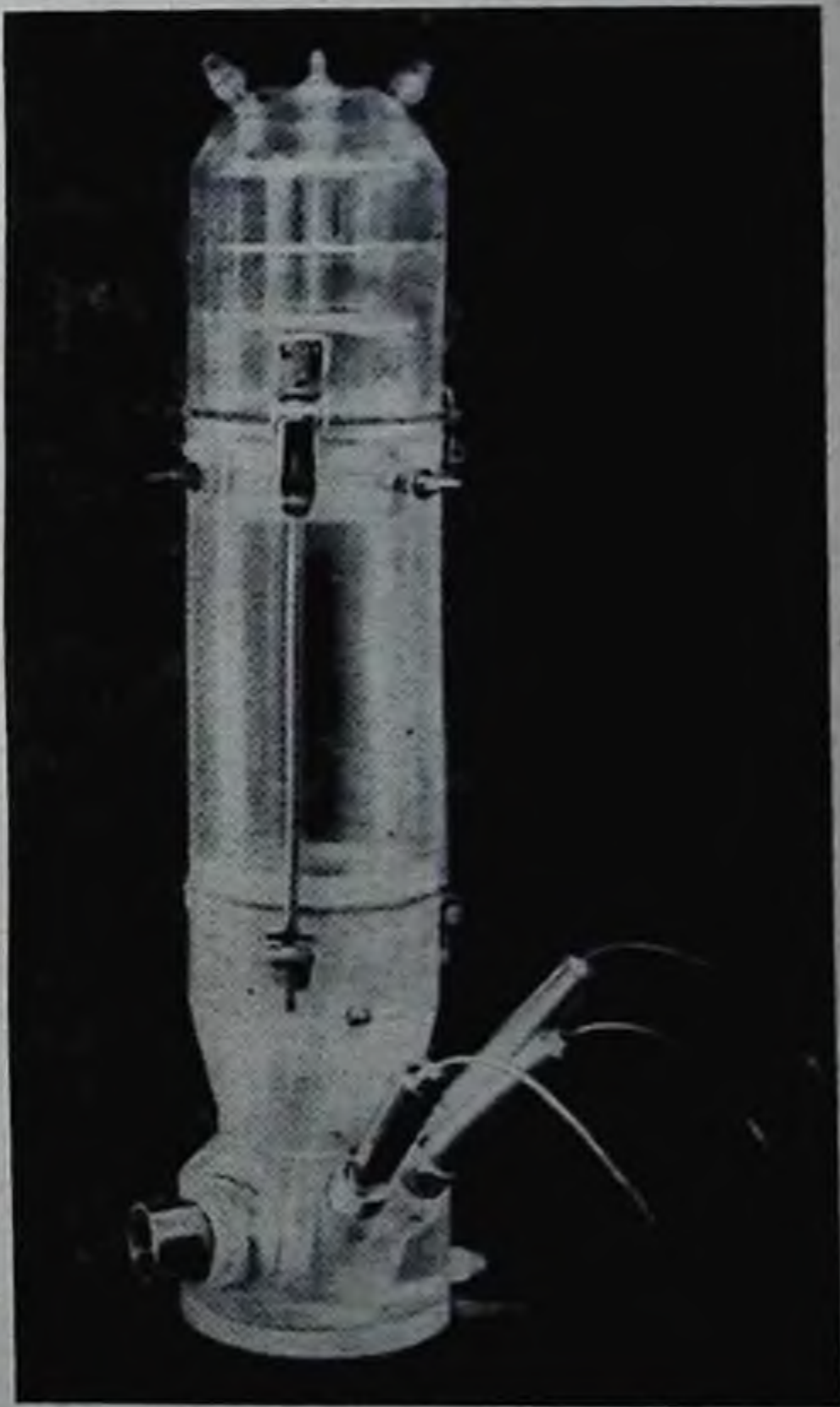


Рис. 30. Внешний вид оксигенатора Института физики СО АН СССР.

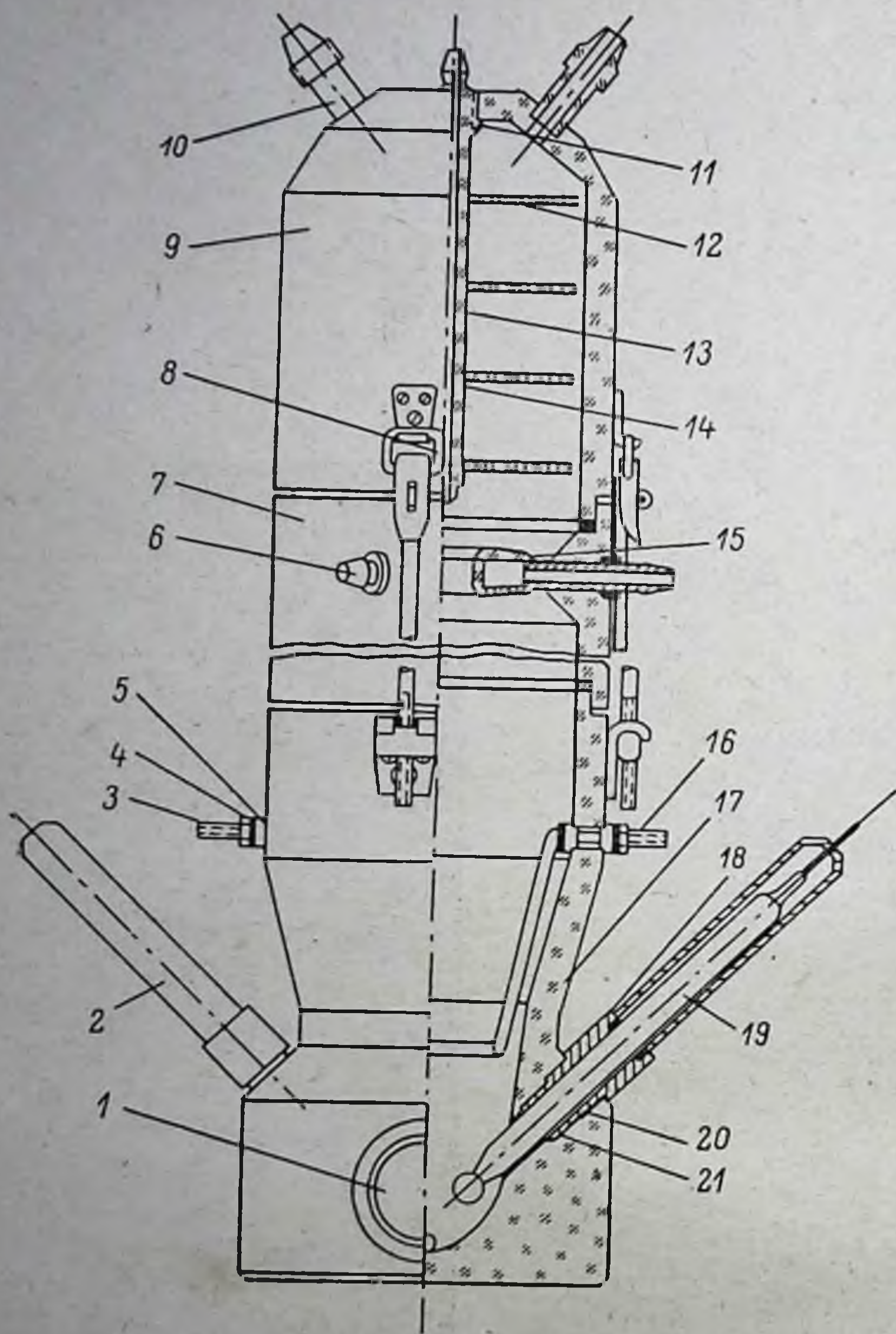


Рис. 31. Конструкция оксигенатора ИФ СО АН СССР.

1 — датчик HbO_2 ; 2 — экран датчика; 3, 16 — газораспределители; 4 — шайба; 5 — резиновая прокладка; 6, 10 — штуцеры; 7 — рабочая камера; 8 — прижимное устройство; 9 — пеногасительная камера; 11 — прокладка; 12 — пеногасительный диск; 13 — держатель дисков; 14 — резиновое кольцо; 15 — распределитель крови; 17 — отстойная камера; 18 — прижимная гайка; 19 — датчик; 20 — фторопластовое кольцо; 21 — резиновое кольцо.

штуцерами. Пеногасительная камера снабжена четырьмя пластмассовыми перфорированными дисками, покрытыми антифомом. Держатель дисков со штуцером одновременно является каналом подачи корректирующих растворов в оксигенатор. Два других штуцера (10), расположенных на пеногасителе, предназначены для выхода газа из оксигенатора во время работы и для испытания всей системы искусственного кровообращения на герметичность перед перфузией, а также для промывки системы после перфузии. Нижняя камера (17) газообменного устройства служит для отстаивания крови от мелких пузырьков газа. В ней размещены чувствительные элементы датчиков рН, P_{O_2} , T° , HbO_2 и датчика уровня жидкости, что позволило автоматизировать процесс регулирования ряда физико-химических параметров среды и значительно уменьшить инерционность регуляторов, исключить транспортное запаздывание и уменьшить колебания в системе. Увеличение объема отстойной камеры позволило исключить резервуар с кровью, обычно необходимый для поддержания уровня перфузата в оксигенаторе. В отстойную камеру введено два газораспределителя с различными диаметрами выходных отверстий, управляя работой которых можно регулировать насыщение крови кислородом, содержание в ней углекислоты или величину рН. Газообменное устройство снабжено специальным крепежным прижимным устройством, позволяющим очень быстро производить сборку и разборку оксигенатора, что создает удобство в обслуживании и оперативность в работе.

Для уменьшения разрушения эритроцитов мы отказались от венозного насоса, и кровь из органа поступает в оксигенатор под действием силы тяжести; температурный режим стабилизирован применением теплообменника и толстостенных камер оксигенатора из органического стекла, силиконовое покрытие образует несмачиваемую поверхность.

Для уменьшения денатурации крови уменьшено количество подводимого газа; увеличены диаметры отверстий диффузионных головок (0.3—0.5 мм), которые образуют сравнительно крупные пузырьки газа: вводимый газ подогревается и увлажняется специальным устройством, совмещенным с теплообменником. Все поверхности, соприкасающиеся с кровью (оксигенатор, насос, камера датчиков, трубки и т. д.), силиконизируются 2%-м раствором кремния в четыреххлористом углероде.

Технические характеристики этого пенно-пленочного оксигенатора следующие: 1) производительность — 1200 мл/мин. при насыщении гемоглобина кислородом до 98%; 2) расход кислорода — до 450 см³/мин.; 3) гемолиз за 1 час перфузии при указанных производительности и подаче кислорода не превышает 20 мг% (по накоплению гемоглобина в перфузате).

Однако для длительного культивирования изолированных органов желательно иметь газообменное устройство, в котором отсутствовал бы непосредственный контакт газа с кровью. Успехи

современной химии полимеров позволяют надеяться на создание более эффективной газопроницаемой пленки, применение которой в мембранных оксигенаторах может создать имитирующее естественные легкие газообменное устройство. Выдающимся успехом в этом направлении является работа Колобова с соавт. (Kolobov et al., 1968), осуществивших оксигенацию через мембранное «мини-легкое» в течение четырех суток без заметных изменений свойств оксигенатора.

2. Поддержание постоянства рН и транспорт углекислоты

В процессе жизнедеятельности различные факторы эндогенного и экзогенного происхождения постоянно воздействуют на активную реакцию внутренней среды организма. К внутренним факторам относятся продукты жизнедеятельности клеток: углекислота, молочная, пировиноградная, фосфорная кислоты, кислоты цикла Кребса, кетоны, аммиак и др. Нейтрализация этих веществ, поступающих в кровь, обеспечивается в организме системой регулирования кислотно-щелочного равновесия, которая включает в себя буферные системы крови, легкие, почки и печень.

Нарушения кислотно-щелочного равновесия могут быть компенсированными, когда рН остается в норме, и некомпенсированными, когда рН выходит за пределы нормы. По направлению сдвига активной реакции крови все нарушения делятся на ацидоз и алкалоз, а по причине, вызывающей изменение рН крови, — на метаболические и респираторные. Ацидоз респираторный развивается при избытке угольной кислоты в организме, наступающем вследствие усиленного образования углекислого газа либо при затрудненном его выведении. Ацидоз метаболический вызывается появлением избыточного количества нелетучих кислот во внеклеточной жидкости. Алкалоз респираторный — результат усиленного выведения углекислого газа из крови при избыточной вентиляции. Алкалоз метаболический развивается вследствие дефицита нелетучих кислот или потери натрия, что приводит к избыточному выведению иона водорода почками.

Принцип компенсации кислотно-щелочных нарушений в организме можно рассмотреть на примере бикарбонатной буферной системы — основной системы плазмы. В этом случае целью регуляции является постоянство отношения $\frac{\text{HCO}_3^-}{\text{H}_2\text{CO}_3} = \frac{20}{1}$, и, следовательно, респираторный ацидоз компенсируется метаболическим алкалозом, метаболический ацидоз — респираторным алкалозом и наоборот. Кислотно-щелочные нарушения наглядно иллюстрируются номограммами. Наибольшую ценность представляет номограмма Зиггаарда—Андерсена, количественно связывающая величины P_{CO_2} , рН, сдвиг буферных оснований (СБО), буферные основания (БО), стандартный бикарбонат (СБ). Также может быть использована диаграмма Ван Слайка (рис. 32).

В крови различают четыре буферные системы.

- | | |
|--|-------------------------|
| 1. $\text{Hb} - \text{HbO}_2$ | } Системы клеток крови. |
| 2. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$ | |
| 3. Углекислота — бикарбонат | } Системы плазмы. |
| 4. Белки плазмы | |

Около 60% всей буферной емкости крови обеспечивает гемоглобиновый буфер (Нагрег, 1967)', локализованный в эритроцитах. Гемоглобин как амфолит содержит в себе большое количество.

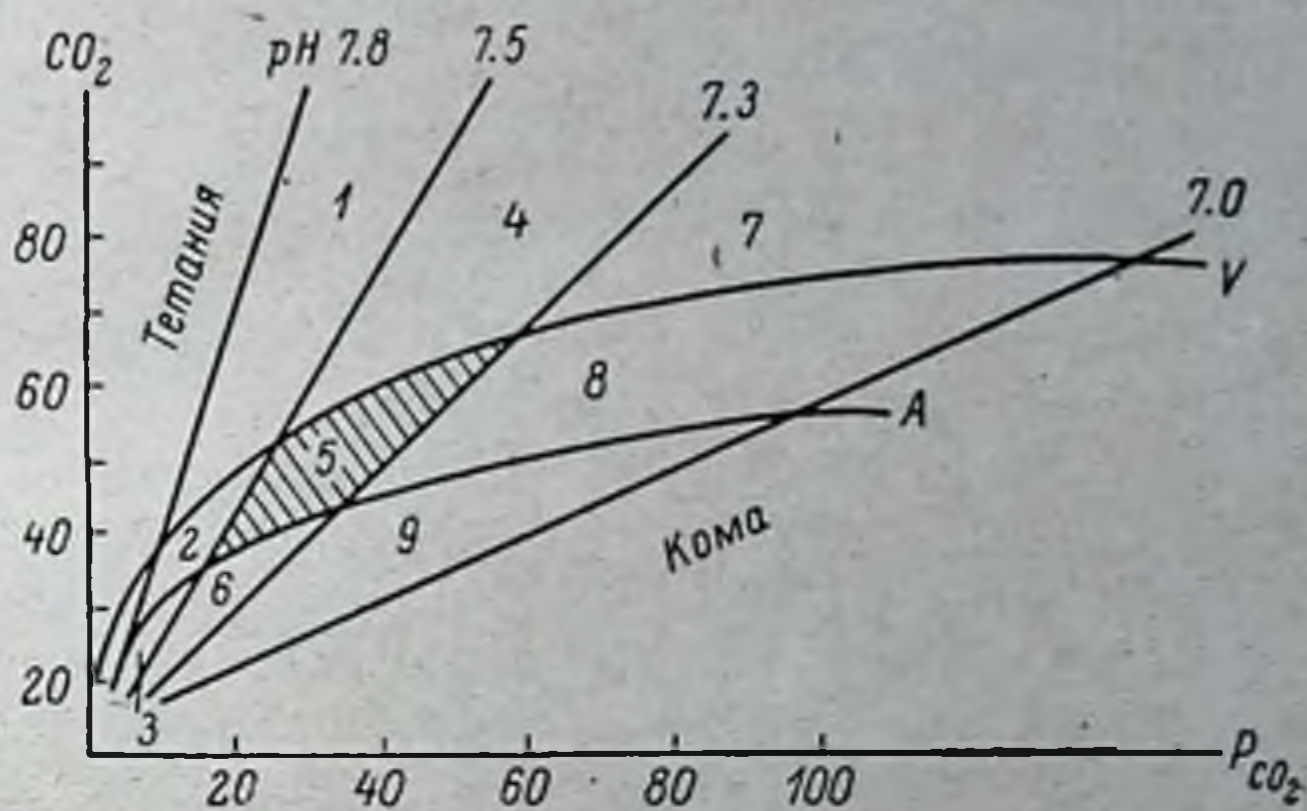
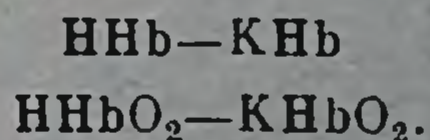


Рис. 32. Диаграмма Ван Слайка (по: Bladengren, 1951).

По оси ординат — общее количество углекислоты. 1, 3 — некомпенсированный алкалоз; 2 — респираторный алкалоз; 4 — компенсированный алкалоз; 5 — значения рН и углекислоты нормального организма; 6 — снижение щелочного резерва, компенсированный ацидоз; 7, 9 — некомпенсированный ацидоз; 8 — респираторный ацидоз. А — кривые предельного связывания углекислоты при нормальных условиях для артериальной крови; V — то же для венозной крови.

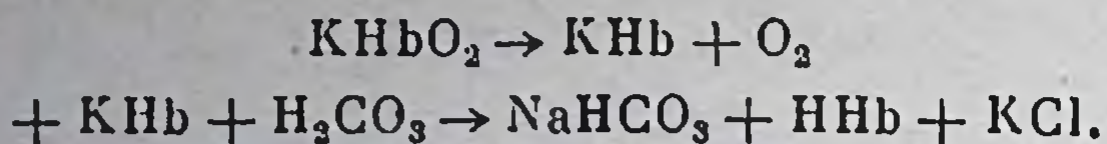
кислотных $[-\text{COOH}]$ и щелочных $[-\text{NH}_2]$ групп. Поскольку рН гемоглобина ниже, чем рН крови, гемоглобин диссоциирует в организме как кислота. При этом оксигемоглобин является примерно в 70 раз более сильной кислотой, чем восстановленный гемоглобин.

Различают две буферные системы гемоглобина:

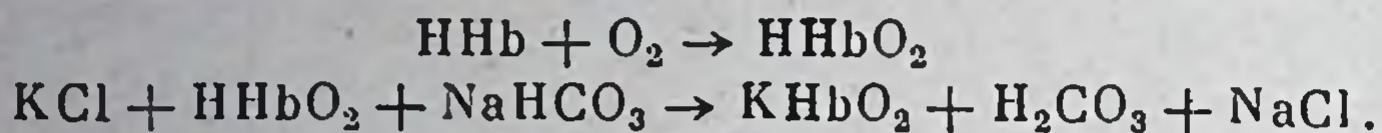


В тканях, потребляющих кислород, преобладает более щелочной восстановительный гемоглобин, способный нейтрализовать кислые продукты метаболизма. В легких, наоборот, преобладает кислый оксигемоглобин, который в состоянии вытеснять углекислый газ из бикарбоната. При этом происходят следующие процессы:

В тканях:



В легких:

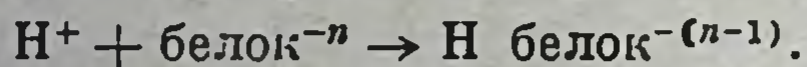
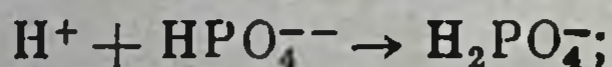
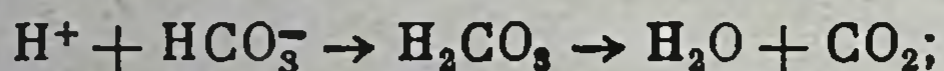


Этим процессам способствует зависимость диссоциации НбО_2 от P_{CO_2} , которая выражается уравнением Бора:

$$a \cdot P_{\text{CO}_2} + b = \frac{[\text{Нб}]}{[\text{НбО}_2]} [P_{\text{O}_2}]^n, \quad (9)$$

где n характеризует взаимодействие гемов в молекуле гемоглобина, a и b — константы. Это явление, известное под названием «эффекта Бора», выражается в смещении кривой диссоциации НбО_2 влево при уменьшении P_{CO_2} , и вправо — при увеличении P_{CO_2} .

На бикарбонатную буферную систему приходится около 20% всей буферной емкости крови, а на фосфатную систему и белки плазмы — остальная часть (Нагрег, 1967). Относительно большее значение бикарбоната в плазме определяется его концентрацией, а также тем, что, присоединяя ион водорода, бикарбонат превращается в угольную кислоту. Образовавшийся из угольной кислоты углекислый газ выводится легкими, и остается только вода. Дегидратация угольной кислоты ускоряется карбоангидразой, что позволяет быстро удалять углекислоту. Механизм связывания ионов водорода в бикарбонатной, фосфатной и белковой буферных системах определяется следующими реакциями:



Поскольку бикарбонат — главное буферное основание внеклеточной жидкости организма, то активную реакцию этой жидкости могут регулировать механизмы, контролирующие концентрацию бикарбоната и P_{CO_2} . Обе эти переменные подвергаются физиологической регуляции, каждая отдельной системой. P_{CO_2} поддерживается постоянным благодаря тому, что между скоростью образования углекислоты в тканях и скоростью, с которой легкие выводят ее из организма, существует равновесие. Объем легочной вентиляции регулируется дыхательным центром так, чтобы в нормальных условиях P_{CO_2} поддерживалось на уровне 40 мм рт. ст.

Путем выделения нелетучих кислот почки регулируют концентрацию бикарбоната в крови. Канальцевый эпителий управляет реабсорбцией катионов и анионов из клубочкового фильтрата так, что сумма концентраций катионов плазмы больше приблизительно на 24—27 мэкв/л, чем сумма концентраций анионов. Равенство

сумм катионов и анионов обеспечивается бикарбонатом, количество которого легко регулируется в организме благодаря выдыхаемой двуокиси углерода. В организме действие рассмотренных механизмов дополняется буферными реакциями внутри клеток и обменом ионами между внеклеточными жидкостями и минеральными компонентами скелета (Robinson, 1969).

Таким образом, первоначальным средством поддержания постоянства кислотно-щелочного равновесия организма являются физико-химические реакции — разбавление и буферное связывание (1-й этап). Затем быстро следует физиологическая компенсация изменений активной реакции, вызванная соответствующим изменением буферного отношения, которое осуществляет аппарат дыхания — дыхательная компенсация (2-й этап). Затем содержание компонентов всех буферных систем, зависящее главным образом от деятельности почек, приходит к норме — восстановление (3-й этап, наиболее длительный).

Показатели кислотно-щелочного равновесия

Параметром, характеризующим активную реакцию среды, является рН. В норме плазма артериальной крови людей имеет $\text{pH} = 7.34-7.44$. Интервал изменений рН, совместимых с жизнью, составляет $7.0+7.8$ (Van Slyke, 1921), что соответствует колебаниям концентрации ионов водорода от 40 до 250% величины, которая поддерживается в нормальных условиях. Это больше, чем совместимый с жизнью диапазон изменений концентрации калия, и значительно больше, чем пределы переносимости изменений концентрации натрия. По-видимому, большинство клеток довольно резистентно к изменениям концентрации ионов водорода. В организме изменения рН наблюдаются крайне редко, в то время как в кислотно-щелочном равновесии могут наступать значительные изменения при постоянном рН.

Важнейшим фактором, влияющим на буферные свойства крови, служит парциальное давление углекислого газа (P_{CO_2}), который постоянно образуется в организме в результате окисления органических веществ. Удалению углекислоты в большей степени способствует большая подвижность ее ионов (в $20-40$ раз больше, чем у кислорода). Однако в условиях организма большее значение в осуществлении эффективной элиминации углекислоты играет не эта физическая характеристика, а присутствие в крови специфического фермента карбоангидразы, катализирующей реакцию,



Наличие этого фермента преимущественно в эритроцитах обеспечивает быструю диффузию углекислоты из тканей в кровь благодаря усилению гидратации ангидрида с образованием углекислоты, что снижает P_{CO_2} крови:



Часть ионов, диффундируя из эритроцитов в плазму, обменивается при этом с ионами Cl^- , входящими в эритроциты. В плазме они соединяются с катионами, образуя бикарбонаты. Другая часть ионов HCO_3^- образует в эритроцитах бикарбонаты с их катионами (преимущественно KHCO_3). Соотношение бикарбонатов в плазме и в эритроцитах соответствует 2 : 1. Благодаря высокой активности карбоангидразы осуществляется быстрая гидратация молекул углекислоты и P_{CO_2} крови становится меньше P_{CO_2} ткани. Это обеспечивает непрерывный транспорт углекислоты из тканей в венозную кровь. Количество связанной и растворенной углекислоты (в об. %) в крови молодых здоровых мужчин приводит Комро и др. (Comroe et al., 1961); при этом в артериальной крови P_{CO_2} равно 41 мм рт. ст., а в венозной — 46.5:

	Артериальная кровь	Смешанная венозная кровь
Общее содержание CO_2	59.6	63.8
Связанная углекислота CO_2	56.8	60.5
Растворенная углекислота CO_2	2.8	3.2

Попадая в капилляры легких, кровь отдает в альвеолярный воздух аккумулированную в тканях углекислоту. Этот процесс обусловлен рядом факторов. P_{CO_2} в венозной крови на 6—8 мм рт. ст. больше, чем в альвеолярном воздухе. Благодаря этому происходит выход ангидрида из крови, и константа равновесия реакции (10) сдвигается в сторону образования углекислоты. Этот процесс ускоряется карбоангидразой. Количество фермента, содержащееся в 1 мл крови, ускоряет реакцию гидратации углекислоты в 1500 раз при температуре 38°C . Освободившиеся катионы связываются в плазме с ионами хлора, вышедшими из эритроцитов, а в эритроцитах катионы соединяются с образовавшимся оксигемоглобином. Значительная часть углекислоты (15—20%) переносится кровью в карбаминовой форме, связанной с белками крови через их аминогруппы.

Схема каскада выведения углекислоты дана на рис. 33. Значение P_{CO_2} в норме у людей составляет в среднем 40 ± 5 мм рт. ст. — это нормокапнический уровень. В патологии пределы колебаний достигают 10—130 мм рт. ст. Повышение P_{CO_2} наблюдается в момент гиповентиляции, накопление углекислоты при этом понижает рН крови. Во время гипервентиляции происходит усиление выделения углекислоты из организма, причем рН крови возрастает. Связь между P_{CO_2} и рН дается уравнением Гендерсона—Гассельбальха

$$\text{pH} = \text{pK} + \ln \frac{[\text{HCO}_3^-]}{\alpha \cdot P_{\text{CO}_2}}, \quad (12)$$

где α — растворимость углекислого газа.

Согласно уравнению, рН зависит не от абсолютных количеств углекислоты и бикарбоната, а от их соотношения. При поступлении

в кровь сильной кислоты последняя вытесняет из бикарбонатов более слабую угольную кислоту и превращается в соль. В результате этого величина отклонения рН значительно уменьшается. Сильная щелочь при попадании в кровь связывается в виде бикарбонатов и выводится почками.

Уровень капнии важен не только для выведения углекислоты из тканей, но и для поддержания тонуса сосудов. Известно, что углекислота оказывает локальное регулирующее воздействие на тонус гладких мышц сосудистой стенки. Согласно Флейшману (Fleischman et al., 1957), углекислота вызывает большее расшире-

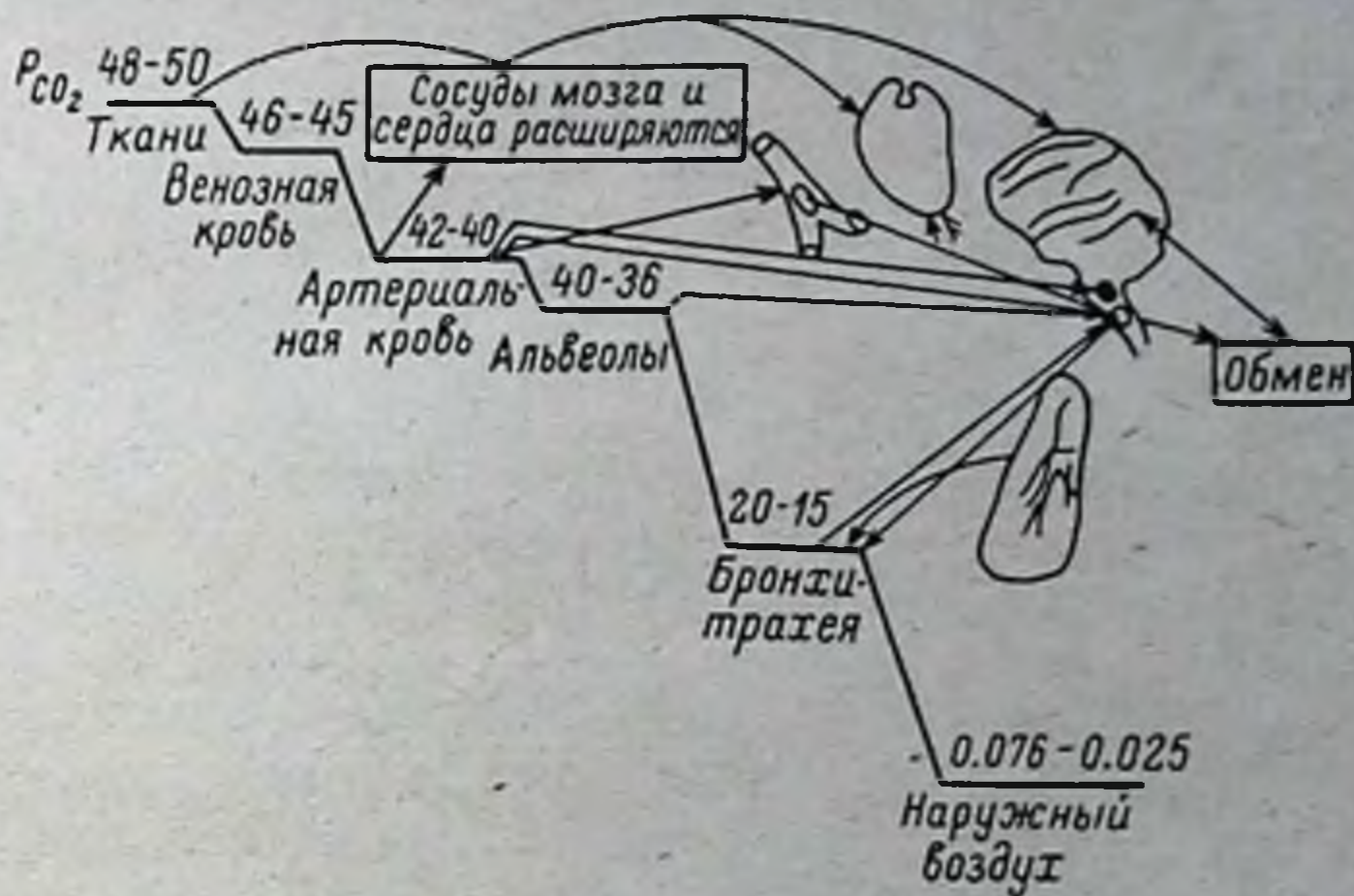


Рис. 33. Схема каскада P_{CO_2} при выведении из организма (по: Коваленко, 1973).

ние капилляров и вен, чем артерий и артериол. Исследования изменения тонуса сосудов и кровоснабжения разных органов при гипер- и гипокпнии обнаружили различия в характере ответа разных органов. При гиперкапнии происходит расширение сосудов мозга (Lewis et al., 1960; Reivich, 1964; Луговой, 1966, и др.), сердца (Nahas, Cavent, 1957; McElroy et al., 1958; Кирюшина, 1964, и др.), но сужение сосудов скелетных мышц (Binit, Burstein, 1947; Рыжова, 1962). Интересно отметить, что при перфузии гиперкапнической кровью иннервированной конечности наблюдали расширение сосудов (Рыжова, 1962). Поскольку в каротидной и аортальной рефлексогенных зонах имеются хеморецепторы, реагирующие на изменение P_{CO_2} (Gellhorn, 1953; Крылов, 1962; Stern, Rapoport, 1967), можно предположить, что при гиперкапнии сосуды конечности подвергаются двойному рефлексорному воздействию через центральные хеморецепторы каротидных и аортальной зон и местные, расположенные в сосудах конечности.

Изменения кровоснабжения ряда органов при гипер- и гипокпнии представлены на рис. 34. Наибольшие и разнонаправлен-

ные изменения кровотока происходят в тканях мозга и скелетных мышц. При повышении P_{CO_2} кровоснабжение мозга увеличивается, в мышцах уменьшается; гипокапния вызывает обратные изменения.

Углекислота принимает активное участие в регуляции газообмена. Гиперкапния артериальной крови усиливает возбуждение дыхательного центра, который стимулирует увеличение легочной вентиляции. В результате углекислый газ выделяется легкими, а

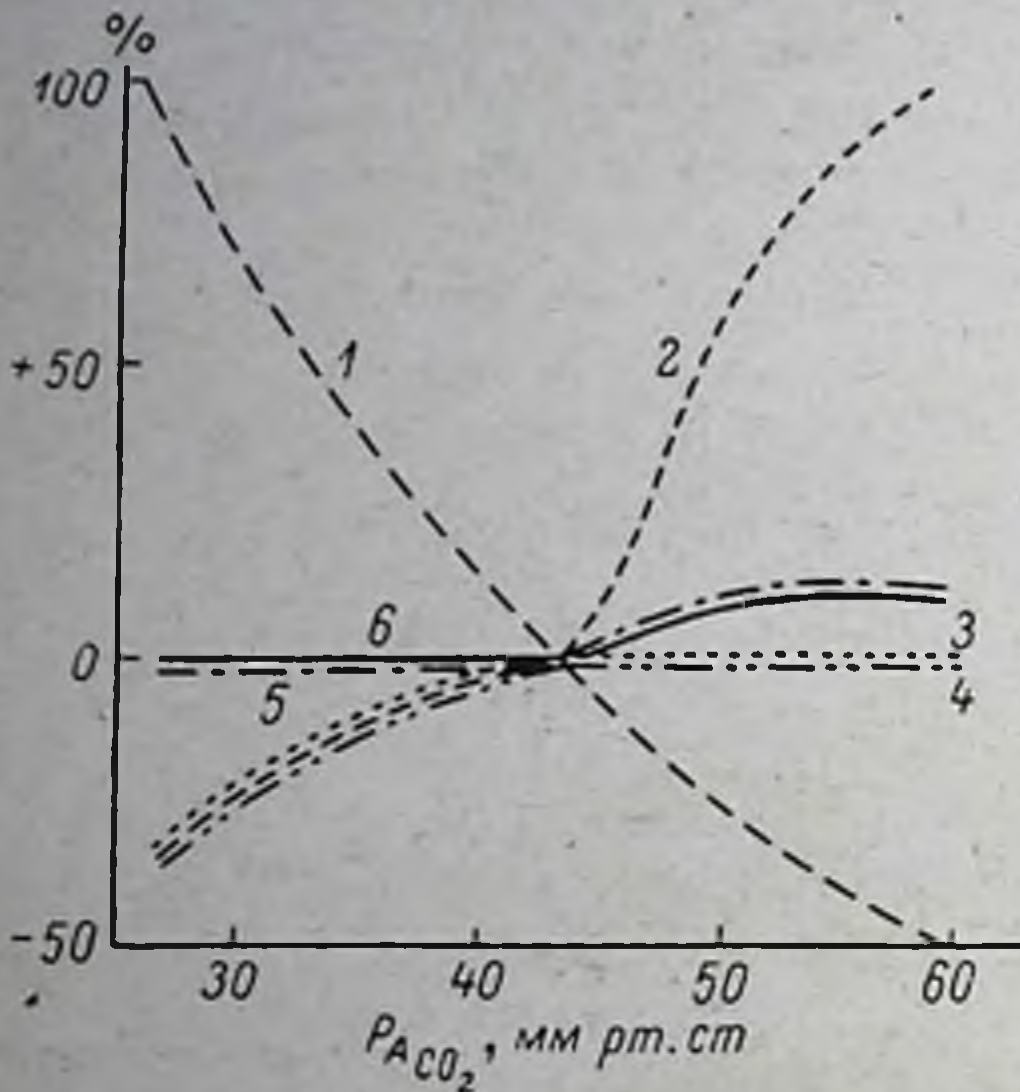


Рис. 34. Схема влияния гиперкапнии и гипокапнии на кровоснабжение разных органов (по: Маршак, 1969).

По оси ординат — изменение кровотока; по оси абсцисс — артериальное P_{CO_2} . 1 — мышцы; 2 — мозг; 3 — печень; 4 — почка; 5 — сердце; 6 — минутный объем сердца.

кровоток и тонус сосудов. Таким образом, углекислота обладает специфическим физиологическим регулирующим воздействием и играет важную роль в обеспечении кровоснабжения тканей организма. Поэтому поддержание нормокапнии является задачей системы адекватной перфузии.

Процесс выведения углекислоты в условиях искусственного кровообращения имеет некоторые особенности. На основании данных Ронгтона и Руппа (Rongton, Rupp, 1958) составлена гистограмма (рис. 22) различных процессов скорости потребления кислорода и элиминации углекислого газа в организме и оксигенаторе. В организме на пути выхода из эритроцита углекислота испытывает незначительное сопротивление, тогда как в оксигенаторе большая резистентность обусловлена относительно толстым слоем крови.

Стремясь обеспечить максимальное насыщение крови кислородом, в оксигенатор подают чистый кислород. Это приводит к гипо-

P_{CO_2} артериальной крови снижается. Гипокапния тормозит активность дыхательного центра. При этом легочная вентиляция в определенной степени угнетается, что снижает выделение углекислого газа и повышает P_{CO_2} артериальной крови (Lambertsen, 1960; Кулик, 1967; Маршак, 1969). Имеются также данные в пользу влияния гипер- и гипокапнии на интенсивность окислительных процессов в тканях: снижение P_{CO_2} вызывает увеличение потребления кислорода, а увеличение этого показателя — снижение дыхания тканей (Rahn, Otis, 1949; Серебряник, 1948).

Величина P_{CO_2} оказывает влияние на P_{O_2} , диссоциацию оксигемоглобина, степень оксигенации тканей, местный

капнии и ухудшает условия перфузии. Добавление к газовой смеси 3%-й углекислоты повышает адекватность перфузии. Отмечается также коррегирующее воздействие иона HCO_3 на регуляцию кровотока в различных органах. В опытах с гипотермической перфузией обнаружено увеличение мозгового кровообращения, P_{O_2} , утилизации кислорода при повышении в крови P_{CO_2} (Петровский, Соловьев, 1966; Раевский и др., 1966). Этот эффект можно объяснить сосудорасширяющим воздействием углекислоты.

В связи с этим в системах искусственного кровообращения следует оксигенировать кровь газовыми смесями, включающими углекислый газ, с соответствующей коррекцией его концентрации. Это позволяет улучшить утилизацию кислорода перфузируемыми органами, приближает условия кровообращения к физиологическим.

Дозирование углекислого газа широко применяется при управляемом культивировании фотосинтезирующих микроорганизмов, где определяют содержание углекислого газа в подводимых в культиватор или отходящих от него газах, используя колориметрический, радиометрический, кондуктометрический методы или инфракрасные оптикоакустические газоанализаторы.

Для определения и регулирования количества углекислоты при искусственном кровообращении требуется измерение его парциального давления в жидкости. Наиболее разработанным методом измерения P_{CO_2} является потенциометрический метод (Severinghaus, Bradley, 1958). Принцип его работы основан на измерении величины рН раствора стеклянным электродом, которая зависит от парциального давления углекислоты. Но этот метод имеет существенный недостаток — большую инерционность измерения. С. А. Гулянян и сотр. (1970) изготовили датчик P_{CO_2} , время установления 95%-го ответа которого равняется 3—5 мин. А. Г. Ахматов и сотр. (1971) описали конструкцию датчика P_{CO_2} , время 95%-го ответа которого составляет также 5 мин. Это затрудняет использование такого типа электродов в качестве элементов системы автоматического регулирования при искусственном кровообращении. Однако для исследования более медленных процессов они пригодны. Так, последующий вариант электродов потенциометрического типа был успешно применен С. А. Гуляняном в нашей лаборатории для исследования динамики P_{CO_2} при перфузии изолированной почки.

Объемное содержание углекислоты в крови определяется по методу Ван Слайка, основанному на ее химическом вытеснении из крови в вакууме. Выделенный таким образом углекислый газ приводится к стандартному объему, и по манометру определяется его давление. Затем найденная величина пересчитывается в объемных процентах (Агапов, 1968). Этот метод требует значительного времени, поэтому он не пригоден для управляемой перфузии.

Известен еще один метод измерения углекислоты для этой цели — кондуктометрический. Его принцип был предложен

Кайном и Максвеллом (Cain, Maxwell, 1919). Затем многие авторы (Spoehr, McGree, 1923, 1924; White, 1928; Пронин и др., 1934; Tomas, Hill, 1949; Вознесенский, 1960, 1964, 1967, 1971, и др.) развили и усовершенствовали этот метод.

А. И. Кривченко (1971) исследовал характеристики кондуктометрических датчиков для измерения концентрации углекислоты. Время 95%-го ответа составляло 5—10 сек. В основе метода лежит измерение электропроводности протекающего раствора щелочи, которая пропорциональна P_{CO_2} в исследуемой среде. Разработанный и апробированный экспериментально датчик P_{CO_2} этой конструкции еще не нашел широкого применения в системах искусственного кровообращения из-за опасных последствий возможного разрыва мембраны между кровью и раствором щелочи, хотя этот датчик вполне удовлетворяет предъявляемые требования по оперативности измерений, малой инерционности и высокой чувствительности. В системах перфузии изолированных органов его применение вполне оправдано. В наших исследованиях использован подобный датчик для измерения концентрации углекислоты в оксигенаторе. С его помощью производится регулирование содержания углекислоты в перфузате. При этом опасность разрыва мембраны сведена к минимуму тем, что давление перфузата в оксигенаторе очень мало и соизмеримо с давлением щелочи. Принцип работы регулятора P_{CO_2} аналогичен таковому для P_{O_2} .

Для оценки кислотно-щелочного баланса используется также сдвиг буферных оснований (СБО; ВЕ — в зарубежной литературе: Base Excess — избыток буферных оснований), характеризующий смещение титруемых буферных оснований крови (БО) по отношению к нормальным буферным основаниям (НБО) при стандартных условиях: $pH=7.4$, $P_{CO_2}=40$ мм рт. ст. при $38^\circ C$. У здоровых людей в покое значение показателя СБО артериальной крови находится в пределах от $+1.5$ до 1.5 мэкв./л. В патологии возможны колебания СБО от $+30$ до -30 мэкв./л (Möller, 1959). Показатель СБО чаще всего определяется по номограмме Зиггаарда—Андерсена и указывает на механизм нарушений кислотно-щелочного равновесия: в противоположность P_{CO_2} наибольшее смещение СБО наблюдается при «метаболических» нарушениях и совсем незначительное при респираторных нарушениях кислотно-щелочного баланса. Положительное значение СБО указывает на недостаток (абсолютный или относительный) нелетучих кислот или на избыток (относительный или абсолютный) оснований, отрицательное значение СБО отражает избыток нелетучих кислот или дефицит оснований. Вместо показателя СБО иногда пользуются показателями БО, который в зарубежной литературе обозначается символом ВВ (Buffer Base). Этот показатель может быть определен титрованием либо по той же номограмме Зиггаарда—Андерсена. В норме величина БО в среднем составляет 44 мэкв./л и состоит в основном из ионов бикарбоната (25 мэкв./л) и анионов

белка (17 мэкв./л) (Агапов, 1968) и так же, как и показатель СБО, отражает степень метаболических расстройств.

Показатель БО значительно изменяется при метаболических нарушениях и минимально при респираторных. Однако пользоваться им сложно из-за широкого диапазона колебания нормы (46—52 мМ/л), поэтому большее практическое значение имеет показатель СБО. Зависимость между СБО, БО и НБО следующая:

$$\text{СБО} = \text{БО} - \text{НБО} \text{ или } \text{НБО} = \text{СБО} - \text{БО}.$$

Наряду с этими параметрами в лабораторной практике применяется показатель «бикарбонат крови», соответствующий концентрации анионов угольной кислоты $[\text{HCO}_3^-]$ (в мэкв./л). Этот показатель вычисляют либо в условиях нахождения крови в русле — истинный бикарбонат (ИБ), либо при стандартных условиях ($P_{\text{CO}_2} = 40$ мм рт. ст., $T = 38^\circ \text{C}$, полное насыщение гемоглобина кислородом) — стандартный бикарбонат (СБ). Величина бикарбоната крови оценивается по номограмме Зиггаарда—Андерсена либо по объему углекислого газа, вытесненного из плазмы кислотой. В норме у людей ИБ и СБ равны и составляют в среднем 27 мэкв./л или, если выражать их через объемные проценты углекислого газа, 60 об.%. Показатель СБ очень близок по значению к показателю СБО (ВЕ). Различие между ними лишь в том, что СБО характеризует буферные ионы всех буферных систем, а СБ — смещение буферных ионов карбонатной буферной системы. Зависимость между показателями СБО и СБ приблизительно такова:

$$\text{СБО} = 1.3\Delta\text{СБ},$$

где $\Delta\text{СБ}$ — величина отклонения СБ от нормы.

Показатель «бикарбонат крови» известен также под названием «щелочной резерв крови».

Устройства для измерения и регулирования рН при культивировании органов

Кровь является многобуферной системой и для ее стабилизации предъявляются особые требования к регулирующим устройствам. Так, в уравнении (12) показано, что зависимость величины рН от количества реагента нелинейная (логарифмическая), что создает дополнительные трудности при регулировании, так как одна и та же порция реагента будет по-разному воздействовать на изменение показателя активности ионов водорода в зависимости от величины последнего в данный момент. Существующие производственные системы автоматического регулирования рН не пригодны без переделки для регуляции кислотно-щелочного равновесия крови, которое требует более чувствительного и менее инерционного регулятора. Тем не менее представляется целесообразным рассмотреть и анализ некоторых систем измерения и регули-

рования рН в микробиологических установках, а также при суспензионном культивировании животных клеток.

Так, для автоматического анализа концентрации водородных ионов при культивировании микроорганизмов применен автомат, состоящий из датчиков, прибора с измерительным, регистрирующим и регулирующим устройствами, резервуаров с растворами кислоты и щелочи. При помощи устройства коммутации в измерительной и регулирующей системах можно одним прибором регулировать кислотность в нескольких ферментерах (Ričica, 1968).

Аналогичная схема использована для измерения и регулирования рН в различных производственных растворах с помощью ионоселективного электрода. Сигнал от датчиков подается на преобразователь, связанный с регистрирующим и регулирующим приборами. Регулятор управляет исполнительным механизмом, посредством которого подается реагент в основную магистраль (Laut, 1972). Следует отметить, что эти регуляторы используются в системах, для которых достаточно грубая регулировка (в пределах нескольких десятых единиц рН) и для более точной компенсации применяется двухступенчатое регулирование. При культивировании изолированных органов такой вариант непригоден, так как требует значительного усложнения системы регулирования и увеличения объема циркулирующего перфузата.

Различные методы измерения и регулирования концентрации ионов водорода используются в технике суспензионного культивирования клеток. Ряд авторов в качестве реагента применяют углекислый газ, который дозированно добавляют в воздух при аэрации культуры (McLimans et al., 1957; Telling, Stone, 1964; Мишин, 1968). Этим достигается простая регулировка рН среды, хотя такие системы довольно инерционны. Применяют также для регулирования рН среды в качестве реагентов растворы кислот и щелочей, добиваясь тем самым уменьшения инерционности регуляторов.

Для построения системы автоматического регулирования состава среды, частным случаем которой является стабилизация рН, следует рассмотреть характеристики процессов (Бирюков, 1963). К ним относятся: 1) заданная программа режима; 2) требуемая точность поддержания программы; 3) статические и динамические характеристики объектов регулирования; 4) основные источники возмущения.

Для автоматизации отдельных стадий служит метод программного управления и регулирования на основе типовых схем. Ввиду того что зависимость величины активности ионов водорода от расхода реагента логарифмическая, статическая характеристика объекта регулирования, которым является рН перфузата оксигенатора, нелинейна. Динамические характеристики оксигенатора, описывающие его инерционные свойства, зависят от его объема, скорости перфузии, перемешивания, кинетики хи-

мической реакции и других параметров. Необходимо также учитывать температурную поправку и время чистого запаздывания, в течение которого система автоматического регулирования не реагирует на изменение величины рН. Это время складывается из длительности поступления реагента, перемешивания, транспорта к электродам и инерции измерительных электродов.

Существующие методы определения рН подразделяются на электрометрические (кондуктометрические и гальванометрические) и неэлектрические (каталитические, калориметрические, спектрофотометрические) (Schwabe, 1962). Наиболее точно производится электрометрическое измерение рН с помощью стеклянных электродов (Навратил и др., 1967), и только этот метод пригоден для непрерывного измерения активности ионов водорода. Он наиболее отвечает требованиям к измерителям при длительном культивировании изолированных органов. Этот метод обеспечивает: 1) достаточную точность и стабильность измерения; 2) простоту и надежность работы; 3) возможность непрерывного измерения и регулирования; 4) отсутствие повреждающих воздействий на живую ткань.

Гальванометрический (электрометрический) метод определения рН основан на измерении ЭДС гальванического элемента, состоящего из двух электродов: измерительного и электрода сравнения.

Преимущества стандартного электрометрического метода измерения рН следующие: 1) быстрота измерения; 2) возможность анализа исследуемого вещества в малых объемах; 3) возможность автоматизации измерения; 4) ненужность предварительной обработки проб (фильтрации, перегонки и т. д.). К недостаткам метода относятся: дрейф потенциала электрода и зависимость измерения от температуры.

Схема регулирования величины рН предусматривает два варианта: стабилизацию кислотно-щелочного равновесия и регулирование концентрации ионов водорода по определенной программе. Стабилизация кислотно-щелочного равновесия крови достигается с помощью простой замкнутой системы автоматического регулирования. Для программного регулирования система несколько усложняется применением специального устройства. Точность регулирования определяется точностью применяемых измерительных электродов и регулятора.

К измерительному электроду предъявляются следующие требования (Макаров, Свердлин, 1970): линейная зависимость электродного потенциала от значения рН; незначительное и закономерное (лучше всего линейное) изменение электродного потенциала с температурой. Этим требованиям отвечают многие из существующих электродов, однако для работы в потоке крови лучше применять стеклянные электроды, обладающие высокой чувствительностью и возможностью стерилизации.

В биологических системах применение в качестве чувствительных элементов стеклянных электродов при непосредственных потенциометрических измерениях позволяет исключить воздействие на электроды окислительно-восстановительных процессов, белков и анионов (Khugi, 1972). При измерении рН перфузата с помощью стеклянного электрода и электрода сравнения создается цепь: вспомогательный электрод → измерительный электрод → электрод сравнения. Хотя точность измерений рН стеклянным электродом в интервале 0—10 единиц достаточно высока и не зависит от состава измеряемой жидкости (Пчелин, 1955), из-за загрязнения электродов и других помех в производственных условиях точность измерения не превышает $\pm 0.1—0.15$ рН (Schwabe, 1962), а постоянная времени составляет 3—5 сек. Во время работы электроды загрязняются, что приводит к увеличению ошибок.

Источниками ошибок при работе с ионоселективными электродами могут стать: измерительный электрод, электрод сравнения (диффузионный потенциал), измерительные приборы (преобразователь, регистратор), изменение температуры. Однако при тщательной корректировке точность измерения ЭДС может составлять 0.01 мв, а относительная ошибка определения концентрации ионов — 0.1% (Layt, 1972).

Особенности регуляции рН крови заключаются в том, что: 1) кровь является буферной системой; 2) концентрация ионов водорода может изменяться как в кислую, так и в щелочную сторону; 3) применение электродов сравнения проточного типа невозможно в связи с тем, что кровь в местах контакта с КСl коагулирует.

Ввиду того что большинство аппаратов искусственного кровообращения не снабжено автоматической регулировкой рН и коррекция величины этого параметра производится вручную, приводим разработанную нами схему автоматической регулировки рН перфузата при культивировании изолированных органов. При этом в нашей системе на точность регулирования рН накладываются дополнительные неблагоприятные факторы: 1) измерение и регулирование производится в относительно малом объеме (отстойная камера оксигенатора); 2) скорость потока перфузата переменная.

На основе анализа описанных методов регулирования рН среды можно заключить, что при искусственном кровообращении лучше производить комбинированную регулировку: для смещения в кислую сторону в качестве реагента применять углекислый газ (он не увеличивает объем циркулирующего перфузата и удобен в работе; возможна его подача вместе с инертным газом, кислородом или воздухом через распределитель газа оксигенатора) или раствор другой кислоты, если P_{CO_2} будет большим и подача углекислоты нежелательна. Коррекция рН в щелочную сторону обеспечивается подачей раствора щелочи.

Поэтому регулирование рН в перфузионной системе производится в три этапа.

1. При отклонении рН от оптимального (заданного) уровня на незначительную величину (± 0.05) компенсация производится газораспределителями с перфорацией диаметров 0.3—0.5 мм (при отклонении в кислую сторону смесь газов подается в оксигенатор через диффузионную головку с отверстиями диаметром 0.5 мм, при отклонении в щелочную — 0.3 мм, если при этом $P_{CO_2} \leq P_{CO_2, \text{опт}}$ и $P_{O_2} \leq P_{O_2, \text{опт}}$).

2. При увеличении отклонения рН от оптимума (± 0.15) включается подача 5% углекислоты с инертным газом, воздухом или кислородом в зависимости от величины P_{O_2} , или интенсивная их подача без углекислого газа для удаления последнего из перфузата через подключенные газораспределители с перфорацией диаметром 0.3—0.5 мм, если $P_{CO_2} = P_{CO_2, \text{опт}}$ и $P_{O_2} = P_{O_2, \text{опт}}$.

3. При значительном изменении рН перфузата (± 0.25) или переводе искусственного гомеостаза по данному параметру на другой уровень программным устройством подаются более сильные реагенты: 5%-е растворы молочной кислоты и бикарбоната натрия. Для увеличения скорости подачи и уменьшения времени смешивания перфузата с реагентами последние вспыскиваются через распылитель дозатором в отстойную камеру оксигенатора.

3. Осмотическое равновесие

Важным параметром среды при культивировании органов является осмотическое давление, которое в значительной степени определяется растворенными в ней кристаллоидами. Физико-химическая сторона этого процесса состоит в следующем: если два раствора разной концентрации разделены полупроницаемой мембраной, пропускающей растворитель, но не пропускающей растворенное вещество, то растворитель из раствора с меньшей концентрацией будет переходить в раствор с большей концентрацией. Это явление известно как осмос, а давление, вызывающее перераспределение молекул растворителя, называется осмотическим. В рассмотренном случае переход растворителя вызван различием осмотических давлений, а истинное осмотическое давление определяется по отношению к чистому растворителю.

Приблизительно величина осмотического давления вычисляется по уравнению Вант-Гоффа:

$$P = iRTC, \quad (13)$$

где R — универсальная газовая постоянная; T — абсолютная температура; C — молярная концентрация растворенного вещества; i — коэффициент Вант-Гоффа, учитывающий степень диссоциации. Этот закон выполняется точно только для очень разбавленных растворов. С увеличением концентрации формула дает заниженные результаты.

Более приемлемой представляется теория осмоса, разработанная Аррениусом, в которой проникновение растворителя через мембрану рассматривается как процесс дистилляции, т. е. растворитель проходит через полупроницаемую мембрану как пар. Осмотическое давление в этом случае обусловлено уменьшением давления пара растворителя при увеличении концентрации раствора и выражается следующим образом:

$$P_{\text{осм}} = \frac{RT}{V} \ln \frac{P_0}{P}, \quad (14)$$

где V — объем 1 моля растворителя; P_0 — упругость пара чистого растворителя при температуре T ; P — упругость пара раствора при той же температуре. Этот закон выполняется для реальных жидкостей в более широком диапазоне концентраций и для очень разбавленных растворов переходит в уравнение Вант-Гоффа, что показали Прюттон и Марон (Prutton, Maron, 1958).

На практике определение осмотического давления возможно как прямым методом — с помощью полупроницаемой мембраны, так и косвенным. Из последних наиболее надежен и особенно пригоден для работы с биологическими жидкостями криоскопический метод. Он заключается в измерении депрессии (понижении точки замерзания) раствора. Из закона Вант-Гоффа следует, что растворы одинаковой концентрации различных веществ с одинаковыми коэффициентами Вант-Гоффа имеют одно и то же осмотическое давление, т. е. величина осмотического давления зависит не от размеров и молекулярного веса ионов растворенного вещества, а только от их числа. Молярный раствор (концентрация ионов $6.02 \cdot 10^{23}$ моль/л) обладает осмотическим давлением 22.4 ат, и депрессия такого раствора представляет собой константу, характеризующую растворитель. Для воды, являющейся растворителем в биологических жидкостях, молярная депрессия равна 1.86° , что соответствует давлению 22.4 ат. Отсюда уменьшение температуры замерзания на 0.001° эквивалентно увеличению осмотического давления на 0.012 ат или 9.2 мм рт. ст. Таким образом, измерив депрессию неизвестного раствора, можно определить его осмотическое давление.

Осмотическое давление крови в норме колеблется около 7.6 ат (депрессия $0.56—0.58^\circ$) и играет значительную роль в регуляции обмена воды между кровью и тканями. Около 60% от всего давления приходится на долю хлористого натрия. Белки плазмы, составляющие 7—8% от веса плазмы, создают всего 1/140 часть от общего осмотического давления (25—30 мм рт. ст.), но, несмотря на это, коллоидно-осмотическое (онкотическое) давление белков имеет большое значение в регуляции водного обмена. Так, в капиллярах, где стенки свободно пропускают ионы кристаллоидов, коллоидно-осмотическое давление белков является главной силой, удерживающей жидкость в кровеносных сосудах, что обеспечивает интенсивный обмен тканевой жидкости, по данным

Гайтона (Guyton, 1963), в 40 раз превышающий объем кровотока. Механизм такого обмена, описанный впервые еще Старлингом, хорошо иллюстрируется моделью онкодиновых трубок, созданной Шаде (Schade, 1923).

Не все белковые фракции равноценны в регуляции водного обмена. Онкотическое давление создается в основном самой низкомолекулярной фракцией — альбуминами, что позволяет считать их главным регулятором водноэлектролитного равновесия.

Роль низкомолекулярных ингредиентов крови (углеводов, жирных кислот, органических кислот, ацетоновых тел, продуктов азотистого обмена, свободных аминокислот и др.) как носителей осмотических свойств количественно еще не определена.

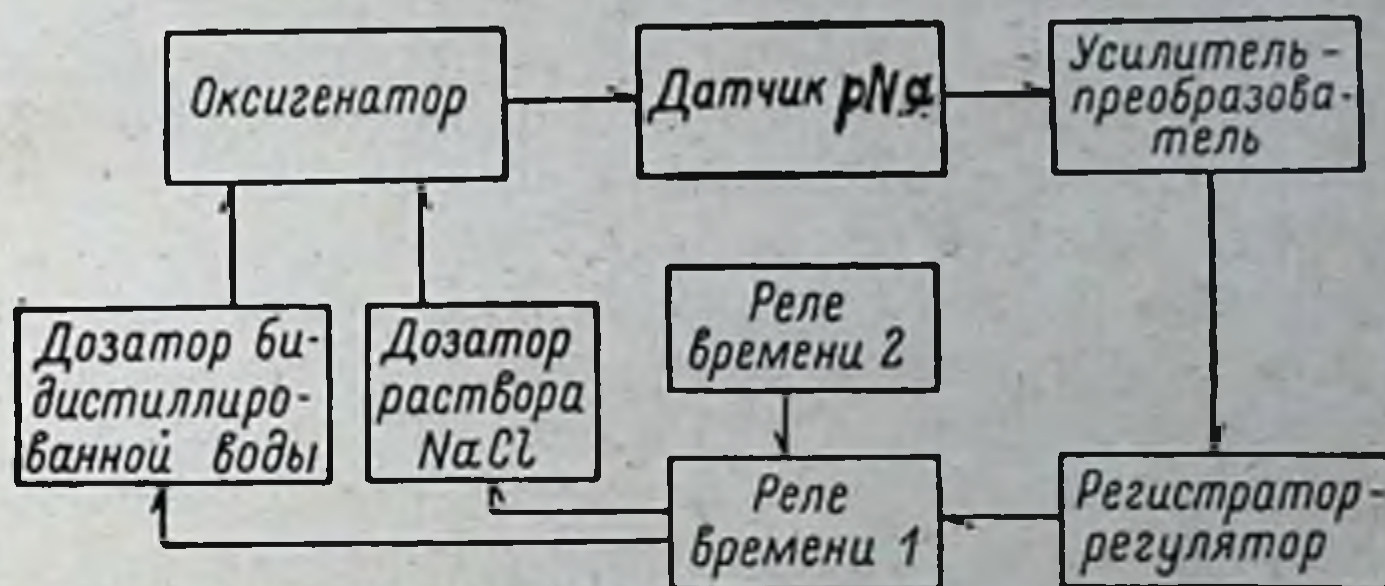


Рис. 35. Блок-схема регулирования рNa.

Постоянство осмотического давления крови в организме обеспечивается в основном органами выделения, причем в первую очередь поддерживается суммарное осмотическое давление и лишь затем — ионный состав плазмы. Особая роль принадлежит почкам, которые можно назвать главным регулятором онкотического давления крови.

Отсутствие датчиков, чувствительных к изменениям осмотического и онкотического давлений, не позволяет осуществить автоматическое слежение и регуляцию по этим параметрам. Поэтому измерение онкотического давления производилось дискретно с помощью рефрактометрического метода, поскольку показатель преломления биологических жидкостей почти целиком определяется содержанием белка. Для ведения процесса культивирования органов на различных уровнях осмотического давления, а также его стабилизации с определенной точностью в зоне оптимального режима наша установка имеет узел слежения и регулирования величины рNa, так как анализ литературных данных показывает, что ионы натрия дают наибольший вклад в осмотическое давление, и в подавляющем большинстве случаев изменение осмотического давления вызывает пропорциональное изменение рNa. Кроме того, периодически проводилась проверка осмотического давления криоскопическим методом.

Блок-схема узла слежения и регулирования рNa изображена на рис. 35. В качестве реагентов применены раствор хлористого натрия (для увеличения осмотического давления) и бидистиллированная вода (для его уменьшения). Чувствительным элементом служит стеклянный электрод. Схема работает следующим образом. При отклонении величины осмотического давления сигнал от датчика, усиленный блоком, включает регулятор, который в зависимости от направления рассогласования подключает дозаторы через реле времени подачи реагента и времени интервала.

4. Температура

Температура тела гомойотермных животных относительно постоянна и колеблется в узкой биокинетической зоне (оптимум T° для большинства клеток теплокровных $37-38.5^\circ \text{C}$). Для различных функций клеток и тканей наиболее благоприятны различные температуры. В связи с этим оптимальные температурные условия для организма достигаются стабилизацией крайне сложного пространственного температурного поля. Наличие в теле весьма сложного распределения температуры (в основном преобладают радиальные и аксиальные температурные градиенты) обусловлено неодинаковым теплообразованием в отдельных органах, их сложной геометрической формой, различной теплоизоляцией, различными условиями испарения, конвективного теплообмена и переноса тепла кровью (Бауер, 1962). Возможно условное разделение организма на внутреннюю — гомойотермную часть тела («сердцевину») и поверхностную часть тела («оболочку»), температура которой в определенной степени зависит от внешней среды. При таком разграничении вес «оболочки» составляет 20—35% от веса тела. При переохлаждении оболочка достигает 50% от всего тела, что соответствует средней толщине поверхностного слоя 2.5 см. В зависимости от условий «оболочка» либо выполняет роль демпфирующего слоя, защищая внутренние органы от охлаждения, либо активно излучает тепло, предотвращая перегрев органов.

Зависимость всех функций в организме от температуры сводится в конечном счете к температурной зависимости скоростей химических реакций. Для описания такой зависимости чаще всего используется температурный коэффициент Вант-Гоффа Q_{10} , характеризующий изменение константы скорости реакции при увеличении температуры на 10°C :

$$Q_{10} = \frac{K_2}{K_1} \quad (15)$$

По коэффициенту Вант-Гоффа можно судить и о природе процесса. Так, для простых химических реакций $Q_{10} = 2-3$, для

ферментативных процессов, возможно, $Q_{10} < 2$, для физических процессов (диффузия и т. д.) $Q_{10} \approx 1$.

Биохимические реакции очень чувствительны к температуре: даже при умеренном понижении температуры скорость основных метаболических процессов может упасть ниже уровня, необходимого для поддержания жизнедеятельности организма. Резкие колебания температуры могут стать причиной разрушения биологически активных химических структур, например денатурации белка.

Постоянство температуры тела обеспечивается регуляцией теплопродукции и теплоотдачи в организме. Регуляция теплопродукции заключается в управлении окислительными экзотермическими реакциями в различных органах и мышцах. Процесс теплоотдачи осуществляется несколькими путями: изменением величины поверхности тела, изменением кровотока в сосудах кожи, соответствующими изменениями в дыхании, потоотделении, положении волосяного покрова и т. д. Регуляция температуры тела осуществляется главным образом вегетативной нервной системой. Рефлекторная дуга терморегуляции обеспечивает центростремительную афферентную импульсацию от терморецепторов, соответствующую переработку сигналов в центрах терморегуляции, локализованных в промежуточном мозге, и эфферентную импульсацию к мышцам, сосудам, потовым железам и др. Большинство исследователей при моделировании терморегуляции принимает, что цель данной системы состоит в поддержании постоянства некоторой средневзвешенной температуры тела, например взвешенной суммы ректальной температуры и температуры кожи (Burton, 1941), или средневзвешенной температуры «сердцевины», кожи и мышечного слоя (Krosby et al., 1961).

Имеется предположение, что система терморегуляции направлена прежде всего на поддержание на постоянном уровне температуры «сердцевины» (Кандрор и Новосельцев, 1969). Наиболее полно разработанной моделью системы терморегуляции является, по-видимому, модель Кросби с сотр. (Krosby et al., 1961).

В условиях искусственного кровообращения регулирование температуры осуществляется с помощью теплообменников. При этом они должны удовлетворять всем требованиям, предъявляемым к элементам, применяемым при экстракорпоральном кровообращении. Необходимо обеспечить: нетоксичность материалов, стерилизуемость, атравматичность для эритроцитов, минимальное сопротивление кровотоку, безопасность для крови (исключение возможности контакта с хладо- или теплоносителем), малый объем первичного заполнения и т. д. Для эффективного теплообмена в малом объеме из существующих методов переноса тепла (радиации, кондукции и конвекции) применяется кондукция и конвекция. Теплообменникам придается форма спирали, цилиндра или пластинок. Спиральные теплообменники эффективны в работе,

однако их недостаток — трудность очистки. Росс (Ross, 1954) применил змеевик типа «труба в трубе»: по внутренней трубе циркулирует кровь, в промежутке между трубками — вода. Аналогичную конструкцию, с помещением стальной трубки, по которой циркулирует вода, в спиральную камеру оксигенатора пузырькового типа Уолла предложил Цуди с сотр. (Zuhdi et al., 1961).

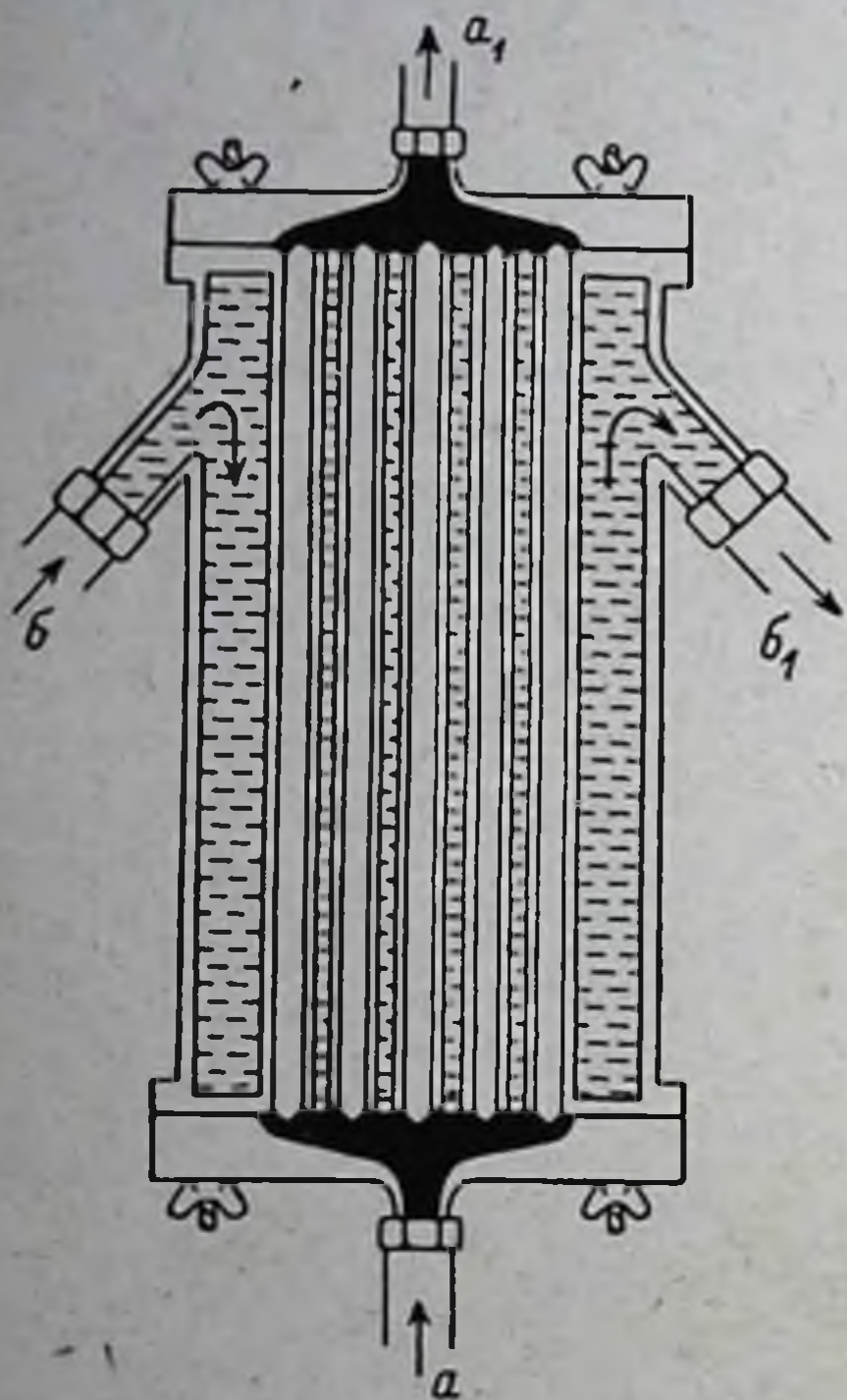


Рис. 36. Теплообменник цилиндрического типа (по: Вишневский, Харнас, 1968).

а—а, — движение крови; б—б₁ — движение тепло- и хладоносителя.

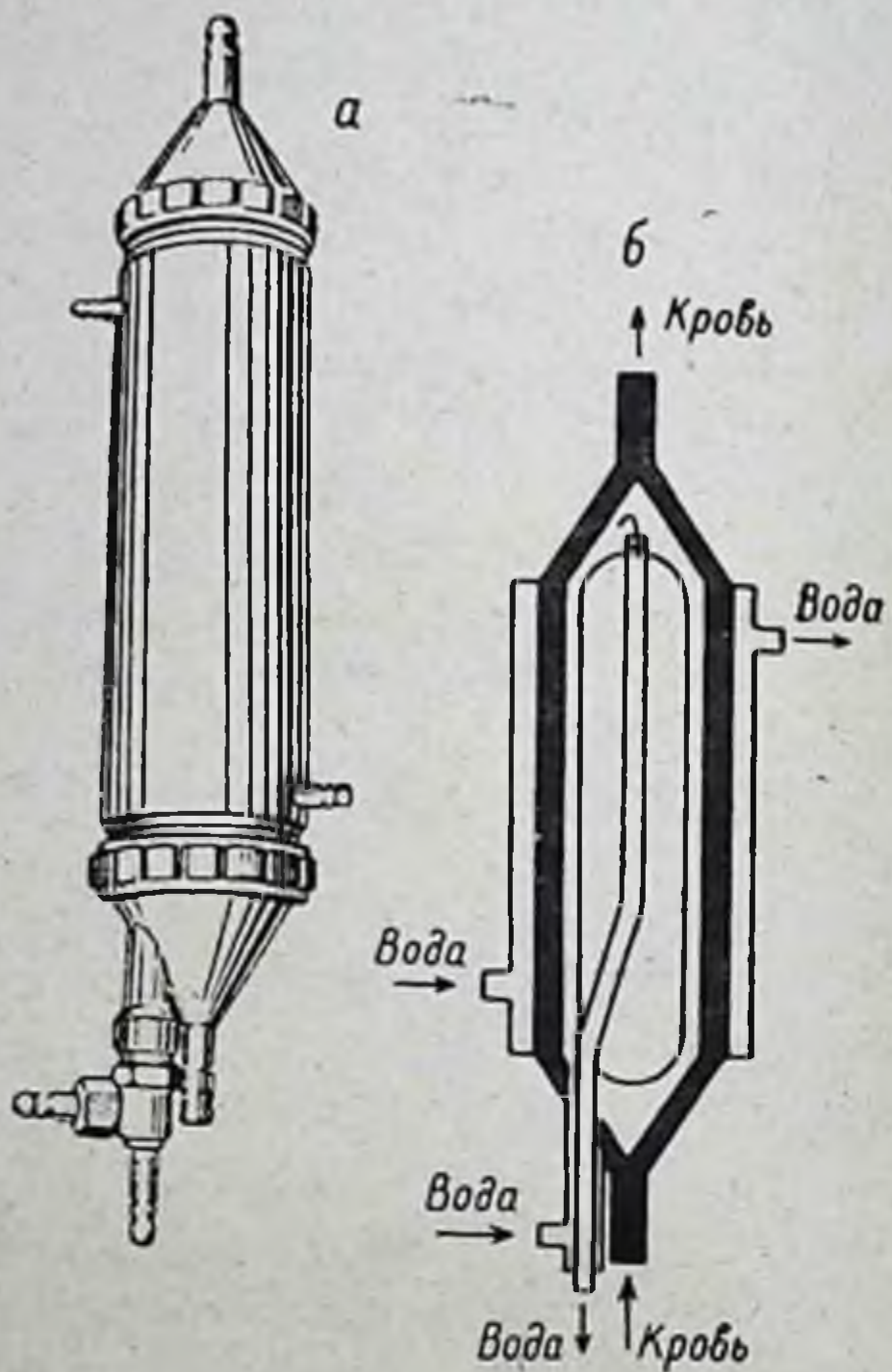


Рис. 37. Аннулярно-щелевой теплообменник А. А. Писаревского с сотр. (по: Вишневский, Харнас, 1968).

а — общий вид; б — схема.

Это уменьшило объем крови в спиральной камере без снижения эффективности ее работы.

Трубчатый теплообменник весьма эффективен, но более сложен (рис. 36). Теплообменник аннулярного типа, включающий в себя концентрические цилиндры, предложил Дреу (Drew, 1961). Оригинальная конструкция аннулярно-щелевого теплообменника, примененная А. А. Писаревским (1967) в аппарате искусственного кровообращения, изображена на рис. 37. В аппарате ИСХФ-4 использован дисковый теплообменник щелевого типа (рис. 38).

Теплообменник пластинчатого типа, сконструированный Ф. В. Баллюзком (1962), представляет собой трехкамерное устройство (рис. 39). Внутренняя камера, образованная двумя полированными пластинами из нержавеющей стали, разделенными по

Таблица 3

Характеристика теплообменников (по: Ковров и др., 1967)

Тип теплообменника	Теплообменник			Режим работы		
	материал	размеры	толщина • стенки, мм	расход теп- лоносителей, л/мин	перепад тем- пературы, °С	коэффициент теплопереда- чи, Вт/см ²
Труба «в трубе»	Дюраль	Внутренний диа- метр 15 мм, на- ружный 22 мм, длина 350 мм	1	7 (7)	23	6.2
То же	Стекло	Внутренний диа- метр 14 мм, на- ружный 30 мм	1.5	7 (7)	23	1.2
«Рубашка»	Оргстекло	Толщина водяно- го слоя 8 мм, площадь 0.33 м ²	10	3	8	0.06
Змеевик в охла- ждающей воде	Резина шланговая красная	Длина 310 см, диаметр 1 мм	1.5	4	23	0.3

Примечание. Цифры в скобках — величина потока хладагента. «Рубашка» — заполненный хладагентом или теплоносителем объем, окружающий рабочее пространство.

краям резиновыми прокладками толщиной 2 мм, имеет входную и выходную канюли, через которые циркулирует кровь. Наружные камеры соединены между собой и через них циркулирует тепло-хладоноситель. Объем заполнения кровью составляет 200 см³ при поверхности теплоотдачи, равной 0.25 м²

В последнее время получили широкое распространение газообменники, совмещенные с теплообменным устройством: оксигенаторы-теплообменники. Примером такой конструкции может служить модель пенно-пленочного оксигенатора (Бобров, Турчанинова, 1968) (рис. 40). В нижней части газообменника, в его отстойной камере, расположен теплообменник кожухо-трубчатого типа. Совмещение этих устройств позволило уменьшить первичный объем заполнения оксигенатора в три раза.

Представляет интерес конструкция теплообменников (Ковров и др., 1967), применяемых в установках для непрерывного управляемого культивирования микроорганизмов. Характеристики теплообменников подобного типа, выполненных из различных материалов, представлены в табл. 3.

Все рассмотренные теплообменники эффективны, имеют значительную поверхность теплообмена и приспособлены для боль-

ших объемных скоростей кровотока. Но для культивирования органов требуется конструкция, позволяющая нагревать или охлаж-

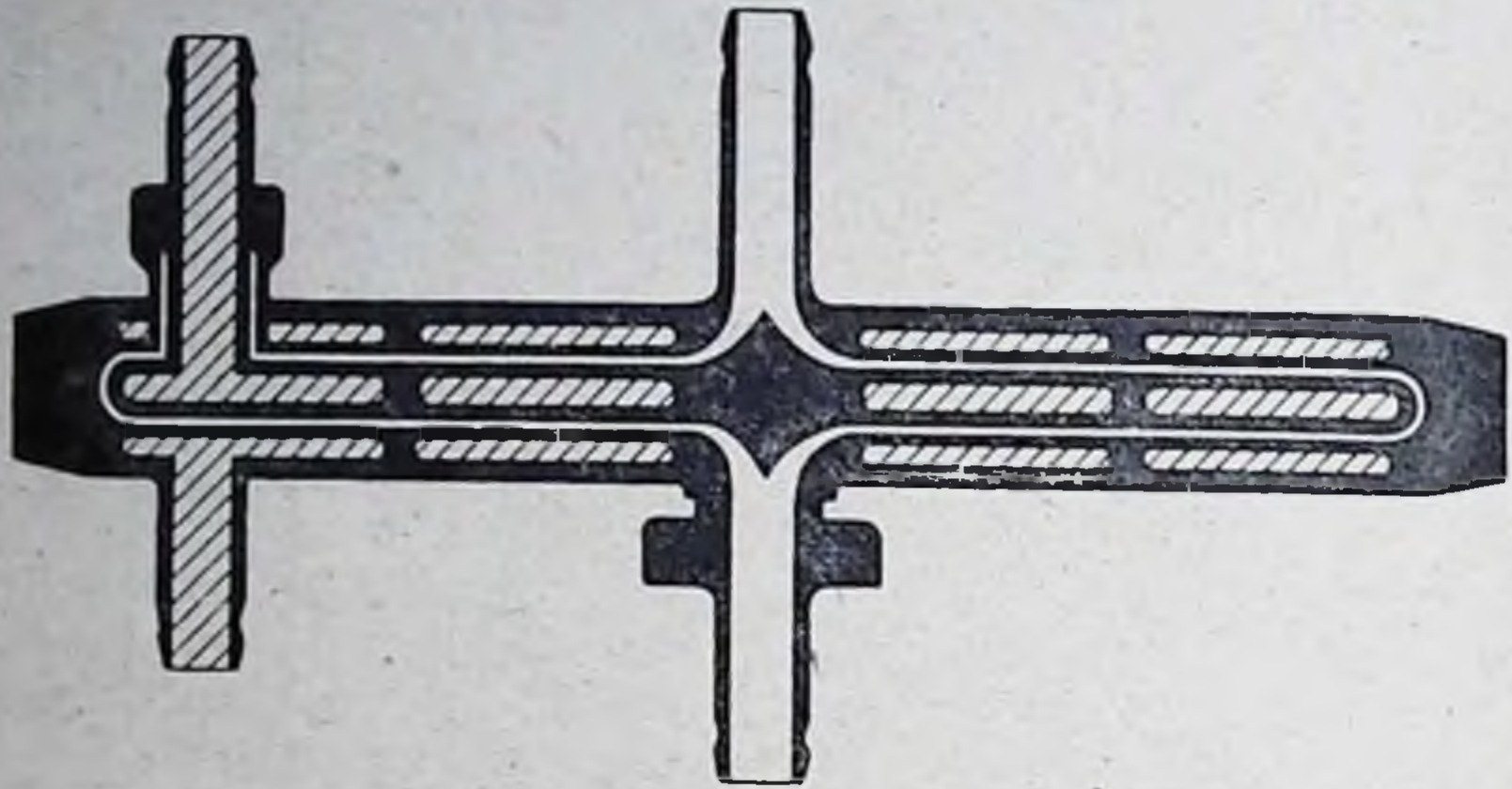


Рис. 38. Схема дискового теплообменника щелевого типа. Модель ИСХФ-4:

Темное — корпус; белое — кровь; заштрихован — тепло-хладоноситель.

дать кровь, чтобы она не успевала охлаждаться на пути к органу в условиях слабого потока. Из рис. 41 видно, что кровь быстро

охлаждается по пути в оксигенатор, поэтому теплообменник необходимо располагать непосредственно возле органа. Так как поток перфузата при культивировании органов небольшой, то вполне достаточно теплообмена, обеспечиваемого конвекцией, что значительно упрощает конструкцию. Для термостабилизации крови нами применено устройство, представленное на рис. 42. Теплообменник состоит из цилиндра с водой, в нижней части которого расположены нагревательные элементы, а в верхней — термочувствительный датчик. Кровь циркулирует по трубке, изогнутой в форме расширяющейся спирали, соединенной с электронагревателем. Все это устройство заключено в цилиндрический резервуар с дистиллирован-

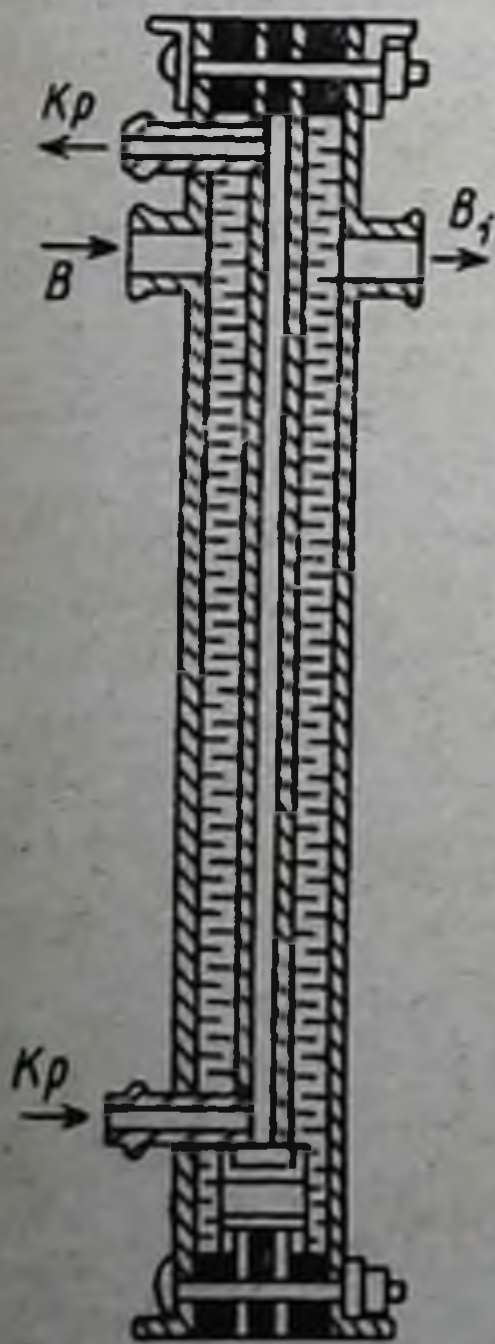


Рис. 39. Теплообменник пластинчатого типа (по: Баллюзек, 1962а).

Кр — движение крови; В—В₁ — циркуляция тепло-хладоносителя.

ной водой, температура которой стабилизируется при помощи двухпозиционного регулятора с тиристорным ключом: при дости-

жении номинальной температуры схема переключается на пониженное напряжение, чем достигается сглаживание пульсаций температуры в 2—3 раза.

Для работы в гипотермических условиях в теплообменнике предусмотрены два штуцера — сверху и снизу, через которые можно пропускать воду для охлаждения крови. Если необходимо быстро перейти от гипотермии к нормотермии или обратно, применяется дополнительное устройство с регулятором; через него подается вода от магистрали, которая нагревается, приобретая на выходе заданную температуру. При достижении заданной температуры крови это устройство отключается и теплообменник работает самостоятельно. Введение обратной связи по скорости кровотока в цепь управления нагревателя теплообменного устройства значительно улучшит характеристику теплообменника. Электронагревательные элементы закреплены на пробках со шлифом, что позволяет производить аварийную замену их при выходе из строя во время работы. Температурный каскад в системе орган — установка зависит от скорости циркуляции перфузата. Измеренное при пер-

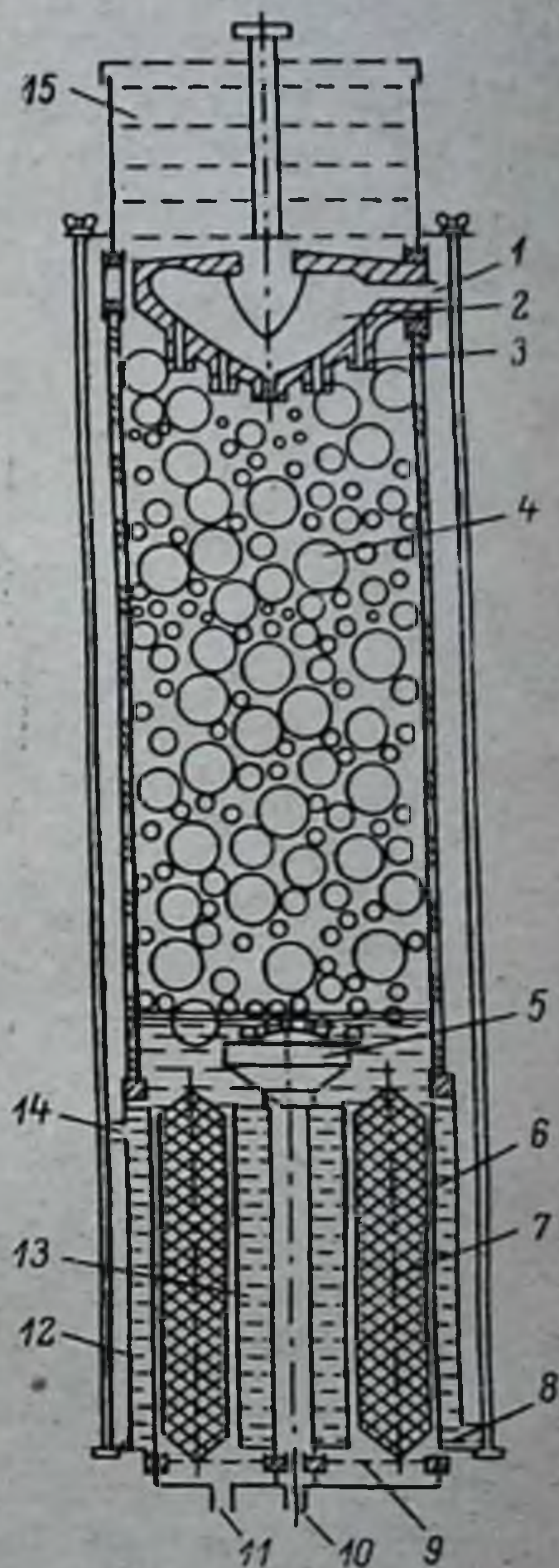


Рис. 40. Конструкция пено-пленочного оксигенатора со встроенным теплообменником (по: Бобров, Турчанинова, 1968).

1 — штуцер ввода венозной крови; 2 — центробежная камера; 3 — дюзы; 4 — пенный столб; 5 — распределитель кислорода; 6 — цилиндрические трубки; 7 — мандрены; 8 — штуцер для подвода воды; 9 — фильтр; 10 — штуцер для подачи кислорода; 11 — штуцер для выхода крови; 12 — водяная рубашка; 13 — увлажнительная камера; 14 — штуцер для отвода воды; 15 — перфорированные диски.

фузии задней конечности собаки температурное распределение изображено на рис. 43.

Для измерения температуры в тканях органа и различных участках гемодинамической магистрали установки нами изготовлены игольчатые датчики, представляющие собой тонкие инъекционные иглы, в запаянных концах которых находятся термисторы. Полупроводниковые термосопротивления типа Т8, Т9, ТШ имеют рабочее тело диаметром в несколько десятых миллиметра, укрепленное внутри малого стеклянного баллончика. При удалении стеклянного баллончика термистор имеет постоянную времени около 0.1 сек. Использование термистора в качестве чувствительного

элемента позволяет определять температуру с высокой точностью благодаря высокому температурному коэффициенту сопротивления. Для точных измерений сопротивления термистора используются потенциометрические и мостовые схемы.

Наружная поверхность игл датчика, кроме конца (рабочая часть), покрывается пленкой лака. Такая конструкция датчиков температуры позволяет вводить их рабочую часть в любой уча-

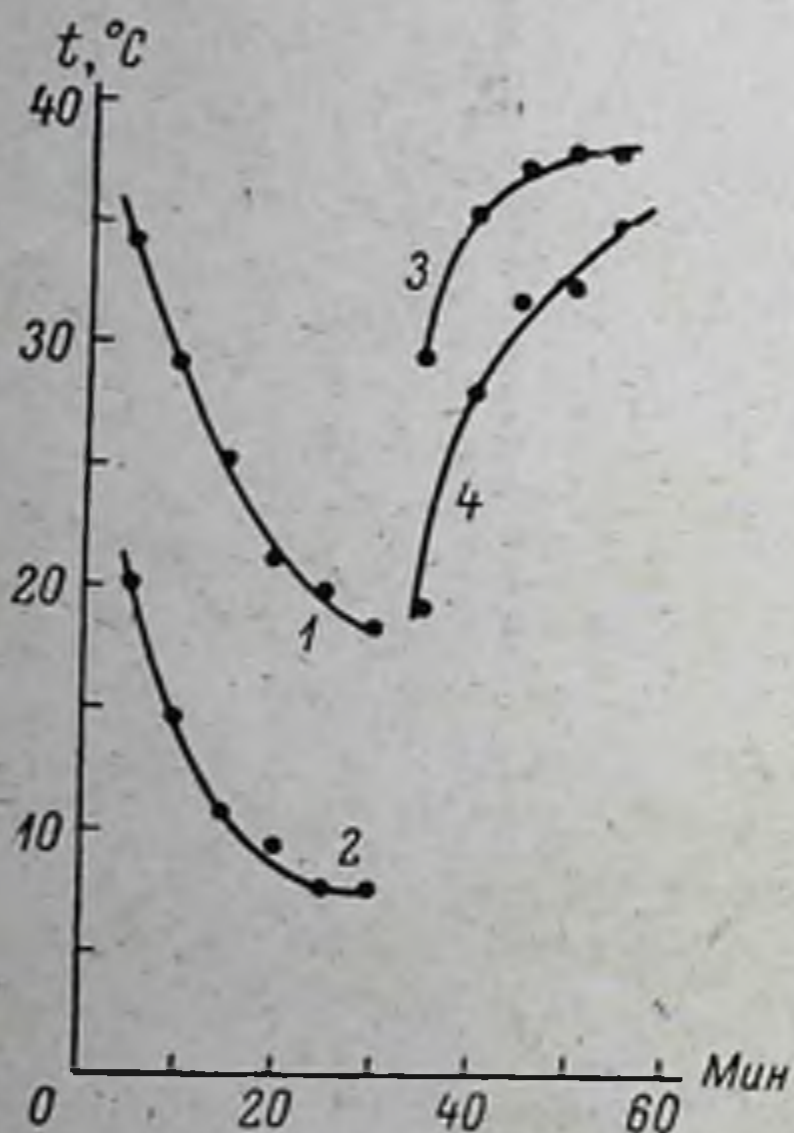


Рис. 41. Изменение температуры крови на входе в оксигенатор в процессе охлаждения (1) и нагрева (4) и на выходе из теплообменника в процессе охлаждения (2) и нагрева (3) (по: Бобров, Турчанинова, 1968).

Теплообменник рассчитан на максимальную скорость кровотока 1.2 л/мин.

старенные термисторы работают стабильно: изменение их сопротивления не превышает 0.2% в год (Lion, 1964). Преимущество термисторов перед металлическими термометрами сопротивления заключается в их малых размерах и высоком температурном коэффициенте. К недостаткам можно отнести нелинейную зависимость сопротивления термистора от температуры. Однако,



Рис. 42. Общий вид теплообменника установки «Гомеостат-1» ИФ СО АН СССР.

сток исследуемого органа с минимальным травмированием тканей. Полупроводниковые термосопротивления подвержены старению — изменению сопротивления во времени. Однако предварительно со-

используя мостовую схему измерения, можно получить близкую к линейной зависимость тока измерителя от температуры (Нечаев, 1962).

Микротермисторы работают в режиме с малым собственным рассеянием (при малых токах, которые не могут изменить их собственную температуру), в результате сопротивление микротермистора определяется температурой окружающей его среды.

Автоматическая система регулирования температуры, применяемая в наших исследованиях, позволяет поддерживать заданную температуру перфузата с определенной точностью незави-

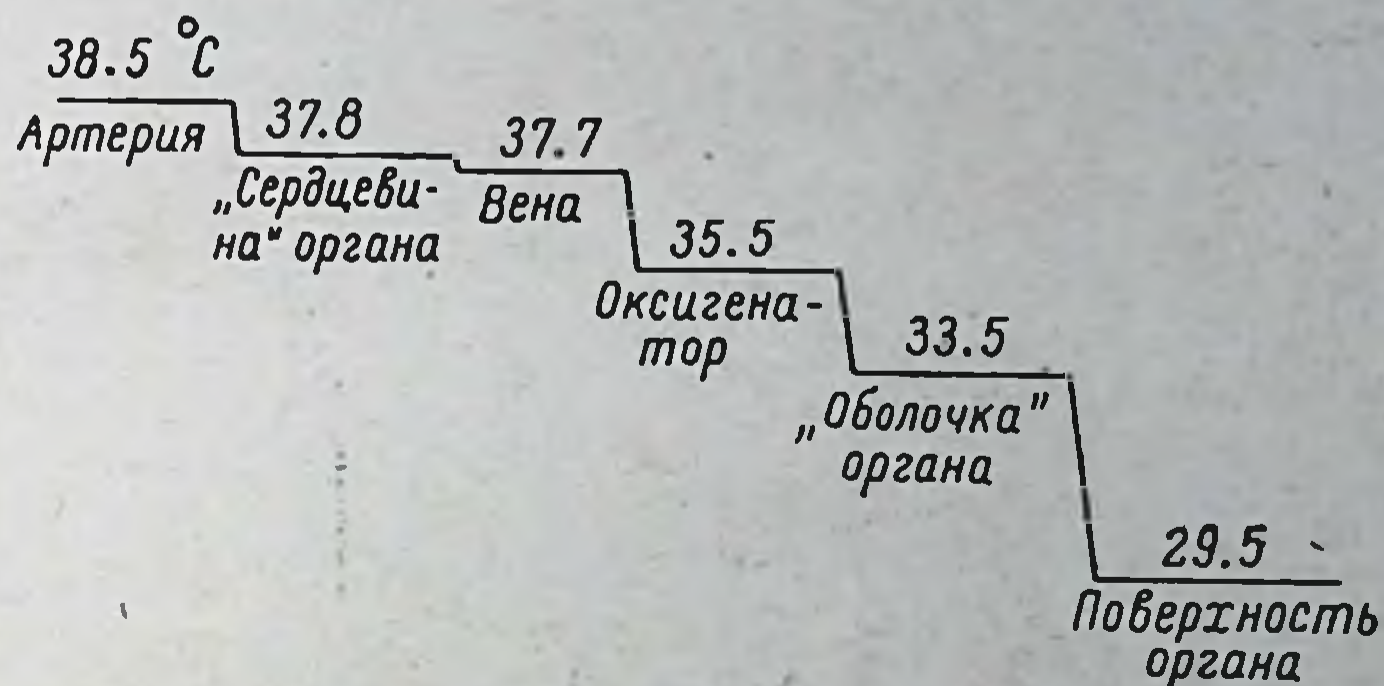


Рис. 43. Градиент температуры конечности собаки при перфузии.

симо от скорости циркуляции и температуры окружающей среды. При этом основным возмущением терморегулятора является температура циркулирующего перфузата, скорость которого может изменяться. Следствием этого будет различное воздействие на регулятор. Поэтому один термоэлемент устанавливается в поток перфузата, другой — в воду теплообменника. Для уменьшения инерционности системы используются терморезисторы с минимальной постоянной времени.

Для повышения точности определения температуры перфузата необходимо уменьшить рассеиваемую мощность термистора, что ведет к усложнению измерительной схемы. После разогрева теплообменника до минимального уровня нагреватель переводится на пониженное напряжение. Это позволяет значительно уменьшить пульсацию. Электрическая схема регулятора дана на рис. 44. После включения в сеть терморегулятора срабатывает (за счет зарядного тока конденсатора C_2) и самоблокируется реле P_2 . При этом нормально замкнутый контакт P_2 размыкается, отключая от термочувствительного моста резистор R_3 , перестраивая тем самым мост на температуру ниже рабочей на 0.5° . После достижения этой температуры включается реле P_1 , разрывая цепь питания для реле P_2 , которое отключает тиристор D_1 , в результате схема терморегулятора продолжает работать только на одном

тиристоре, т. е. напряжения питания на нагреватель подается в два раза ниже начального. Реле P_2 при отпускании якоря замыкает свой нормально замкнутый контакт, подключая резистор R_5 и, следовательно, перестраивая термочувствительный мост на рабочую температуру. Дальнейшая работа терморегулятора производится реле P_1 с пониженным напряжением на нагревателе.

Термочувствительными элементами служат терморезисторы типа КМТ-1 и МТ-54, включенные в противоположные плечи моста.

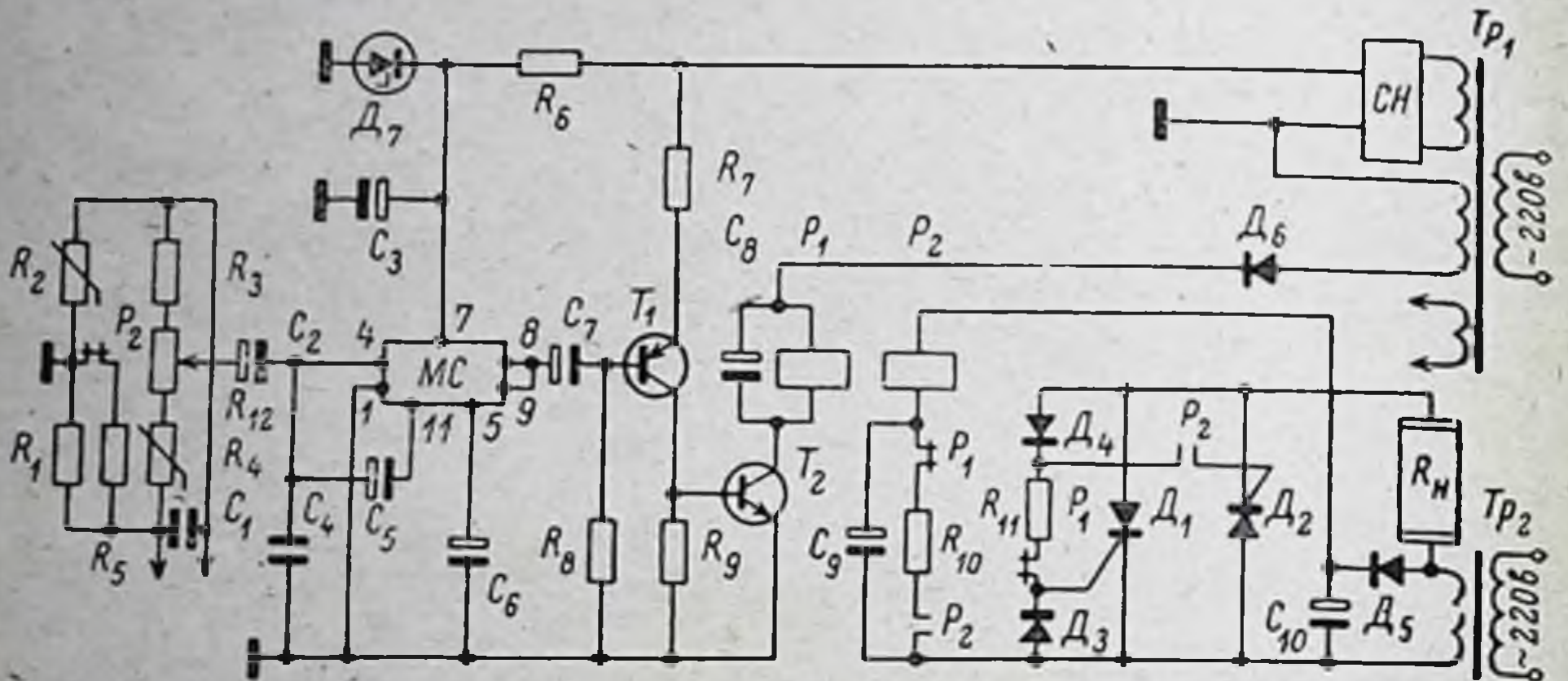


Рис. 44. Схема управления теплообменником.

$R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_{11}, R_{12}$ — резисторы: МЛТ-1 ($R_1, 2$ кОм; $R_3, 1$ кОм; $R_5, 200$ кОм), МЛТ-0.5 ($R_6, 300$ кОм; $R_7, 100$ кОм; $R_8, 3.3$ кОм; $R_{10}, 3.6$ кОм); МЛТ-0.25 ($R_9, 100$ кОм; $R_{11}, 100$ кОм), ПП-3-40 ($R_{12}, 1$ кОм); R_2, R_4 — терморезисторы: МТ-54 ($R_2, 2$ кОм); ММТ-4 ($R_4, 1$ кОм). $C_1, C_2, C_3, C_4, C_5, C_6, C_7, C_8, C_9, C_{10}$ — конденсаторы: КД ($C_1, 1000$); К50-6 ($C_2, 5.0 \times 10$; $C_3, 30.0 \times 15$; $C_4, 50.0 \times 10$; $C_5, 5.0 \times 10$; $C_6, 10.0 \times 10$; $C_7, 5.0 \times 100$; $C_8, 20.0 \times 100$); КЛС ($C_9, 10\ 000$; $C_{10}, 10\ 000$); $D_1, D_2, D_3, D_4, D_5, D_6, D_7$ — диоды: Д238В (D_1, D_2); Д226Д (D_3, D_4); Д7Б (D_5); Д226А (D_6); КС-168А (D_7). T_1, T_2 — транзисторы: МП114 — T_1 , КТ604Б (T_2). R_1, R_2 — реле (РЭС-9); МС — микросхема IUC-22IB: 1, 4, 5, 7—9, 11 — выходы микросхемы; СН — стабилизатор напряжения (12 в); R_H — нагреватель; Tr_1, Tr_2 — трансформаторы.

Термочувствительный мост питается переменным током от трансформатора Tr_1 . В противоположную диагональ моста включен усилитель переменного тока. Напряжение разбаланса усиливается и подается на управляющий электрод выходного транзистора T_2 , в коллекторную цепь которого включено электромагнитное реле P_1 . Выходной транзистор питается переменным (пульсирующим) током через диод D_6 от этого же трансформатора Tr_1 , чем обеспечивается фазочувствительность схемы. При совпадении фазы напряжения разбаланса моста с напряжением на коллекторе транзистора T_2 (что происходит при расстройке термочувствительного моста вследствие понижения контролируемой температуры), через последний будет протекать максимальный ток (при положительной полуволне), от которого срабатывает реле P_1 . При разбалансе моста в другую сторону (напряжения противоположны по фазе) транзистор T_2 остается запертым и якорь реле P_1 отпущенным.

Применение маломощных термодатчиков с малой рассеиваемой мощностью требует применения усилителя переменного тока с большим коэффициентом усиления. В качестве предварительного усилителя применена микросхема ИУС 221, соединенная с оконечным каскадом через буферный усилитель. Такая схема позволила получить большой коэффициент усиления. Питание переменным током моста рассогласования требует большого усиления сигнала, иначе у регулятора появляется большая зона нечувствительности. Увеличением коэффициента усиления схемы терморегулятора достигается высокая точность поддержания температуры теплообменника.

Описанная схема обеспечивает: 1) достаточно высокую точность поддержания точки термостатирования ($\pm 0.2^\circ \text{C}$); 2) высокую стабильность при изменении температуры окружающей среды; 3) высокую стабильность при изменении скорости циркулирующего перфузата; 4) малые габариты и потребляемую мощность; 5) увеличение надежности регулятора и срока его службы при бесконтактном подключении нагревателя к сети питания с помощью тиристорного ключа.

5. Определение функциональной активности и состояния тканей перфузируемого органа

Самая достоверная оценка адекватности перфузии органа — это определение состояния и функциональной активности его тканей. Вместе с тем измерение этих показателей представляет собой основной источник полезной информации, ради которой предпринимаются эксперименты с изолированными органами. Поэтому выбор методов анализа состояния перфузируемого органа представляет собой важнейшую проблему, определяющую конечную ценность всего эксперимента. Эта задача имеет также и важный практический аспект. Перед пересадкой органов и тканей необходимо знать состояние трансплантата — степень его жизнедеятельности, способность восстановить функциональную активность.

Из существующих методов оценки жизнеспособности ни один не является абсолютным. Только комплексное исследование с применением ряда методов позволяет оценивать состояние органов и тканей. Выбор методов зависит от специфики органа, условий эксперимента, его задачи. Поэтому представляется необходимым дать возможно более полный обзор существующих методов. Исходя из сложности определения состояния и функциональной активности перфузируемых органов, этот вопрос рассмотрим главным образом на одном примере — костном мозге.

Безусловно, точным показателем состояния исследуемой ткани служит способность органа к приживлению и нормальному его функционированию. Однако этот ответ ретроспективный — тогда как представление о качестве трансплантируемого материала

требуется до решения об операции. Кроме того, если приживление органа дает однозначный ответ, то отсутствие приживления может зависеть не только от органа, но и от дефекта в выполнении операции, от взаимодействия трансплантата с реципиентом со всей неопределенностью этой иммунологической проблемы. Тем не менее в экспериментальных исследованиях этот метод используется как окончательный критерий пригодности ткани к трансплантации и может служить оценкой условий перфузии, которой орган подвергался до пересадки.

Методы определения жизнеспособности можно подразделить на цитоморфологические, цитохимические, метаболические, биофизические, иммунологические, клеточно-популяционные, функциональные и опосредованные через кровь.

Цитоморфологические и цитохимические методы

На помещение органа в экстремальные условия искусственного культивирования клетки, составляющие его ткани, могут отвечать стереотипными патологическими реакциями — инфильтрацией, дегенерацией, аутолизом, нарушением тканевой архитектоники, аплазией одних и метаплазией других видов тканей. На рис. 45 приведены микрофотографии препаратов костного мозга из грудины после 12-часового культивирования. Для анализа состояния клеток культивируемого органа применимы все методы, которыми располагают нормальная и патологическая цитология. Предпочтение при выборе должно быть отдано методам, чувствительным к ранним изменениям, в особенности таким, которые позволяют характеризовать эти изменения количественно. Такие возможности представляют методы современной морфометрии и микроспектрофотометрии.

Рассмотрим возможности цитологических методов на примере культуры кроветворной ткани. Для костного мозга применяются обычно цитологические методы: определение содержания ядерных элементов, клеточного состава и состояния клеток. Подсчет клеток костного мозга производится в камере Горяева по общепринятым правилам. Применение электронных счетчиков клеток (целлоскоп, култер-каунтер и др.) облегчило и ускорило процедуру анализа, а главное, намного повысило его точность. Клеточный состав изучается в мазках, окрашенных различными способами, чаще по Романовскому—Гимза. Ценную информацию дает применение цитохимических методов (Залкинд, Заславский, 1962; Терентьева и др., 1974, и др.), особенно в сочетании с цитофотометрией (Бродский, 1965; Гительзон и др., 1972; Гомзякова и др., 1973, и др.), позволяющей количественно оценить результаты исследования. Обнаружено, что микроскопические изменения структуры клеток и архитектоники тканей проявляются при электронной микроскопии раньше, чем нарушения, видимые в оптический микроскоп. Поэтому в последние годы электронной микроскопии

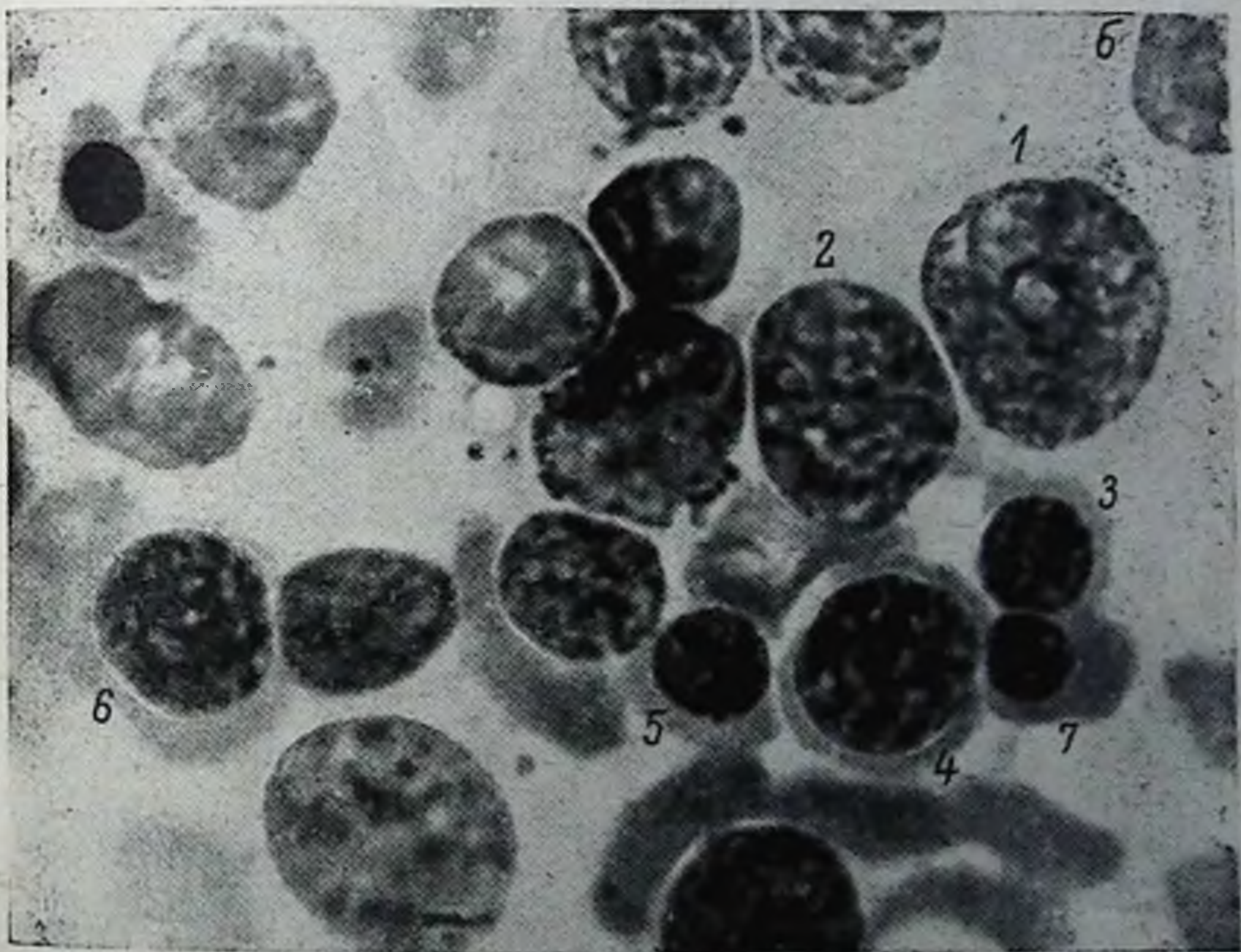
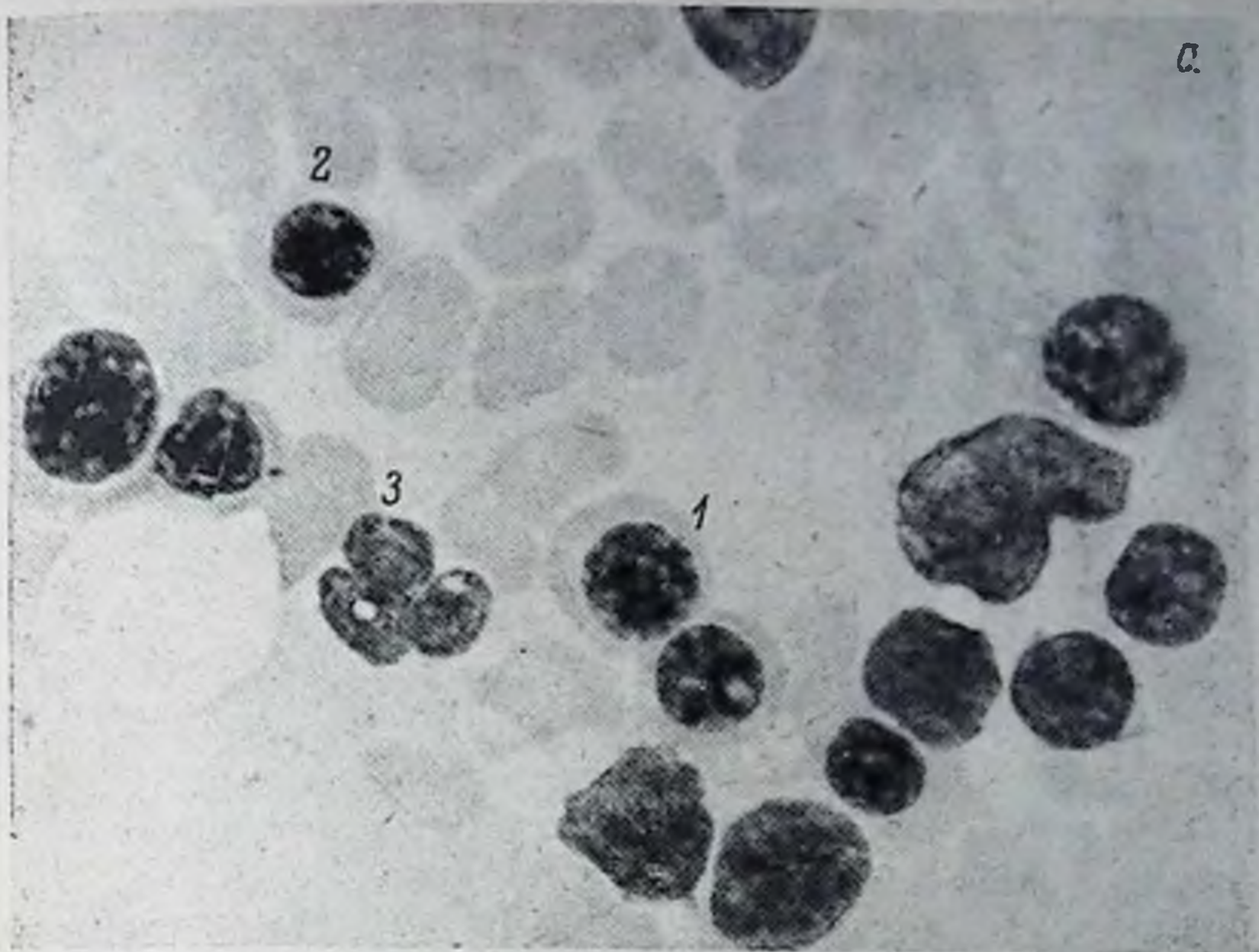


Рис. 45. Клетки костного мозга собаки после 12 часов перфузии (окраска по Романовскому—Гимза).

а — контроль: 1, 2 — эритробласты различной степени зрелости, 3 — моноцит; б — опыт: 1, 2 — ретикулярные клетки, 3—6 — эритробласты различной степени зрелости, 7 — нормобласт.

перфузированных тканей, несмотря на относительную сложность этого метода, уделяется все большее внимание (MacKay et al., 1968; Лопухин и Коган, 1975).

Эти методы дают представление о динамических изменениях клеточного состава в ходе культивирования. Для оценки состояния клеток часто используется метод люминесцентной микроскопии с применением в качестве флюорохрома акридина оранжевого (Спичарская, 1961; Hathaway et al., 1964, и др.). Метод люминесцентного тетрациклинового зонда для определения жизнеспособности клеток предложен Ю. М. Лопухиным и Э. М. Коганом (1975).

Функциональные методы

К функциональным относятся методы, определяющие уровень специфической активности органа — электрическую активность нервной ткани, сократительную деятельность мышц, секреторную и инкреторную активность железистых органов, клеточную продукцию пролиферирующих тканей и т. д.

Оценка функциональной активности клеток крови заключается в измерении фагоцитарной и пролиферативной активности, изучении клеточной подвижности, способности к гранулообразованию и прижизненному окрашиванию.

Измерение фагоцитарной активности клеток использовали многие авторы для изучения состояния костного мозга, взятого от доноров или из трупов (Караванов, 1940; Лаврик и др., 1964; Спичарская, 1964, и др.). При исследовании фагоцитарной активности костного мозга Л. М. Спичарская (1963) применяла живые культуры стафилококка и кишечной палочки. Взвесь, которая приготавливалась из этих микробов, добавлялась к клеткам костного мозга. После инкубации в термостате делались мазки костного мозга для микроскопии. Вычислялся процент фагоцитировавших клеток и фагоцитарный индекс (среднее количество микроорганизмов, захваченных одной клеткой). По степени выраженности фагоцитарной активности условно выделено четыре состояния клеток: а) с завершенным фагоцитозом; б) с частичным перевариванием микробов; в) с проявлениями фагоцитоза; г) без фагоцитоза. В основном фагоцитоз в костном мозге осуществляется зрелыми гранулоцитами, молодыми нейтрофилами — промиелоцитами и эозинофилами.

Согласно Л. М. Спичарской, фагоцитарная активность клеток костного мозга, полученного в первые четыре часа после смерти, в среднем составляет 72.4%, а фагоцитарный индекс — 20.5%. Для свежего донорского костного мозга фагоцитарная активность равна 75—90% при индексе 15—22%. По этому показателю клетки костного мозга, заготовленные в первые часы после смерти организма, мало отличаются от донорских. Эти данные согласуются с результатами, полученными Н. А. Ме-

федовой (1964), изучавшей фагоцитарную активность клеток костного мозга плодов человека.

Изучение подвижности клеток. Подвижность клеток свидетельствует об их жизнеспособности. Этот метод костного мозга применял Перри с сотр. (Perry et al., 1960); Портеус и др. (Porteus, 1961). Исследование производится с помощью фазово-контрастного микроскопа. Портеусом было отмечено, что подвижность клеток зависит от срока получения костного мозга после смерти организма. Наиболее выраженной она была в первые пять часов.

Определение способности клеток к гранулообразованию. Способность клеток к абсорбции основных красителей в виде гранул свойственна только клеткам в состоянии, близком к физиологическому (Насонов, 1940). При этом ядро и цитоплазма жизнеспособных клеток остаются бесцветными. Умирая, клетка утрачивает способность откладывать гранулы красителя, а ее ядро и цитоплазма равномерно прокрашиваются. Наиболее пригодным красителем для исследования гранулообразования является 0.1%-й раствор нейтрального красного в жидкости Рингера без бикарбоната натрия. Этот метод определения жизнеспособности мозга был использован Л. И. Спичарской (1967).

Разновидностью метода определения жизнеспособности клеток является прижизненная окраска. Впервые описанный Шреком (Schreck, 1936), этот метод благодаря своей простоте и доступности был широко применен при изучении жизнеспособности клеток (Бутомо и др., 1963; Капичников, 1963; Пхрикян, 1963; Мефедова, 1964, и др.). При этом используют не основные красители, как при изучении гранулообразования, а кислые: 1%-й водный раствор эозина (Лаврик и др., 1964; Астахова, Мамышева, 1965, и др.), эритрозина (Пхрикян, 1963), 0.1%-й раствор трипановой или метиленовой сини (Капичников, 1963; Мефедов и др., 1967). Жизнеспособные клетки не воспринимают краску, а мертвые — диффузно окрашиваются.

Определение пролиферативной активности. Интенсивность клеточного размножения определяется по скорости синтеза ДНК (Thomas et al., 1959). Применяется автордиография при инкубации костного мозга с глицином— C^{14} и тимидином— H^3 . Так, Г. И. Козинец (1964) исследовал костный мозг доноров, трупов людей и обезьян, собак и кроликов автордиографическим методом. По его данным, костный мозг доноров и лабораторных животных содержит 80—95% способных к пролиферации клеток, а пролиферативная активность трупного костного мозга, взятого в первые часы после смерти, равна 70—85%.

Культура тканей in vitro. Этим методом для определения жизнеспособности тканей длительно культивируемых органов успешно пользовался еще Каррель (Carrel, Lindbergh, 1938); не вполне пригодным его можно считать лишь для растущих элементов тканевой культуры. При этом Каррель, а позднее

Алгёвер (Allgöver, 1952), отмечали, что даже через несколько дней после прекращения роста ткани *in vitro* ткань сохраняет способность развиваться в благоприятных условиях — *in vivo*. Для определения жизнеспособности костного мозга этот метод применяли М. М. Капичников и др. (1963), Н. В. Бутомо и др. (1963, 1965) и др. Н. А. Мефедова (1964) методом культуры ткани установила, что клетки костного мозга, консервированного в растворах № 1, 2, 3, изготовленных в Центральном институте гематологии и переливания крови, остаются жизнеспособными в течение 5—8 дней хранения.

Представляют интерес методы определения жизнеспособности клеток костного мозга, основанные на феномене экспериментальной спленомегалии. Так, Иберт (Ebert, 1954) показал, что любая жизнеспособная ткань, богатая ретикулоэндотелиальными клетками, вызывает спленомегалию у куриного зародыша после пересадки ее на хорионаллантоис. Симонсен (Simonsen, 1957) предпринял попытку объяснить это явление тем, что возникновение спленомегалии связано с пролиферацией пересаженных клеток и их способность к продуцированию антител.

Лангерова и Абрахам (Lengrova, Abraham, 1960) внутрибрюшинно переливали консервированный костный мозг новорожденным мышам. При этом был также получен спленомегалический эффект, степень которого зависела от количества пересаженных клеток. В. И. Теодорович (1962) получила подобный эффект при посеве концентрированных клеточных взвесей костного мозга на хорионаллантоис куриного зародыша. Эти данные позднее были подтверждены также Ж. А. Пхриян (1964).

Для оценки пролиферативной активности костного мозга может быть применен также метод Тилла—Мак Каллока (Till, McCulloch, 1961), основанный на способности костного мозга при внутривенном введении облученным мышам образовывать через 7—10 дней макроскопически хорошо видимые дискретные колонии в селезенке реципиента. В среднем при трансплантации 10^4 клеток сингенного костного мозга образуется одна колония.

Сравнение способности ткани костного мозга повышать выживаемость облученных животных и образовывать селезеночные «колонии» дает хорошее совпадение результатов (Lewis, Trobanch, 1964). Для оценки жизнеспособности клеток С. С. Лаврик и А. Н. Тринченко (1967) применили имплантацию костного мозга в селезенку с последующим определением миелокариоцитов в отпечатках срезов этого органа.

Методы исследования метаболизма

Метаболические методы определения жизнеспособности клеток и тканей перспективны, но еще недостаточно разработаны. Здесь прежде всего следует обратить внимание на некоторые показатели энергетического обмена клеток. Так, М. Н. Ылинов (1964)

изучал дыхание, гликолиз, синтез гликогена, содержание АТФ и некоторые ферменты, участвующие в синтезе гликогена. Было показано, что клетки костного мозга, взятого не позднее трех часов после смерти, сохраняют способность активно поглощать кислород и образовывать молочную кислоту. Целостная система метаболических критериев жизнеспособности предложена В. И. Шумаковым и др. (1975). Они исходили из представления о жизни как о состоянии устойчивого неравновесия со средой. Этот глубокий общеприродный принцип был сформулирован еще Э. С. Бауэром (1930). Шумаков и соавторы предлагают количественно оценить работу, производимую органами для поддержания этого неравновесия по теплопродукции, потреблению кислорода, работе натриевого насоса, поддержанию окислительно-восстановительного потенциала. Введя представление о должных затратах для органа в физиологическом состоянии, эти авторы предлагают определять глубину отклонения состояния переживающего органа от нормы по отличию между измеренным и должным значениями энергетических или связанных с ними показателей. Накопление этого отличия они называют задолженностью органа — энергетической, кислородной и т. п. Например, расчет энергетической задолженности производится по формуле

$$D_s = Ht - \int_0^{\infty} h(t) dt, \quad (16)$$

где D_s — энергетическая задолженность; H — должная скорость энергетических трат органа; h — наблюдаемая скорость энергетических трат органа; t — продолжительность наблюдения.

Авторами предложены алгоритм обработки текущей информации о состоянии органа по непрерывно регистрируемым интегративным показателям (энергетике, дыханию и др.) и устройство для реализации этой информационной системы в виде аппарата для консервации органов с анализатором жизнеспособности. Эта система привлекает своей логической стройностью и биологической обоснованностью, но требуется еще большая работа по экспериментальному соотнесению измеряемых значений интегративных показателей с полем многочисленных вариантов состояний, в которых может находиться исследуемый орган. Вопрос об однозначности связи между интегративными показателями и состоянием живого объекта остается открытым.

Нами при перфузии органов исследовались потребление кислорода тканями (скорость дыхания митохондрий и клеточных гомогенатов), а также константа скорости потребления кислорода (КСП O_2) клеточных взвесей и тканей.

Определение КСП O_2 тканей производилось полярографически с помощью открытых платиновых электродов (Эпштейн, 1968). Эта методика обладает значительными преимуществами,

поскольку измерение производится без нарушения естественной архитектоники тканей, ее кровообращения, микроциркуляции и диффузионных потоков. Культивируемую ткань удобно периодически лишать доступа кислорода, прекращая артериальный приток, и в этот период регистрировать падение P_{O_2} за счет его потребления клетками (рис. 46). Нами при перфузии органов этот процесс автоматизирован следующим образом: на артериальной и венозной пластиковой магистралях кровоснабжения органа ставятся фторопластовые клапаны, которые электромаг-

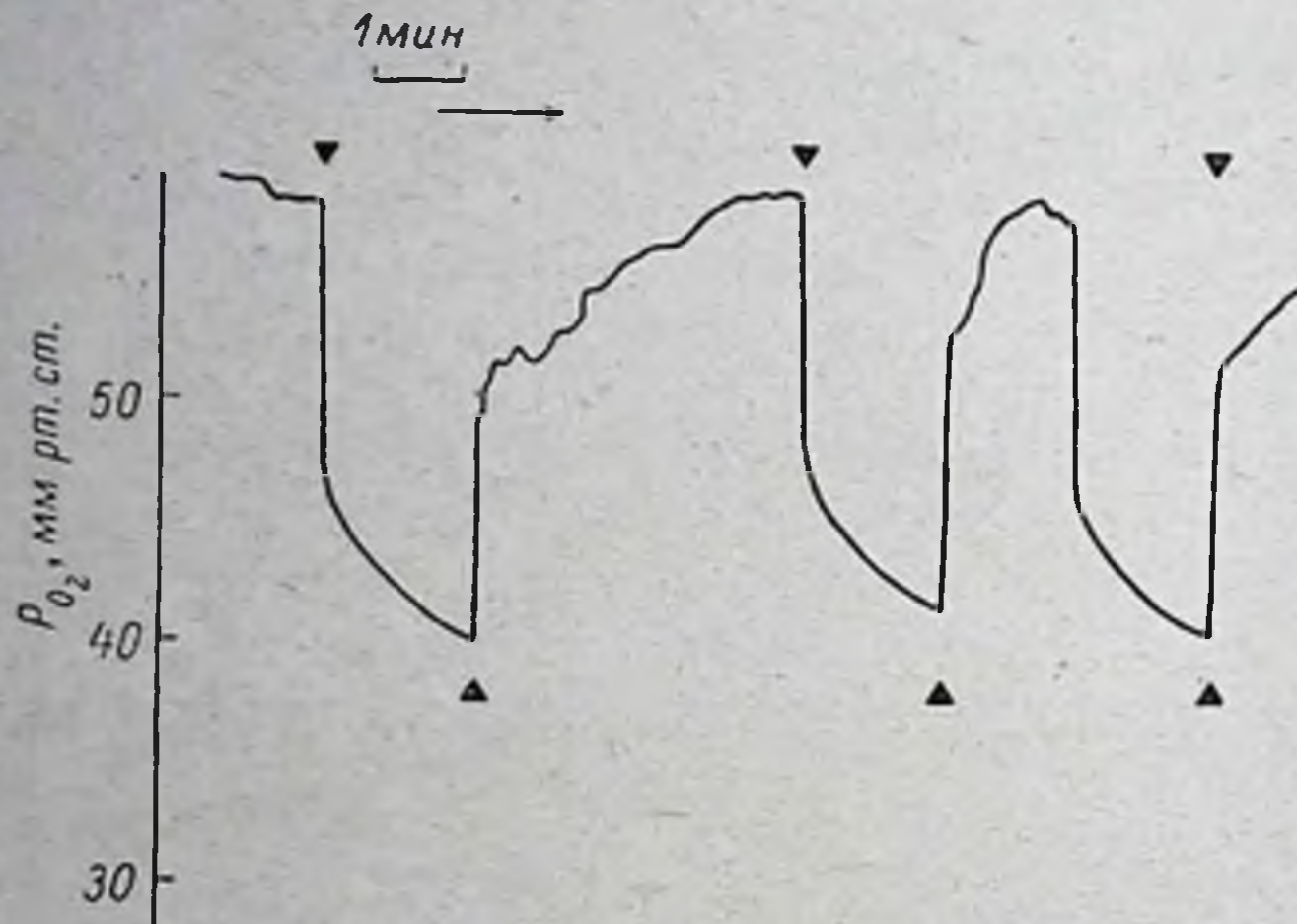


Рис. 46. Регистрация КСП O_2 в мышечной ткани перфузируемой грудины.

Треугольники вершиной вниз — наложение жгута; вверх — его снятие.

нитное устройство по заданной программе периодически закрывает и открывает. В момент перекрытия клапанов перфузия приостанавливается и изменение P_{O_2} ткани регистрируется на диаграммной ленте самопишущего потенциометра в виде кривой падения тока (рис. 47).

На основании этой кривой и производится расчет КСП O_2 по формуле И. М. Эпштейна (1968):

$$\text{КСП } O_2 = \frac{\lg J_1/J_2}{0.43 (t_2 - t_1)}, \quad (17)$$

где J_1 и J_2 — сила тока, измеренная в момент времени t_1 и t_2 . Скорость потребления тканью кислорода (в мл/ед. объема ткани) может быть вычислена по формуле

$$V = \dot{Q} \text{ КСП } O_2, \quad (18)$$

где \dot{Q} — количество кислорода, содержащегося в ткани, в отн. ед. После открытия клапанов уровень P_{O_2} в ткани восстанавливается. Программа измерений выполняется электромеханическим

командным устройством. Весьма информативна также динамика показателей углеводного и белкового обмена — содержание глюкозы и молочной кислоты в перфузате; изменение баланса свободных аминокислот, содержание в перфузате макро- и микроэлементов.

Следует отметить, что все рассмотренные методы характеризуют различные стороны жизнедеятельности и обладают разной степенью точности. Ни один из них не дает полного представления о состоянии исследуемой ткани. Поэтому для получения более достоверной характеристики необходимо использовать параллельно ряд методов. Сравнительная оценка методов определения жизнеспособности дана в работе Паппаса с сотр. (Pappas et al., 1961), где результаты определения подвижности клеток, их превращения в тканевых культурах, подсчет фигур митоза, пробы с метиленовым синим и производными тетразола, поглощением формиата- C^{14} и тимидина- H^3 , окраска эозином не дали совпадающих результатов. На основании своих исследований авторы рекомендуют для оценки жизнеспособности клеток применять следующее сочетание методов: окраску, определение подвижности клеток, тканевую культуру и подсчет митозов.

Лохт с сотр. (Locht et al., 1959), Роуе и Феллинг (Rowe, Felling, 1963) при сравнительном исследовании получили следующие результаты: клетки, диагностированные на основании прижизненного окрашивания как жизнеспособные, метаболически (синтез ДНК, поглощение кислорода, включение глицина¹⁴) были неактивны, а в ряде случаев метаболическая активность не наблюдалась и в клетках, принятых за жизнеспособные по окраске.

По некоторым данным (Mannick et al., 1960; Rowe, Felling, 1963), хорошее совпадение с результатами трансплантации костного мозга дают показатели, характеризующие метаболическую активность.

Трансплантационные методы

Обзор этих методов составлен также на примере трансплантации костного мозга. Они позволяют отличать кроветворные клетки донора от клеток реципиента и вместе с тем служат тестом на жизнеспособность (Петров, Карташевский, 1967). Наиболее достоверными методами, доказывающими жизнеспособность кле-



Рис. 47. Блок-схема измерения КСП O_2 .

ток, являются те, которые определяют приживание и размножение клеток донора в организме реципиента. Для этой цели необходимо уверенное распознавание клеток донора в тканях реципиента. Наиболее распространены следующие тесты.

Гистохимический тест. Согласно Гомори (Gomori, 1941) и Вахштейну (Wachstein, 1946), гранулоциты крыс в отличие от гранулоцитов мышей дают положительную реакцию на щелочную фосфатазу. Это различие было использовано для идентификации клеток костного мозга крыс при пересадке облученным мышам (Nowell et al., 1956; Бутомо и др., 1963, и др.). Нарастание в крови мышей числа миелоидных клеток, содержащих щелочную фосфатазу, свидетельствовало о приживлении и размножении клеток костного мозга крыс.

Цитологический тест. Форд с сотр. (Ford et al., 1956) применил в качестве доноров линию мышей, у которых одна из аллельной пары хромосом в ядрах клеток костного мозга имела характерную форму и малую величину. Это позволило после пересадки такого костного мозга мышам другой линии определять хромосомы-маркеры в делящихся клетках костного мозга реципиентов.

Сходные результаты дает метод идентификации клеток донора в организме реципиента по половому хроматину в случае трансплантации костного мозга от женской особи мужской. Ряд авторов использовал этот метод в условиях эксперимента (Fergebee et al., 1958; Бутомо с сотр., 1963) и в клинике (Davidson, Smith, 1954).

Иммунологический тест. После трансплантации костного мозга в организме реципиента образуются антитела против антигенов донора, что указывает на приживание пересаженных клеток костного мозга (Mitchison, 1956).

Изосерологический тест основан на определении появления в крови реципиента эритроцитов, генетически родственных донорскому костному мозгу по факторам, отсутствующим у реципиента (Thomas et al., 1957; Mathe et al., 1963, и др.).

Физико-химический тест позволяет определять приживание клеток костного мозга в организме реципиента по физико-химическим особенностям гемоглобина донора. Этот метод применяется в экспериментальной модели «крыса—мышь» (Makinodan, Andersen, 1957).

Радиографический тест также был применен для исследования приживания трансплантированных клеток костного мозга. В качестве метки донорских костномозговых клеток были использованы радиоактивные изотопы фосфора (Brown, 1955) и железа (Mathe, 1959).

Важный общий показатель состояния органа — наличие или отсутствие отека тканей, определяемого по изменению веса органа при перфузии. За этим показателем можно также следить и по изменению объема перфузата.

Существенным показателем является общая морфология, а также кинетика клеточного состава ткани. Изменение характера кинетики при внешних регулирующих воздействиях и повторяемость результатов при стандартных условиях позволяет успешно использовать этот простой и в то же время надежный метод (Нефёдов и др., 1971; Терсков и др., 1972; Гительзон и др., 1974, и др.). Так, после изоляции кроветворного органа из целого организма и при его перфузии происходит активация эритроидного кроветворения. Эта разница имеет специфический характер (Нефёдов и др., 1972б). В условиях мультиорганых культур регулирующее воздействие других органов (почка, печень, селезенка), особенно при их гипоксемии, специфически меняет характер кроветворения. Взаимодействие кроветворного органа с изолированной гипоксемической почкой вызывает активацию кроветворения. При подключении к этой паре органов изолированной печени описанная эритропоэтическая реакция еще более усиливается. Совместная перфузия костного мозга и печени меняет кинетику кроветворения, приближая ее к стандартному процессу, наблюдаемому в интактном организме. Взаимодействие костного мозга с гипоксической селезенкой вызывает ингибирование эритроидного кроветворения (Гительзон, Нефёдов, 1973).

Следующая группа критериев состояния перфузируемых органов основана на функциональных показателях. Это прежде всего сохранение функции, которую выполнял орган в организме. Электровозбудимость мышечной ткани изолированной перфузируемой конечности была успешно использована Т. М. Оксман (1969, 1970) в качестве характеристики состояния тканей. В наших исследованиях этот тест также применялся при перфузии конечностей собаки и изолированной грудины. Определялась электровозбудимость межреберных мышц или групп мышц плеча, бедра. Исследование электровозбудимости мышечной ткани производилось с помощью генератора прямоугольных импульсов и игольчатых электродов. При 10-часовой перфузии изолированной конечности собаки сохранялась электровозбудимость мышц при воздействии прямоугольными импульсами длительностью 0.01 сек. и напряжением тока 1—10 в.

Сохранность функции изолированного костного мозга выражается в продолжающемся кроветворении и выходе в перфузат ретикулоцитов и лейкоцитов, что было показано в работах Гордона (Gordon, 1959), Дорнфеста и др. (Dornfest et al., 1962) и других авторов и подтверждается в наших исследованиях.

Адекватность перфузии почки определяется сохранением ее диуретической функции. Эта функция усиливается, если перфузат содержит маннитол, обладающий, как известно, выраженным диуретическим действием.

Аналогичным образом может быть определена активность и других органов. Это направление, которое можно называть функ-

циональным, имеет давнюю историю. Большой вклад в него внесены А. А. Кулябко и Н. П. Кравковым. Опыты Кулябко по оживлению изолированных сердец человека путем перфузии, а также поддержание жизнедеятельности изолированных голов рыб, получили в свое время мировую известность. Оценку состояния культивируемых органов по функциональным тестам разработали Н. П. Кравков (1911) и его ученики. Ими исследовано функционирование изолированных сердец, уха кролика, изолированного пальца, матки, эндокринных желез. Так, роды изолированной перфузируемой матки кролика наблюдались Е. М. Курдиновским (1903), а Г. Л. Шкавера и А. И. Кузнецов (1923) показали повышение выхода адреналина из перфузируемых надпочечников под влиянием никотина.

Можно выделить еще один биофизический метод — простой и быстрый, позволяющий по электропроводности ткани характеризовать ее состояние. Электропроводность служит одним из критериев подвижности частиц в сложной коллоидной системе, которой являются тканевые структуры. Если электропроводность клетки необратимо возрастает, ее следует считать мертвой. Таким образом, проба на проницаемость может считаться проверкой жизнеспособности, обладающей достоинствами экспресс-метода.

Измерение электропроводности как метод определения жизнедеятельности тканей был предложен Б. Н. Тарусовым в 1938 г. и в дальнейшем неоднократно применялся для исследования первичных физико-химических процессов, возникающих в тканях при повреждениях (Аладжалова, 1956; Кригер, Елховская, 1958; Бурлакова, Кольс, 1960; Поливода, 1969). Существующие теоретические представления об измеряемых в тканях процессах при определении импеданса сводятся к следующему. Мембранная емкость C пропорциональна результирующей диэлектрической проницаемости сложного диэлектрика ϵ_m , которым является биологическая мембрана:

$$\epsilon_m = \frac{\epsilon_1 \cdot \epsilon_2}{\epsilon_1 + \epsilon_2} \quad (19)$$

где ϵ_1 и ϵ_2 — диэлектрические постоянные липидов и белков. Формула (19) отражает свойства диэлектриков ϵ_1 или ϵ_2 в зависимости от их соотношений. Поскольку диэлектрическая постоянная белков значительно превышает постоянную липидов, то емкостные свойства мембраны должны в основном зависеть от состояния ее липидов. Поэтому при $\epsilon_2 \gg \epsilon_1$ величина ϵ_m почти полностью определяется значением ϵ_1 . Помимо мембранной емкости, импеданс тканей включает емкость межтканевой жидкости. Известно, что клеточная среда содержит различные электролиты, в том числе и макромолекулярные соединения, обладающие различной степенью проводимости. Макромолекулярные соединения несут заряд, распределение которого может быть

представлено в виде диполя. В диэлектрике с такой сложной структурой при наложении внешнего переменного поля ток будет складываться из следующих основных составляющих: ток прямой проводимости, ток тепловой поляризации и ток ориентационной поляризации. Первой составляющей тока будет

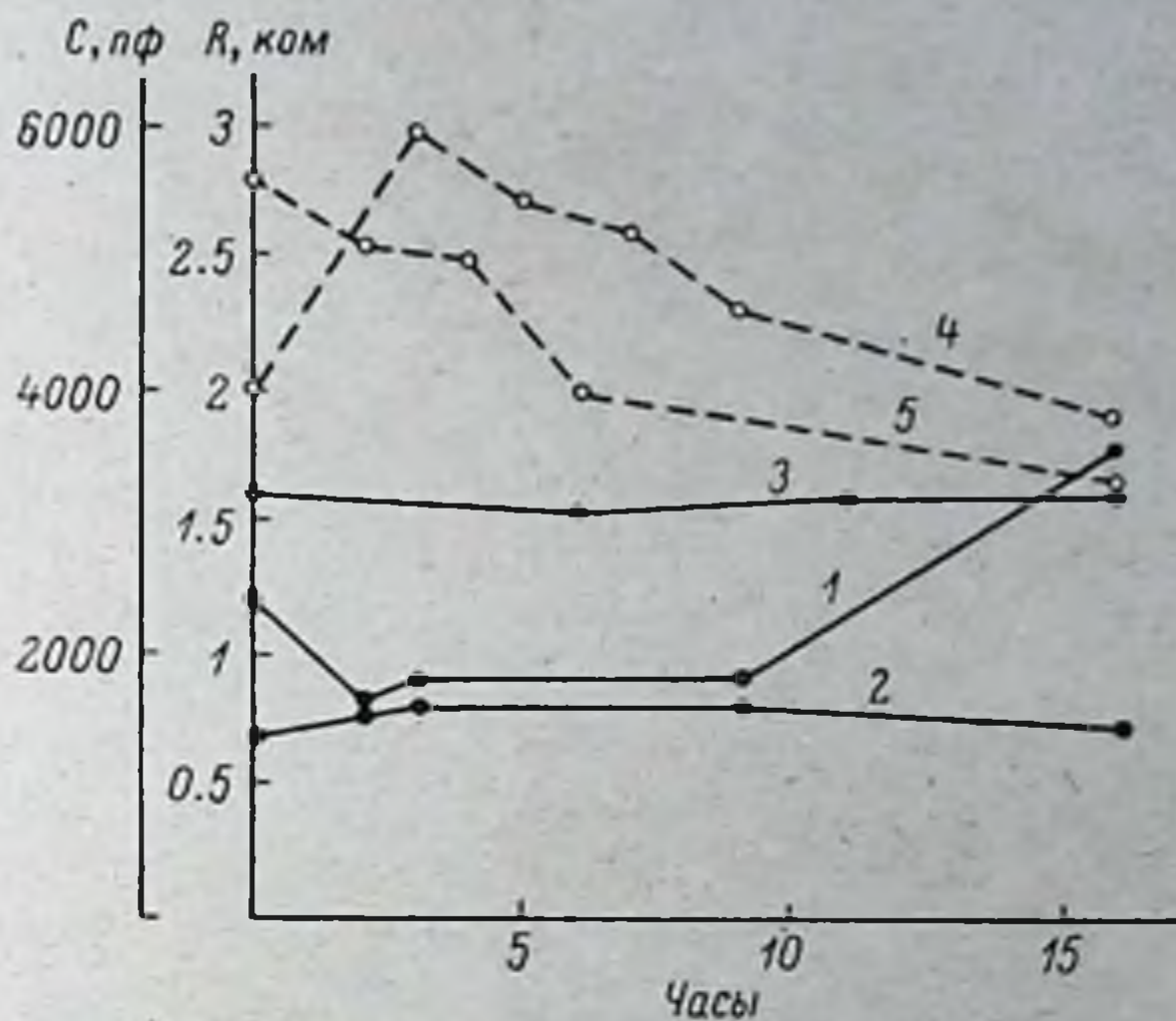


Рис. 48. Импеданс мышечной ткани перфузируемого органа при частоте напряжения 10 кгц (по: Нефёдов и др., 1971).

По оси ординат: слева — емкостное сопротивление, справа — омическое; по оси абсцисс — время перфузии. 1 — омическое сопротивление периферии органа; 2 — то же в центре органа; 3 — емкостное сопротивление в центре (3220—3080 пф); 4, 5 — соответственно омическое и емкостное сопротивления в центре контрольного органа (без перфузии).

определяться основная, активная часть импеданса, второй и третьей — его реактивная часть, имеющая емкостный характер.

Результаты измерения импеданса мышечной ткани перфузируемой грудины (Нефёдов и др., 1971) указывают на то, что на периферии органа омическое сопротивление (рис. 48, 1) возросло, в то время как в центре (рис. 48, 2), где сохранено достаточное кровообращение, оно почти не изменялось, характеризуя тем самым сохранность ткани перфузируемого органа.

Клеточно-популяционный метод

Весьма информативен популяционный подход к анализу состояния органа. Он основан на следующих предпосылках. Нормальное состояние каждого органа, клетки которого способны к пролиферации, поддерживается динамическим равновесием между гибелью и воспроизводством клеток; каждому его

состоянию должно соответствовать закономерное распределение составляющих орган тканей по возрасту, состоянию и степени дифференцировки клеток. Патологические процессы должны изменять вид распределения клеточных популяций. Этот подход был подробно разработан для популяции эритроидных клеток в виде метода эритрограмм (Терсков, Гительзон, 1957; Гительзон, Терсков, 1957). Метод эритрограмм характеризует распределение эритроцитарной популяции по какому-либо свойству клеток, например по их устойчивости к гемолизу. Рассмотрим на его

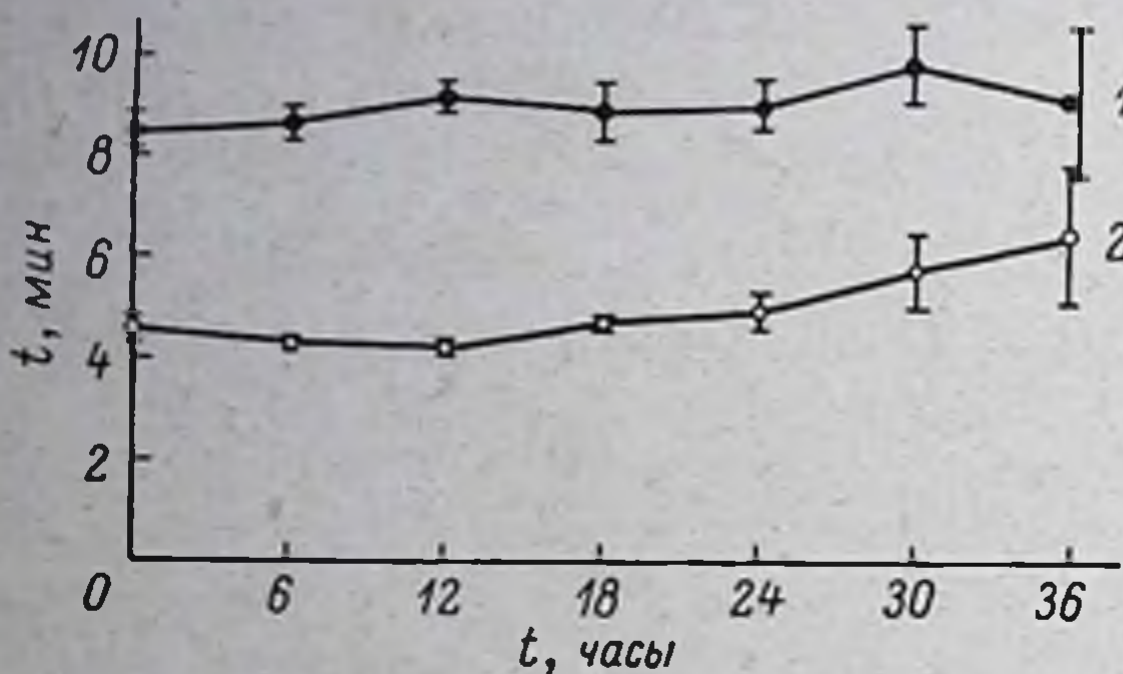


Рис. 49. Динамика изменения кислотной стойкости эритроцитов при экстракорпоральном кровообращении (по: Нефёдов и др., 1972а).

По оси ординат — время гемолиза; по оси абсцисс — время циркуляции крови. 1 — полное время гемолиза; 2 — время максимального гемолиза.

времени достижения полного гемолиза (рис. 49), что свидетельствует о разрушении наименее стойкой части эритроцитарной популяции и об изменениях в структуре сохраняющихся клеток.

Являясь мерой интенсивности изменений в эритроцитарной популяции перфузата, эритрограмма позволяет количественно оценивать степень адекватности аппарата искусственного кровообращения и условий перфузии для клеток крови. Этот метод, в частности его модификация, автоматически регистрирующая дифференциальную кривую кинетики гемолиза (Нефёдов и др., 1970), может использоваться для оценки состояния эритроцитов при экстракорпоральном кровообращении. Следует отметить возможность распространения метода химических цитограмм и на исследование состояния популяций других культивируемых клеток. Так, на примере клеток асцитной опухоли Эрлиха было показано (Нефёдов, 1967), что эти клетки обладают дисперсией, основанной на щелочной и осмотической резистентности, характер которой может служить критерием состояния популяции. Подробнее результаты популяционного подхода излагаются в гл. III на примере костномозговых клеточных популяций.

примере применимость популяционного подхода к задачам культуры органов, так как одной из составляющих частей перфузата являются эритроциты, и слежение за их физико-химическим состоянием представляет собой важную характеристику адекватности перфузии.

При длительном экстракорпоральном кровообращении в первые 12 час. перфузии характер кислотных эритрограмм не меняется. После этого максимум гемолиза смещается вправо и увеличивается

Особо следует отметить информативность и удобства опосредованного метода анализа состояния органа по изменениям, которые его метаболизм вызывает в перфузате. В сущности это тот же принцип, который лежит в основе получившего такое широкое распространение в эксперименте и клинике метода анализа крови. Кровь как транспортная ткань приходит в соприкосновение со всеми тканями организма и несет на себе отпечаток их обмена, служа как бы их метаболическим зеркалом. В системе для культивирования органов ту же роль выполняет перфузат. Возможности определения метаболизма органов по перфузату даже еще больше, чем в организме, так как метаболиты не поглощаются и не выводятся из системы другими органами.

Достоинство метода — возможность многократного определения метаболизма органа прямыми измерениями в перфузате или путем отбора малых проб, что никоим образом не нарушает состояния исследуемого органа. Значение этого преимущества настолько велико, что при развитии системы слежения за культивируемым органом в установках ближайшего будущего методы непрерывного и дискретного анализа перфузата, видимо, займут главное место и послужат основой для создания систем автоматического поддержания гомеостаза среды. Исходящие от них сигналы об изменениях среды, вызываемых метаболизмом культивируемого органа, будут использоваться для управления корректирующими среду воздействиями. Примером первых попыток создания таких систем могут быть уже упоминавшийся анализатор жизнедеятельности В. И. Шумакова с сотр. (1975) и установки Института физики СО АН СССР.

В гл. II рассмотрен пример анализа метаболизма культивируемого органа по спектру аминокислот перфузата. В работе Грана с сотр. (Grana et al., 1968) в качестве теста состояния печени использован выход клеточных ферментов в плазму. Показано, что особенно чувствительны ферменты цитоплазмы (сорбитолдегидрогеназа, глютаматпируваттрансмутаза, лактатдегидрогеназа, фруктозо-1,6-фосфатальдолаза), выходящие из клеток в первые часы, а структурно связанные ферменты, такие, например, как глютаматдегидрогеназа и гидролазы из лизосом, появляются во внеклеточной среде позднее. Таким образом, анализ выбранного ферментного спектра перфузата может служить тестом повреждения органа и характеризовать его глубину и динамику. Аналогичное предложение тестировать состояние органа по спектру выделяемых в перфузат ферментов делают Эббот и Сэл (Abbott, Sell, 1968). Однако к избирательности освобождения ферментов они относятся более скептически, чем Грана с сотр. (Grana et al., 1968).

Скептицизм в оценке энзимологических данных для определения жизнеспособности разделяют также Ю. М. Лопухин и

Э. М. Коган (1975). По-видимому, предстоит еще большая работа по выбору наиболее показательных ферментов прежде, чем этот принцип сможет быть реализован в качестве надежного метода.

Подводя итог рассмотрению методов оценки состояния перфузируемого органа, мы можем заключить, что ни один из рассмотренных методов не является универсальным, надежный результат достигается лишь комплексом методов. Исследователю, ставящему задачу определения состояния органа, жизнь которого поддерживается искусственно, не приходится жаловаться на недостаток методов, предлагаемых современной экспериментальной биологией. Трудность заключается, скорее, в отборе достаточного минимума методов. Очевидно, для каждого органа и конкретной задачи он будет особым. Можно высказать ряд основанных на собственном опыте соображений по выбору методов. Предпочтительны методы, позволяющие выразить изменение состояния органа количественными показателями. Очень важна возможность длящегося в течение всего опыта слежения за измеряемым показателем без повреждения органа. Для управления ходом эксперимента необходимо быстрое действие метода, адекватное возможной скорости изменений наблюдаемого параметра. Методически удобно непрерывное слежение за измеряемым показателем с графической записью или дискретной цифровой регистрацией в памяти вычислительной машины с возможностью вызова из памяти предыдущей информации, ее анализа и сопоставления с текущим значением.

Такие экспресс-методы, как измерение электропроводности, скорости потребления кислорода, импеданса и других биофизических характеристик тканей, вполне отвечают этим требованиям. Однако, как правило, эти быстродействующие методы интегративны, они дают представление о сумме многих взаимодействующих процессов. Поэтому целесообразно дополнять такую непрерывную экспресс-информацию дискретными химическими и цитологическими измерениями, более медленными и трудоемкими, но и более определенными.

6. Проблема регенерации химического состава крови (перфузата)

Циркулируя по организму, кровь доставляет его клеткам необходимые питательные вещества и уносит продукты жизнедеятельности. Клеточная активность ослабляет или совсем прекращается, если в клетке недостаточно питательных веществ или же их чрезвычайно много, а также если конечные продукты метаболизма не удаляются кровью.

Состав крови изменяется по мере ее перемещения в организме в соответствии со специфическими особенностями и активностью функционирования его частей, с которыми кровь в данный момент контактирует. Таким образом, каждый орган в той или

ной степени влияет на состав крови. При нарушениях обмена веществ наступающие сдвиги в концентрации метаболитов вызывают в организме нервным и гуморальным путями гомеостатизирующие реакции, которые противодействуют развитию обменных отклонений.

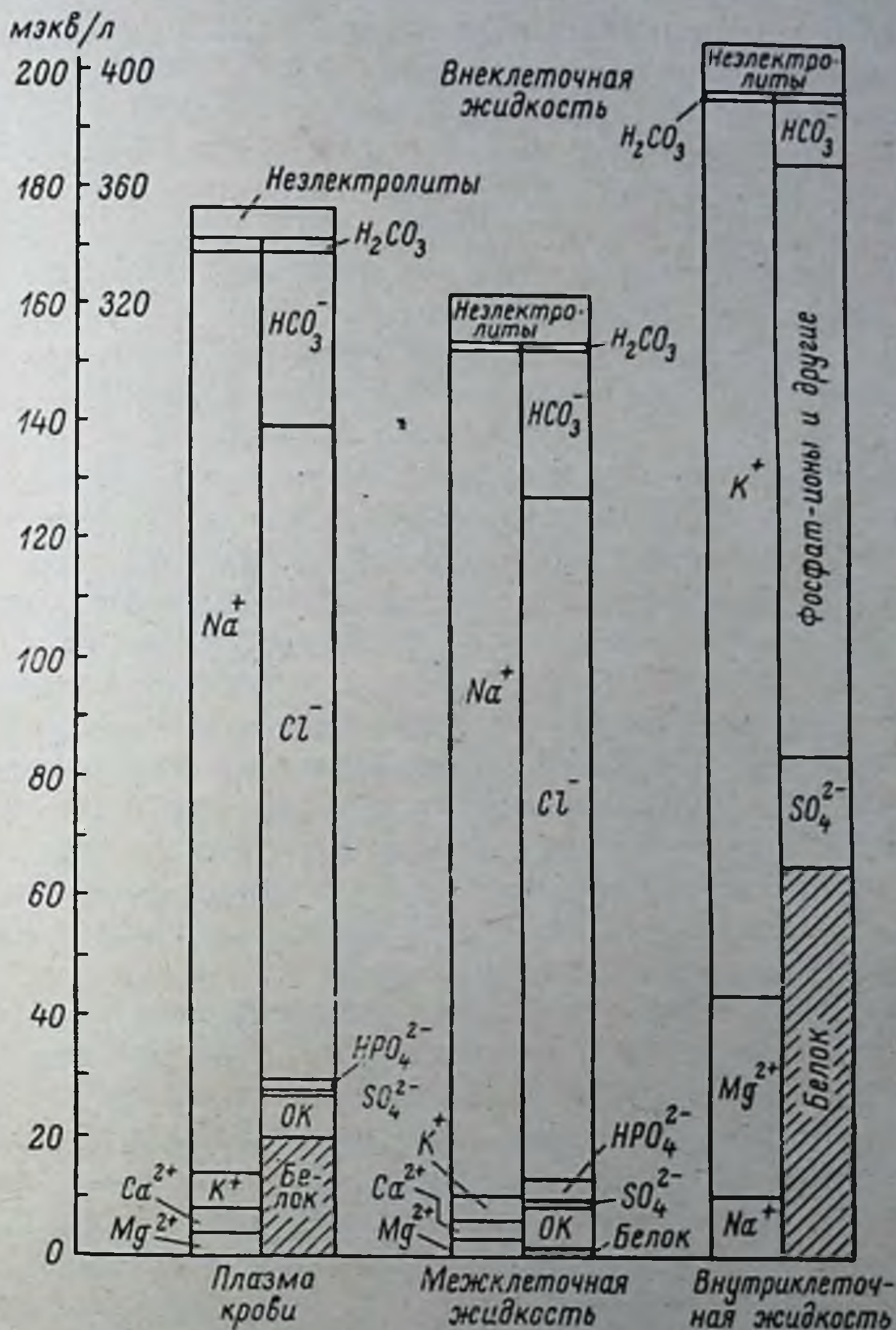


Рис. 50. Электролитный состав жидкостей организма (по: Holm, 1965).

OK — органические кислоты.

Большой устойчивостью обладают активная реакция и осмотическое давление крови, в частности соотношение катионов (Na, K, Ca, Mg). В поддержании (рис. 50) нормального водно-солевого баланса важное значение имеют белковый состав крови, проницаемость капилляра и клеточных оболочек, состояние соединительной ткани и деятельность эндокринного аппарата.

Локальные неоднородности обмена веществ в организме сглаживаются благодаря смесительной функции крови. В организме действует хорошо отрегулированный в ходе эволюции механизм химического гомеостаза внутренней среды, заключающийся в постоянном восстановлении концентрации потребляемых клетками компонентов и продуктов их метаболизма. Следует отметить, что знания по этому вопросу в основном касаются концентрации веществ в крови и их колебаний, а сведений о скоростях их поступления и ухода из крови еще недостаточно. Интересной попыткой в этом направлении был метод сосудистых фистул Е. С. Лондона (1968). К сожалению, время одного оборота крови через орган слишком мало, чтобы надежно количественно оценить скорость его метаболизма. Метод культуры тканей и органов открывает в этом направлении широкие перспективы.

Представление о том, что идеальным перфузатом является аутокровь, в литературе широко распространено (см., например, последнюю монографию по перфузии Ритчи и Хардкастла (Ritchie, Hardcastle, 1973)). Это представление подкупает своей внешней очевидностью, но в действительности оно неверно. Конечно, циркулирующая в организме кровь идеально сбалансирована с метаболическими потребностями тканей, которые она омывает. Однако эта гармония достигается непрерывным энергичным обменом между кровью и различными органами, кровь же сама по себе не является ни емким резервуаром питательных веществ, ни поглотителем конечных продуктов обмена. Эти функции выполняют специализированные органы. Кровь представляет собой только транспортное средство, эффективность которого обеспечена не столько большой запасной емкостью, сколько быстротой оборота. В этом легко убедиться, сравнив суточные уровни, например, экскреции мочевины (30—50 г в сутки у человека) с ее концентрацией в крови (меньше 50 мг%). В системе перфузии, где изолированный орган лишен возможности установить через кровь обменное равновесие с другими органами, и перфузат должен выполнять функцию не только транспорта, но и запасаения необходимых метаболитов. Поэтому перфузат должен своим составом отличаться от крови. Этот пример иллюстрирует то принципиально важное обстоятельство, что обеспечение физиологических функций в искусственной системе поддержания жизнеспособности органов не всегда наилучшим образом решается готовым способом — прямой имитацией способов, которыми пользуется организм.

Опыт постепенно показывает исследователям недостатки цельной крови как перфузата и заставляет искать ей замену. Гемолиз, быстро нарастающий при продолжительных перфузиях, требует замены хрупких эритроцитов другими носителями кислорода. Гипероксигенация позволяет транспортировать большие количества кислорода, растворенного в плазме, но требует сложной барокамерной техники; недостаточно изучены и побочные эффекты

повышенного давления. В последние годы открылся другой путь — замена гемоглобина функциональными аналогами совершенно иной химической природы. Первые сообщения о поддержании жизни изолированных органов и даже целых организмов с помощью синтетических переносчиков кислорода — флюорокарбонатов и силиконов, растворенных в минеральных или растительных маслах, показывает обнадеживающие результаты (Geyer et al., 1968; Hutson et al., 1968; Linn et al., 1968). Однако по форме кривых диссоциации и другим характеристикам эти вещества еще так далеки от природного переносчика кислорода — гемоглобина, отшлифованного миллионами лет эволюции, что эксперименты с перфузией пока служат лишь для проверки их качества. Но в состав стандартных сред для физиологической перфузии они рекомендованы быть не могут, хотя быстрый прогресс в этой области позволяет надеяться на возможность их применения в недалеком будущем. Пока возможности исследователя и клинициста-трансплантолога в отношении транспорта кислорода перфузатом ограничены гипероксией, ускоренной циркуляцией либо использованием эритроцитов в максимально щадящем режиме циркуляции. Для защиты от гемолиза и его токсических продуктов пользуются либо разведенной кровью, либо применяют протекторы — инсулин, аденозин, сахарозу и другие вещества, создавая слегка гиперосмотическую среду для эритроцитов, либо прибегают к частой смене перфузата. Наименее стабильным элементом бесклеточной части крови являются липопротениды, которые, выпадая в осадок, могут образовывать эмболы, блокирующие циркуляцию преимущественно в мелких сосудах. Предлагаются методы их удаления (Belzer et al., 1968a, 1968b), после которых оставшаяся часть плазмы может использоваться для перфузии в течение нескольких суток.

Эффективными протекторами многостороннего действия оказались поверхностно активные вещества. Они защищают белковые и липидные компоненты плазмы от денатурации, уменьшают гемолиз и способствуют сохранению микроциркуляции, снижая вязкость крови. По данным Патона с сотр. (Paton et al., 1968), введение в состав перфузата препарата Plurone F-68b несколько раз продлевает время эффективной перфузии.

Важнейшая проблема создания адекватных сред — включение в их состав питательных веществ, необходимых для поддержания метаболизма органов.

Из очевидных соображений в рецепты сред для перфузии включают нуклеотиды, АТФ, глюкозу, пировиноградную кислоту, и другие метаболиты. Наилучшей питательной средой остается, однако, нативная плазма или плазма с различными добавками. Из этого следует, что наши знания о химическом составе плазмы пока далеки от полноты и ее имитация остается несовершенной. Этапы развития этой проблемы включают разработку солевых поддерживающих растворов Рингера, Локка, Тироде, Хэнкса,

Эрла и др., а затем добавление к ним естественных компонентов плазмы или сыворотки крови, эмбриональных экстрактов и, наконец, попытку создания полностью синтетических питательных сред, например широко распространенной «среды 199», предложенной Морганом и сотр. (Morgan et al., 1950), «среды Игла» (Eagle, 1955) и др. Обзоры литературы, отражающей совершенствование питательных сред для культур тканей, даны в руководствах по культуре клеток и тканей (Paul, 1960; Parker, 1961, и др.).

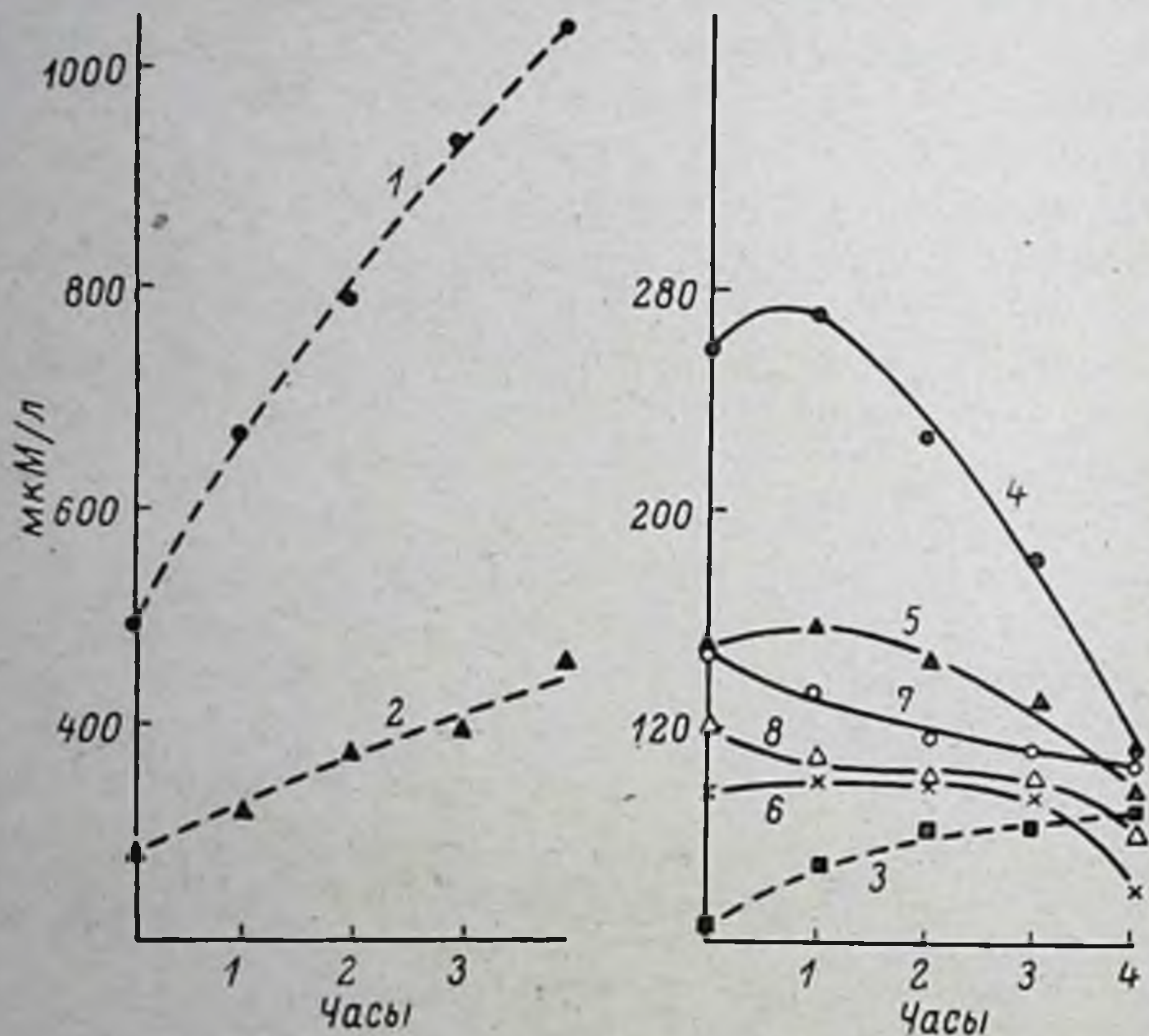


Рис. 51. Динамика аминокислотного состава среды при 4-часовой перфузии грудины собаки (по: Барашков и др., 1975).

По оси ординат — концентрация аминокислот; по оси абсцисс — время перфузии. 1 — аланин; 2 — лизин; 3 — глутидин; 4 — серин; 5 — аспарагиновая кислота; 6 — изолицин; 7 — фенилаланин; 8 — тирозин.

Подбор питательных сред для перфузии осуществляется пока эмпирически. Общая тактика синтеза сред отсутствует. Очевидно, она должна строиться на значении двух основных факторов: полном списке незаменимых компонентов плазмы, определении скоростей их потребления и выделения различными органами. Данных по скоростям обмена, а также подбору соответствующих питательных сред в культурах изолированных органов пока мало, хотя еще у Карреля (Cargel, Lindbergh, 1938) имеются сведения по потреблению глюкозы при длительном культивировании изолированных органов. Как Каррель, так и многие другие исследователи считают, что наилучшей питательной средой для изолированных органов является аутоген-

ная плазма, но поскольку запаса ее питательных веществ в условиях изолированной от организма системы недостаточно, питательная среда для перфузии в количественном отношении по многим компонентам должна быть более богатой, чем кровь.

На примере перфузии изолированной грудины и комплекса грудина—почка—печень В. А. Барашков с сотр. (1975) показал, что органы обладают специфическим обменом аминокислот (табл. 4, рис. 51). Обычно используемая перфузионная среда (40% плазмы и 60% «среды 199») не сбалансирована по аминокислотному составу с потребностями органов: избыточна по гистидину, лизину и аланину и недостаточна по аргинину, серину, треонину, глютамину и аспарагиновой кислоте. По глицину, цистину, метионину, глютаминовой кислоте, тирозину и фениланину изменения недостоверны. Полученные данные могут быть положены в основу расчета более адекватной питательной среды.

Таблица 4

Концентрация аминокислот в исходном фоне (И) и в среде после 6-часовой перфузии мультиорганной культуры (грудина, почка и печень) (К)

Аминокислоты	Концентрация аминокислот, в мкМ/л		К/И, %
	И	К	
Гистидин	69.8±4.4	200.3±17.2 *	286.0
Лизин	256.4±12.9	491.7±17.6 *	191.7
Аланин	488.3±10.0	708.6±74.7 **	145.1
Аргинин	181.6±11.3	0 *	—
Серин	249.1±6.8	33.1±7.5 *	13.3
Аспарагиновая кислота	150.1±10.7	20.5±6.1 *	13.6
Треонин и глютамин	529.2±11.1	115.9±24.2	21.9
Изолейцин	96.4±3.6	52.6±8.3 *	54.5
Пролин	245.2±6.5	139.1±14.2 *	56.7
Лейцин	461.8±8.5	308.9±16.4 *	66.8
Валин	269.6±11.3	190.7±26.6 *	70.7

* $P < 0.01$.

** $P < 0.5$ (по сравнению с данными исходного фона).

Динамика концентрации молочной кислоты в ходе перфузии изолированных органов (Нефёдов, 1975) характеризуется следующим: количество молочной кислоты в среде возрастает от исходного уровня — с 4.8 ± 1.0 мкМ/мл при перфузии комплекса грудина—печень, до 14 ± 1.5 мкМ/мл, а при перфузии грудины с почкой — до 9.8 ± 1.0 мкМ/мл. Концентрация глюкозы при перфузии грудины с почкой снижалась от 75 ± 10 до 15 ± 3 мг% за шесть часов перфузии.

Таким образом, культура изолированных органов позволяет исследовать специфику и характер обмена в различных частях

организма как в норме, так и при патологических состояниях, и разрабатывать более адекватные питательные среды с учетом специфики метаболизма органов.

На современном этапе развития метода культивирования данных о скоростях обмена веществ между органами и средой еще недостаточно. Это затрудняет выработку программ гомеостатического регулирования состава среды. Приходится производить замену перфузата по интегральным физико-химическим

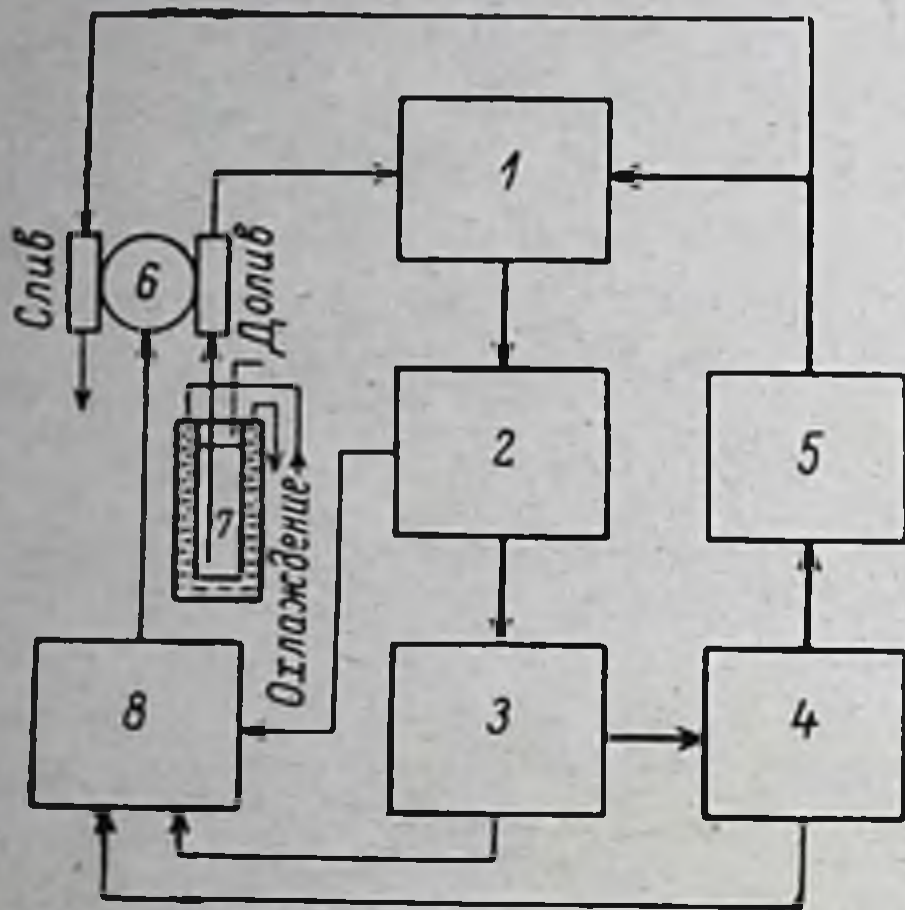


Рис. 52. Устройство регенерации крови при культивировании изолированных органов.

1 — аппарат искусственного кровообращения; 5 — культивируемый орган. Остальные обозначения в тексте.

показателям состояния. С этой целью в нашу установку для культивирования изолированных органов включен специальный автоматический блок — регенератор перфузата, состоящий из узла контроля уровня оксигемоглобина в перфузате (рис. 52, 2), узла контроля и регулирования кислотно-щелочного равновесия (3), узла контроля и регулирования содержания растворенного кислорода (4), блока насосов (6), резервуара со свежей средой (7), блока управления (8). На рис. 53 представлена схема блока управления регенератором, состоящая из электромагнитных реле $P_1—P_5$, блоков реле времени PB_1 и PB_2 , тиристорного ключа $D_3—D_4$, исполнительного механизма и вспомогательных элементов D_1, D_2, R, C_1, C_2 . Устройство работает следующим образом: перфузат при циркуляции в гемодинамической части системы проходит через контуры датчиков оксигемоглобина, pH, P_{O_2} . Когда нарушаются буферные свойства перфузата — затрудняется коррекция pH и уменьшается процент оксигемоглобина, — блок управления (рис. 52, 8) включает насосы (6) и производится смена части перфузата.

Принцип действия схемы блока управления состоит в следующем: при уменьшении насыщения перфузата кислородом реле P_1 подключает цепь обмотки реле P_3 к источнику питания, и если в этот момент P_{O_2} равно или больше нормы (P_2 отключено, pH не равно норме, P_3, P_4 и PB_1 включено), то срабатывает реле P_6 , которое включает исполнительные механизмы, после чего начинается смена перфузата в оксигенераторе. По истечении времени подачи перфузата, длительность которого задается в зависимости от скорости перфузии, PB_2 разрывает цепь управления тиристорами и исполнительные механизмы обесточиваются (рис. 53).

Если за время смены перфузата параметры среды не восстановились, цикл повторяется до достижения уровня физиологически допустимой зоны параметров перфузата.

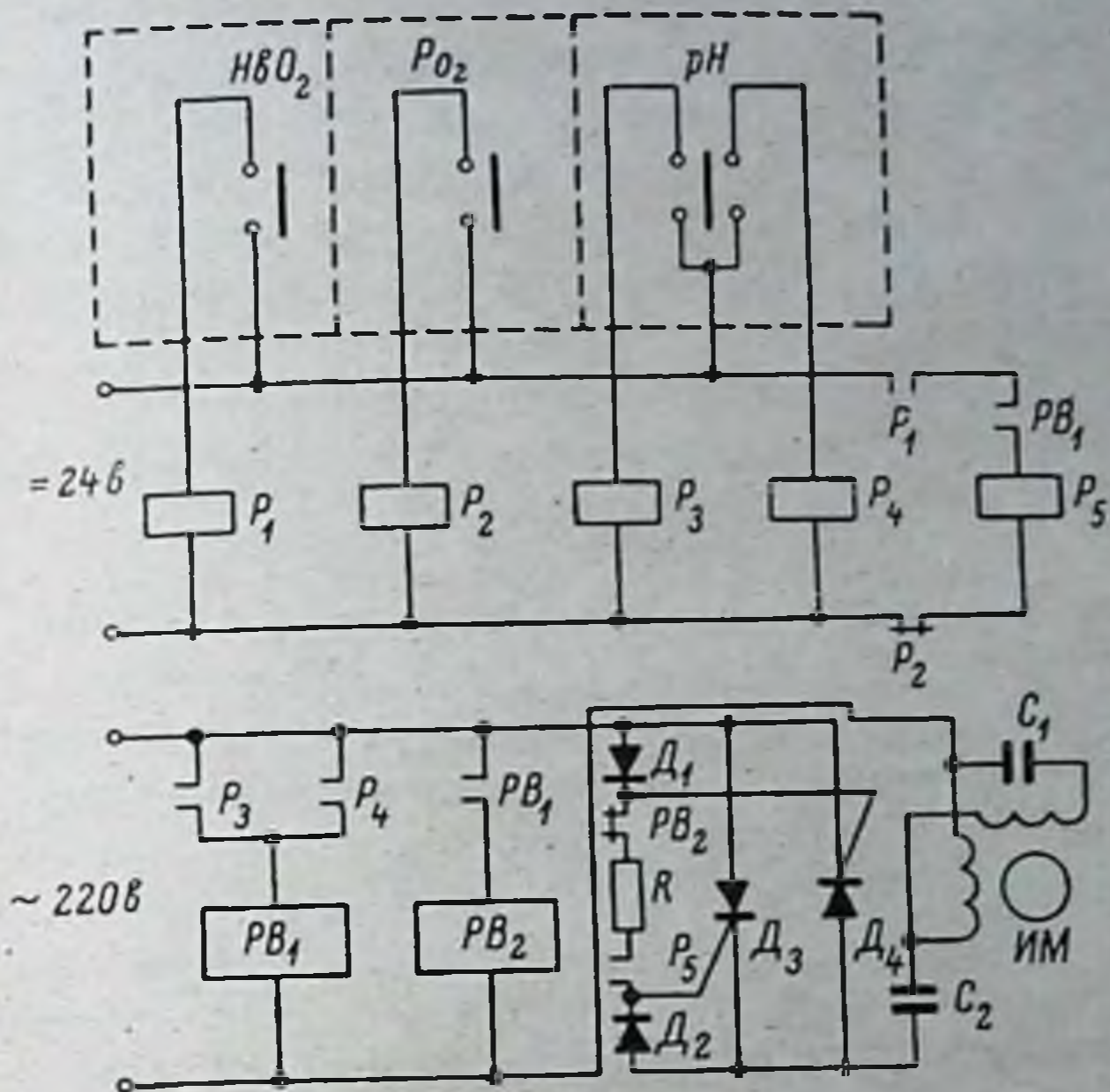


Рис. 53. Схема блока управления регенератором.
ИМ — исполнительный механизм; R — регистр. Остальные обозначения в тексте.

Алгоритм работы блока управления регенератора состоит из $P_5 = X_1 X_2 X_3$, где $X_1 = 1$ при $HbO_2 < HbO_{2\text{опт}}$; $X_2 = 1$ при $P_{O_2} \geq P_{O_2\text{опт}}$; $X_3 = 1$ при $pH \neq pH_{\text{опт}}$.

Таким образом, обратная связь датчиков физико-химических величин с блоком управления насосами обеспечивает поддержание ряда важных параметров перфузии на оптимальном уровне путем периодического обновления части питательной среды.

7. Адекватная перфузия как метод управляемого культивирования органов

Ключевым методом, обеспечивающим гомеостаз среды для культивируемого органа, является создание в нем адекватной перфузии. Ее воспроизведение в условиях изоляции органа от организма представляет собой центральную задачу всей системы управляемого культивирования.

Обеспечение адекватности искусственного кровообращения невозможно без всестороннего изучения гемодинамики как *in vivo*, так и *in vitro*. Проблема гемодинамики в настоящее время развилась в обширную область физиологии, современному состоянию которой посвящены монографии Гайтона (Guyton, 1963); Г. П. Конради (1973), Фолькова и Нила (Folkov, Neil, 1976) и др. Ниже будут рассмотрены лишь основные физические и физиологические параметры кровообращения: давление в различных участках сосудистого русла, объемная скорость кровотока в различных сосудистых областях, общее периферическое сопротивление сосудов, частота сердечных сокращений, ударный объем сердца, минутный объем сердца, вязкость крови, число Рейнольдса.

Вязкость идеальной (ньютоновой) жидкости не зависит от скорости ее движения по сосудам. С некоторой натяжкой это справедливо для плазмы крови, но совсем немыслимо для цельной крови, в которой взвешенные в виде суспензии форменные элементы составляют 40—60% общего ее объема. Полное физико-математическое описание свойств этой системы сопряжено с большими трудностями. Поэтому неизбежно приходится прибегать к существенным упрощениям. Для облегчения задачи обычно рассматривают жидкость как гомогенную с некоторой кажущейся вязкостью (обобщенная ньютонова жидкость). В этом случае применяют различные формулы (в зависимости от количества взвешенных частиц), связывающие вязкость суспензии (η_s) и вязкость среды, в которой взвешены частицы. Для крови наиболее применимы формулы Бингама—Уайта

$$\frac{\eta_s}{\eta} = \frac{1}{1 - \Phi} \quad (20)$$

и Хатчека

$$\frac{\eta_s}{\eta} = \frac{1}{1 - \Phi^{1/3}}, \quad (21)$$

где Φ — часть общего объема, занимаемая частицами (Bayliss, 1952). Если при ньютоновой жидкости зависимость между давлением и расходом выражается прямой линией, то для суспензии влияние вязкости на расход зависит от градиента давления (кривая Оствальда) (рис. 54).

В качестве характерной реологической особенности суспензий можно отметить пристеночный эффект: при течении жидкости по трубе взвешенные частицы скапливаются преимущественно в осевом потоке, а вблизи стенки образуется слой, содержащий сравнительно мало частиц. Следовательно, при движении вязкость суспензии не одинакова по радиусу трубки. Мнения иссле-

дователей о природе силы, действующей на частицы в направлении оси, разноречивы (Coulter, Parrenheimer, 1949; Bayliss, 1952; Barthel, 1960, и др.). Таким образом, кажущаяся вязкость суспензии не является константой и зависит не только от гидродинамических величин, но также и от геометрических (например, от радиуса трубки).

Ток крови в сосудистой системе обеспечивается градиентом давления, схематически показанным на графике (рис. 55).

Из него видно, что можно вполне обоснованно пренебречь падением давления в крупных артериях и венах, а при некоторых условиях — и в капиллярах, и считать, что основное давление в системе приходится на мелкие артерии и артериолы. Все сказанное относится к постоянному давлению. Колебание давления в каждой точке обусловлено сердечным циклом, и разница между максимальным (систолическим) и минимальным (диастолическим) давлением составляет около 50 мм рт. ст.

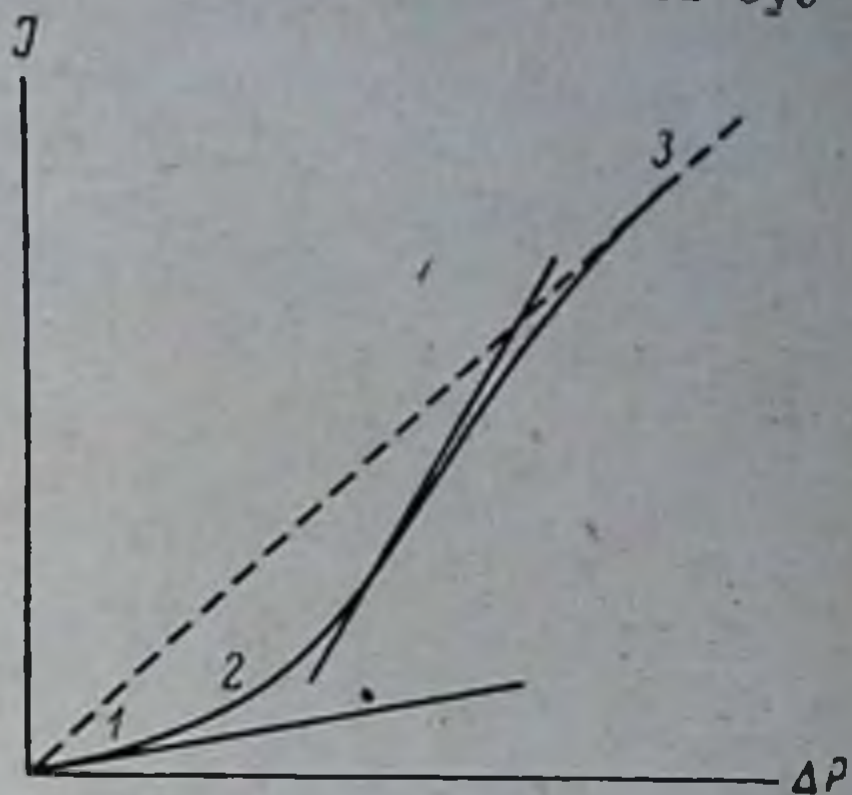


Рис. 54. Кривая Оствальда (для реальной жидкости в широком диапазоне давлений) (по: Bayliss, 1960).

По оси ординат — расход; по оси абсцисс — давление. 1 — первый линейный участок; 2 — нелинейный участок; 3 — второй линейный участок.

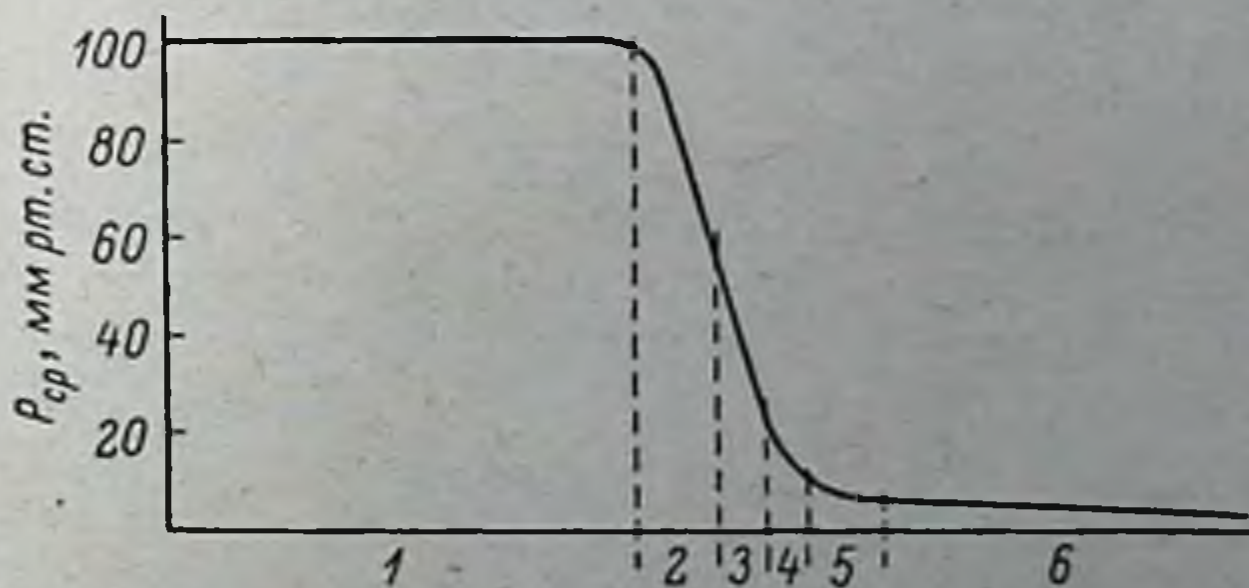


Рис. 55. Падение давления в большом круге кровообращения (по: Rein, 1955).

По оси ординат — среднее давление. 1 — крупные артерии; 2 — мелкие артерии; 3 — артериолы; 4 — капилляры; 5 — венулы; 6 — вены.

Вязкость крови и эластичность сосудов обуславливают демпфирующие свойства кровеносной системы при переменном давлении (кривая 1 преобразуется в кривую 2) (рис. 56), что выражается в различии кривых колебания давления в разных частях системы. Центробежная волна давления в аорте встречает волну, отраженную от места ее разветвления в более мелкие артерии.

Сложение этих двух волн дает результирующую кривую колебания давления. Такой вид имеют кривые колебания на периферии. В определенных моменты времени давление на периферии больше, чем в аорте. Так, давление в бедренной артерии может превышать аортальное на 20—30 мм рт. ст. (Pheleps, 1940; Shipley et al., 1943; Whittlesey, 1952, и др.).

В артериальной системе нормального организма поддерживается состояние динамического равновесия (систолическое дав-

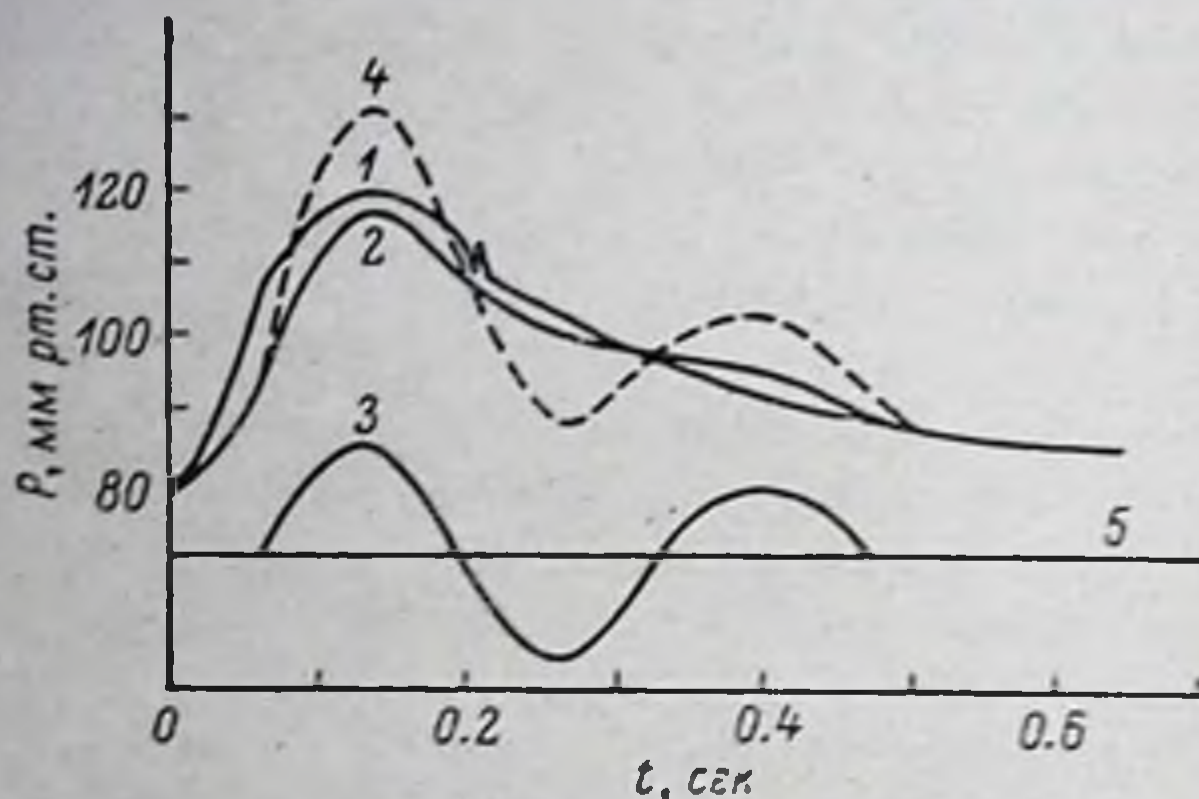


Рис. 56. Иллюстрация принципа демпфирования и сложения волн в артериальной системе (по: Wiggers, 1938).

1 — колебания давления в аорте; 2 — изменения формы и амплитуды колебаний, вызванные демпфированием; 3 — отраженная волна; 4 — сложение кривых 2 и 3; 5 — нулевая линия отраженной волны.

ление — 120 мм рт. ст., диастолическое давление — 80 мм рт. ст.). Ритмические сокращения левого желудочка обеспечивают наличие в аорте небольшого резервного объема крови; через капилляры протекает кровь в количестве, равном ударному объему. Состояние равновесия нарушается при изменении частоты сердечных сокращений, ударного объема, периферического сопротивления либо эластичности стенок артерий.

Согласно Уиггерсу (Wiggers, 1938), наблюдаются следующие реакции системы на различные изменения: при увеличении частоты сердцебиения диастолическое давление возрастает в большей степени, чем систолическое; при увеличении ударного объема систолическое давление повышается больше, чем диастолическое; рост периферического сопротивления вызывает большое увеличение диастолического давления, но до тех пор, пока степень растяжения артерий во время диастолы не будет резко уменьшена (100 мм рт. ст.). После этого систолическое давление нарастает быстрее, в результате чего пульсовое давление превышает норму. При понижении эластичности стенок артерий диастолическое давление снижается больше, чем систолическое.

Трение между слоями жидкости приводит к возникновению градиента линейной скорости кровотока по радиусу трубки. Поскольку вязкость крови непостоянна в направлении радиуса трубки, то под средней линейной скоростью следует понимать скорость, обеспечивающую ту же объемную эффективность кровотока. Более приемлемая характеристика кровотока — средняя объемная скорость крови (Q). Для ньютоновых жидкостей Q определяется по формуле Пуазейля

$$Q = \frac{\pi \Delta P R^4}{8 \eta l}, \quad (22)$$

где ΔP — разность давлений на концах трубки; l — длина трубки; R — радиус трубки.

Поскольку кровь является не ньютоновой жидкостью, то применение этого соотношения возможно лишь для приблизительной оценки соотношения кровотока и других параметров. Эксперименты, проведенные на живом изолированном сосудистом ложе (Whittaker, Winton, 1933; Parrenheimer, Maes, 1942; Nicol et al., 1951, и др.) показали, что Q представляет экспоненциальную функцию давления, и ход кривых зависит от всех параметров, влияющих на кровоток. Из тех же экспериментов следует, что существует нижний предел давления, сильно зависящий от степени сужения сосудов, ниже которого кровоток не наблюдается. В норме Q в аорте человека составляет около 5 л/мин, собаки — 2.5 л/мин.

Поскольку кровь является суспензией клеток, то при определенных условиях инерционные силы, стремящиеся разогнать клетки, могут преобладать над силами, стремящимися собрать их. В таком случае течение становится турбулентным. Критическое число Рейнольдса, характеризующее границу между ламинарным и турбулентным потоками, по данным Колтера, Папенхеймера (Coulter, Parrenheimer, 1949), *in vitro* составляет около 1000, *in vivo*, по данным Рейнольдса (Reynolds, 1883), — 2000. На основании многочисленных экспериментов большинство исследователей считают, что течение крови ламинарно во всей сердечно-сосудистой системе организма, кроме сердца и устья аорты. Однако, по мнению С. А. Регирер (1971), представление о ламинарном характере течения крови нуждается в уточнении. Дело в том, что при движении крови траектория отдельных форменных элементов, находящихся под действием гидродинамических сил, случайна и течение в этом случае приобретает свойства псевдо-турбулентности (интенсивность хаотического движения зависит не от числа Рейнольдса, а от скоростей сдвига). Роль псевдо-турбулентности в организме еще не выяснена. Зависимость характера течения от величины кровотока, градиента давления и диаметра трубок представлена на номограмме Вадота (Vadot, 1960) (рис. 57). Число Рейнольдса определяется по следующей формуле:

$$Re = \frac{VD\sigma}{\eta}, \quad (23)$$

где V — средняя скорость кровотока; D — диаметр трубки; ρ — плотность; η — вязкость.

Динамика кровотока во многом зависит от общего сосудистого тонуса. Параметром, характеризующим состояние сосудистой системы, является общее периферическое сопротивление. Оно обусловлено всеми факторами, препятствующими току крови в артериальных сосудах (давлением вне и внутри сосудов, вазокон-

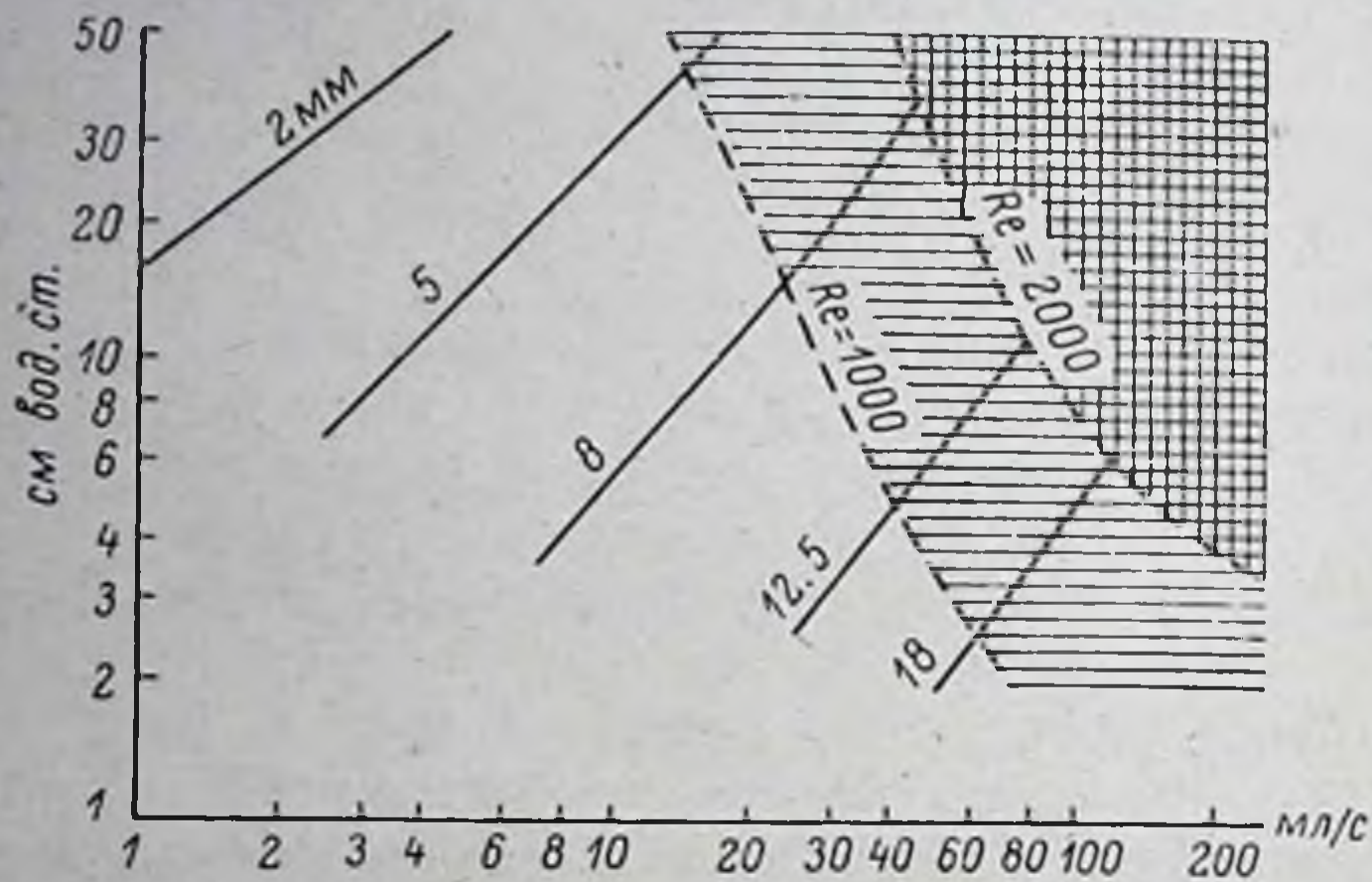


Рис. 57. Взаимоотношение между током крови (по оси абсцисс) и градиентом давления (по оси ординат) в пластической трубке: (по: Vadot, 1960).

Внутренний диаметр трубок указан над косыми линиями.
Re — число Рейнольдса.

стрикцией и др.). Приблизительно величину периферического сопротивления можно вычислить, применив закон Пуазейля

$$R = \frac{\Delta P}{\eta}. \quad (24)$$

Установлено, что сосудистый тонус в большой степени обеспечивается периферическими механизмами без участия центральной нервной системы и циркуляции в крови вазоконстрикторных веществ (Конради и др., 1969). Среди периферических механизмов следует выделить сократительный автоматизм гладкой мускулатуры, т. е. ее реакцию на растяжение стенок сосуда.

Взаимодействие факторов регуляции регионарного кровообращения Г. П. Конради с сотр. (1969) представили в виде схемы (см. с. 112).

Физиологическая роль пульсирующего кровотока до сих пор окончательно не выяснена. От Людвига (Ludwig, Schmidt, 1868) до Карреля (Carrel, Lindbergh, 1938) все физиологи отводили значительную роль пульсации кровотока в обеспечении нормальных функций органов. Затем специфическая роль пульсирующего тока крови была подвергнута сомнению. В многочисленных работах не было замечено значительной разницы во влиянии пуль-

сирующего и непугсирующего кровотока на функции органов (Selkurt, 1951; Rittel, 1952; Weselowski et al., 1955, и др.). Но менее многочисленные эксперименты показали, что непугсирующий кровоток отрицательно сказывается на функциональной активности органов (Parsons, McMaster, 1938; Thomas, Beaudoin, 1951). Однако различное влияние пулсирующего и непугсирующего тока замечено лишь при низких и средних скоростях кровотока и не наблюдалось при кровотоке, достигающем 100—130 мл/кг/мин. Таким образом, нет достаточных оснований, чтобы отдать предпочтение какому-либо из мнений, и большинство исследователей, пока не решен этот спорный вопрос, при моделировании кровообращения стремится подражать физиологическому действию сердца.

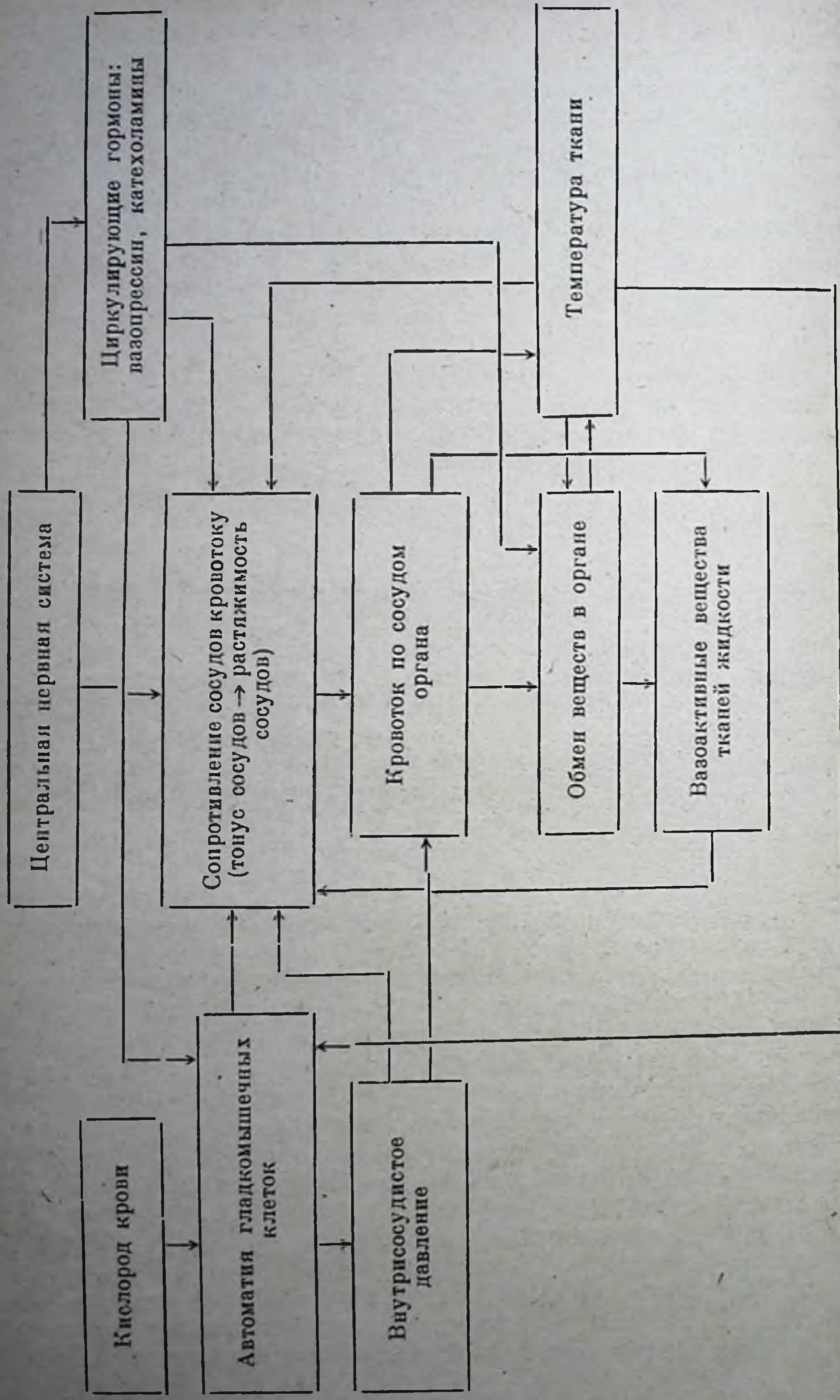
Ударный объем позволяет вычислить объемную скорость кровотока без ее непосредственного измерения (ударный объем умножить на частоту пульса). Для нормального организма справедливо следующее соотношение:

$$\frac{\text{Пульсовое давление}}{\text{Ударный объем}} \times \text{Диастолический объем артериальной системы} = \text{const.} \quad (25)$$

Объем циркулирующей крови является одним из параметров, стабилизируемых в организме, поскольку постоянство объема крови — необходимое условие жизнедеятельности организма. Капиллярный и венозный отделы кровеносной системы содержат около 80% всей крови, поэтому предполагают, что именно вены и капилляры играют главную роль в регуляции объема кровотока и циркулирующей крови. Объем крови и скорость кровотока определяют время кругооборота в сосудистой системе:

$$\frac{\text{Объем крови}}{\text{Скорость кровотока}} = \text{Время кругооборота.} \quad (26)$$

Физиологический интервал колебания температуры довольно узок, и такие небольшие колебания температуры практически не изменяют непосредственно гемодинамические характеристики крови. Влияние изменений температуры на кровообращение опосредовано системой терморегуляции и сосудодвигательной системой и проявляется только в вазоконстрикции и вазодилатации. Защитная реакция организма на понижение окружающей температуры проявляется в сужении поверхностных капилляров, что уменьшает теплоотдачу. Повышение температуры внешней среды, наоборот, вызывает расширение капилляров для интенсивного теплоизлучения. Непосредственное влияние температуры на состояние сосудов изучено весьма слабо, и исследование этой зависимости — дело будущего, хотя уже есть некоторые необычные данные. Например И. А. Мануйлов (1969) при регионарной перфузии конечностей собаки кровью с повышенной температурой наблюдал вазоконстрикцию. Перерезка бедренного и седа-



Взаимодействие факторов регуляции регионарного кровообращения (по: Коиради, 1969).

лищного нервов не влияла на эффект. Сосудосуживающий эффект, возможно, объясняется отсутствием сокращений мышц и «первичным» нагреванием крови. Для окончательного же вывода данных слишком мало.

Проблема адекватной перфузии

При создании гомеостатических механизмов, поддерживающих жизнедеятельность изолированного органа, требования, предъявляемые к крови в искусственных биолого-технических системах, несколько отличаются от требований к крови intactного организма. В этом случае кровь становится искусственной средой, посредством которой обеспечиваются физиологические условия для существования органа. Эта среда выполняет следующие функции: транспортную (перенос газов и метаболитов), буферно-смесительную и в какой-то мере регуляторную, остальные же функции (терморегуляционная, защитная, самоподдерживающие клеточного и белкового состава крови и др.) выполняются техническими устройствами или становятся ненужными. Обеспечение действительно физиологических условий при перфузии требует всестороннего контроля как за перфузатом, так и за органом. Особенно это относится к перфузиям изолированного органа, поскольку само нарушение нормальных связей между организмом и органом создает неблагоприятные условия для жизнедеятельности последнего. Под термином «адекватность» искусственного кровообращения следует понимать не точную копию параметров организма, а оптимальное удовлетворение потребностей органа, причем достигаться это может совершенно иными путями, и отдельные параметры могут существенно отличаться от своих нормальных значений в организме. Адекватность искусственного кровообращения целесообразно расчленить на несколько составляющих понятий, важнейшими из которых являются адекватность транспортных свойств и буферно-смесительных свойств крови.

Адекватность транспорта газов и метаболитов

Транспортные возможности крови определяются совокупностью гемодинамических и физико-химических условий. В нормальных условиях интенсивность кровоснабжения тканей зависит от выполняемых ими функций. Так, например, почки, составляя менее 1% от всего тела, получают около 1/4 минутного объема кровотока, что связано с их диуретической функцией (Galletty, Biesher, 1966). Кровоснабжение сердца и мозга обеспечивает почти неизменное количество кислорода, необходимого для их нормального функционирования, тогда как снабжение менее жизненно важных органов кислородом может быть временно уменьшенным. Основываясь на потребности органа в кислороде, можно определить оптимальную величину объемной скорости кровотока и в нем.

Для вычисления идеального (по доставке кислорода) объема перфузии широко пользуются формулой, которую предложил Кларк (Clark, 1960).

$$P = \frac{7.46WR}{H(A - V)}, \quad (27)$$

где p — объемная скорость перфузии, в л/мин.; W — вес тела, в кг; R — потребность в кислороде, в мл/кг·мин.; H — гемоглобин, в г%; A — насыщение артериальной крови, в %; V — насыщение венозной крови, в %.

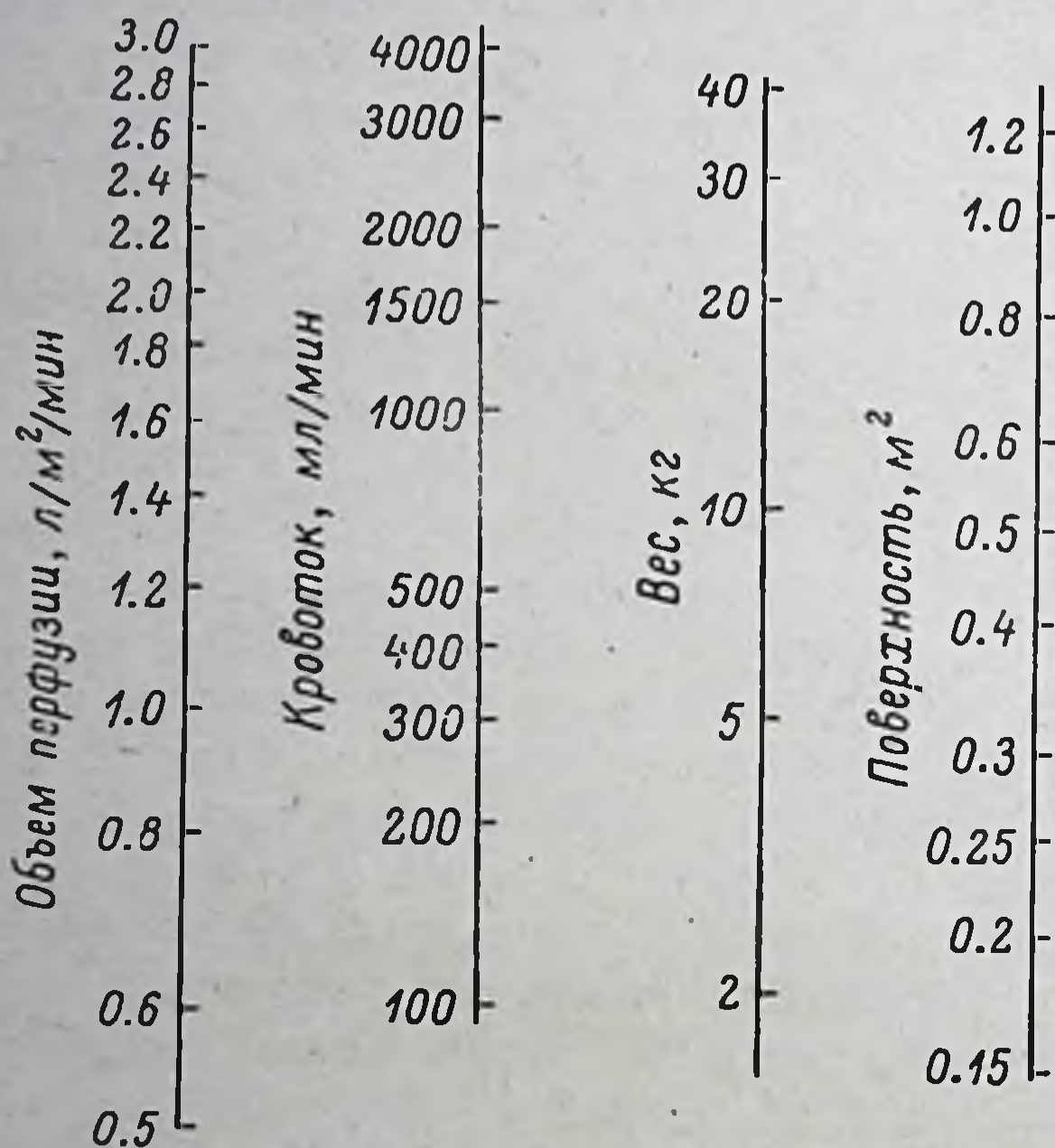


Рис. 58. Связь веса и поверхности тела с кровотоком и объем перфузии для взрослых собак (по: Galletti, Brecher, 1966).

Предполагается, что насыщенность гемоглобина кислородом в венозной крови на 50% нормальна. Оптимальный объем перфузии для собак можно определить по номограмме, представленной на рис. 58. Правая часть шкалы позволяет определять зависимость между весом W (в кг) и поверхностью тела S (в m^2) взрослой собаки по формуле

$$S = 0.012 \sqrt[3]{W^2}. \quad (28)$$

Все приведенные данные относятся к целому организму. Для вычисления оптимального кровотока при изолированной перфузии необходимо иметь полную картину топографического распределения кровотока у животного.

Головной мозг. По данным Шмидта (Schmidt, 1950), головной мозг получает около 50 мл/мин кислорода на 100 г. Снижение

кровотока на 30—40% вызывает расстройства функции мозга (Finperty et al., 1953). Наибольшее время остановки кровообращения, совместимое с сохранением жизни тканей мозга, составляет около 10 мин (Schneider et al., 1955).

Сердце. Для человека нормальной коронарный кровоток составляет 46 мл/мин на 100 г ткани (Glenn et al., 1960). В норме эта величина устойчиво поддерживается.

Почки. Уропозитическая функция почек существенно зависит от скорости кровотока. Однако необратимых нарушений этой функции не наступает даже при глубокой ишемии в течение 90 мин. В норме для человека объемная скорость кровотока через почки равна примерно 150 мл/мин (на 100 г почечной ткани). Артерио-венозная разница по кислороду составляет всего 0.33 об.% (Galletty, Brecher, 1966), потому что количество кислорода, приносимое к почке при столь высоком кровотоке, многократно превышает ее метаболические потребности. По Бонесу (Boupons et al., 1960), почка может нормально секретировать мочу при величине кровотока в четыре раза меньше нормального.

Печень. Печеночный венозный кровоток в норме у собак составляет около 30 мл/кг·мин ($1/4$ минутного объема сердца), из них 80% приходится на воротную систему и 20% — на кровь, приносимую печеночной артерией (Selkurt, Brecher, 1956).

Мышцы. Нормальный кровоток у собак в покое составляет около 60 мл/кг·мин (Schwartz et al., 1959), но может значительно возрасти при общей мышечной нагрузке.

В табл. 5 суммированы количественные данные о регионарном потреблении кислорода и кровотока для органов человека, по Фолькову и Нилу (Folkow, Neil, 1971). Числа в таблице округлены и лишь грубо описывают ситуацию в организме человека со средней массой и среднего возраста в покое. Величины кровотока при максимальной вазодилатации вычислены также весьма приблизительно.

До сих пор не решен вопрос о необходимости пульсирующего кровотока при экстракорпоральном кровообращении. Физико-математический анализ изменений гидрохимических показателей при подаче крови через ограничивающее сечение артериальной канюли с использованием различных амплитуд пульсовых колебаний, проведенный Ю. Н. Барановым (1959), показал, что неппульсирующая и близкая к ней подача создает наиболее выгодные условия с точки зрения гидродинамики для максимального использования просвета артериальной канюли. Редкий же пульс создает все условия для таких нежелательных явлений, как гемолиз, кавитация, турбулентность и др. Все это позволяет утверждать, что при перфузии изолированного органа нет необходимости использовать кровоток с высокой амплитудой пульсации, тем более, что технически осуществить такой ток сложнее. Таким образом, оптимальным вариантом является более частый пульс, позволяющий насосу максимально использовать ограничиваю-

Таблица 5

Региональный кровоток и потребление кислорода (по: Folkow, Neil, 1971)

Орган	Масса, кг	Кровоток в покое			Кровоток при максимальной вазодилатации, мл/мин	Артериально-венозная разница по O ₂	Потребление кислорода в покое		
		мл/мин	мл/мин 100 г массы ткани	% от общего минутного объема			мл/мин	мл/мин/100 г массы ткани	% от общего потребления O ₂
Мозг	1.4	750	55	14	1500	6	45	3	18
Сердце	0.3	350	80	5	1200	10	25	8	10
Печень	1.5	1300	85	23	5000	6	75	2	30
Желудочно-кишечный тракт	2.5	1000	40		4000				
Почки	0.3	1200	400	22	1800	1.3	15	5	6
Мышцы (скелетные)	35	1000	3	18	20000	5	50	0.15	20
Кожа	2	200	10	4	3000	2.5	5	0.2	2
Кости, костный мозг, жировая ткань, соединительная ткань и т. д.	27	800	3	14	4000	5	35	0.15	14
В целом	70	5500	—	100	—	—	250	—	100

щее сечение артериальной канюли. Такой вывод справедлив не только с точки зрения гидродинамики, но и физиологии, поскольку многочисленными экспериментами показано, что действие пульсирующего и неппульсирующего кровотока различно лишь при малых скоростях перфузии.

Кровь должна обеспечивать транспорт растворенных метаболитов и газов, поэтому одним из факторов адекватности искусственного кровообращения является насыщение артериальной крови кислородом. Норма насыщения гемоглобина кислородом для интактного организма составляет 96—98%, но, однако, для характеристики поглощения кислорода тканями недостаточно знать степени насыщения, поскольку диссоциация оксигемоглобина зависит от температуры и рН среды.

Это обстоятельство, имеющее малое влияние в нормальных условиях, приобретает большое значение при гипотермической перфузии. Со снижением температуры возрастает сродство кислорода к гемоглобину, и вполне естественным является предложение компенсировать это искусственным ацидозом (Вишневский, Харнас, 1968). Кроме транспорта кислорода, необходима адекватная элиминация углекислого газа, интенсивность которой зависит от объема кислорода, поступающего в оксигенатор. Гипервентиляция приводит к газовому алкалозу, что особенно опасно в сочетании с гипотермией. В этом случае целесообразно оксигенировать кровь смесью кислорода с углекислым газом.

Необходимо остановиться на широко применяемых в последнее время гипотермических перфузиях. Обеспечение адекватности кровообращения, вызванными повышением вязкости крови и замедлением капиллярного кровотока. Наиболее эффективным средством, предотвращающим эти осложнения, служит гемодилюция. При определении степени гемодилюции рекомендуется учет характерных особенностей перфузируемого органа. Часто наилучший эффект дает 20—30%-ное разведение (Филатов, Баллюзек, 1972).

Адекватность буферно-смесительных свойств крови

Кровь как буферная система имеет в норме следующие параметры: $pH=7.35\div 7.46$, $P_{CO_2}=35\div 45$ мм рт. ст., $СБО=+1.5\div -1.5$ мэкв/л, $БО=44$ мэкв/л, бикарбонат крови — 27 мэкв/л.

Наиболее часто встречающееся нарушение кислотно-щелочного баланса — метаболический ацидоз, который вызывается абсолютным или относительным избытком нелетучих кислот метаболического происхождения. Для обеспечения адекватности искусственного кровообращения рекомендуется коррекция кислотно-щелочного равновесия следующим путем. При метаболическом ацидозе (рис. 59) дефицит буферных оснований ликвидируется добавлением бикарбоната натрия или триамина. Дефицит буферных систем (ДБС) вычисляется по модифицированной формуле Мельмгарда—Аструпа

$$ДБС = 4.3 \cdot СБО \cdot V, \quad (27)$$

где ДБС дается в пересчете на $NaHCO_3$, в мэкв/л; СБО — сдвиг буферных оснований крови, в мэкв/л; V — объем циркулирующей крови, в л.

Данные для определения необходимого объема раствора $NaHCO_3$ представлены ниже

$NaHCO_3$, %	$NaHCO_3$, мэкв/л в 1 мл раствора
8.40	1.000
4.20	0.500
2.10	0.250
1.05	0.125

Пример. Если $V=1$ л, $СБО=5$ мэкв/л, то $ДБС=4.3 \cdot 5 \cdot 1 = 21.5$ мэкв/л, т. е. необходимо ввести 21.5 экв/л $NaHCO_3$. Такое количество $NaHCO_3$ содержит 21.5 мл 8.4%-ного раствора $NaHCO_3$ или 43 мл 4.2%-ного раствора. Концентрация применяемого раствора зависит от целей и условий эксперимента.

Эффективный химический способ коррекции респираторного ацидоза пока не найден. Во многих случаях для этих целей используют триамин (ТИАМ). Действие триамина объясняется его способностью проникать в клетку и вытеснять углекислоту

(Robin et al., 1961). В результате происходит резкое увеличение HCO_3^- в плазме. Все побочные явления, вызываемые тризаминном в организме (усиление выброса инсулина, угнетение вентиляции

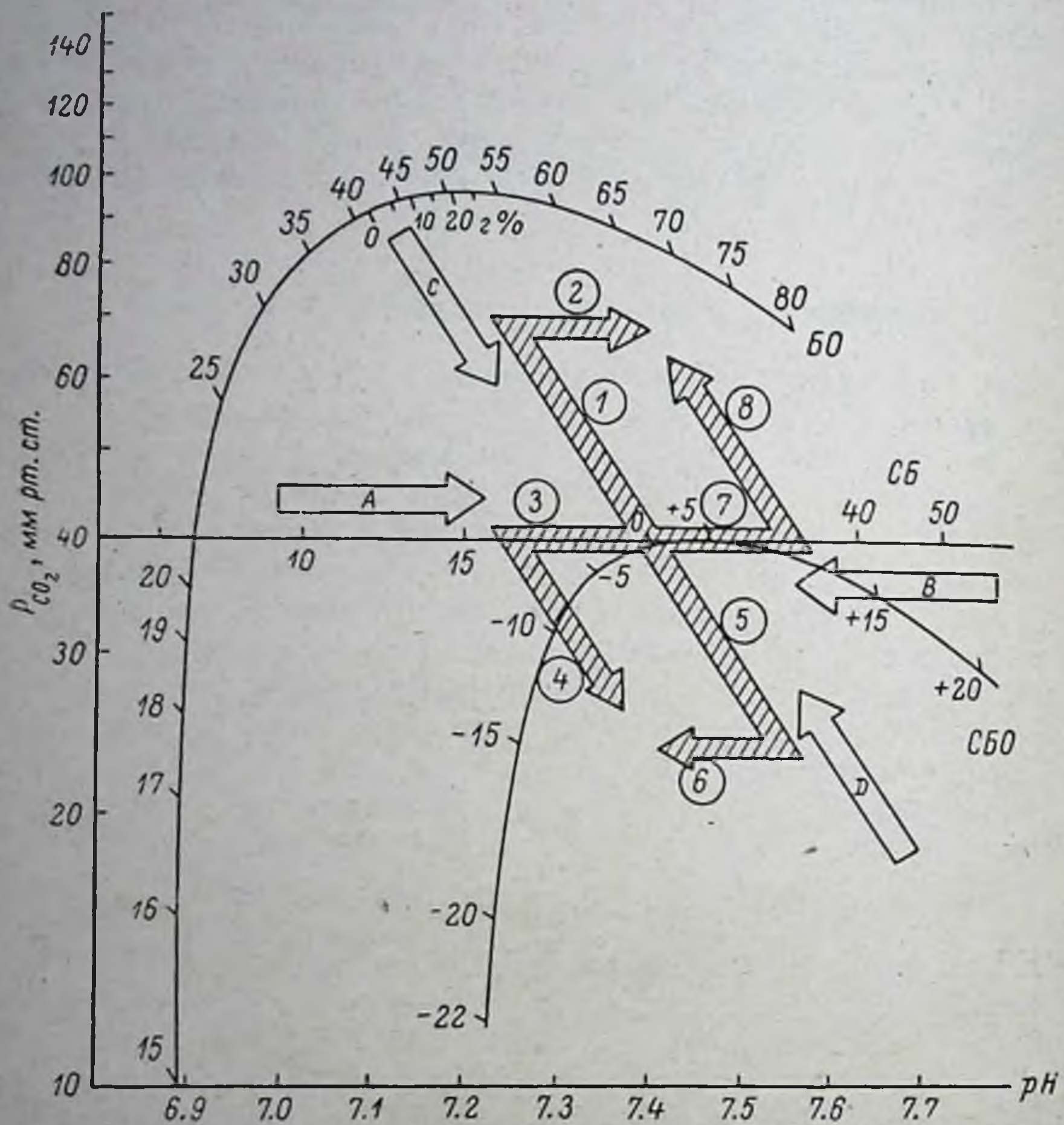


Рис. 59. Схема наиболее рациональных методов коррекции кислотно-щелочных нарушений (по: Агапов, 1968).

1 — причинные изменения при респираторном ацидозе; 2 — при компенсаторном (наиболее эффективная коррекция в данном случае идет в направлении стрелки С); 3 — причинные изменения при метаболическом ацидозе компенсируются усилением легочной вентиляции (4) (коррекция — по стрелке А); 5 — причинные изменения при респираторном алкалозе компенсируются за счет задержки в организме нелетучих кислот (6) (коррекция — по стрелке Д); 7 — причинные изменения при метаболическом алкалозе компенсируются усилением вентиляции (8) (коррекция — по стрелке В). БО — буферные основания; СБ — стандартный бикарбонат; СБО — сдвиг буферных оснований.

и др.), не существенны при перфузии изолированного органа. Действие триамина аналогично действию почечной компенсации (рис. 59, стрелка А). Оно не устраняет причины кислотно-щелочного нарушения. С этой точки зрения более действенным методом коррекции респираторного ацидоза является увеличение легочной вентиляции (стрелка В), что аналогично уменьшению

содержания углекислого газа в оксигенирующей газовой смеси. Метаболический алкалоз (стрелка 3) эффективнее всего компенсируется введением в перфузат нелетучих кислот (стрелка С). Чаще всего для этой цели используют соляную кислоту. Дефицит буферных кислот в этом случае вычисляется по уравнению (27). При респираторном алкалозе (стрелка 4) необходимо снижение альвеолярной вентиляции либо увеличение содержания углекислоты в оксигенирующей смеси (стрелка D).

Рассмотрение основных факторов, определяющих адекватность искусственного кровообращения, показывает сложность экспериментального решения этой задачи.

Методы обеспечения адекватной перфузии и ее контроля

Для обеспечения адекватной перфузии органа необходимы прежде всего устройства, заменяющие легкие и сердце, для оксигенации крови и нагнетания ее в орган. Необходимо, чтобы они были атравматичны для клеток и белков крови. Помимо этих основных узлов, требуется ряд вспомогательных регулирующих и регистрирующих устройств.

Для поддержания определенного артериального давления в системе искусственного кровообращения необходим датчик давления с выходом на регистрирующий прибор с регулятором, который может поддерживать оптимальное давление в магистрали. Кроме того, добавочная регулировка давления может осуществляться артерио-венозными шунтами.

Для имитации упругих свойств сосудов системы кровообращения применяются эластичные трубки или используется демпферное устройство, сглаживающее высокую амплитуду пульсаций кровотока. Для предохранения сосудов органа от тромбов после теплообменника устанавливается артериальный фильтр. В артериальном русле возможно присутствие мелких пузырьков газа, проникающих из оксигенатора, поэтому перед органом требуется установка ловушки пузырьков. Все поверхности, контактирующие с кровью, подвергаются стерилизации одним из существующих методов. Перед стерилизацией эти поверхности обрабатываются силиконовой жидкостью для придания им гидрофобных свойств. Измерение объемной скорости кровотока производится с помощью любого расходомера. Применением трубок из специальных пластиков достигается значительное уменьшение травматизации крови.

Перфузионные насосы. Из существующих моделей насосов (кинетические и положительно перемещающиеся) для искусственного кровообращения пригодны только последние, так как кинетические насосы в процессе работы создают условия для выделения растворенного газа из жидкости, что приводит к значительному гемолизу.

Положительно перемещающиеся насосы подразделяются на две группы: роторные и поступательно-возвратные. Перемешивание жидкости в роторных насосах осуществляется вращающейся деталью, которая захватывает порцию жидкости и толкает ее к выходу насоса. Другой тип насосов имеет полость с входными и выходными клапанами; в ней происходит возвратно-поступательное движение поршня или диафрагмы, при этом поступающая через входной клапан жидкость выталкивается через выходной клапан в отводящую магистраль.

Для искусственного кровообращения используются насосы только пульсирующего типа (Melrose, 1960; Амосов и др., 1962;

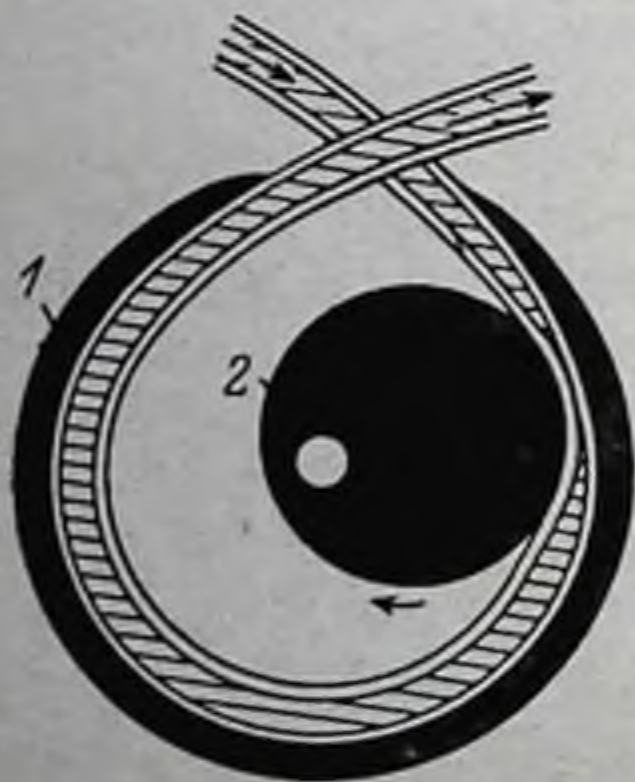


Рис. 60. Насос эксцентрик-ролик (по: Galletti, Brecher, 1966).

Заштрихованная область — эластичная трубка, заполненная кровью; зачерненная — монолитные части: 1 — корпус 2 — ролик.

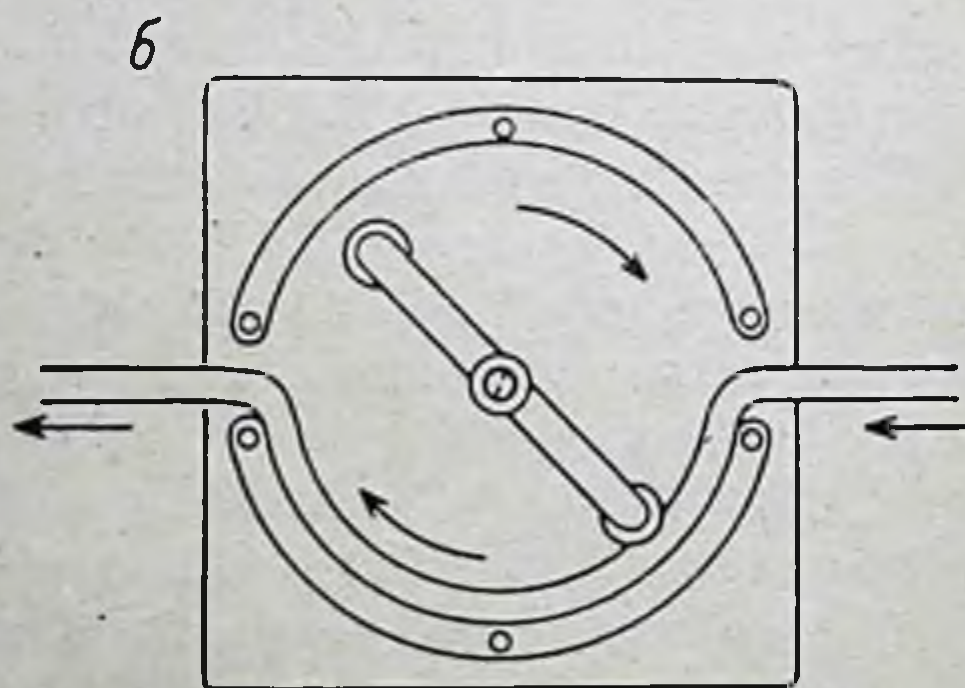
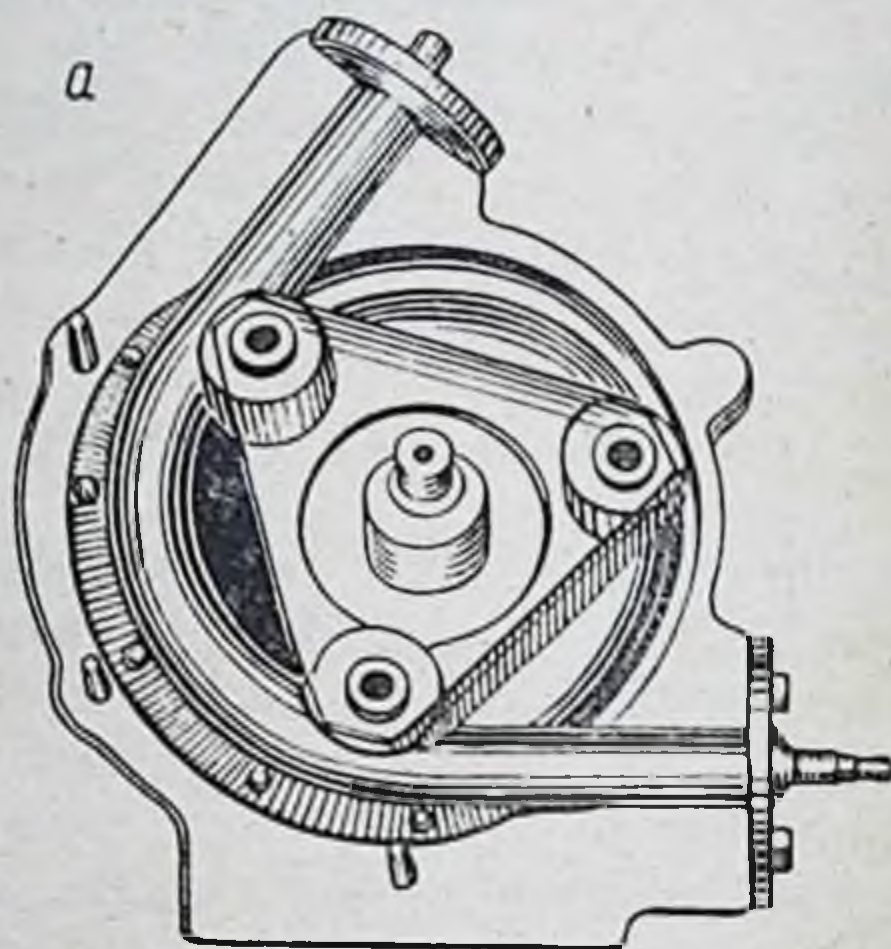


Рис. 61. Внешний вид (а) и схема (б) роликового насоса Де Бакея (по: Вишневский, Харнас, 1968).

Прямые стрелки — направление движения крови; изогнутые — вращение роликов.

Баллюзек, 1962а, 1962б, и др.) как наиболее адекватные кровообращению организма. По характеру создаваемого кровотока они делятся на насосы с пульсацией высокой и низкой амплитуды, а по способу создания направленного потока — с клапанами и без них. К первым относятся насосы мембранного (диафрагменного) и желудочкового типа. Во вторую группу входят роликовые (ротационные) и пальчиковые (сигмамоторные) насосы, которые получили широкое распространение как в зарубежных, так и

в отечественных аппаратах «сердце—легкие» из-за отсутствия клапанов, легкости очистки и стерилизации. Принцип работы этих насосов заключается в последовательном сдавливании упругой трубки подвижными роликами или металлическими пальцами и проталкивании находящейся в ней жидкости. За счет упругости трубка расправляется, заполняясь новой порцией крови.

Роликовые насосы подразделяются на насосы с одиночным роликом (эксцентрики), изображенные на рис. 60, с парным роликом (рис. 61) и множеством роликов (рис. 62). С увеличением числа роликов увеличивается степень гемолиза, поэтому явных преимуществ насос с многочисленными роликами перед насосом с одиночным роликом не имеет. Однако с увеличением количества роликов можно, уменьшив петлю трубки, расположить артериальную и венозную линии так, чтобы ролики сжимали их внутри одного корпуса.

Как роликовые, так и пальчиковые насосы (рис. 63) могут работать по одному из трех режимов, отличающихся степенью пережатия трубки: неокклюзионном, с точной окклюзией и с тугой окклюзией.

При неполной окклюзии происходит обратное проскальзывание части перфузата, что уменьшает производительность насоса. Тугая окклюзия приводит к механической травматизации крови и быстрой изнашиваемости насосной трубки. Оптимальным вариантом работы роликового и пальчикового насосов является режим точной окклюзии (Баллюзек, 1962а; Galletti, Brecher, 1966, и др.). При этом не следует превышать окклюзионное давление, равное 2 кг/см^2 . Это предел, выше которого появляется гемолиз. Очевидно, и это давление превышает механическую устойчивость мембран эритроцитов. В насосах лучше применять упругую трубку не круглого сечения, а ромбовидного, предложенную Вадотом (Vadot, 1960) и требующую минимального усилия для полной окклюзии. Лучшим материалом для упругих трубок признан каучук за отсутствие остаточной деформации.

Мембранный или диафрагменный насос обеспечивает пульсирующий кровоток с большой пульсовой амплитудой, соответствующей естественному кровообращению. Такие насосы обычно применяются парами, работающими в противофазе, что умень-

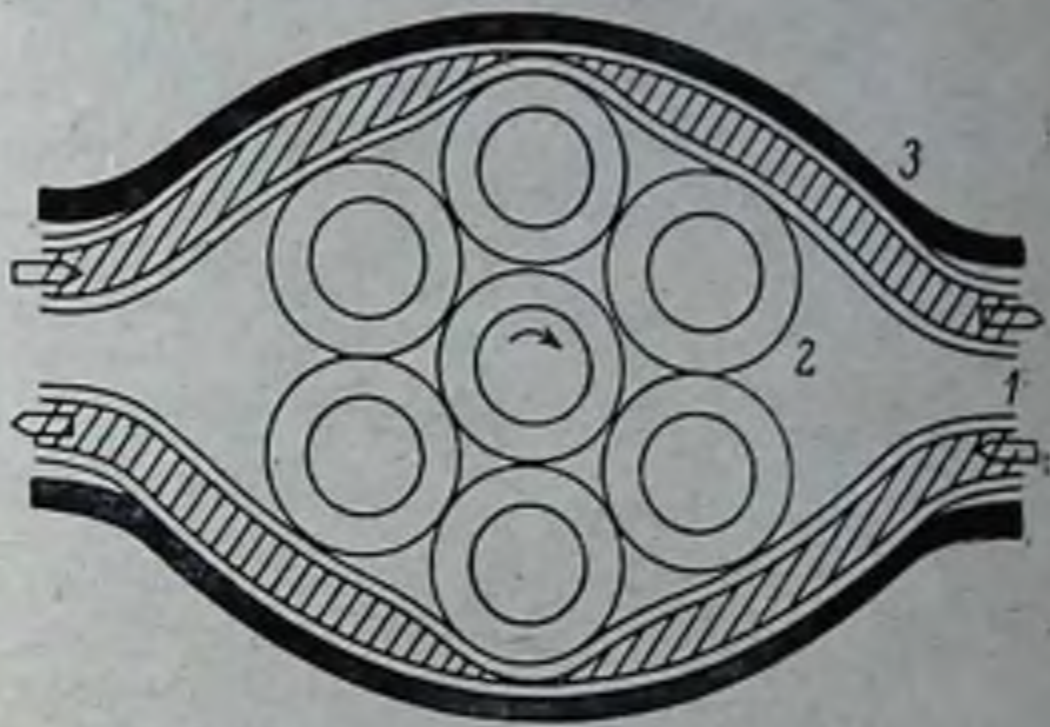


Рис. 62. Многороликовый насос.

Заштрихованная область заполнена перфузатом. 1 — трубки; 2 — прижимные ролики; 3 — корпус. Прямые стрелки — направление движения крови; изогнутая стрелка — вращение центрального ролика.

шает резкие перепады давления. Мембранные (диафрагменные) насосы (рис. 64) состоят из двух камер, в каждой из которых имеются мембрана и два клапана (входной и выходной), выпол-

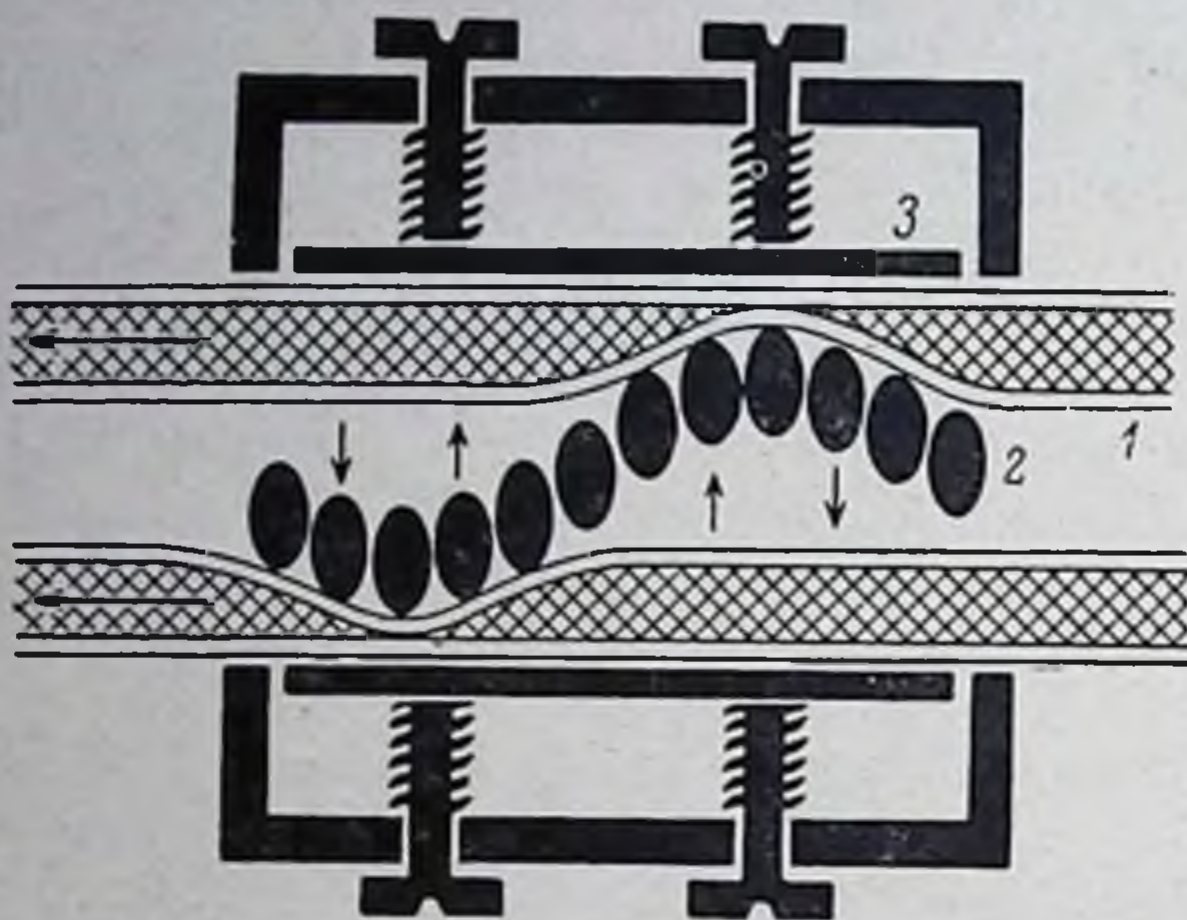


Рис. 63. Насос пальчиковый (клавишный) (по: Galletti, Brecher, 1966).

1 — трубки для перфузии; 2 — «пальцы»; 3 — корпус и пластины. Стрелки — направление движения крови и «пальцев».

ненные из специальной мягкой резины или пластика. Мембраны насосов изготавливаются из тонкого слоя резины, пластика или

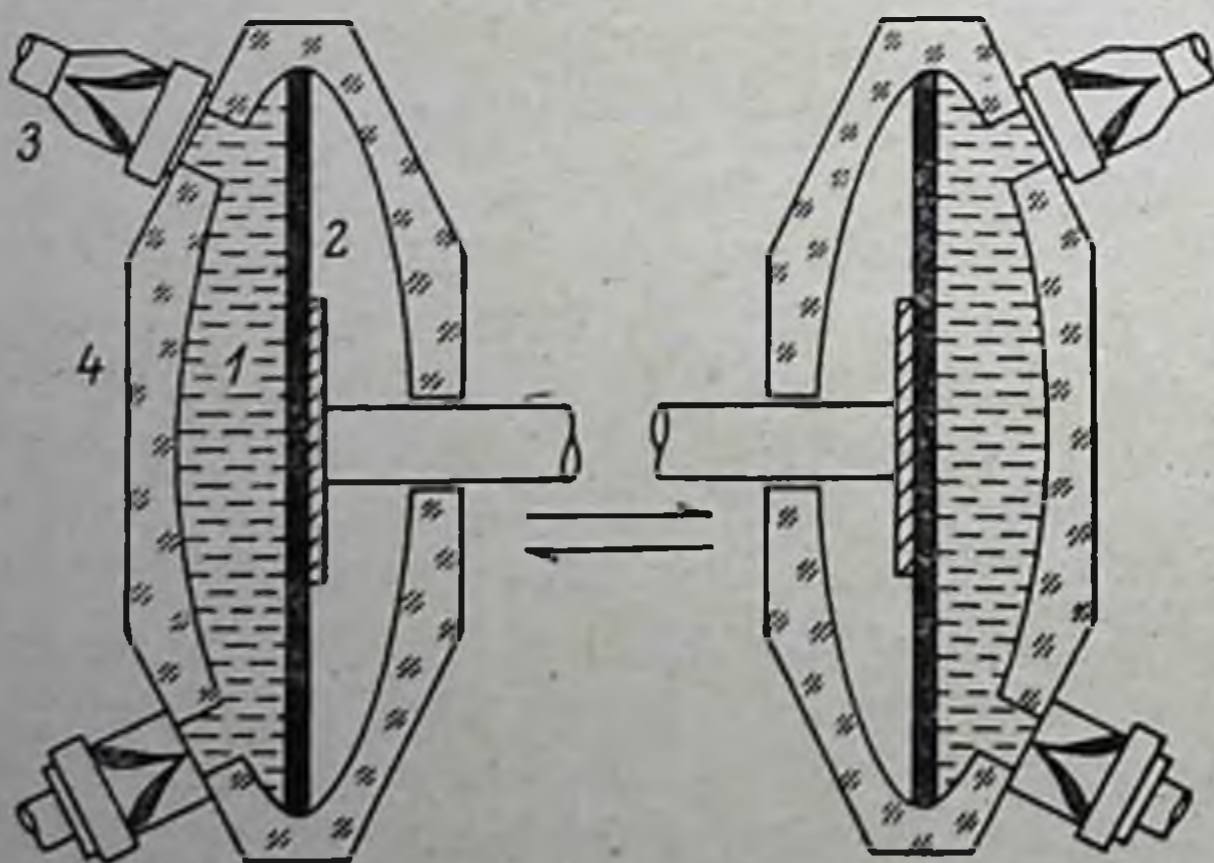


Рис. 64. Насос мембранного типа.

1 — перфузат; 2 — мембрана; 3 — клапан; 4 — корпус. Стрелки — направление движения штока с мембранами.

металла и приводятся в действие гидравлическим, пневматическим или электромагнитным приводом. Перемещением мембраны осуществляется всасывание и проталкивание крови в нужном направ-

лении, определяемом клапанами. Производительность мембранных насосов регулируется частотой колебания мембраны и величиной ударного объема. Мембранные насосы используются в аппаратах экстракорпорального кровообращения отечественного производства.

А. А. Писаревский и сотр. (1970) провели анализ гидравлических циклограмм перфузионных насосов для крови и рекомендуют при работе с мембранными насосами использовать одновременно два качающих узла, работающих в противофазе на общую отводящую магистраль, и демпферные устройства на выходе насоса.

Одним из наименее травматичных для эритроцитов признан желудочковый насос (рис. 65), состоящий из твердого корпуса с вмонтированной в него эластичной камерой, приводящейся в движение введением газа или жидкости в полость корпуса. Повышение давления в корпусе вследствие введения газа или жидкости ведет к сжатию внутренней камеры, и кровь выталкивается из нее. При понижении давления внутренняя камера заполняется кровью. Желудочковые насосы относятся к типу насосов, чувствительных к нагрузке.

Большая часть перфузионных насосов допускает регулировку производительности за счет изменения как частоты рабочих циклов, так и объема выталкиваемой крови. В отечественном аппарате искусственного кровообращения ИСЛ-3 (Баллюзек и Фаршатов, 1965) используется насос с двумя попеременно сжимаемыми параллельными трубками (рис. 66), с независимой регулировкой ударного объема, который позволяет создавать режимы пульсации, различные по амплитуде.

Как показывают обзорные данные (Амосов и др., 1962; Galletti, Вrecher, 1966; Вишневский, Харанас, 1968), критериями преимущества и целесообразности использования насосов считаются: 1) обеспечение больших диапазонов объемов перфузии; 2) возможность регулирования ударного объема и частоты; 3) минимальное травмирование крови; 4) хорошая стерилизуемость деталей, контактирующих с кровью; 5) надежность в работе и простота в управлении.

Следует отметить, что все конструкции насосов еще недостаточно совершенны. Ходгес с сотр. (Hodges et al., 1958) сравнили роликовый и пальчиковый насос. Они определили, что насосы идентичны по производительности и по травматизации крови, однако Мак-Коган с сотр. (McCoughan et al., 1958) указывают, что роликовый насос менее травматичен, чем пальчиковый.

По данным Бьерка (Björk, 1949), пальчиковый насос вызывает гемолиз в три раза меньший, чем насосы компрессионного типа. Согласно Мелроузу (Melrose, 1958), менее травматичны насосы диафрагменного типа. Бьерком (Björk, 1960) описаны испытания сигмамоторного насоса и насоса Крафурда—Севиняга, в котором имеются две попеременно сжимаемые параллельные трубки

(рис. 67). Показано, что гемолиз после ста проходов крови через насосы при объемной скорости кровотока 2000 мл/мин. приблизительно в три раза выше в сигмамоторном насосе.

В Институте сердечно-сосудистой хирургии им. А. Н. Бакулева АМП СССР А. А. Писаревским с сотр. (1969) были проведены испытания насосов окклюзионного типа. Результаты испыта-

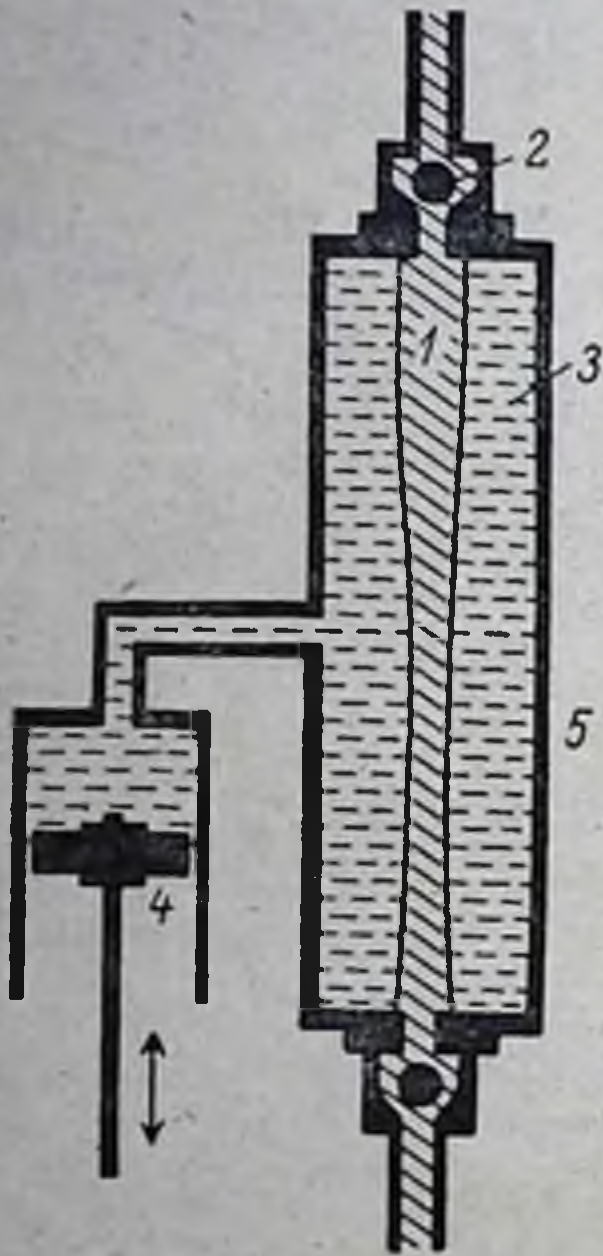


Рис. 65. Насос желудочкового типа с внутренними клапанами и водяным приводом (по: Galletti, Brecher, 1966).

1 — эластичная трубка; 2 — клапан; 3 — вода; 4 — поршень; 5 — корпус.

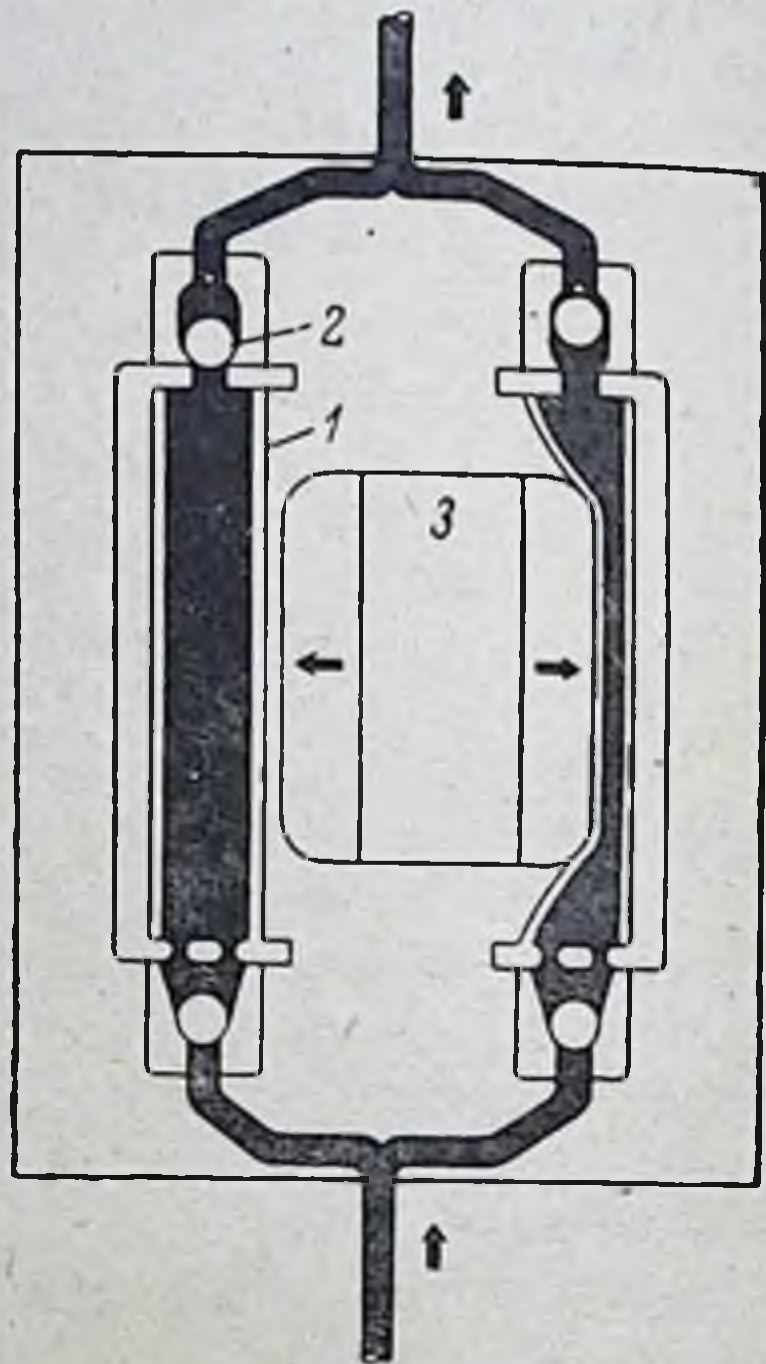


Рис. 66. Насос с двумя параллельными трубками (по: Баллюзек, Фаршатов, 1965).

1 — эластичная трубка; 2 — клапан; 3 — прижимное устройство. Стрелки — направление движения крови и прижимного элемента.

ний зависимости гемолитического индекса от типа насоса показывают, что меньшим значением перепадов давления, характерным для однороликового насоса, соответствует и меньшая величина гемолитического индекса. Л. В. Макаров и Н. А. Супер (1970) приводят средний показатель травматического индекса для мембранного, роликового и пальчикового насосов, равный соответственно 120, 260, и 530.

С этой точки зрения наименее травмирующими следует признать мембранные (Вишневикий, Харнас, 1968) и желудочковые (Galletti, Brecher, 1966) насосы. Широкое применение имеет также насос неперекрывающего типа (Melrose, 1960), менее травмирующий кровь. Следует также подчеркнуть, что пульсация высокой

амплитуды в условиях недостаточного демпфирования может вызвать большие колебания потока и давления, увеличивая тем самым травму эритроцитов. В исследованиях гемоллиза, вызываемого роликовым насосом, установлено, что частичное перекрытие трубки роликом уменьшает травматизацию крови и изнашиваемость насосной трубки (Melrose, 1960).

Отдельную группу составляют насосы-резистографы, широко применяемые при исследованиях сосудистых реакций. Они позволяют поддерживать постоянную производительность (Хаютин и др., 1958; Cohen et al., 1973, и др.). Другого типа насосы позволяют поддерживать постоянное давление (Конради, Паролла, 1967; Тярасов, 1970, и др.).

Сравнение различных типов перфузионных насосов в настоящее время затруднено ввиду того, что конструктивное их исполнение зависит от общего уровня техники, не всегда соответствующего строгим требованиям: «Может быть плохим насос, основанный на хорошем принципе» (Баллюзек, 1962а).

Немаловажное значение при искусственном кровообращении имеет привод. Он должен быть надежным и позволять при аварии быстро переходить на работу вручную. Лучшей следует признать механическую систему передачи и с точки зрения безопасности, так как при гидравлическом или пневматическом приводах во время аварии не исключена возможность проникновения жидкости или газа в русло кровотока. Конструкция насоса должна также предусматривать автоматическую регулировку физиологических пределов гемодинамических (объем перфузии, артериальное и венозное давление) и метаболических (артерно-венозная разница по кислороду) параметров.

Из вышеизложенного следует, что при культивировании изолированных органов можно применять различного типа перфузионные насосы, обеспечивающие пульсирующий кровоток, адекватный кровообращению организма.

Расходомеры. Для измерения объемной скорости кровотока используется ряд расходомеров (Кремлевский, 1963). Наиболее простым измерителем скорости крови является ротаметр, состоящий из конической трубки и поплавка, который поднимается кровью на высоту, зависящую от объемной скорости. Изготовив поплавок из ферромагнитного сплава, армированного стеклом,

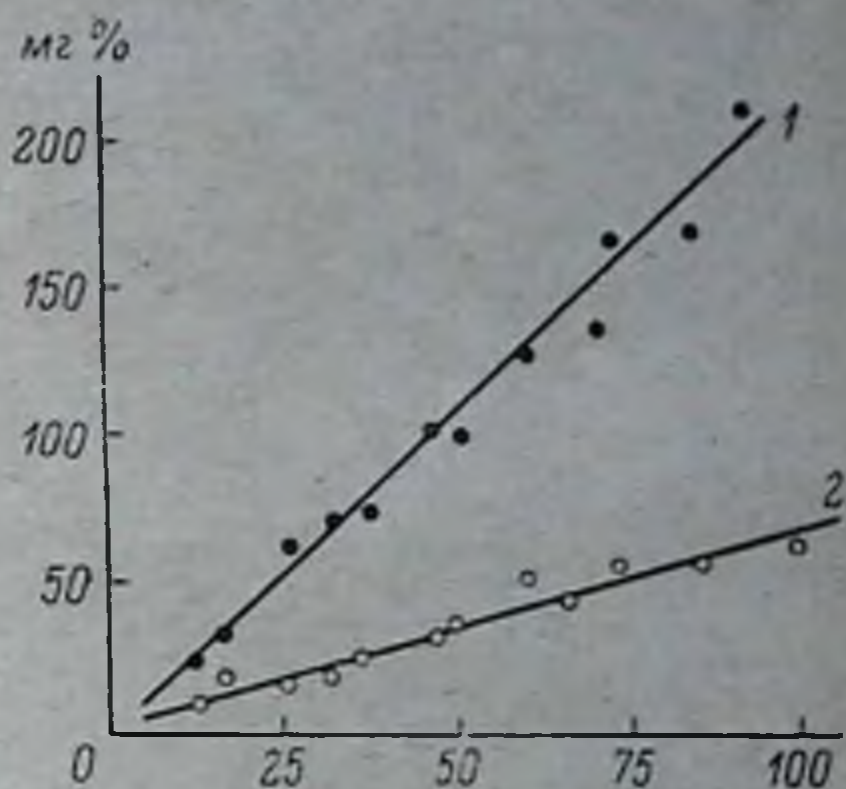


Рис. 67. Гемоллиз после циркуляции крови через сигматорный насос (1) и насос Крафурда—Севинга (2) (по: Vjögk, 1960).

По оси ординат — гемоллиз; по оси абсцисс — число проходов крови.

и поместив ротаметр в электромагнитное поле, можно производить автоматическую регистрацию объемной скорости перфузата. Однако ротаметр имеет существенные недостатки, его показания колеблются в зависимости от вязкости крови, так как на поплавке может выпадать осадок, изменяющий его плавучесть.

Расходомеры непосредственного действия основаны на деформации внесенной в кровяной поток детали, которая пропорциональна

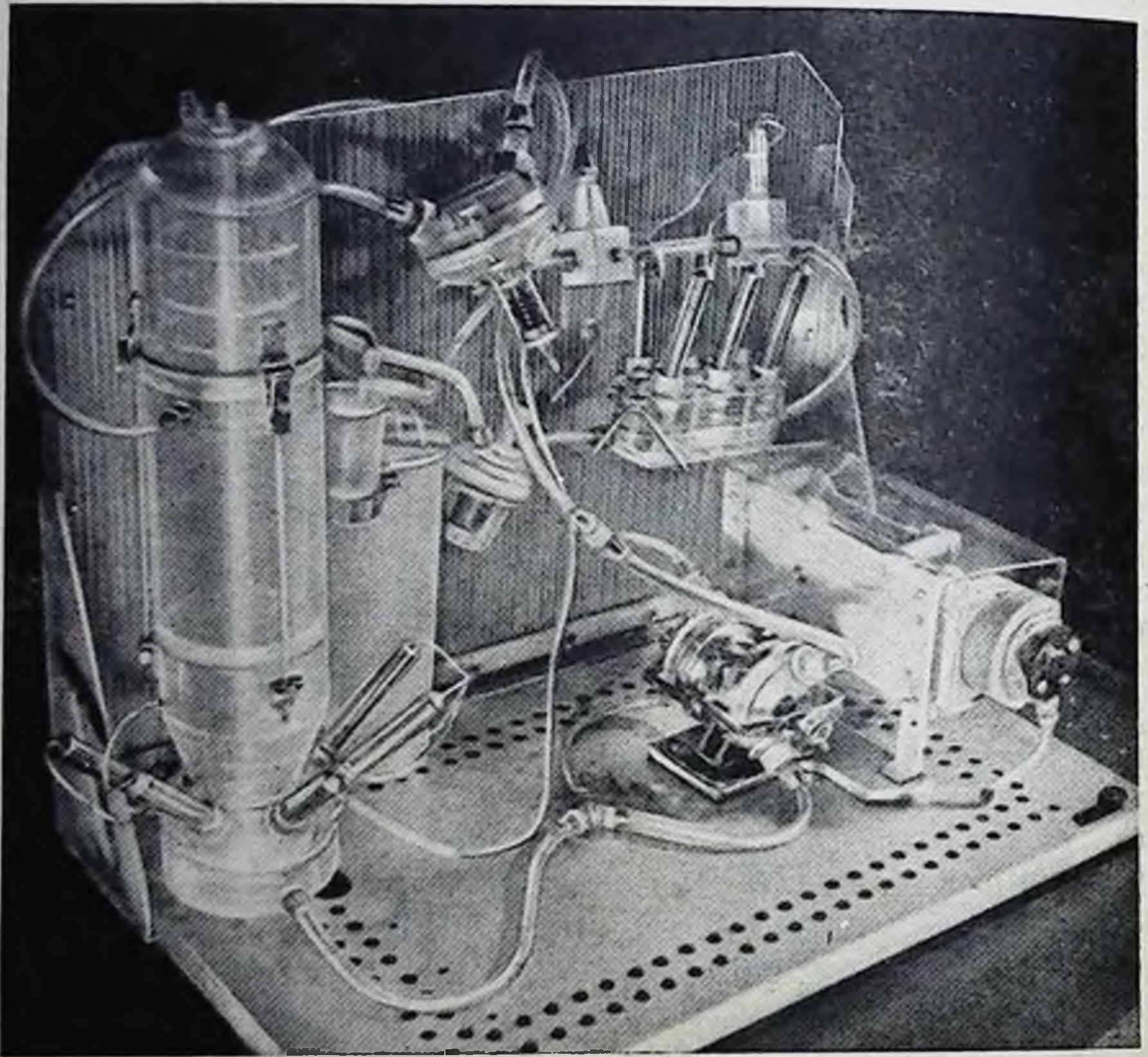


Рис. 68. Гемодинамическая часть установки «Гомеостат-1»
ИФ СО АН СССР.

скорости движения. Такой расходомер также прост, но и ему присущи недостатки ротаметра, делающие его непригодным для пульсирующего кровотока.

Трубка Вентури с дифференциальными манометрами не нашла широкого применения для измерения объемной скорости из-за наличия в ней суженного участка, который вносит дополнительное сопротивление потоку. Этот тип расходомера также чувствителен к изменению вязкости крови.

Ультразвуковой расходомер основан на изменении скорости прохождения ультразвукового сигнала. Прибор определяет ли-

нейную скорость течения жидкости за счет различного времени прохождения акустического сигнала от датчика до приемника в направлении потока и навстречу ему. Прибор имеет хорошие характеристики, но наблюдается дрейф нулевой линии, что требует постоянной корректировки и сложной электронной схемы. Это препятствует массовому применению ультразвукового расходомера.

Более широко используется термоэлектрический метод измерения скорости кровотока. Этому способствовало применение полупроводниковых терморезисторов, которые значительно увеличили чувствительность датчиков. Метод основан на измерении разности температур двумя термисторами, между которыми установлен нагреватель. Термисторы расположены по течению жидкости до нагревателя и после него. При отсутствии потока крови разность температур будет равна нулю. При движении возникает разность температур, пропорциональная скорости потока крови. Конструкция этого расходомера компактна, а сопротивление потоку крови минимально. Для измерения требуются чувствительные приборы.

Изменение кровотока турбинометром заключается в помещении в поток турбинки или пропеллера, содержащих в себе магнит, который индуктирует сигнал в катушке, находящейся на внешней стороне трубки. Этот сигнал преобразуется и подается на регистратор. Прибор малочувствителен к изменению вязкости крови, измеряет пульсирующий и средний поток и не имеет дрейфа нулевой линии в течение длительного периода (McMillan, 1960; Бошняк, Бызов, 1968). К недостаткам турбиномера можно отнести снижение давления потока в турбинке и дополнительное сопротивление потоку крови.

Наиболее надежным и не создающим сопротивления потоку крови является электромагнитный расходомер. Принцип измерения заключается в следующем. Электропроводящая жидкость, протекая через магнитное поле, индуцирует разность потенциалов, пропорциональную скорости потока. Возникающая разность потенциалов усиливается и затем регистрируется. На показания прибора не влияет вязкость, температура и давление



Рис. 69. Общий вид датчика давления.

крови, но влияет ее удельный вес и электропроводность. Однако довольно сложная электронная аппаратура, требующаяся для реализации этого метода измерения, пока препятствует широкому распространению электромагнитного расходомера.

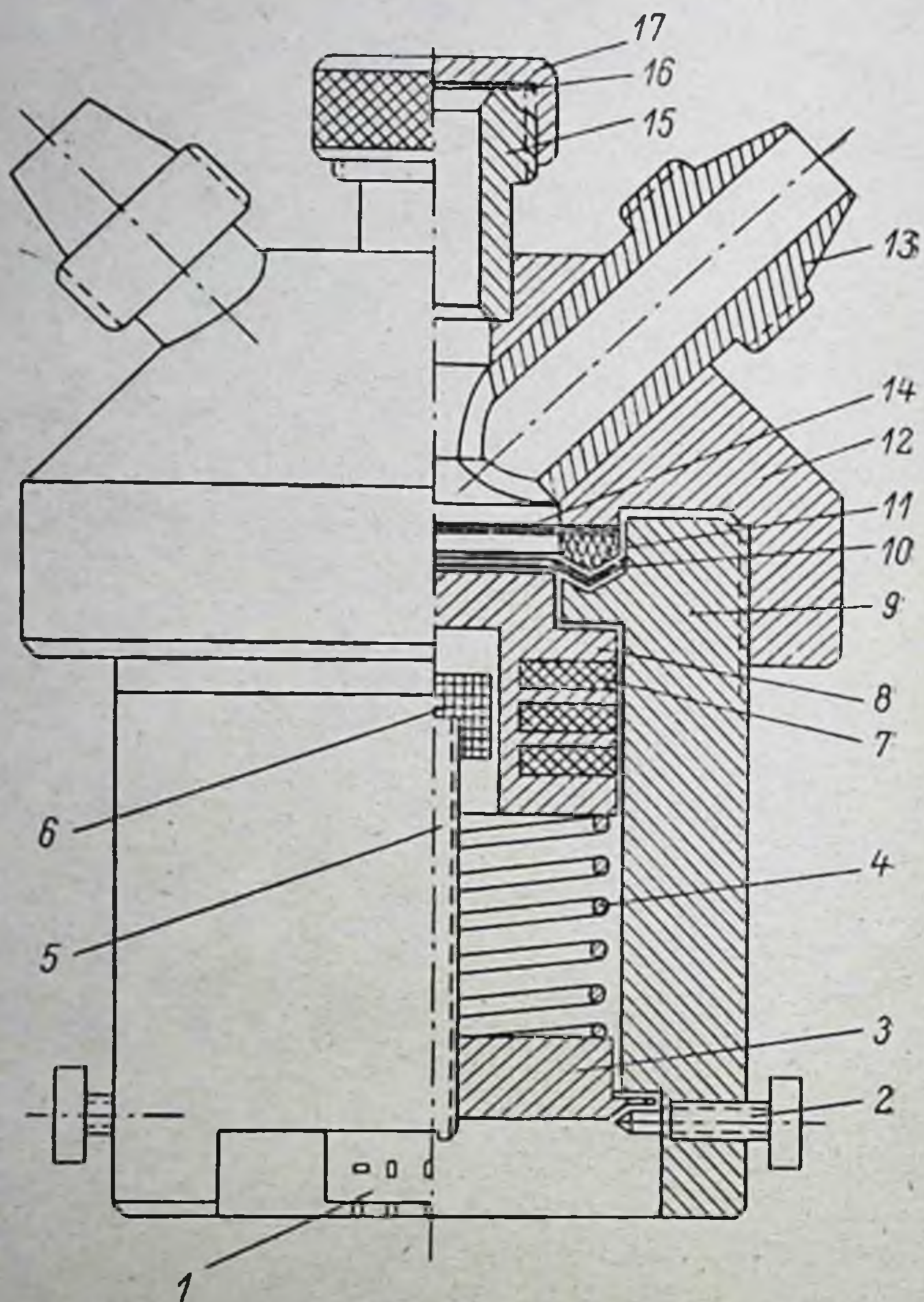


Рис. 70. Конструкция датчика давления.

1 — переходная колодка; 2 — стопорный винт; 3 — нижняя крышка датчика; 4 — пружина; 5 — винт сердечника; 6 — ферромагнитный сердечник; 7 — обмотка трансформатора; 8 — дифференциальный трансформатор; 9 — корпус датчика; 10 — резиновая мембрана; 11 — фторопластовое прижимное кольцо; 12 — верхняя крышка датчика; 13 — штуцер; 14 — прокладка из медицинского пластика; 15 — ловушка пузырей; 16 — резиновая прокладка; 17 — накидная гайка.

В наших исследованиях для создания искусственного кровообращения (рис. 68) в изолированных органах применен насос мембранного типа с двумя камерами. Шток насоса связан с рабочими мембранами, которые деформируются возвратно-поступательно, повторяя движение штока. Для изоляции перфузата от металла

рабочая мембрана со штоком покрывается резиновой мембраной, непосредственно контактирующей с кровью. Крышки насосов прижимаются траверсами, уплотняя мембраны. Шток приводится в действие управляемым от системы автоматического регулирования электродвигателем с помощью эксцентрикового механизма, червячного редуктора и соединительной муфты. Регулирование производительности насоса осуществляется частотой колебаний мембран.

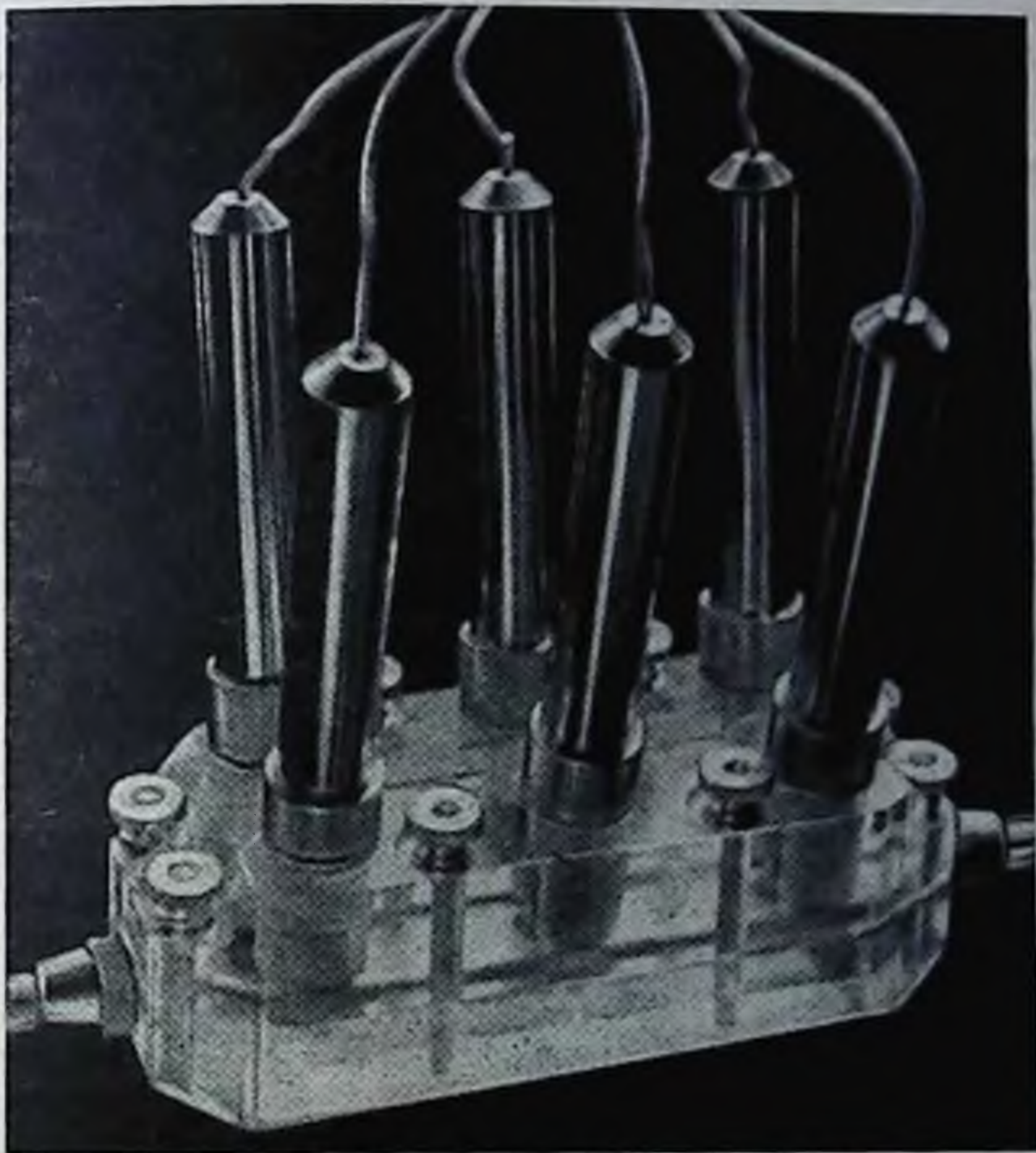


Рис. 71. Контур датчиков установки «Гомеостат-1» ИФ СО АН СССР.

Для сглаживания пульсаций высокой амплитуды нами применено демпферное устройство, совмещенное с датчиками давления и улавливателем пузырей (рис. 69, 70). Измерение и регулирование давления перфузата в системе искусственного кровообращения производится с помощью датчика трансформаторного типа. Прибором для измерения, регистрации и регулирования служит электронный самописец ПСР1-10. При этом в случае падения давления, которое может возникнуть в результате разрыва магистрали, включается аварийный сигнал. В случае сильного повышения давления, влекущего за собой аварийную ситуацию, регулятор приостанавливает работу искусственного сердца. Датчики контроля ряда физико-химических параметров расположены в контуре (рис. 71), включенном в систему циркуляции крови.

В наших исследованиях непрерывное измерение скорости кровотока не производилось, так как регуляция кровообращения осуществлялась в соответствии с экспериментальными задачами по величине артериального давления.

Следует отметить, что при выборе регуляции перфузии органов по артериальному давлению или скорости кровотока предпочтение следует отдавать регуляции по давлению, как наиболее отвечающей условиям регионарного кровотока (не нарушаются естественные вазоконстрикторные и дилаторные механизмы, кровообращение соответствует метаболическим потребностям тканей органа) (Кобради, Паролла, 1967).

8. Проблема объединения контуров регуляции и слежения по отдельным параметрам в систему

В организме контуры регуляций различных систем взаимосвязаны и согласованы. Эту взаимосвязь регуляций необходимо создавать и в искусственной гомеостатической системе (рис. 72—74). Слежение за уровнем рН перфузата и поддержание его в заданных пределах сопряжено с поддержанием заданного уровня P_{O_2} . Гомеостатизирование этих двух переменных объединяется в узел регенерации среды, в который, в случае содержания в перфузате эритроцитов, включается и регулирование HbO_2 (Самойлов и др., 1970, 1973).

Углекислота существенно влияет как на буферные свойства перфузата, так и на изменение сродства гемоглобина к кислороду, поэтому производится регулирование уровня углекислого газа: при его падении включается его добавочная подача в оксигенатор, а при возрастании выше допустимой нормы, вызванной изменением динамики перфузии или жизнедеятельности органа, подача углекислого газа автоматически прекращается. При этом его избыток уносится кислородом, воздухом или инертным газом, поступающим в оксигенатор.

При регулировании нескольких взаимосвязанных физико-химических параметров рН, P_{CO_2} , P_{O_2} , T° , HbO_2 отдельными контурами возникает взаимодействие между последними, влияющее на устойчивость как отдельных контуров, так и общей системы (Самойлов др., 1976). Так, при регулировании рН имеют большое значение уровень парциального давления углекислого газа. Поэтому один регулятор, стремясь привести к физиологической норме уровень P_{CO_2} , неизбежно будет изменять уровень концентрации ионов водорода, а величина рН повлияет на диссоциацию оксигемоглобина и через нее на концентрацию кислорода в перфузате.

Температура перфузата оказывает влияние на все эти физико-химические процессы. Следовательно, изменение одних параметров среды является возмущающим воздействием при регулировании других. Поэтому при работе взаимосвязанных систем ре-

гулирования недостаточно настройки регуляторов изолированных контуров. Их одновременная независимая работа может ввести систему в колебательный режим. Следует отметить, что модели, учитывающей взаимодействие параметров между собой и с органами, ввиду ее сложности, пока нет, взаимодействие регулируемых параметров корректируется эмпирически.



Рис. 72. Установка для управляемого культивирования изолированных органов «Гомеостат-1» ИФ СО АН СССР.

Адекватность перфузии определяет следующая группа основных параметров: 1) уровень артериального давления; 2) частота пульсации; 3) амплитуда пульсации; 4) скорость кровотока; 5) объем перфузата; 6) периферическое сопротивление. Оценка жизнеспособности тканей по скорости потребления кислорода и импедансу, характеризующему в определенной степени мембранно-ионную проводимость, является пока наиболее удобным показателем состояния тканей, пригодным для дискретного автоматического контроля. Регулирующее воздействие на эти показатели может быть осуществлено изменением скорости кровотока и артериального давления.

Увеличение веса органа и соответствующего уменьшения объема перфузата вследствие задержки жидкости в тканях органа может быть признаком нарушения адекватности перфузии и жизне-

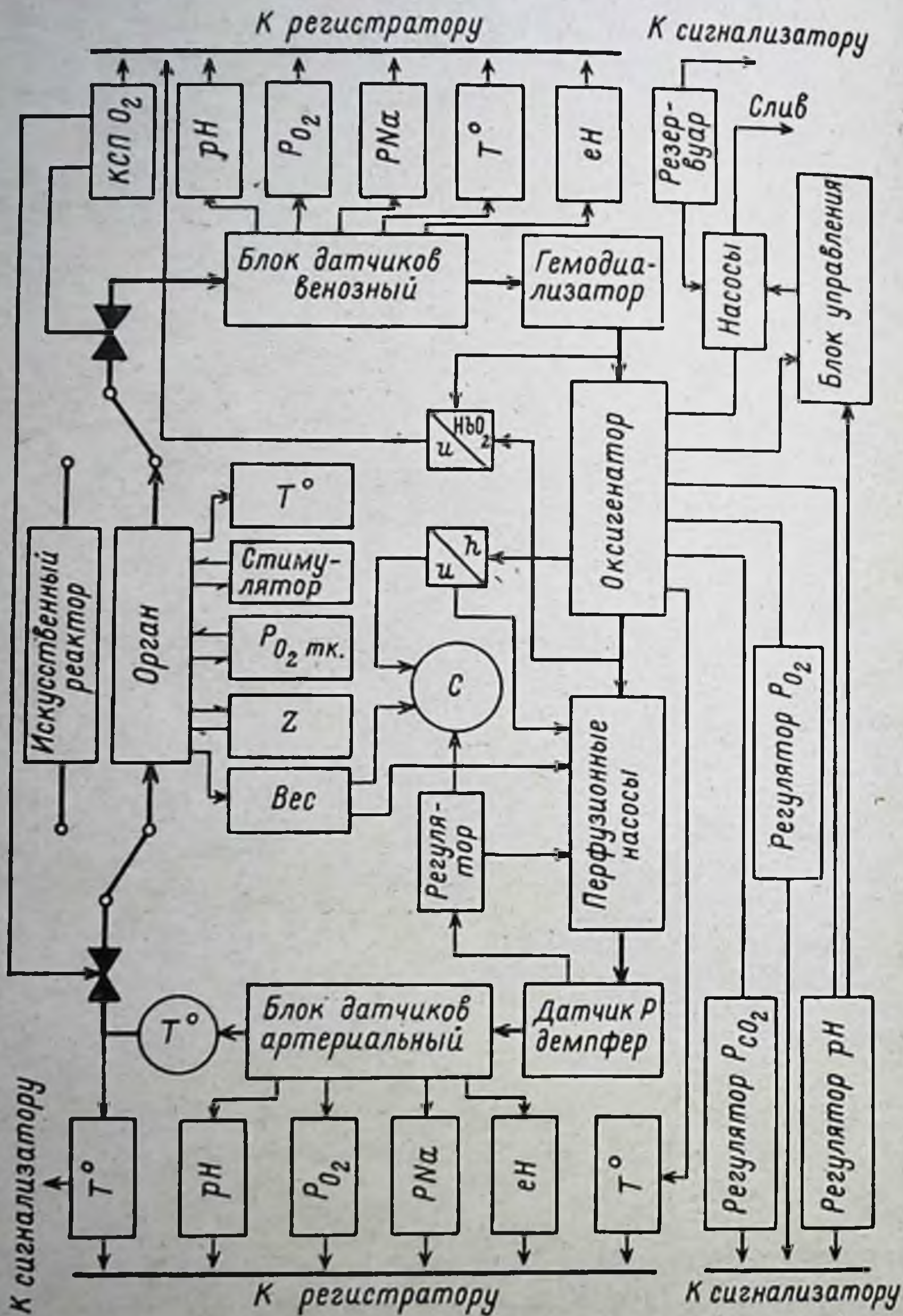


Рис. 73. Блок-схема установки для управляемого культивирования изолированных органов.

$И$ — напряжение; h — высота столба перфузии.

деятельности органа. Система слежения за весом органа или объемом перфузата в случае появления признаков отека автоматически снижает артериальное давление и коррелирующую с ним скорость перфузии. Предусмотрена также аварийная система,

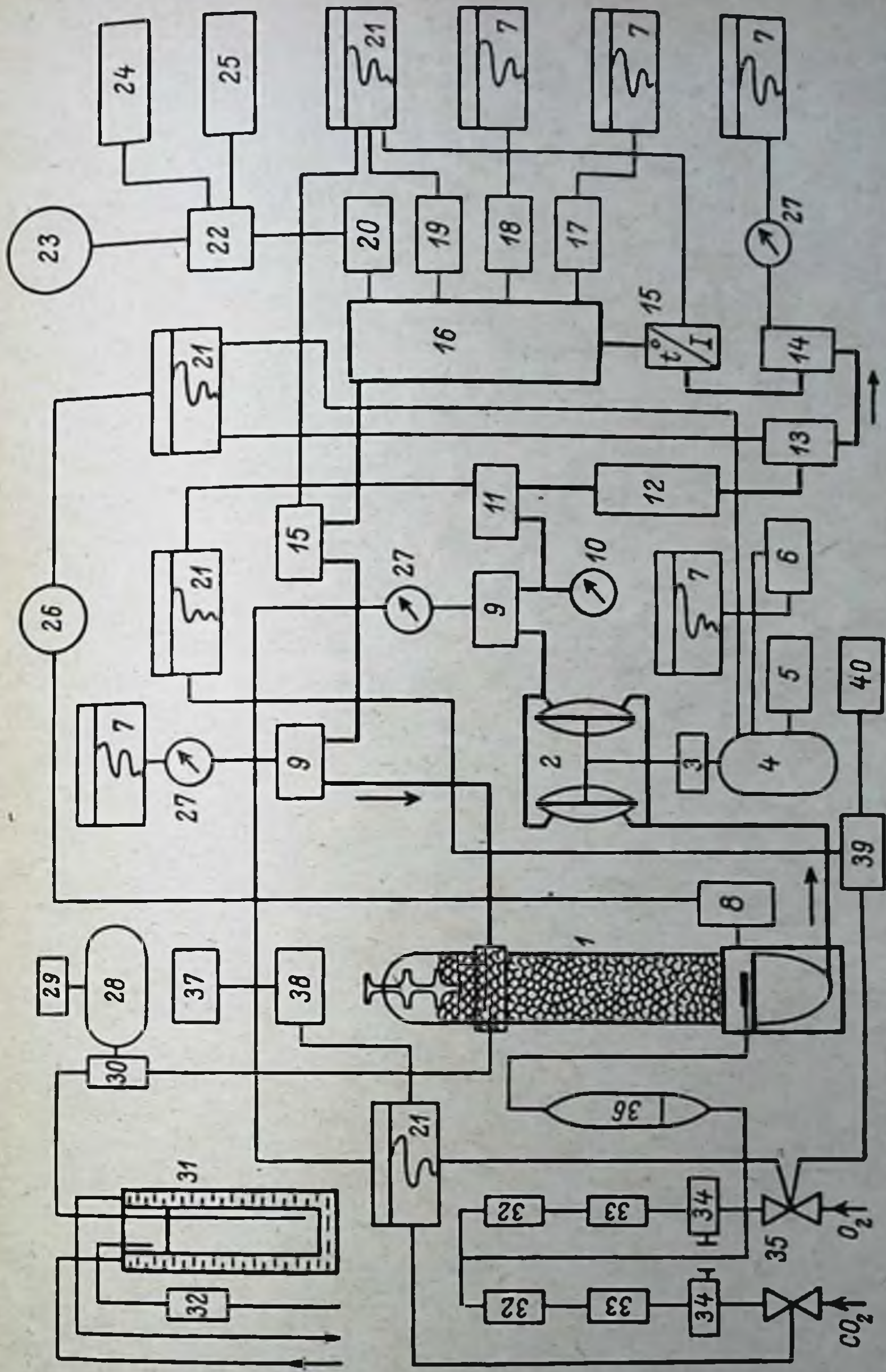


Рис. 74. Функциональная схема установки для управления изолированных органов (по: Нефёдов и др., 1971).

1 — оксигенатор; 2 — мембранный насос; 3 — редуктор; 4 — электродвигатель; 5 — регулируемый источник питания электродвигателя; 6 — датчик скорости вращения электродвигателя; 7 — регистратор; 8 — датчик уровня перфузата в оксигенаторе; 9 — датчик рН перфузата; 10 — датчик PO_2 перфузата; 11 — датчик PO_2 перфузата; 12 — теплообменник; 13 — датчик давления в системе искусственного кровообращения; 14 — датчик HbO_2 ; 15 — датчик температуры перфузата; 16 — культивируемый орган; 17 — датчик PO_2 костного мозга; 18 — датчик PO_2 мышцы органа; 19 — датчик температуры мышцы органа; 20 — датчик импеданса мышц органа; 21 — регистратор-регулятор; 22 — измерительный мост; 23 — осциллограф; 24 — генератор 1 МГц; 25 — генератор 10 кГц; 26 — сигналлизатор; 27 — усилитель с указателем; 28 — электродвигатель; 29 — программное устройство; 30 — насос; 31 — регенератор перфузата; 32 — ватный фильтр; 33 — угольный фильтр; 34 — ротамер; 35 — электромагнитный клапан; 36 — увлажнитель газа; 37—40 — реле времени.

подающая сигнал остановки перфузии, если отек продолжает нарастать.

Регуляция температуры для осуществления как нормо-, так и гипотермической перфузии является автономной. Температурное поле органа наряду с распределением P_{O_2} и реографией может служить характеристикой адекватности кровоснабжения органа.

Слежение за потенциалом eH , являющимся интегральной характеристикой окислительно-восстановительных свойств системы, и гомеостазирование по этому показателю осуществляется через обратную связь регенератором перфузата.

Таким образом, система контроля и управления среды в описываемой установке образуют ряд контуров регуляции и две крупные подсистемы: подсистему регенерации перфузата по физико-химическим параметрам и подсистему поддержания гемодинамики перфузируемого органа в соответствии с состоянием его тканей.

МЕТОДИКА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ ОРГАНОВ

Раздел 1. МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ С КУЛЬТИВИРУЕМЫМИ ИЗОЛИРОВАННЫМИ ОРГАНАМИ

Выбор и подготовка животных. Для создания перфузионных культур изолированных органов млекопитающих в качестве доноров могут быть использованы разные виды животных. Их выбор обуславливается задачами эксперимента и возможностями системы культивирования. Чаще всего для перфузий берутся органы собаки, которая благодаря своей анатомо-физиологической близости к организму человека является наиболее распространенным видом экспериментального животного в физиологии.

Когда возникает потребность уменьшить вес перфузируемых органов и объем питательной среды, используют более мелких животных — кошек, крыс, кроликов, морских свинок. Большие возможности изучения специфических особенностей метаболизма представляет перфузия человеческих органов, удаленных во время операций или взятых из трупа.

Опишем практическую методику культивирования органов, сложившуюся в нашей лаборатории в ходе многих повторных экспериментов.

Исследования проводились на беспородных собаках (самцах) весом 15—20 кг в возрасте 2—3 лет. Следует подчеркнуть важность тщательного подбора животных, методика которого подробно описана в специальных руководствах (Ковалевский, 1958; Лопухин, 1971, и др.). Имеет значение пол, возраст, время года и состояние здоровья животного. Оно определяется как по внешним признакам — степени упитанности и виду шерсти, которая у здоровой собаки должна быть гладкой и блестящей, так и по клиническим показателям — температуре, частоте дыхания и пульса, анализам крови: содержанию лейкоцитов, эритроцитов, ретикулоцитов и гемоглобина. Животных перед опытом следует наблюдать в течение 6—10 дней. Накануне операции животных желательно не кормить для предотвращения осложнений во время наркоза — рвоты, регургитации.

Наркоз. Обезболивание экспериментальных животных достигается теми же методами, что и в клинической хирургии. Ингаляционный наркоз переносится животными тяжелее, чем внутривен-

ний, в связи с большим расходом энергии на дыхательные движения и напряжение мускулатуры. Нами использовался как внутривенный, так и ингаляционный наркоз. Как принято в экспериментальной хирургии (Лопухин, 1971), в качестве наркотических препаратов для внутривенного введения можно использовать барбитураты короткого действия: тиопентал натрия или гексенал. Половина требуемой дозы вводится в течение двух минут, что позволяет сократить до минимума продолжительность стадии возбуждения. После этого медленно вводится оставшая часть до достижения необходимой глубины наркоза. Дозу вводимого анестетика, предварительно рассчитанную по весу животного, следует уточнять по достигаемому эффекту. Ориентировочно доза тиопентала натрия для внутривенного введения составляет 25 мг на 1 кг веса (в 2%-м растворе), а гексенала — 15—18 мг на 1 кг веса (в 10%-м растворе). Тиопентал натрия и гексенал используют также для внутримышечного, внутрибрюшинного, внутриплеврального и внутрилегочного введения. Тиопентал натрия для внутрибрюшинного введения применяется в дозе 1.5 мл (2%-го раствора) на 1 кг веса, а для внутримышечного введения — 30—40 мг на 1 кг веса. Гексенал при внутрибрюшинном введении применяют в дозе 50—60 мг на 1 кг веса.

Хорошим наркотическим действием в эксперименте на животных обладает уретан, который в меньшей степени, чем другие наркотики, угнетает сосудодвигательный и дыхательный центры. Доза для внутривенного введения собакам, кошкам и кроликам составляет 0.7—1 г/кг, для внутримышечного и внутрибрюшинного введения собакам и кошкам — 1—1.2 г/кг, кроликам — 0.6—1 г/кг. Внутрибрюшинно или подкожно применяют этаминалнатрий (нембутал), который вводят в дозах 40—60 мг/кг в 5%-м растворе. Если наркоз в течение 10—15 мин. не наступит, то добавляют еще четверть дозы. Хлоралоза не меняет уровня сахара в крови и обладает эффективным снотворным действием. Собакам и другим лабораторным животным ее вводят растворенную в теплом физиологическом растворе — 100—120 мг/кг. Доза 150 мг/кг уже токсична.

Нами с хорошим результатом применялся также алкогольный наркоз. Внутривенно капельно вводился препарат, состоящий из 96°-го этилового спирта (30%), раствора Рингера (30%) и раствора глюкозы (40%). Этот наркоз позволял поддерживать сон у животных в течение 10 час., как при спонтанном дыхании, так и при управляемой легочной вентиляции. Управляемое эндотрахеальное дыхание осуществлялось с применением листенона — релаксанта деполяризующего действия в дозе 1.4—1.7 мг/кг. Достигаемое при этом полное расслабление всей скелетной мускулатуры длится недолго — 5—20 мин. и требует повторного введения препарата. В некоторых случаях дозу препарата приходится увеличивать, так как она зависит от индивидуальной чувствительности животного.

Введение интубационной трубки в трахею собаки осуществляется с помощью ларингоскопа при положении животного на спине. Рот животного широко раскрывается и язык подтягивается вперед. При освещении лампочкой ларингоскопа виден надгортанник, который захватывается концом клинка и приподнимается вместе с корнем языка. При этом становится видна голосовая щель. В трахею вводится эндотрахеальная трубка, которую подсоединяют к наркозному аппарату. В качестве простого аппарата для управляемой вентиляции, а также и для ингаляционного эфирного наркоза по открытому контуру, может быть использован мешок Амбу.

Поскольку действие листенона длится 10—15 мин., за это время животному должно быть введено достаточное количество наркотической смеси или эфира. Если же нет необходимости в продолжении искусственной вентиляции легких, животное может быть переведено на самостоятельное дыхание. Если требуется поддерживать состояние обездвиживаемости животного при сравнительно неглубоком наркозе, этого можно достичь повторными введениями (через 10—15 мин.) релаксанта. Надобность в повторном введении релаксанта определяется по появлению подергивания мышц конечностей и признаком дыхательных движений мышц живота и грудной клетки.

Техника операций. Оперативная техника выделения и изоляции органов для перфузии принципиально не отличается от техники, применяемой при трансплантации органов. Она подробно излагается в специальных руководствах (Лопухин, 1971; Кирпатровский, Семенова, 1972, и др.). Анатомотопографические особенности строения лабораторных животных описаны Б. М. Хромым с сотр. (1972).

Для внутривенных введений и взятия крови у собак используется латеральная подкожная вена голени задней конечности. Если во время операции необходимо срочное внутривенное введение (например, доза анестезирующего вещества оказывается недостаточной), используется подъязычная вена.

Доступ к бедренной артерии при взятии крови, необходимой для приготовления перфузата, производится ниже пупартовой связки в области скарповского треугольника на границе верхней и средней трети бедра. Разрез начинается ниже пупартовой связки и идет параллельно внутреннему краю *m. sartorii*, пересекается последовательно: 1) кожа, 2) подкожная клетчатка, 3) *fascia superficialis*, 4) влагалище *m. sartorii*, чтобы ясно видеть ход его волокон, после этого мышца оттягивается латерально и обнажается, 5) плотная *fascia lata*, которая также осторожно пересекается. Под ней лежит артерия, позади нее — вена, а над ней и сбоку — *n. safenus* и его ветвь. Под бедренную артерию подводятся лигатуры и после надреза стенки артерии в нее вводится в центральном направлении полиэтиленовая канюля с катетером, через который производится взятие крови и в случае необходимости — переливание кровезаменяющей жидкости.

Операция выделения грудины. Операция впервые описана В. П. Демиховым и Ю. М. Зарецкой (1961). Нами применяется модификация этой операции (Нефедов и др., 1971) (рис. 75). Кожный разрез производится по средней линии грудной клетки от яремной вырезки до мечевидного отростка. Отпрепаровываются в обе стороны от разреза кожные лоскуты с подкожной клетчаткой. Попутно производится гемостаз наложением кровоостанавливающих зажимов. Мышцы брюшной стенки рассекаются поперечным разрезом под мечевидным отростком в обе стороны до узлов реберных дуг с наложением зажимов. Производится поперечный разрез диафрагмы параллельно грудины. Ребра пересекаются с обеих сторон в местах перехода костных частей в реберные хрящи (*cartilago costalis*), соединенные с грудиной. Грудина оттягивается кверху, открывая полость грудной клетки. При этом хорошо видны питающие грудину две верхние грудные артерии (*aa. mammae interna*) и две вены, сливающиеся в одну — центральную. Как можно дальше от грудины артерии пережимаются кровоостанавливающими зажимами и перерезаются. Также перерезается и вена. После перерезки грудино-ключичного сочленения выделяется рукоятка грудины (*manubrium sterni*). Полностью грудина вычленяется после канюлирования внутренних грудных артерий и прошивания межреберных мышц (для предотвращения утечки перфузата через анастомозы внутренних грудных артерий с межреберными). Выделенный препарат промывается при помощи 100- или 50-миллилитрового шприца пульсирующим потоком раствора Рингера, подогретого до 35—38° С, и через артериальную магистраль подключается к аппарату для культивирования органа (рис. 76).

Операция выделения конечности. Выделение задней конечности собаки производится путем экзартикуляции в тазобедренном суставе (рис. 77). Первоначально выделяется *a. et v. femoralis* в скарповском треугольнике. Под сосуды подводятся лигатуры, но не перевязываются, чтобы сохранить кровоток до полного выделения конечности. Для проведения экзартикуляции в области тазобедренного сустава хороший доступ дает способ Кохера. Производится дугообразный разрез, огибающий большой вертел выпуклостью кпереди. Разрез начинается у основания большого вертела, направляется к верхушке и загибается кверху по направлению к волокнам большой ягодичной мышцы, проникая через кожу и подкожную клетчатку. Поскольку при выделении конечности для перфузии животное-донор не сохраняется, тактика операции направлена на быстрое выделение органа. Тем не менее необходимо проводить по ходу операции временный гемостаз путем наложения кровоостанавливающих зажимов, чтобы избежать массивного кровотечения до окончания операции. Рассечением подлежащих мышечных слоев обеспечивается подход к тазобедренному суставу. Проникнув скальпелем в полость тазобедренного сустава, пересекают *lig. teres* свадии

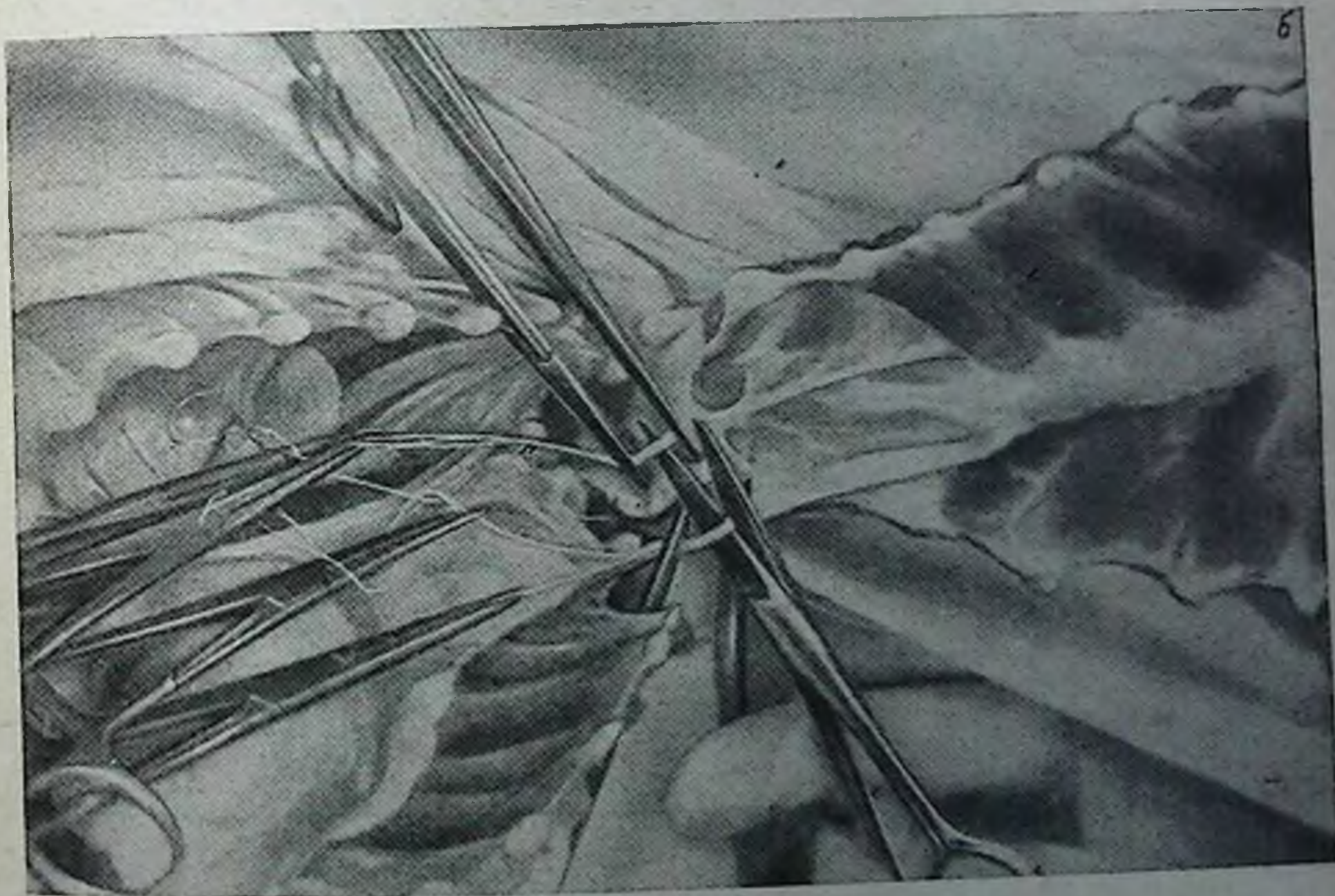


Рис. 75. Этапы операции выделения грудины собаки.
 а — грудная клетка вскрыта, грудина частично выделена, обнажен доступ к кровоснабжающим ее сосудам; б — грудина выделена полностью; кровоснабжающие ее сосуды пересекаются.

и снизу, бедро при этом сильно приводят, ротируют кнутри и сгибают. После перерезки *lig. teres* головка бедра легко вывихивается из *fossa acetabuli*; перерезается медиальная группа мышц

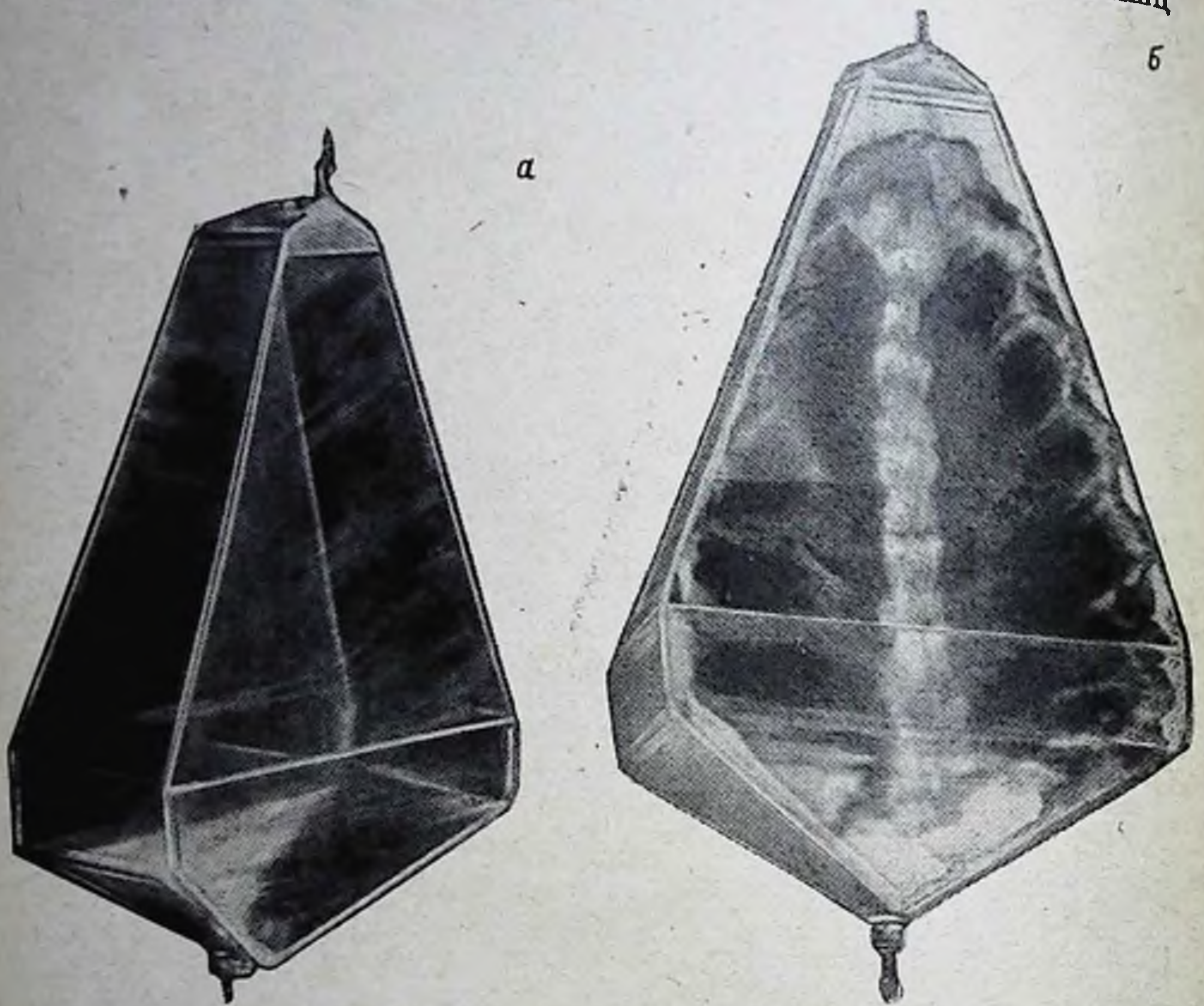


Рис. 76. Камера для перфузии изолированной грудины.

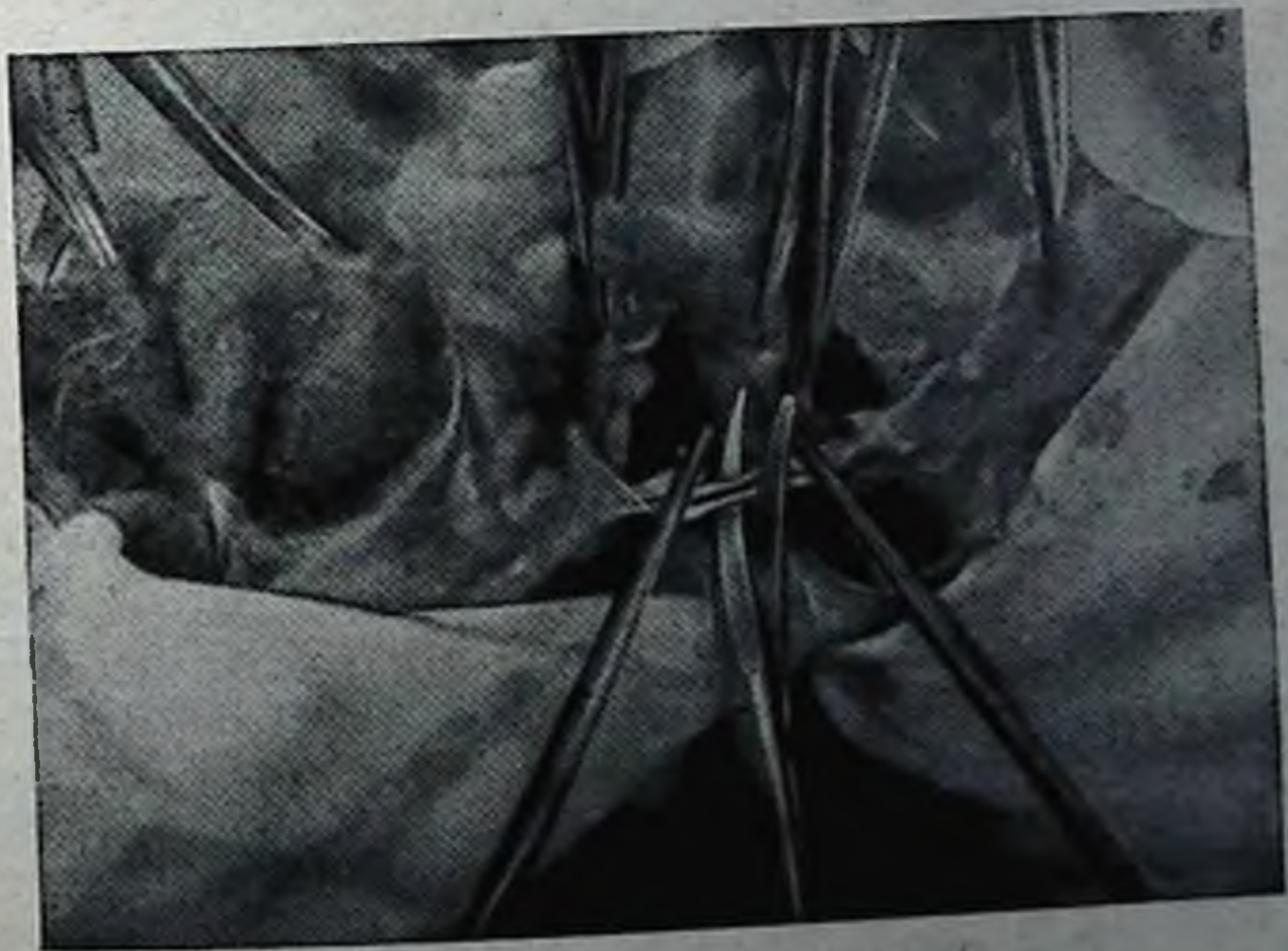
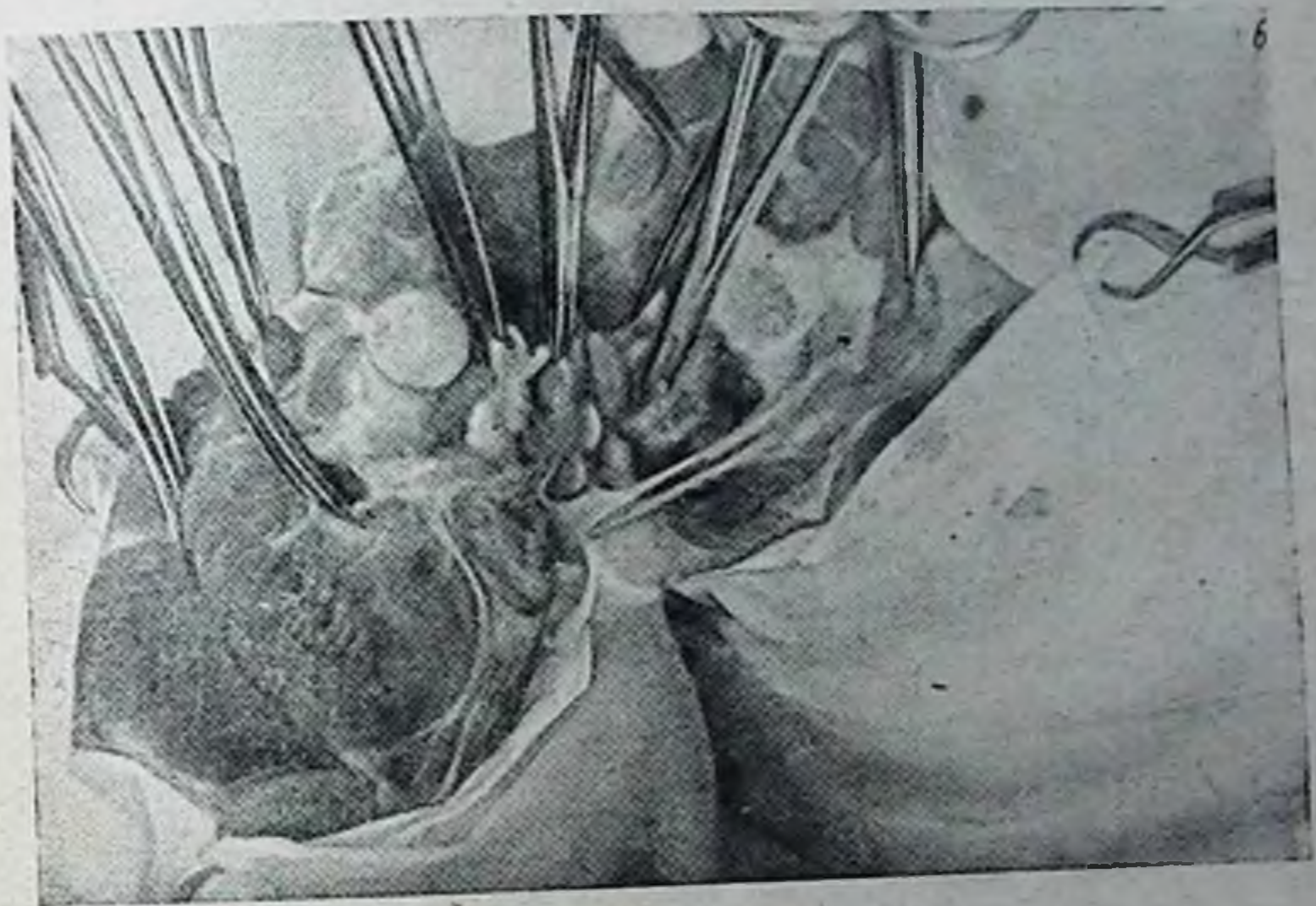
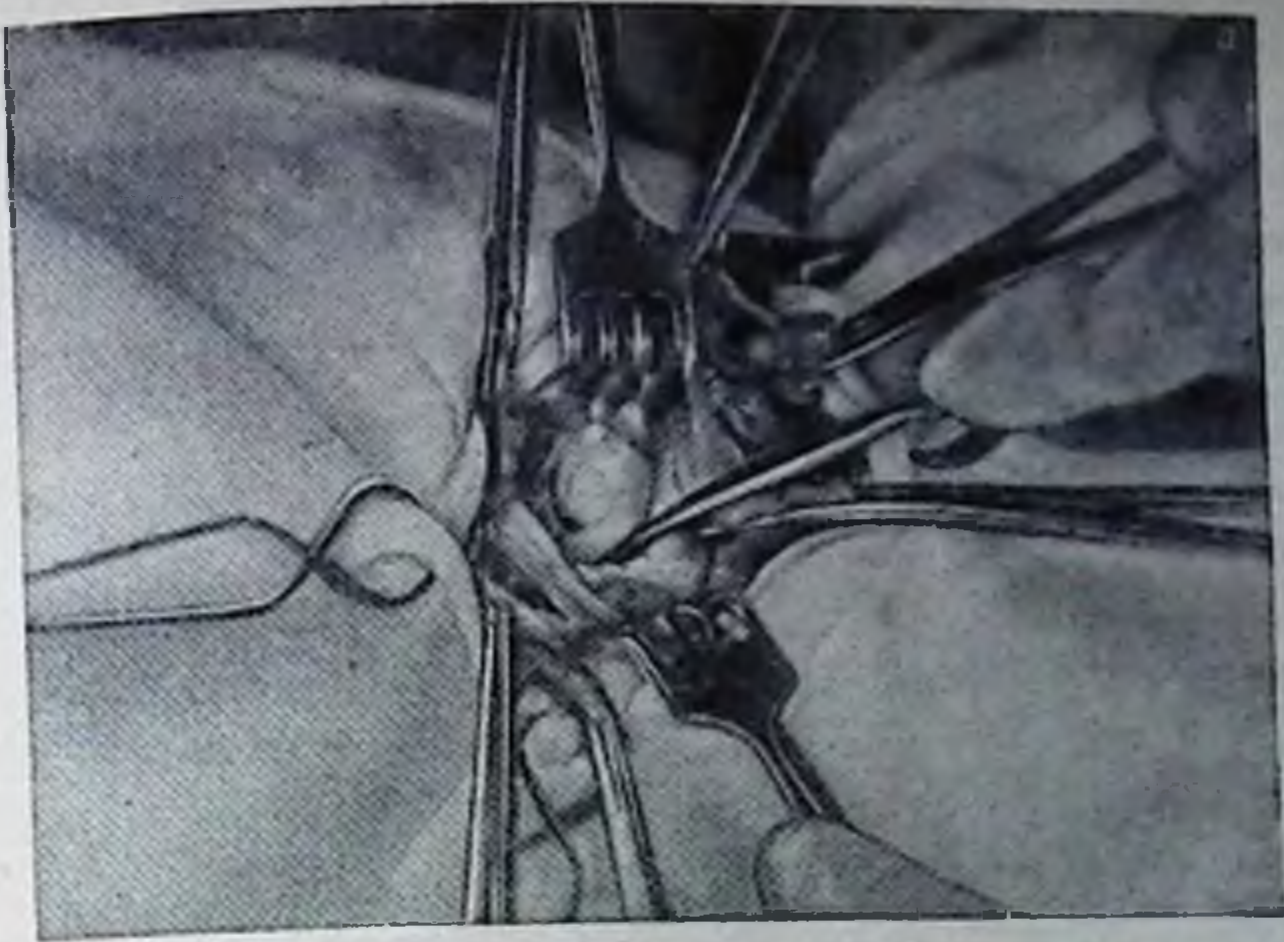
a — пустая; *б* — с грудиной.

бедра. Конечность остается соединенной с туловищем только сосудами. На них накладываются зажимы, между которыми сосуды пересекаются. Затем производится канюлирование сосудов полиэтиленовыми канюлями. Изолированный орган промывается подогретым раствором Рингера и подсоединяется к артериальной магистрали аппарата культивирования (рис. 78).

Выделение передней конечности для перфузии производится вместе с лопаткой и начинается также с выделения подмышечного сосудисто-нервного пучка.

Рис. 77. Этапы операции выделения задней конечности собаки путем экзартикуляции в тазобедренном суставе.

a — подход к головке бедра и пересечение круглой связки; *б* — конечность полностью выделена и соединяется с организмом только через бедренную артерию и вену; *в* — пересечение бедренной артерии и вены — заключительный момент операции.



Операция выделения печени, почки и селезенки. Поскольку почка и печень как паренхиматозные органы очень чувствительны к гипоксии, выделение их необходимо производить наиболее коротким путем, стремясь предельно сократить разрыв между прекращением естественного и началом искусственного кровообращения. Выделение печени производится путем тораколапаротомии (рис. 79). Продольный разрез стенки брюшной полости по средней линии дополняется поперечным в области правого

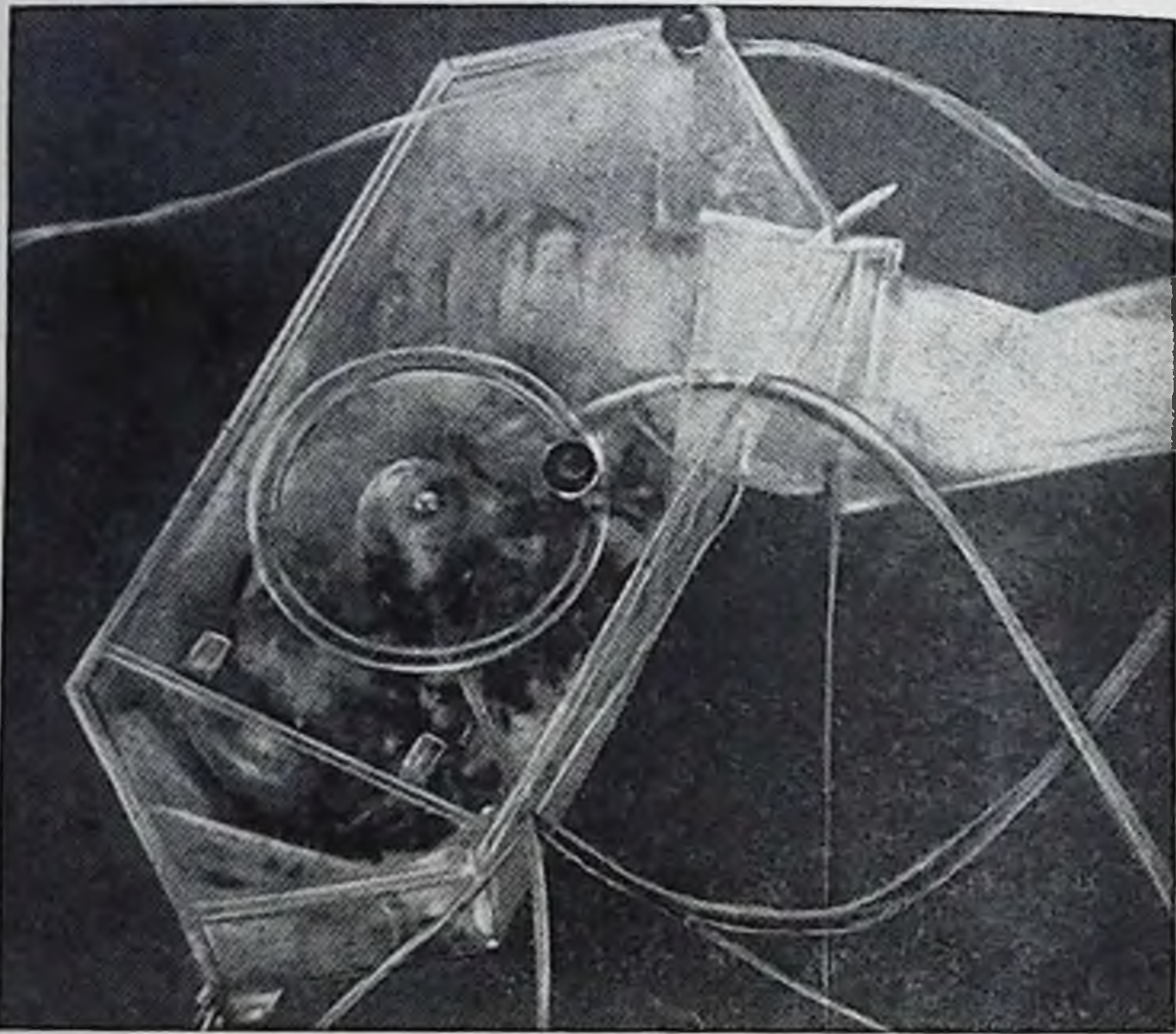


Рис. 78. Камера для перфузии с изолированной конечностью собаки.

подреберья. Отпрепаровываются и подводятся лигатуры без перекрытия кровотока под надпочечный участок нижней полой вены, печеночную артерию, воротную вену и общий желчный участок. Затем производится рассечение ребер нижней и средней трети правой половины грудной клетки по сосковой линии. Подводится лигатура под грудной отдел нижней полой вены. После рассечения диафрагмы выделяется печень. На все лигированные сосуды накладываются зажимы, между которыми они пересекаются. После выделения органа канюлируется воротная вена, печеночная артерия и грудной отдел нижней полой вены. Надпочечная часть нижней полой вены перевязывается. Желчный пузырь удаляется. Через канюли воротной вены и печеночной артерии печень промывается раствором Рингера ($35-38^{\circ}\text{C}$) и подключается к аппарату (рис. 80).

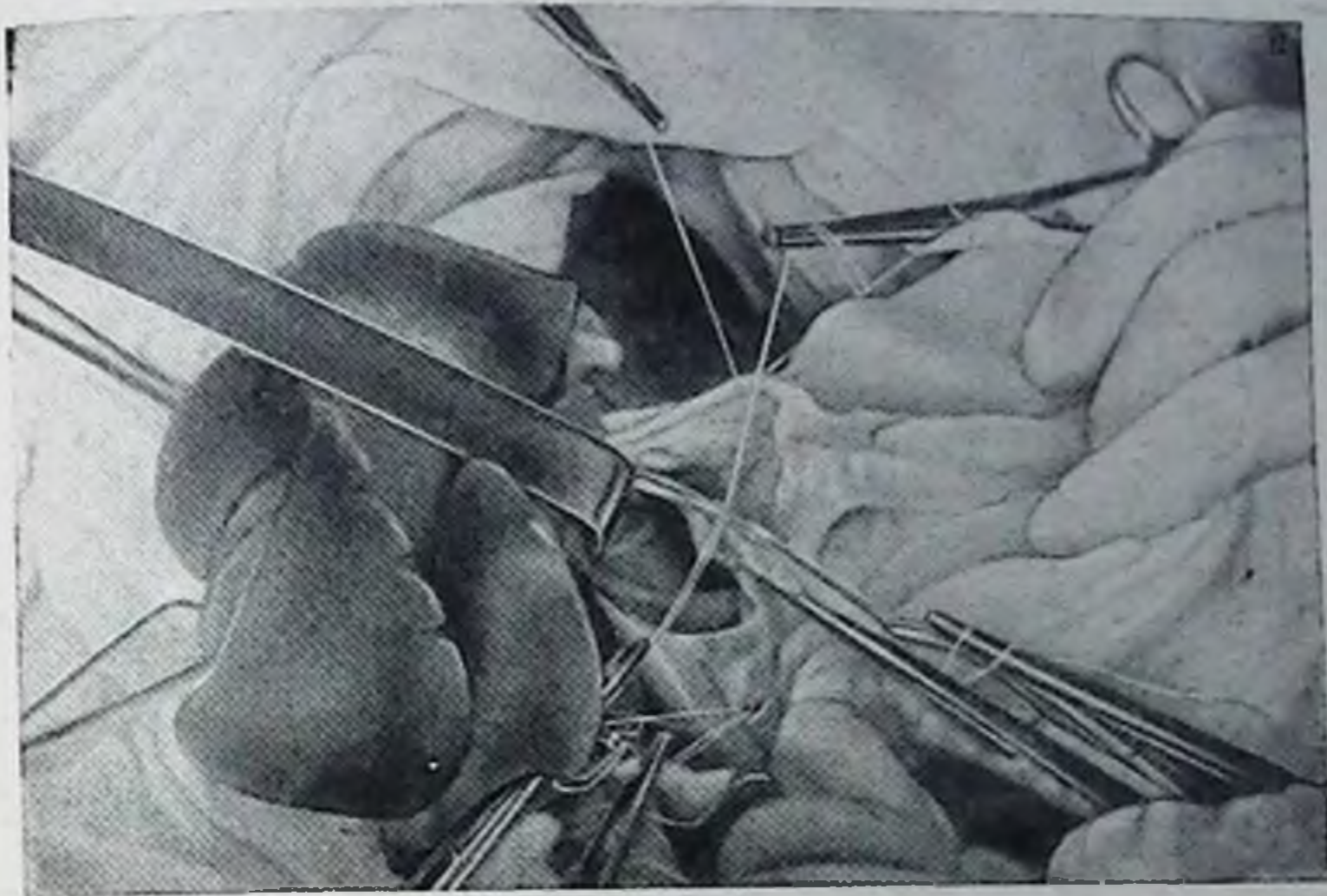


Рис. 79. Этапы операции выделения печени собаки.

а — печень выделяется через торакоабдоминальный подход, видны взятые на лигатуры печеночная артерия и воротная вена; *б* — пересечение сосудов, кровоснабжающих печень, — заключительный момент операции.

Выделение почки производится трансабдоминально посредством срединной лапоротомии и дополнительного поперечного разреза брюшной стенки в средней трети вправо или влево в зависимости от выделяемой почки (рис. 81). После отведения кв-

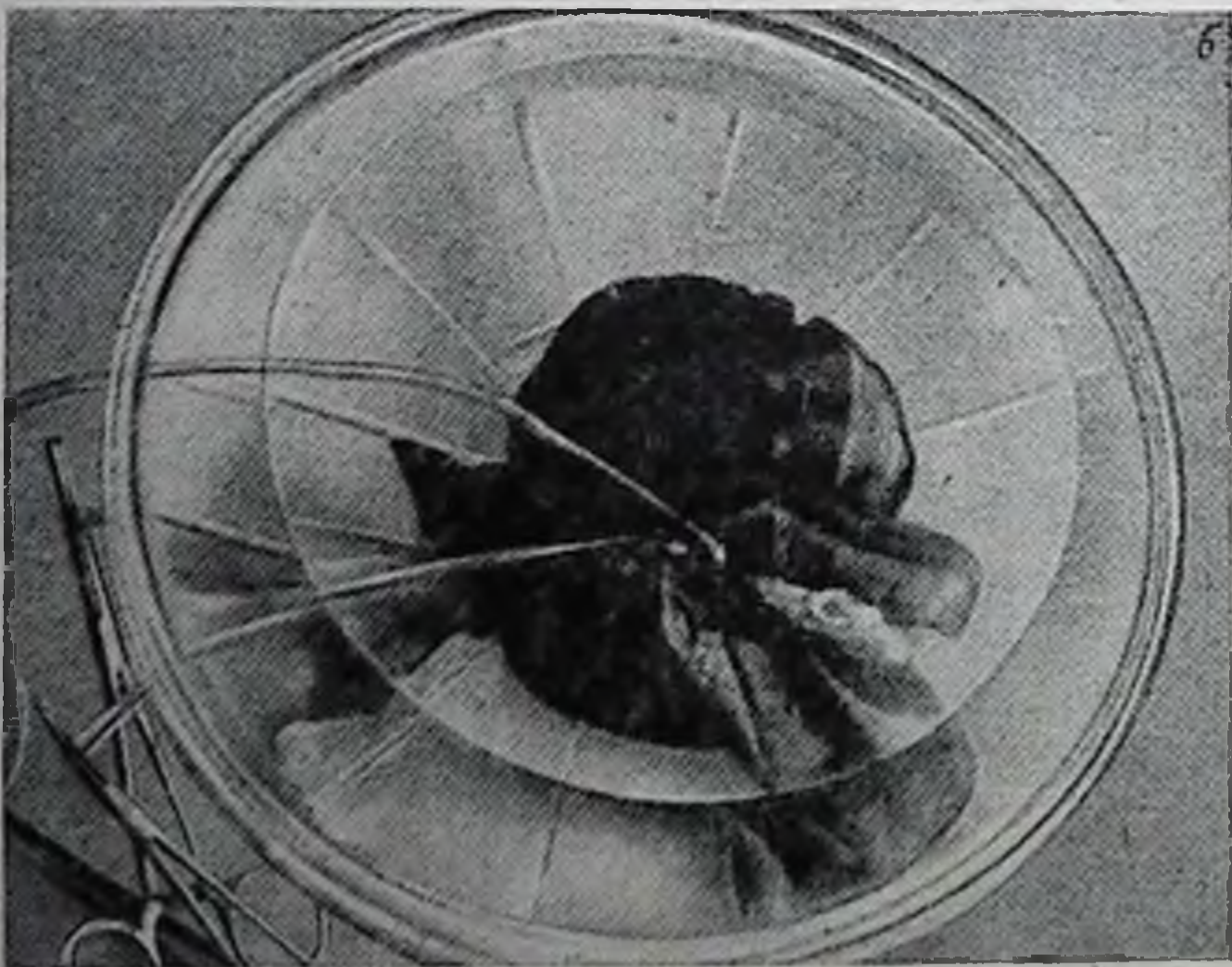
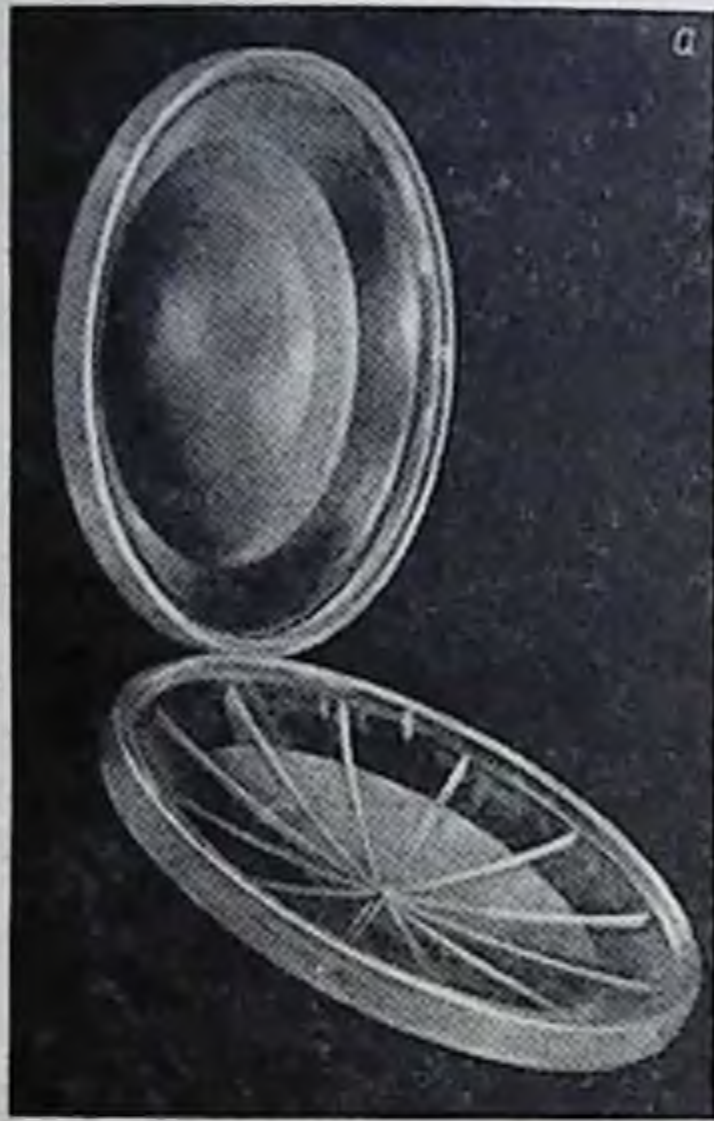


Рис. 80. Камера для перфузии изолированной печени.
а — пустая; б — с печенью.

печных петель в сторону открывается подход к расположенной ретроперитонеально почке и ее сосудам. Вслед за вскрытием париетального листка брюшины почка тупым путем выделяется из окружающей ее клетчатки. На почечную артерию и вену как

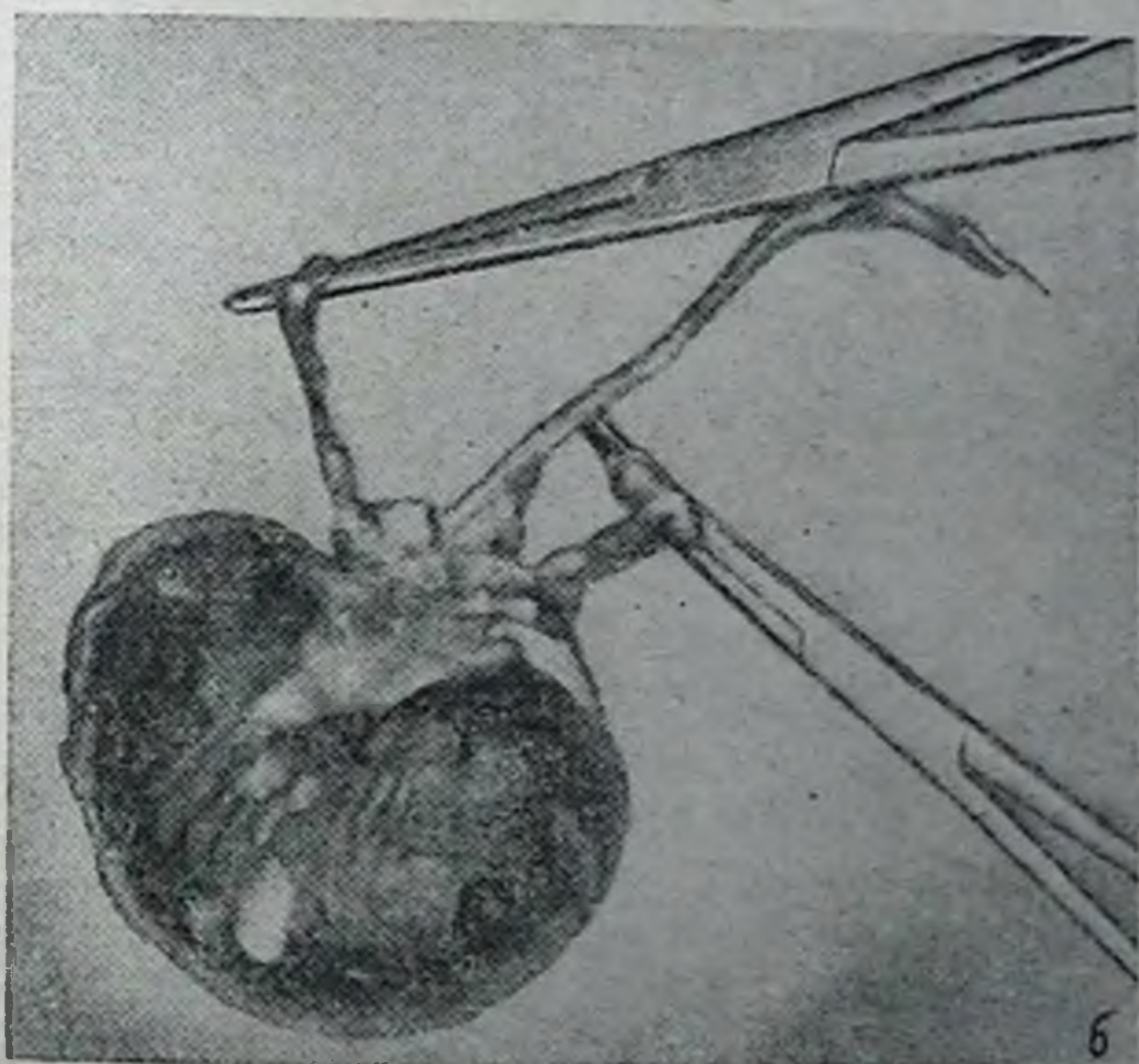
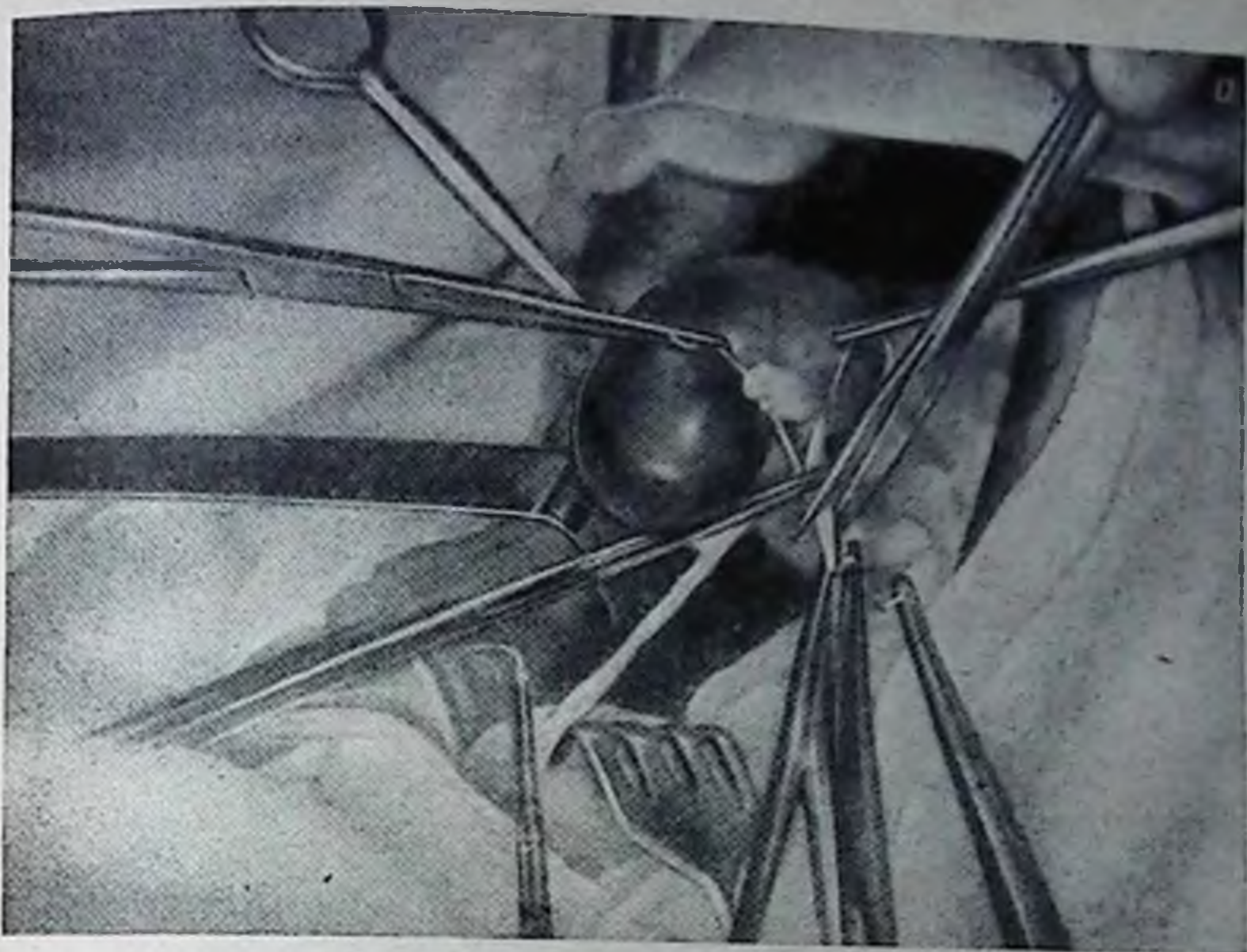


Рис. 81. Этап операции выделения почки собаки.

а — почка выделяется трансабдоминальным путем (видны мочеточник и взятые на лигатуры сосуды почки, которые в этот момент пересекаются); б — почка, выделенная из организма (видны мочеточники и взятые на зажимы почечные артерии и вена).

можно дальше от ворот почки накладываются зажимы, между которыми сосуды пересекаются на расстоянии 7—8 см от почки. На мочеточник также накладывается зажим. В выделенной почке канюлируется почечная артерия, мочеточник и иногда вена. Почка промывается раствором Рингера — подключается к системе культивирования (рис. 82).

Спленэктомия производится операцией, описание которой дано Ю. М. Лопухиным (1971). Делается поперечный послойный разрез влево от средней линии параллельно реберному краю. Селезенку, расположенную по большой кривизне желудка, извлекают. Отпрепаровывается селезеночная артерия, под нее подводится лигатура. Селезеночная вена и дополнительные селезеночные артерии, если таковые имеются, лигируются и пересекаются. Затем приступают к отделению от селезенки желудочно-селезеночной связки. Как можно ближе к селезенке эту связку пересекают небольшими участками, на которые предварительно были наложены лигатуры. Канюлируется селезеночная артерия. Выделенную селезенку промывают раствором Рингера и подключают к системе культивирования (рис. 83).

При подключении к искусственному кровообращению все выделенные органы помещаются в специальные камеры из органического стекла, позволяющие предотвращать внешнее охлаждение органов, а также поддерживать влажность окружающего их воздуха. Перед помещением в камеры к органам подсоединяются датчики (электроды полярографии и импеданса).

1. Подготовка системы к перфузии. Методика запуска системы и обеспечение ее функционирования

Подготовка установки для перфузии органов начинается со сборки сначала по узлам, а затем в комплексе. После сборки системы искусственного кровообращения она проверяется на герметичность путем нагнетания воздуха до давления 250—300 мм рт. ст. и по манометру определяется скорость утечки воздуха из системы. Затем гемодинамическая часть системы стерилизуется. Стерилизация химическим путем надежно обеспечивается 10%-ным раствором пергидроля в течение 4—6 час. В качестве стерилизующих реагентов могут быть также использованы 5%-й раствор формалина в течение 1 часа, 70—96°-й спирт на 15—20 мин. или специальные препараты, например диацид и др. Газовая стерилизация окисью этилена с бромистым метилом в течение 4—6 час. является вполне надежной, но пары эти токсичны и быстро приводят к разрушению оксигенаторов из полиметил-метакрилатов, что ограничивает применение этого метода. Детали, дополнительный контакт которых с химическими стерилизующими реагентами нежелателен, стерилизуется облучением ультрафиолетовыми лучами в течение 30 мин. Затем система промывается стерильным физиологическим раствором.

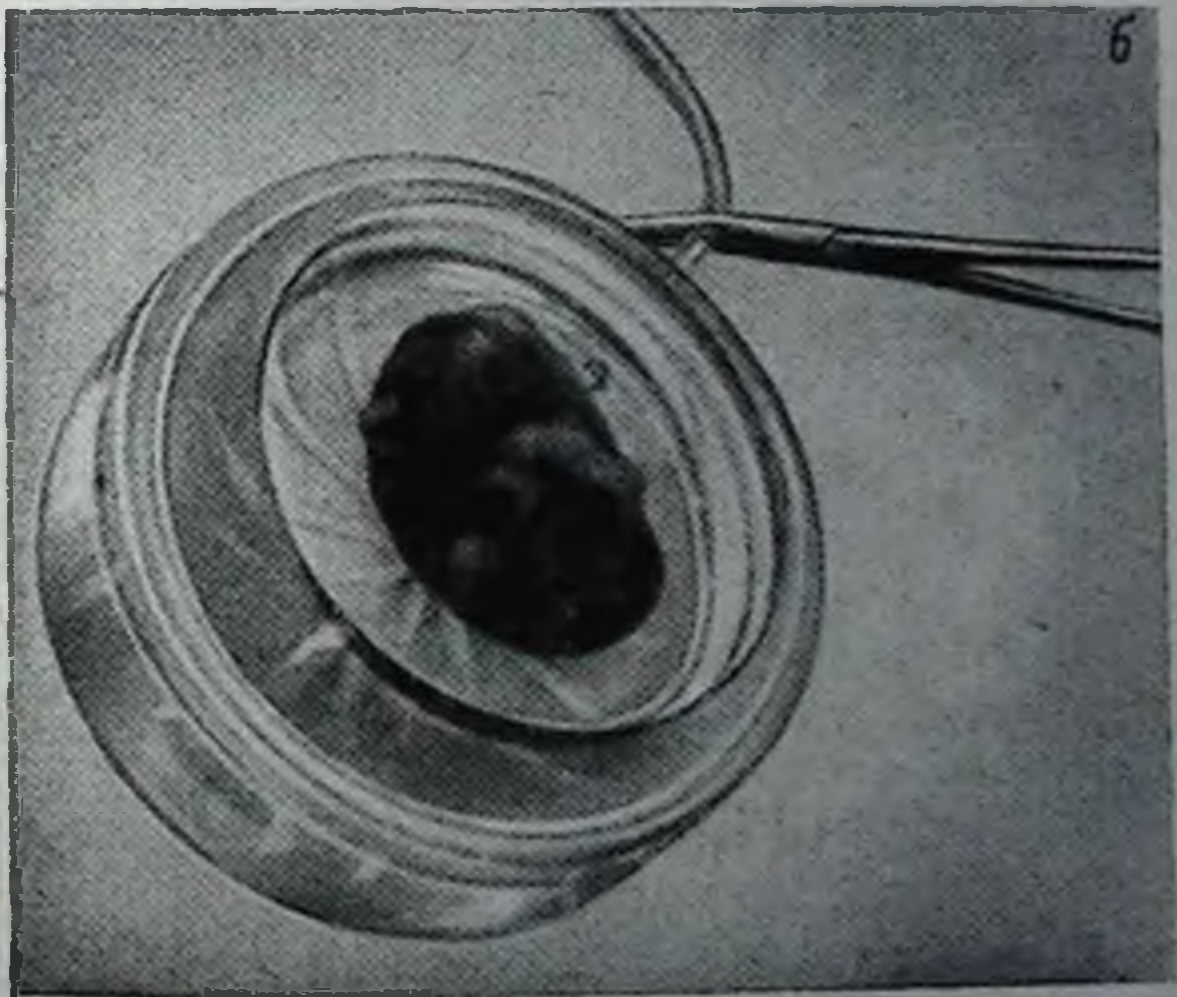
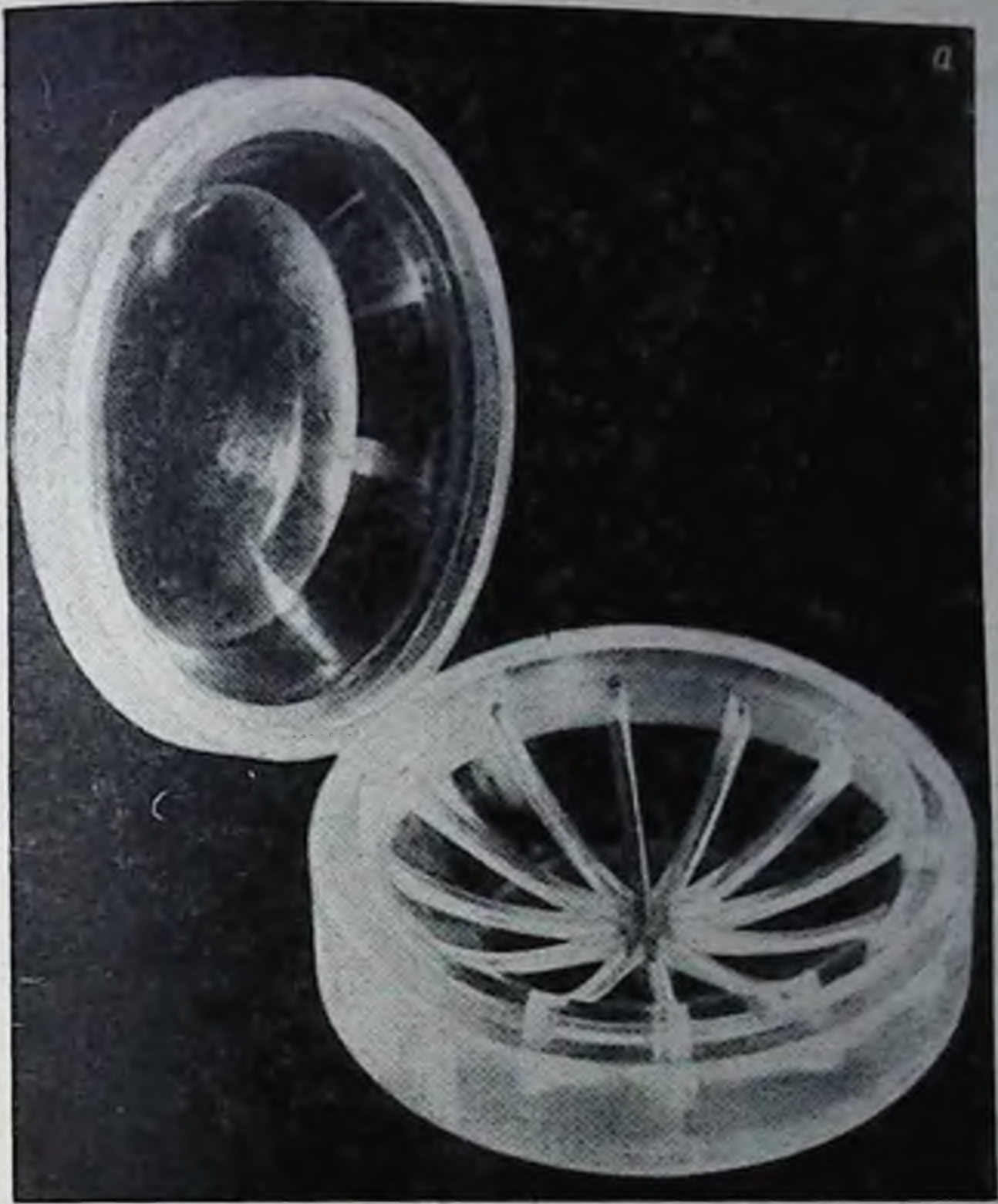


Рис. 82. Камера для перфузии изолированной почки.
а — пустая; б — с почкой.

Во время стерилизации системы искусственного кровообращения производится прогрев всей контрольно-измерительной аппаратуры для определения фоновых показателей датчиков.

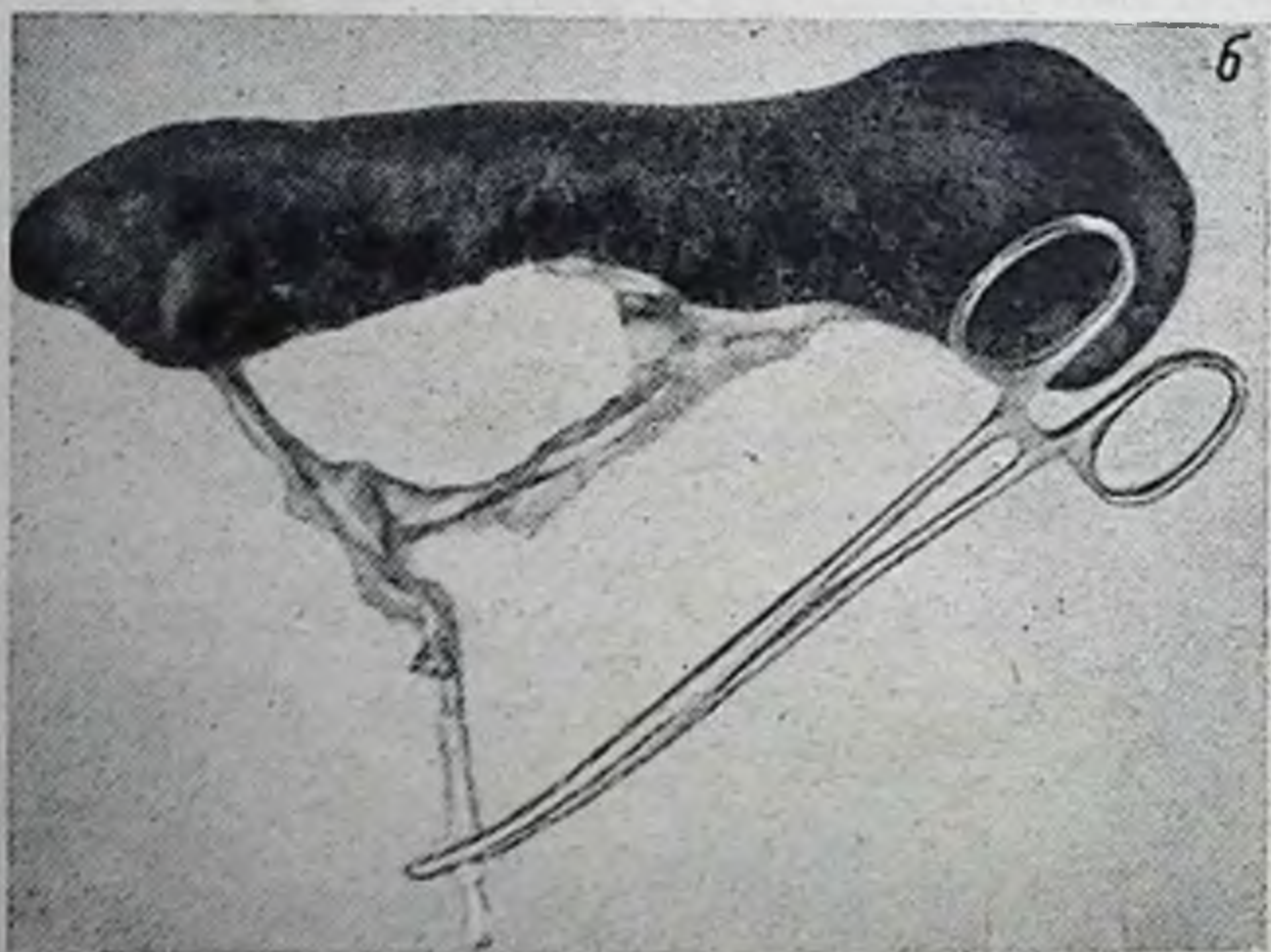
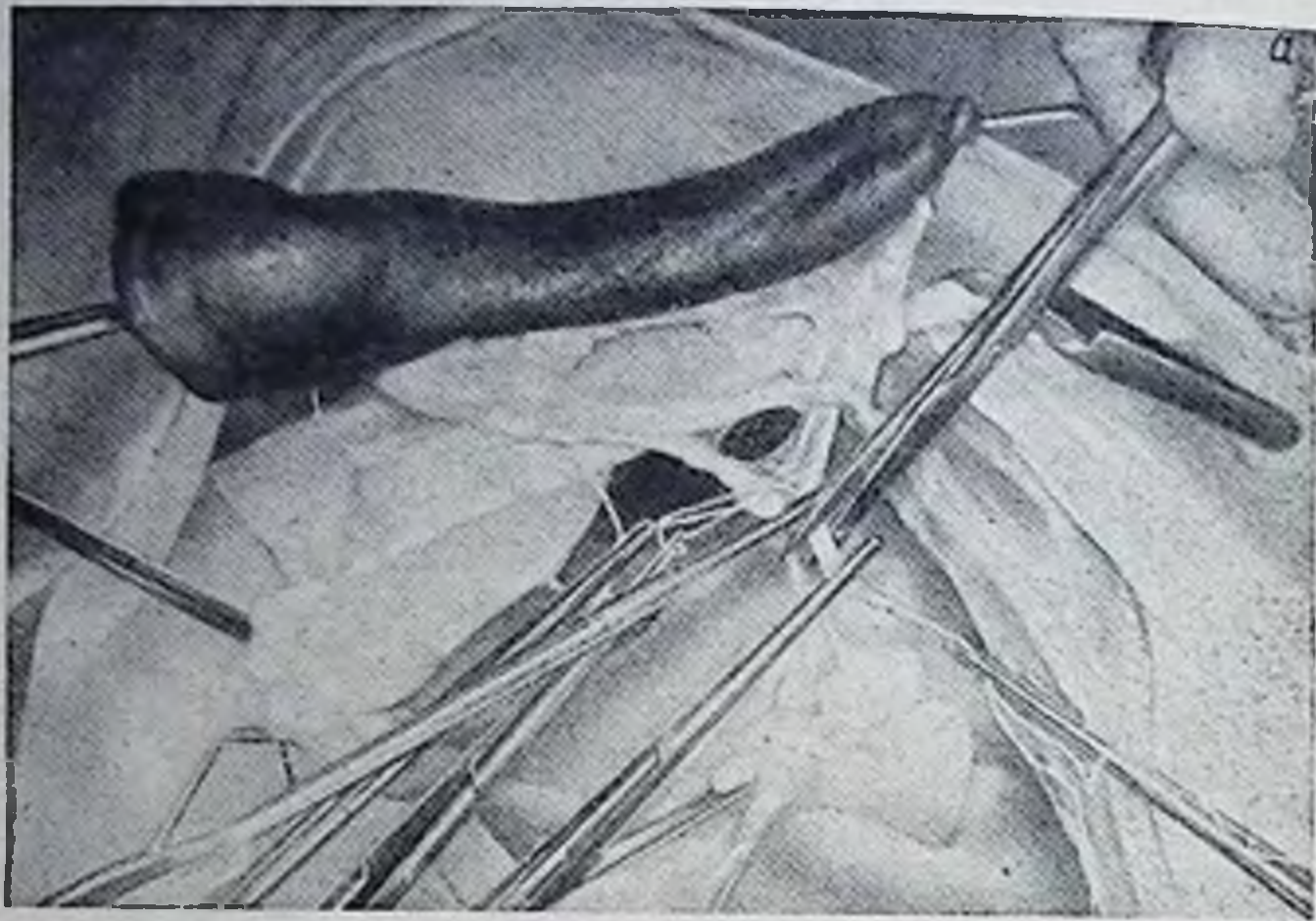


Рис. 83. Этап операции выделения селезенки собаки.

а — взята на лигатуру и пересекается селезеночная артерия;
б — селезенка выделена из организма, видна перекрытая кровоостанавливающим зажимом селезеночная артерия.

После двойной промывки стерильным физиологическим раствором в систему еще раз заливается стерильный физиологический раствор, в котором производится проверка датчиков. Затем этот раствор заменяют перфузатом, в котором окончательно проверяются датчики физико-химических параметров (рН, P_{CO_2} , P_{O_2} и др.) и устанавливаются их исходные режимы. При подключении к си-

стеме органа задается определенное артериальное давление с помощью регулятора ударного объема на артерио-венозном шунте.

Для обеспечения надежности при длительном многочасовом функционировании системы в установке должны быть предусмотрены блоки дублирования и резервирования для основных частей.

Организация сбора информации. Одни физико-химические параметры среды: рН, P_{O_2} , P_{CO_2} , P_{Na} артериальное давление, частота пульсации, вес органа, HbO_2 регистрируются непрерывно, автоматически на лентах самопишущих приборов. Другие измеряются дискретно, в пробах: щелочной резерв, вязкость, осмотическое и онкотическое давление. Также дискретно путем взятия проб производятся измерения некоторых биохимических показателей среды: содержание аминокислот, липидов, глюкозы, молочной кислоты, микро- и макроэлементов. До начала перфузии и после нее орган взвешивается. В течение перфузии изменение веса органа измеряется и регистрируется непрерывно. Автоматически регистрируется P_{O_2} тканей органа полярографическим методом путем введения в ткань открытых платиновых электродов (Эпштейн, 1968). КСП O_2 измеряется дискретно автоматически по заданной программе. Измерение импеданса тканей перфузируемого органа осуществляется с помощью специального блока и введенных в ткань электродов. После окончания перфузии ткани органов берутся для гистологического и биохимического исследования. Костный мозг извлекается из костей грудины или конечности компрессионным методом.

Р а з д е л 2. ЧАСТНЫЕ МЕТОДИКИ

1. Культура почки

Длительное время попытки добиться при перфузии изолированной почки ее функциональной диуретической активности были безуспешными. Широко применявшиеся для перфузии изолированных органов солевые растворы, например Рингера—Локка, оказались для почки непригодными. Перфузия почки дефибрированной кровью при помощи насоса или инфузионно почти невозможна, так как через почку в этом случае кровь протекает со скоростью не более нескольких миллилитров в 1 мин. Гепаринизированная кровь обладает сосудосуживающим действием, и даже при высоком давлении через почку проходит слишком мало крови. Эти известные факты объяснялись физиологами тем, что почки являются высокочувствительными органами и на неадекватные условия кровообращения реагируют анурией (Лопухин, 1971). Была сделана попытка применить для перфузии почек препарат Старлинга (Evans, 1914), которая также не привела к успеху.

Первые удачные опыты с перфузией почек принадлежат Старлингу и Вернею (Starling, Verney, 1924), в которых было установлено, что изолированные почки, изъятые из тела и лишенные нервных и гуморальных связей, при создании им необходимых условий могут сохраняться живыми и даже продуцировать в течение нескольких часов мочу. Согласно их данным, прежде всего необходимо не охладить почку ни до, ни после ее удаления из организма; кровь перед перфузией должна несколько раз пройти через легкие животного (при этом она за несколько минут теряет свои сосудосуживающие свойства). Так, в их опытах 1 л дефибрированной крови, взятой от другой собаки, пропускался через препарат Старлинга в течение 30 мин. до поступления в почку. Поддерживалось артериальное давление до 120 мм рт. ст. Скорость кровотока составляла около 400 мл/мин. При этих режимах почка через 10 мин. после начала перфузии начинала выделять мочу.

В настоящее время перфузия изолированной почки широко применяется как метод консервации в сочетании с гипотермией перед трансплантацией, а также для исследования физиологии этого органа и, наконец, в гематологических исследованиях, поскольку почка является основным местом выработки гуморального регулятора эритропоэза.

Для гипотермической перфузии почек применяются аппараты разной степени сложности, позволяющие консервировать почку в течение 24—72 час. перед трансплантацией. Здесь также очень важен подбор перфузата. Одна из лучших питательных сред — осажденная при низкой температуре и отфильтрованная плазма (Belzer et al., 1968a; Aschby, Belzer, 1968). Недостатком этой среды является высокое содержание в ней лабильного липопротеида (Horsburgh, 1973). Грундман с сотр. (Grundman et al., 1973) применил для перфузии почек раствор электролитов с альбумином, составленный Колстом с сотр. (Collste et al., 1971), получив жизнеспособные почки после 72 час. консервации. Широкое распространение для гипотермической перфузии нашли растворы, сходные по своему электролитному составу с внутриклеточной жидкостью (Wen Pen-Liu et al., 1971; Kauffman et al., 1973; Vargarakise et al., 1973).

Нормотермическая перфузия изолированной почки привлекла внимание исследователей в первую очередь для выяснения ее функциональной способности перед трансплантацией. Здесь изучение ведется главным образом по пути создания адекватной и длительной перфузии. Баркин с сотр. (Barkin et al., 1963) для увеличения адекватности перфузии предложил промывать почку перед началом искусственного кровообращения теплым физиологическим раствором и добавлять в перфузат глюкозу, что способствовало отдалению срока развития «блока циркуляции» и улучшало процессы обмена. Длительность их опытов при адекватной объемной скорости кровотока и удовлетворительном

функционировании органа составляла 3 часа. Сохранить жизнеспособность почек 2—16 час. удалось Н. П. Коваленко и Н. М. Николаеву (1966), которые применили для перфузии оксигенированную кровь. Хамприес с сотр. (Hampries et al., 1962) перфузировали почки в течение 18—24 час. смесью крови, раствора Рингера и сахарозы. Последующая реплантация перфузируемой почки животному была успешной. 24-часовые перфузии почек были проведены также Теландером (Telanders, 1962, 1964) и Куперманом (Cooperman et al., 1971). В первом случае перфузировались аутологичной кровью почки баранов и обезьян без развития «блока циркуляции» и с сохранением функциональной активности. Во втором — перфузия осуществлялась неразведенной плазмой крови. Жизнеспособность почек также сохранялась.

Для исследования функции органа в условиях, максимально приближенных к естественным, предложен метод перфузии почки с использованием в качестве «насоса» животных-реципиентов (Лопухин, 1971).

Эксперименты на перфузируемой почке с целью выяснения ее роли в регуляции эритропоэза выполнены Куратовской с сотр. (Kuratsowska et al., 1961). Во всех работах этого направления большое внимание уделялось режимам перфузии и исследованию эритропоэтической активности перфузата. Куратовская показала, что в гипоксемических условиях перфузат почки кролика приобретает эритропоэтическую активность в отличие от перфузатов других органов, культивированных в аналогичных условиях. Жизнеспособность органов во время трехчасовой перфузии определяли по наличию артерио-венозной разницы по кислороду и функциональным показателям — выделению почкой мочи, печенью желчи. Ерслев с сотр. (Erslev et al., 1965) в аналогичных исследованиях при перфузии почек контролировали более широкий спектр параметров культивирования. Перфузия проводилась в течение 4 час. при 37° С. Кровоток через почку поддерживался на уровне 100—200 мл/мин. при артериальном давлении 150 мм рт. ст., артерио-венозная разница по кислороду составляла 20 мм рт. ст., диурез — 0.5—1 мл/мин. Контролировался также уровень рН. Насыщение крови кислородом осуществлялось путем коррекции состава оксигенирующей газовой смеси (O₂, CO₂, N₂). В качестве оксигенатора использовали перфузируемые легкие животного. Производилось также определение роли фактора разведения крови. Исследование эритропоэтической активности перфузата по тестированию на полицитемических мышцах и крысах с помощью Fe⁵⁹ не обнаружило отличия от контроля.

Фишер и Лангстон (Fischer, Langston, 1968) наряду с гипоксией исследовали также влияние тестостерона и кобальта на выработку почкой эритропоэтина. Кровь насыщали кислородом при помощи оксигенатора или легких животного. Перфузию проводили при 37° С в течение 4—5 час.

В наших исследованиях (Нефёдов и др., 1972б, 1973; Нефёдов, 1975) почки собак перфузировали при 38°C в течение 6—8 час. Этот срок и режимы перфузии были обусловлены задачами эксперимента. Перфузия осуществлялась кровью, стабилизированной гепарином (10 ед. на 1 мл крови), которая бралась у собак-доноров почек непосредственно перед операцией. Система кровообращения заполнялась 1 л крови. В других опытах перфузатом служила смесь из аутокрови или аутоплазмы (40%) и среды 199 (60%). Артериальное давление составляло 100—200 мм рт. ст.; скорость кровотока для цельной крови — 0.25—0.3 мл/г/мин., для смеси крови со средой 199 — около 0.5 мл/г/мин., для смеси плазмы со средой 199 — 1.1—1.7 мл/г/мин.; P_{O_2} — 130—150 мм рт. ст.; HbO_2 (для цельной крови) — 85—95%; pH — 7.3—7.4; P_{O_2} ткани почки — 40—50 мм рт. ст. при введении полярографического платинового электрода диаметром 0.5 мм на глубину 5—10 мм.

Динамика интенсивности дыхания ткани почки дана на рис. 84, 2. В ряде опытов для увеличения диуретической функции к перфузату добавлялся маннитол в дозе 30 г на 1 л, который, как известно, усиливает диурез почек как *in vivo*, так и *in vitro* (Медведев и др., 1971).

Слежение за весом почки показывает, что при адекватно подобранных режимах перфузии органа отека почти не происходит. Это коррелирует также и с другими показателями благополучного состояния ткани органа — КСП O_2 , импедансом.

Известно, что почки — один из наиболее чувствительных к ухудшению общего кровообращения органов. В то же время почки могут переносить полную ишемию в течение 90 мин. (Galletti, Brecher, 1966) и низкий ток перфузии. 70 мл/кг/мин. артериализованной крови достаточно для поддержания секреции мочи и позволяет животному выжить без признаков поражения почек (Boupons et al., 1960).

Полярографические исследования содержания кислорода в почечной ткани (Mahoney et al., 1962) показали, что при перфузии со скоростью 80—100 мл/мин. парциальное давление кислорода в почечной ткани даже увеличивается по сравнению с исходным и снижение P_{O_2} наблюдается только при объемной скорости 60 мл/мин. и ниже. Наиболее частое осложнение при перфузии изолированной почки — это «блок циркуляции» и развитие отека ткани. Одной из основных причин этих осложнений является ангиоспазм. Так, согласно данным Морриса с сотр. (Morris et al., 1960), во время перфузии отмечается уменьшение почечного кровотока и клубочковой фильтрации на 25—29%. Ранее этот факт был получен Халли с сотр. (Halley et al., 1959), установившим снижение почечного кровотока вследствие спазма почечных сосудов.

Данные ангиографического исследования Финстербуха с сотр. (Finsterbusch et al., 1961) указывают также на резкий спазм по-

почечных артерий в первые 30 мин. искусственного кровообращения. Имеются данные о том, что введение β -адренергических антагонистов снимает напряжение гладких мышц почечных сосудов (Sarkka et al., 1968). В нарушении кровообращения в почке имеет значение также агрегация эритроцитов и тромбоцитов, жировые эмболы и т. п. Пейдж (Pegg, 1971) изучал изменение сопротивления сосудов изолированной почки кролика при перфузии средой без эритроцитов или кровью. Перфузия проводилась при 37°C в течение 1—1.5 час. Среда оксигенировалась газовой смесью

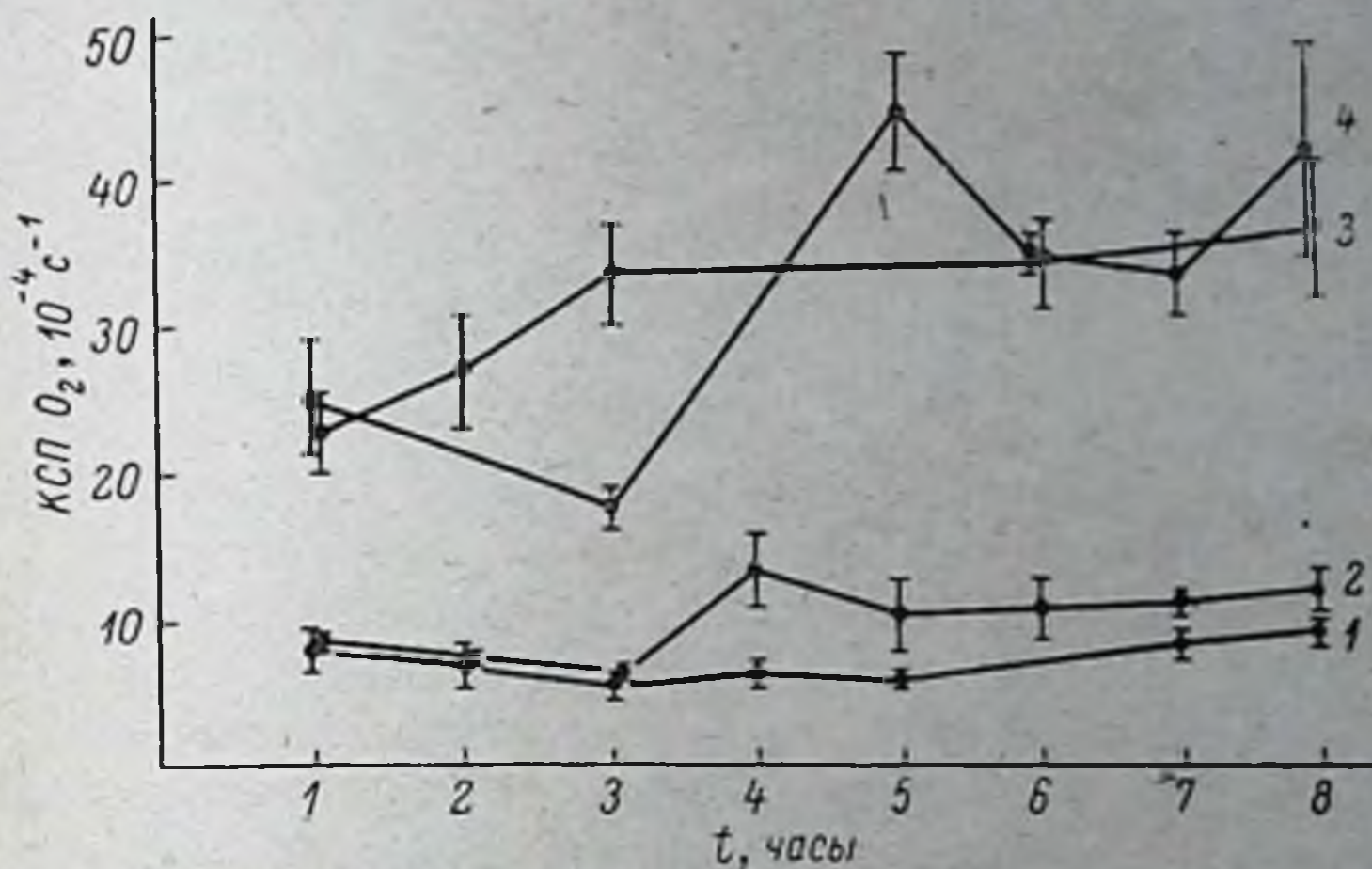


Рис. 84. Динамика интенсивности дыхания ткани печени (1), почки (2), костного мозга (3) и селезенки (4) при изолированной перфузии (по: Нефёдов и др., 1972).

По оси ординат — константа скорости потребления кислорода; по оси абсцисс — время перфузии.

O_2 (95%) и CO_2 (5%); P_{O_2} перфузата — 670—700 мм рт. ст., рН 7.4—7.5. Было показано, что при однократном использовании среды сопротивление сосудов органа снижается, а при рециркуляции перфузата повышается.

При перфузии кровью сопротивление сосудов органа увеличивается в большей степени при использовании оксигенатора пенного типа, чем мембранного. Различие объясняется меньшим разрушением эритроцитов в последнем случае. Развитие отека в почечной ткани при перфузии имеет много причин. Сам по себе эффект возникновения отека ткани при инкубации в искусственных средах хорошо известен в биохимии (Hillman, 1975). Его причиной считается любое существенное изменение в среде по сравнению с условиями *in vivo*. При перфузии органов развитию отека также способствуют ишемия тканей, нарушение гемодинамики, метаболизма и диффузии. Тесная взаимосвязь этих процессов обуславливает всю сложность патогенеза этого нарушения.

2. Культура печени

Перфузируемая изолированная печень, являясь ценной экспериментальной моделью для биохимиков, физиологов и фармакологов, представляет собой так же, как и почка, важный объект трансплантации. Известны отдельные попытки пересадки печени, и уже занявшие свое место в клинической практике операции подключения донорской печени, трупной или свиной, к сосудистому руслу реципиента при ряде тяжелых патологических состояний, связанных с острой недостаточностью печени. Вполне вероятно, важная в будущем, роль перфузируемой печени как элемента комплекса культивируемых органов для трансплантаций (Баллюзек, Фаршатов, 1970). Все это стимулировало разработку методик перфузии печени.

По методу Ю. М. Лопухина (1971) исследуемую печень извлекают из брюшной полости вместе с сосудами: полую вену, воротную вену и печеночной артерией. Проксимальный конец полых вен перевязывают. В сосуды вводят канюли. В общем желчном протоке фиксируют полиэтиленовый катетер. Печень помещают в термостатируемую камеру, заполненную раствором Рингера, а трубки выводят через отверстия в ее стенке. Подготовка животного — «мотора» заключается в канюлировании воротной вены (канюлю вводят в ее дистальный отрезок), бедренной артерии и нижней полых вен (канюлю вводят в центральный отрезок). Канюли сосудов животного соединяют трубками с соответствующими сосудами изолированной печени. В других методах, осуществляемых различного типа аппаратами искусственного кровообращения, достигается полная изоляция органа от организма, и здесь важную роль играют режимы перфузии, направленные на обеспечение ее адекватности. Перфузия печени оксигенированной средой только через воротную вену приводит к уменьшению в ее клетках количества гликогена и нуклеиновых кислот, что указывает на неадекватность такой перфузии (Кричевский и др., 1970). Однако в опытах Р. Л. Розенталь (1972) не было получено существенных различий в функциональной активности органа при перфузии через воротную вену и почечную артерию или только через воротную вену.

Чтобы условия приближались к естественным, перфузия печени проводилась при пульсирующем кровотоке в печеночной артерии, а в воротной вене — при ламинарном (Плих, 1970).

Для оценки функциональной активности печени выполняют ряд функциональных проб: измеряется желчеотделение, задержка и экстракция бромсульфата, печеночный кровоток, исследуется влияние печени на уровень аммиака, мочевины, билирубина, сахара в перфузате, определяются энергетические показатели (аэробный и анаэробный метаболизм), производится морфологический анализ ткани (Кузнецов, 1970). Кроме того, в течение

перфузии оцениваются скорость утилизации органом кислорода по артерио-венозной разнице, по содержанию HbO_2 (Маргулис и др., 1970, и др.), а для оценки степени нарушения проницаемости мембран, отражающей состояние ткани печени, предлагается изучать в процессе перфузии динамику концентрации в перфузате специфических ферментов (Лопухин и др., 1970). При этом отмечается, что наиболее чувствительна к нарушению стационарности ткани пигментновыделительная функция и скорость кровотока, тогда как остальные показатели — синтез мочевины, утилизация глюкозы и т. д. более устойчивы (Кузнецов и др., 1970; Лопухин с сотр., 1970).

В наших исследованиях (Нефёдов и др., 1972б; Нефёдов, 1975) перфузию печени собаки проводили при 38°C в течение 6—8 час. Применялись различные перфузаты: донорская кровь, стабилизированная гепарином (10 ед. на 1 мл крови), смесь гепаринизированной крови или плазмы (25%) со средой 199 (75%). Общий объем перфузата в системе искусственного кровообращения 1.5 л. Артериальное давление поддерживалось на уровне 50—80 мм рт. ст., давление в портальной вене — 20—35 мм рт. ст. Общая скорость кровотока для цельной крови составляла 0.04 мл/г/мин., для смеси крови со средой 199 — 0.88—0.1 мл/г/мин., для смеси плазмы со средой 199 — 0.24—0.36 мл/г/мин. рН поддерживалось на уровне 7.3—7.4, P_{O_2} артерии — 130—150 мм рт. ст., P_{O_2} ткани — 50—60 мм рт. ст., HbO_2 (для цельной крови) — 85—95%. На рис. 84, 1 представлена динамика изменения КСП O_2 ткани печени при изолированной перфузии.

«Блок оттока» является также наиболее частым осложнением при перфузии печени. Он сопровождается увеличением сосудистого сопротивления и нарастанием отека. По данным Сэна с сотр. (Sen et al., 1965), блок оттока, наблюдаемый ими в 28 случаев при перфузии печени, может как прогрессировать, так и спонтанно исчезать в течение 15—45 мин. Кестенс и Дермотт (Kestens, Dermott, 1961) и Ейсман и др. (Eisman et al., 1965) указывают, что наиболее часто блок оттока возникает при перфузии печени собак, что обуславливается большим развитием мышечных сфинктеров в печеночных венах. Возникновение блока оттока связывается также с перепадами температуры в момент подсоединения органа к перфузионной системе (Лопухин, Коган, 1975). Интересный эксперимент был проделан Низетом с сотр. (Nizet et al., 1964), который перфузировал изолированные почки аппаратом искусственного кровообращения с параллельным включением в эту систему *in situ* кишечника, печени, легких. Было показано, что при этом происходит нейтрализация сосудосуживающих факторов. Местом образования сосудосуживающего фактора, как считают эти авторы, являются циркулирующие эритроциты. Встряхивание или центрифугирование крови еще больше увеличивают сосудосуживающий эффект. Поэтому авторы рекомендуют

при перфузии органов максимально уменьшать толчки и вспенивание крови, а также через каждые 2—3 мин. (время циркуляции) добавлять в аппарат свежие порции крови.

3. Культура костного мозга

Для изучения жизнедеятельности изолированной кроветворной ткани необходимо создание в культуре *in vitro* условий, приближающихся к естественным (в организме). Этим требованиям в большей степени отвечает перфузия целого органа, содержащего костномозговую ткань. При этом кроветворение исследуется в условиях ненарушенной архитектоники костного мозга во взаимодействии со стромальной тканью, а также при сохранении путей микроциркуляции и диффузионных потоков, создаваемых кровообращением.

Дринкер с сотр. (Drinker et al., 1922) перфузировали заднюю конечность собак с целью изучения состава выходящих в перфузат клеток крови. В дальнейшем перфузию кроветворного органа стали применять для исследования непосредственного взаимодействия различных гуморальных агентов — предполагаемых регуляторов кроветворения с костномозговой тканью. Так, Куна с сотр. (Kuna et al., 1959), перфузируя конечности крыс кровью животных с анемиями различного происхождения: постгеморрагической, гипоксической и фенилгидразиновой, обнаружил увеличение количества эритробластов в культивируемом костном мозге.

Гордон (Gordon, 1959) также обнаружил увеличение количества клеток эритроидного ряда в костном мозге после перфузии конечности крысы в присутствии эритропоэстимулирующего фактора. Эффект стимуляции эритроидного кроветворения в ответ на добавление в перфузат очищенных препаратов эритропоэтина был получен при перфузии конечности собак и кроликов Фишером с сотр. (Fisher et al., 1964, 1965).

Было исследовано стимулирующее влияние эритропоэтина при перфузии бедра крыс (Gordon et al., 1962) на выход в перфузат ретикулоцитов и нормобластов. При перфузии бедра крыс кровью, содержащей лейкопоэтин, Дорнфестом с сотр. (Dornfest et al., 1962) было обнаружено ускорение выхода лейкоцитов в перфузат из кроветворной ткани. При небольших концентрациях исследуемых веществ или при пониженной их активности для выявления характера воздействия применяют исследование морфологии костного мозга, а также предварительную метку костномозговых клеток H^3 -тимидином (Dornfest et al., 1962), Fe^{59} (Fisher et al., 1965) или Fe^{55} (Lobue et al., 1969).

Влияние режима перфузии на кроветворный орган изучали Куна с сотр. (Kuna et al., 1959). Они исследовали влияние изменения артериального давления при перфузии от 50 до 120 мм рт. ст. на величину рН, клеточный состав перфузата и морфологию

костного мозга. В этом диапазоне давлений существенного влияния обнаружено не было. При величине артериального давления 60—80 мм рт. ст. кровоток через изолированную конечность крысы составлял 3—6 мл/мин. Перфузию изолированной бедренной кости крысы проводили Дорнфест с сотр. (Dornfest et al., 1962) и Гордон с сотр. (Gordon et al., 1962). Дорнфест и сотр. (Dornferst et al., 1962) обнаружили, что увеличение артериального давления с 10—30 мм рт. ст. до 120 сопровождается ростом количества выходящих клеток из кроветворной ткани в перфузат. Оптимальным был кровоток 3—8 мл/час. Методический интерес представляет также и то, что перфузия бедренной кости, оказавшись возможной у крыс линии Лонг-Еванс (Long-Evans), не удалась у крыс линии Спрак-Даули (Sprague-Dawley) из-за отличий в кровоснабжении кости (табл. 6).

Таблица 6

Сроки перфузии кроветворного органа

Животные	Перфузируемый орган	Длительность перфузии, час.	Литературные источники
Крысы	Конечность	4	Kuna et al., 1959
	Бедро	4—6	Dornfest et. al., 1962
Собаки	Конечность	4—6	Fisher et al., 1964
Кролики	»	5—6	Fisher et al., 1965
Крысы	»	3.5	Lobue et al., 1968

Развитие метода изолированной перфузии кроветворного органа для культивирования гемопоэтической ткани способствует изучению влияния различных факторов на кроветворение. Доказательствами сохранения функциональной активности в этих условиях служит способность исследуемого органа отвечать на воздействие вазоактивных веществ, факторов, стимулирующих лейко- и эритропоэз (выход в перфузат лейкоцитов и ретикулоцитов), сохранение активного синтеза ДНК, измеряемого по включению H^3 -тимидина, а также перераспределение численности в популяциях клеточных элементов костного мозга в зависимости от воздействия (Kuna et al., 1959; Gordon et al., 1962; Lobue et al., 1968, и др.).

В некоторых случаях для исследования кроветворной ткани удобно перфузировать, как это делалось другими авторами ранее, конечность животного. Этот объект может также служить для изучения метаболизма и физиологии мышц теплокровного животного. Основным недостатком изолированной перфузируемой конечности для изучения кроветворения органа является большая по сравнению с грудной биомасса мышечной ткани. В то же время конечность обладает и рядом анатомических преимуществ:

выраженность структуры сосудисто-нервного пучка и топографии красного костного мозга в трубчатых костях. Техника перфузии конечности основана на опыте регионарной перфузии, применяемой в хирургии, и перфузии конечностей для реплантации (Лапчинский, 1957; Баллюзек, Фаршатов, 1965; Кованов, Кирпатовский, 1970; Оксман, 1970, и др.).

В наших исследованиях для перфузии использовалась грудина, а также задняя или передняя конечности собак (Нефёдов и др., 1971; Самойлов и др., 1973, и др.). Техника операции описана ранее (см. гл. III, раздел 1).

Перфузия конечности проводилась при 38°C в течение 6—10 час. В качестве перфузатов использовались гепаринизированная кровь, смесь крови или плазмы (40%) со средой 199 (60%). В течение экспериментов рН поддерживалось на уровне 7.3—7.4, P_{O_2} артерии — 130—150 мм рт. ст., HbO_2 (для цельной крови) — 85—95%, артериальное давление — 50—70 мм рт. ст. Скорость кровотока для цельной крови составляла около 0.02 мл/г/мин., для смеси крови со средой 199 — 0.04—0.055 мл/г/мин. и для смеси плазмы со средой 199 — 0.087—0.26 мл/г/мин. На рис. 84, 3 показана динамика изменения КСП O_2 костного мозга при изолированной перфузии.

Осложнения при перфузии грудины и конечностей те же, что и при перфузии почки и печени — блок циркуляции и отек, причины возникновения которых исследованы сравнительно мало.

4. Культура селезенки

Одной из первых работ, выполненных на изолированной селезенке, является исследование Бока (Bock, 1932). Селезенка перфузировалась при помощи препарата «сердце—легкие» Старлинга. Наблюдался выход моноцитов в перфузат. Дорнфест (Dornfest, 1966) предпринял попытку определить влияние уровня эритропоэтина в крови на выход ретикулоцитов из перфузируемой селезенки. Селезенка выделялась у крыс через 72 и 96 час. после кровопотери и перфузировалась в течение 4 час. при 37°C . Уровень кровотока поддерживался в пределах 0.2—0.3 мл/мин. Перфузат (50—60 мл) пропусклся однократно и содержал 7 ед. эритропоэтина. В части экспериментов эритропоэтин (10 ед.) вводился через 1 час. после начала перфузии. Стимулирующее влияние обнаружено не было.

Дорнфест и др. (Dornfest et al., 1969) исследовали также зависимость уровня секвестрации клеток крови селезенкой от интенсивности эритропоэза. Для этой цели перфузировались селезенки нормальных или анемизированных крыс кровью интактных животных (гематокрит 34—40%) при 37°C от 15 мин. до 2 час. Кровоток в органе составлял 0.3 мл/мин. при величине артериального давления 40—60 мм рт. ст. Для определения количества резервируемых селезенкой эритроцитов они метились Cr^{51} до перфузии.

Измерялись также величины P_{O_2} и P_{CO_2} в венозной крови. Было обнаружено, что селезенка нормальных и анемизированных животных резервирует эритроциты с одинаковой скоростью. Добавление к перфузату ингибиторов окислительного и гликолитического обмена снижает уровень секвестрации эритроцитов в органе.

В следующих экспериментах Дорнфестом с сотр. (Dornfest et al., 1971) перфузировалась селезенка нормальных, анемизированных и лейкоэмических крыс кровью, содержащей различное количество (2.7, 12.1, 22.4%) ретикулоцитов. Скорость кровотока — 0.3 мл/мин. Было обнаружено, что увеличение процентного содержания ретикулоцитов сопровождается возрастанием числа резервируемых клеток. С увеличением продолжительности перфузии повышалось число резервируемых клеток, однако интенсивность процесса секвестрации снижалась. Резервируется больший процент макроцитарных, чем нормальных ретикулоцитов. Было найдено также, что селезенка нормальных и анемизированных животных с одинаковой интенсивностью резервирует клетки, тогда как снижение этого процесса наблюдается при перфузии селезенки. Пшала (Przala, 1972) обнаружила, что перфузируемая в течение 5 час. плазмой интактных животных селезенка овец с посттрансфузионной полицитемией приобретала способность тормозить эритропоэз при введении ее перфузата нормальным мышам, вызывая у них падение включения Fe^{59} в эритроциты. При перфузии селезенки интактных животных плазмой полицитемических овец она также оказывала ингибирующее воздействие на эритропоэз. Эти данные позволили автору сделать вывод о том, что селезенка является местом образования ингибитора эритропоэза. Этот краткий обзор ряда работ, выполненных на изолированной перфузируемой селезенке, демонстрирует некоторые проявления функциональной активности этого органа в условиях *in vitro*.

В наших исследованиях (Нефёдов с сотр., 1972б; Гительзон, Нефёдов, 1973) перфузируемая селезенка применялась как объект для изучения роли органных взаимодействий: костный мозг — селезенка в механизме регуляции эритропоэза. Перфузия осуществлялась так же, как в опытах на других органах. В ходе опытов рН поддерживалось на уровне 7.3–7.4, P_{O_2} артерии — 130–150 мм рт. ст., P_{O_2} ткани — 50–60 мм рт. ст., HbO_2 (для цельной крови) — 85–95%, артериальное давление — 100–120 мм рт. ст. Объемная скорость кровотока для цельной крови составляла 0.02 мл/г/мин., для смеси крови со средой 199 — 0.04–0.055 мл/г/мин. для смеси плазмы со средой 199 — 0.1 мл/г/мин. На рис. 87, 4 приведена динамика изменения КСП O_2 ткани селезенки при изолированной перфузии.

Осложнения при перфузии селезенки бывают редко. В основном это незначительный отек органа. Причины большого успеха при перфузии селезенки заложены, вероятно, в особенностях кровообращения и строения стромальной ткани этого органа.

5. Мультиорганные культуры

Идея воспроизведения межорганного взаимодействия в культуре принадлежит Каррелю (Carrel, Lindbergh, 1938). Этот метод позволяет исследовать непосредственное гуморальное влияние

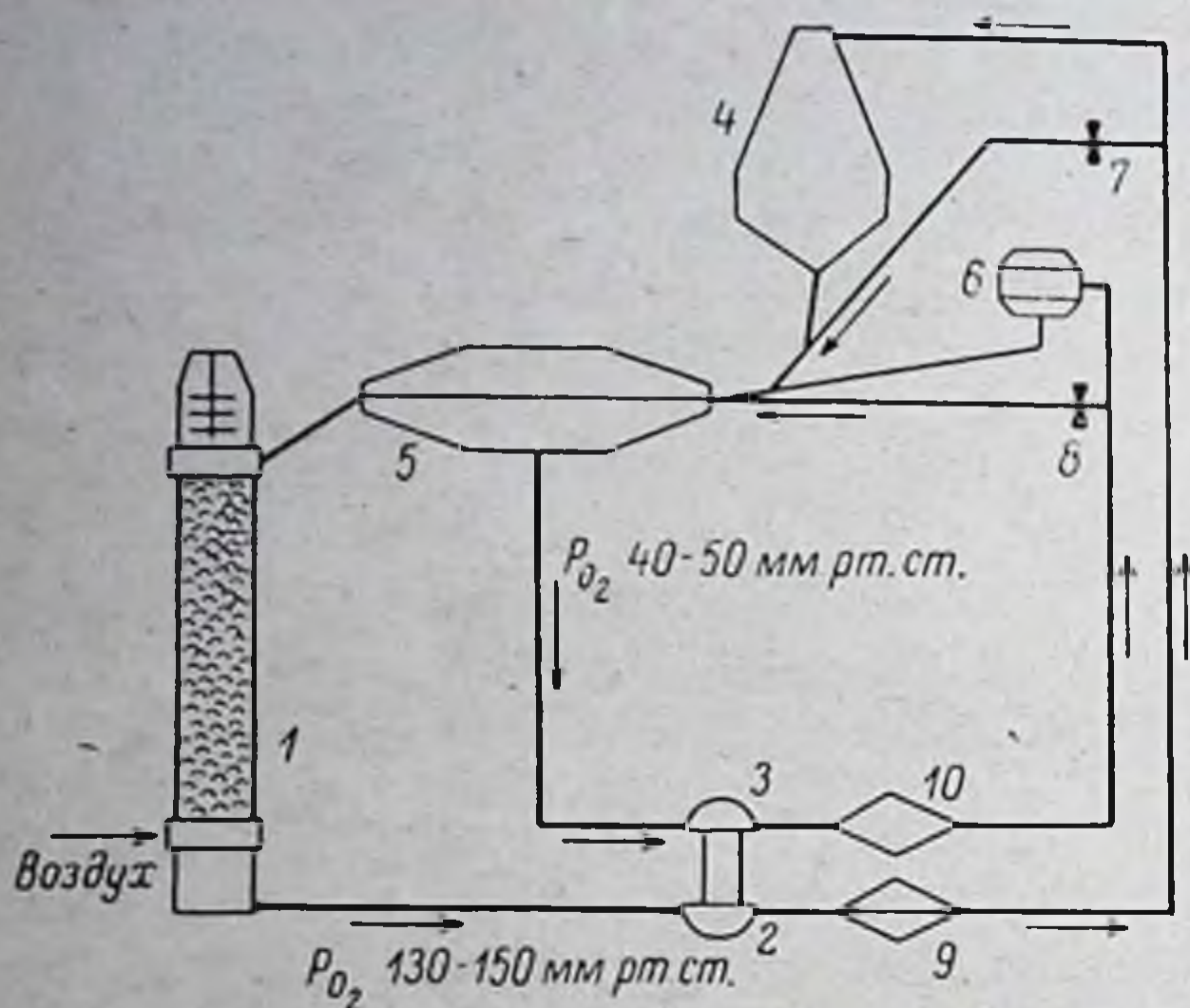


Рис. 85. Схема кровообращения при сочетании нормо- и гипоксического режимов перфузии органов.

1 — оксигенатор; 2 — левая камера насоса; 3 — правая камера насоса; 4 — кроветворный орган (грудина); 5 — коллектор; 6 — орган, культивируемый в гипоксическом режиме; 7, 8 — регулирующие зажимы; 9, 10 — контуры датчиков.

различных органов на другие органы и вклад этого процесса в регуляцию организма. В наших исследованиях (Гительзон, Нефёдов, 1973; Нефёдов и др., 1973; Нефёдов, 1975) экспериментально осуществлены следующие органые сочетания в условиях нормо- и гипоксии: костный мозг—почка, костный мозг—печень, костный мозг—селезенка, костный мозг—почка—печень.

Схема кровообращения этих экспериментальных плеяд органов может быть показана на примере парной культуры: костный



Рис. 86. Датчик для измерения P_{O_2} перфузата.

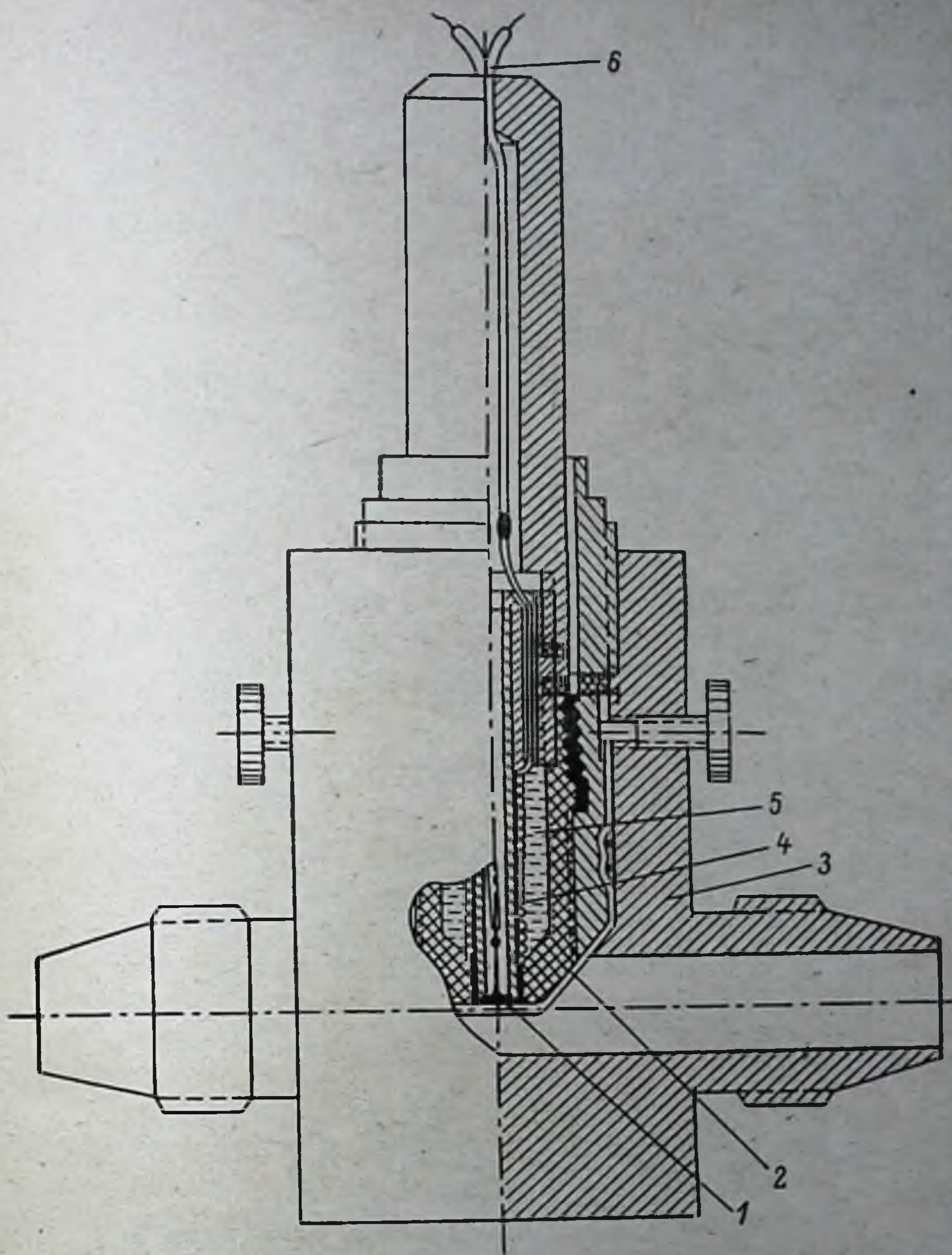


Рис. 87. Конструкция полярографического датчика P_{O_2} .

1 — платиновый электрод; 2 — тефлоновая мембрана; 3 — корпус датчика; 4 — хлорированное серебро; 5 — раствор $5 \cdot 10^{-2}$ М КСl; 6 — выводы электродов.

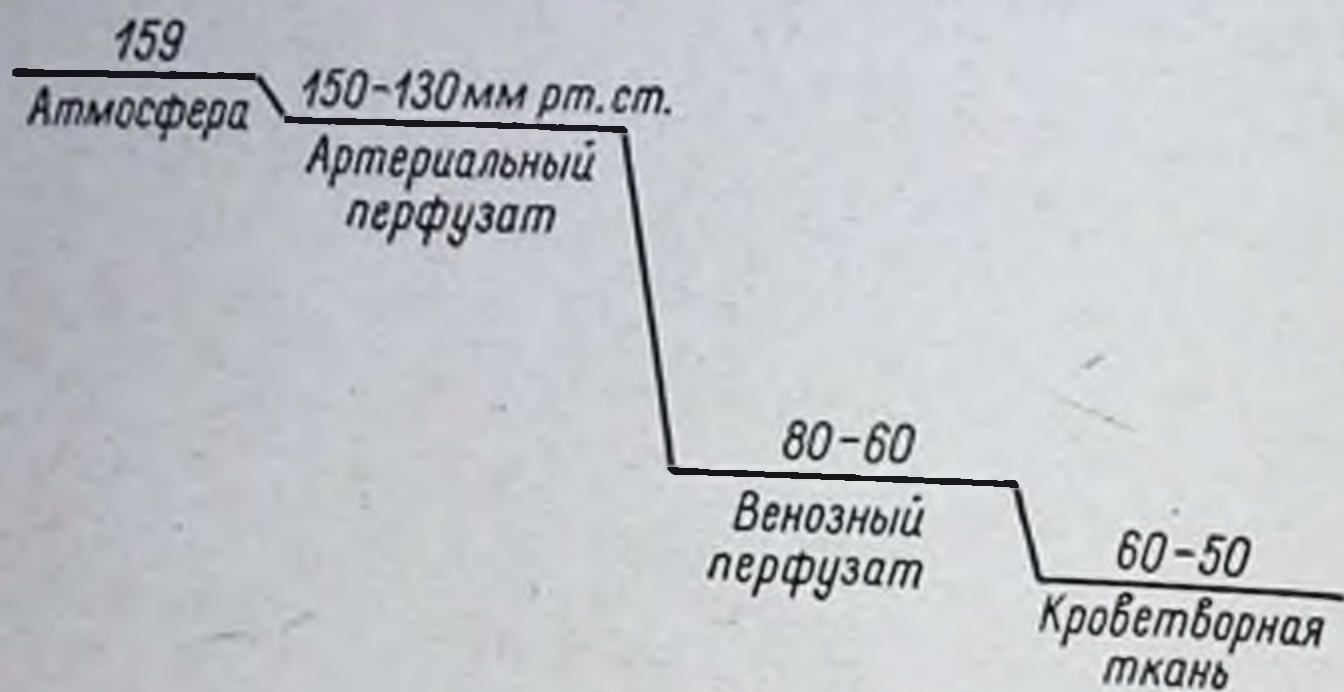


Рис. 88. Схема каскада P_{O_2} в условиях управляемой перфузионной системы.

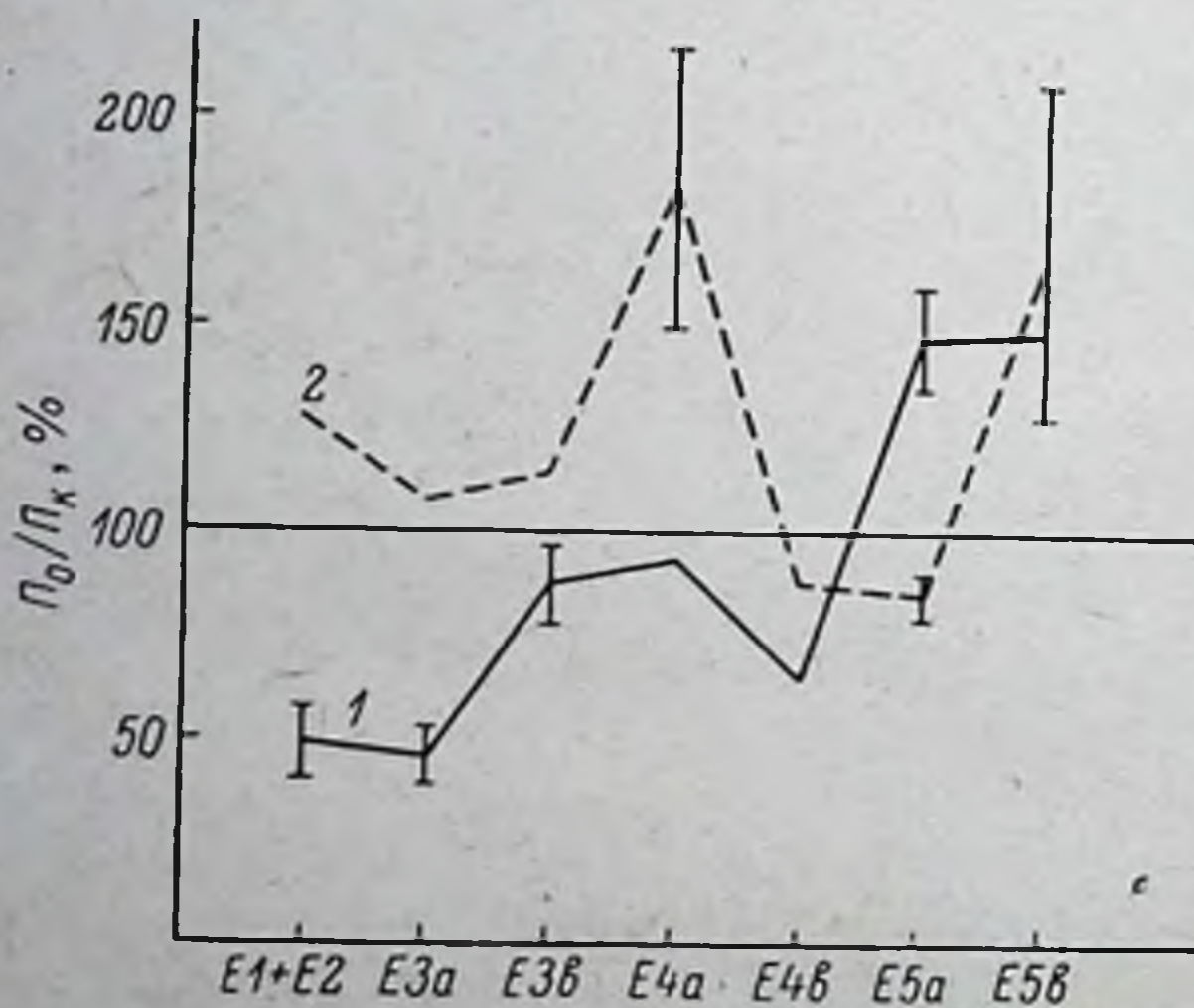


Рис. 89. Кинетика эритроидного кроветворения в костном мозге изолированной грудины через 6 час. совместной перфузии с почкой.

По оси ординат — отношения количества клеток в опыте к количеству клеток в контроле (P_0/P_k); по оси абсцисс — клеточные элементы эритроидного ряда. 1 — в условиях нормоксии (контролем служил костный мозг интактного животного); 2 — в условиях гипоксии (контролем служил костный мозг через 6 час. перфузии с почкой в условиях нормоксии).

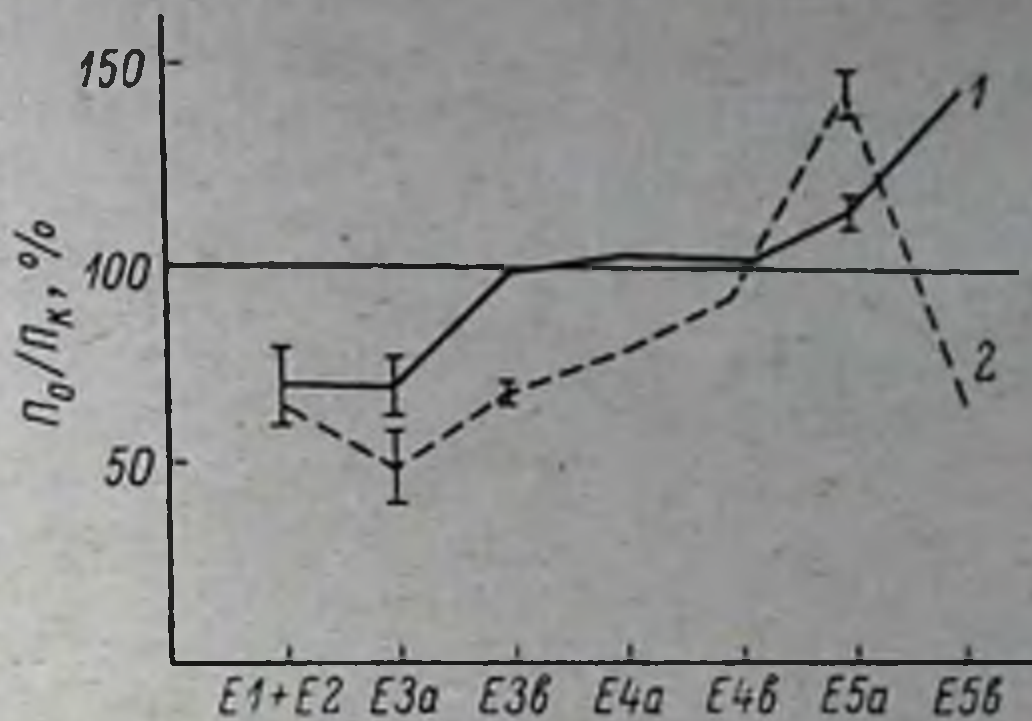


Рис. 90. Кинетика эритроидного кровотока в костном мозге изолированной грудной через 6 час. совместной перфузии с селезенкой.

1 — в условиях нормоксии (контролем служил костный мозг интактного животного); 2 — в условиях гипоксии (контролем служил костный мозг через 6 час. перфузии с селезенкой в условиях нормоксии). Остальные обозначения те же, что и на рис. 89.

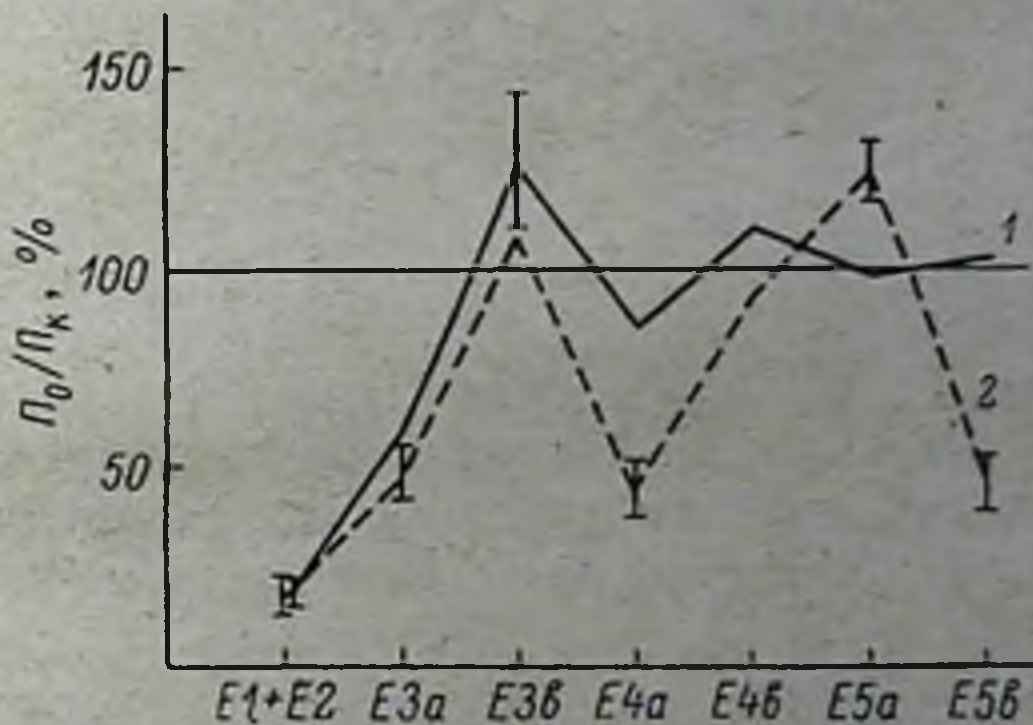


Рис. 91. Кинетика эритроидного кровотока в костном мозге изолированной грудной через 6 час. совместной перфузии с почкой и печенью.

1 — в условиях нормоксии (контролем служил костный мозг через 6 час. перфузии с почкой в условиях нормоксии); 2 — в условиях гипоксии (контролем служил костный мозг через 6 час. перфузии с почкой в условиях гипоксии). Остальные обозначения те же, что и на рис. 89.

мозг—почка, где перфузат из оксигенатора (рис. 85) поступал к одной из камер насоса (искусственное сердце), и, пройдя через контур датчиков, подводился по артериальной магистрали в грудину. Регуляция кровотока через грудину осуществлялась с помощью шунта. Венозный перфузат из грудины поступал в коллектор, из которого без оксигенации шел в другую половину насоса (искусственное сердце) и через контур датчиков к почке, для которой требовалось создать гипоксический режим культи-



Рис. 92. Общая схема управляемых перфузионных систем (по: Нефедов, 1975).

вирования. Уровень перфузата в коллекторе поддерживался с помощью зажима на магистрали, соединяющей его с оксигенатором. Регуляция кровотока через почку проводилась с помощью шунта.

Аналогичным образом создавалась пара костный мозг—селезенка. Нормоксический режим для обоих органов обеспечивался по обычной схеме (рис. 86—88). Взаимодействие костного мозга и печени при нормо- и гипоксии осуществлялось с помощью двух контуров циркуляции с программным обменом порциями перфузата. Это было необходимо в связи с различиями объема биомассы и уровней обмена между этими органами. Тройное взаимодействие осуществлялось также в двух контурах перфузии: один — костный мозг—почка и второй — печень, с программным обменом порциями перфузата между контурами.

Результаты исследования кинетики костномозгового кроветворения в грудине при гуморальном взаимодействии с почкой, печенью и селезенкой при нормо- и гипоксических режимах пред-

ставлены на рис. 89—91 и выявляют специфический характер воздействия этих органов. Так, взаимодействие с гипоксической почкой вызывает стимуляцию эритроидного кроветворения, которое еще более усиливается, когда в систему включается печень. Взаимодействие костного мозга с печенью характеризуется стационарированием кроветворения на уровне, соответствующем *in vivo*.

Межорганное взаимодействие с селезенкой указывает на ингибирующее влияние этого органа на кроветворение, хотя некоторые стадии дифференцировки костномозговых клеток она стимулирует.

Образование таких экспериментальных плеяд органов, варьирование схем между ними и возможность создания различных условий для каждого из культивируемых органов в отдельности открывают разнообразные перспективы изучения межорганного метаболизма и путей регуляторного воздействия одних органов на другие (рис. 92).

ПЕРСПЕКТИВЫ МЕТОДА КУЛЬТУРЫ
ИЗОЛИРОВАННЫХ ОРГАНОВ

Развивая метод культуры изолированных органов, мы исходили из представления о том, что в висцеральной физиологии он может сыграть роль «пробирки», которая способствовала успехам современной биохимии тем, что в ней удалось сделать казавшееся невероятным еще полвека тому назад — воспроизвести вне клетки самые фундаментальные процессы жизни. В такой же мере физиология нуждается в возможности исследовать элементарные функции органов вне организма. Попытаемся на примере некоторых возможностей культуры изолированных органов показать, что надежды на этот метод не беспочвенны.

Вряд ли можно указать более фундаментальную для современной висцеральной физиологии задачу, чем понимание природы тех управляющих воздействий, под влиянием которых миллиарды автономных, генотипически абсолютно одинаковых — эквипотентных клеток объединяются в организмы, разделяя между собой его функции и подчиняя свой метаболизм и темп размножения нуждам организма как целого. Интерес к этому механизму регуляции особенно обостряется тем обстоятельством, что его нарушение лежит в основе патогенеза болезни нашего времени — злокачественного роста.

Культура изолированных клеток и тканей давно используется в исследованиях этого направления. Однако становится все более очевидным, что в поддержании клеточного гомеостаза, в создании устойчивой архитектоники органа основную роль играет взаимодействие между разнородными клетками и тканями. Культура органов открывает возможности исследования этих взаимодействий — их морфологических и главное биохимических проявлений. Культивирование с замкнутым контуром рециркуляции перфузата позволяет накопить в среде вещества, которые выделяются клетками в исчезающе малых количествах, но могут обладать громадной регуляторной активностью.

Близко к этой проблеме стоит задача выяснения механизмов, управляющих специализацией и морфогенезом в развивающейся или регенерирующей клеточной популяции. Культура эмбриональных и регенерирующих органов может стать плодотворным полем этих исследований.

Одним из труднейших для исследования задач висцеральной физиологии и частной биохимии органов является описание метаболизма каждого органа, его специфических особенностей и скоростей. Для решения этой задачи еще в начале нашего столетия Е. С. Лондоном была предложена методика ангиостомии. Однако при интенсивном кровотоке артерио-венозная разница в биологическом составе крови, притекающей и оттекающей от органа, оказалась по большинству веществ слишком маленькой для уверенного количественного измерения. Иллюстрацией возможностей использования для решения этой задачи органов при замкнутой рециркуляции перфузата может служить исследование аминокислотного обмена ряда органов, описанное в гл. III. Изученные в этом отношении органы — почки, печень, селезенка, костный мозг — отличаются по направленности и интенсивности потоков аминокислот. Для каждого может быть составлен специфический спектр поглощаемых и выделяемых аминокислот с характерными скоростями. Аналогичные спектры могут быть составлены по каждому метаболиту и для каждого органа. Такие метаболические карты для всех органов должны быть положены в основу понимания путей межуточного обмена веществ в нормальном и больном организме.

Метод мультиорганного культивирования, образование плеяд органов с регулируемым обменом между ними, как это описано в гл. III, открывает возможности изучения межорганного обмена веществ и выявления конкретных путей взаимодействия органов, образующих функциональные системы.

Культура изолированных органов представляет собой удобный объект для изучения специфических для каждого органа ответов на воздействия биологически активных веществ — гормонов, медиаторов и фармакологических средств, для выяснения механизма их действия. Последнее направление — использование изолированных органов как тест-объектов в фармакологии — один из давних и традиционных путей их применения. Разработка методов адекватной перфузии позволяет расширить круг используемых органов и избежать значительной части артефактов, связанных с их отмиранием. К сожалению, пионерские работы в этом направлении Н. П. Кравкова (1922) и вслед за ним С. В. Аничкова (Аничков, Хлопин, 1925) не получили должного развития. Если раньше это могло быть объяснено несовершенством метода, то теперь основные методические трудности для наиболее простого варианта культуры органов преодолены, и полезность их применения очевидна.

Следующим этапом может быть культивирование регуляторных органов — желез внутренней секреции и других органов — продуцентов биологически активных веществ с целью изучения их функциональной деятельности, а впоследствии и для получения промышленных количеств гормонов.

Особенно привлекательна перспектива культивирования органов, ответственных за иммуногенез. Вычленение и изучение *in vitro* (пока не удавшееся) этого механизма, все многообразие биологических функций которого только теперь начинает вырисовываться, уже одно достаточно для оправдания всех затрат труда и средств на преодоление методических препятствий культивированию изолированных органов.

Все упомянутые задачи, помимо своих частных целей, направлены на решение общей физиологической проблемы — выявление законов и механизмов управления деятельностью органов. Культивирование отдельных органов, их плеяд, целых функциональных систем, выведение органов из-под нервной или гуморальной регуляции организма — все многообразные методические возможности культуры органов являются новым инструментом для решения этой трудно поддающейся физиологическому анализу проблемы. Иллюстрацией возможностей культуры органов в этом направлении могут служить описанные в гл. III эксперименты с культивированием грудины и сопряженных органов, имеющие целью выявление механизма управления эритропоэзом в организме. Сделанное представляет собой лишь самые первые шаги в этом направлении.

Прикладной стороной культуры органов может стать банк органов, длительно поддерживаемых в состоянии нормального или пониженного метаболизма, с целью трансплантаций или временной подсадки для замещения функции больного органа. После того как в культуре будет достигнута устойчивая дифференцировка гемопоэтических клеток, органная культура костного мозга может стать продуцентом клеток крови и самой камбиальной кроветворной ткани.

Вслед за Каррелем решимся упомянуть перспективу, в его время совершенно фантастическую, а в обозримом будущем вполне возможную — культивирование органов, временно вычленяемых из организма, для их интенсивной терапии такими средствами, применение которых в организме невозможно, с последующей реплантацией больному.

Говоря о перспективах и достоинствах метода культуры органов, мы не хотели бы закрывать глаза на присущие ему недостатки и ограничения. Главный из них, принципиальный — это недостижимость полного подобия искусственных условий внутренней среде, в которой орган живет в составе организма. О том, насколько далеки от физиологических условия, создаваемые современными аппаратами перфузии для изолированных органов, говорит весьма красноречиво такое сопоставление: в искусственной системе удается поддерживать жизнедеятельность почки до суток; такая же почка, включенная в артерио-венозный шунт реципиента, функционирует, по данным Ю. М. Лопухина и Э. М. Когана (1975), до 24 суток.

Культивируемый орган лишается связей с организмом. Многие из них нам еще неизвестны. Изолированный орган может функционировать не так, как в организме, по-иному отвечать на экспериментальные воздействия. Отсюда опасность наблюдения искаженных реакций и артефактов. Вполне сознавая эту реальность, мы все же придерживаемся оптимистической точки зрения на будущее культуры органов в физиологии. Основанием для нашего оптимизма является методологическое представление об иерархическом принципе организации управления в организме, рассмотренном во введении. Согласно этому представлению, за которым стоят многочисленные физиологические факты и принципы, справедливые для широкого класса сложных систем, каждый уровень организации внутри сложной системы обладает существенной автономностью — он самоуправляется, получая от вышестоящего уровня только обобщенные сигналы, задающие темп и направление деятельности.

В организме по иерархическому принципу организована вся структура управления от клеточных органоидов до центральной нервной системы. Поразительный прогресс биохимии последних десятилетий показал возможность автономной работы таких сложных субклеточных систем и органоидов, как митохондрии, рибосомы, системы синтеза и генетического транскрибирования. Потенциальная автономность на клеточном уровне показана самим фактом культивирования изолированных клеток и впечатляющими опытами Гертона, доказавшими сохранность полного генома у таких высокоспециализированных клеток, как эпителий и эритроциты амфибий. Вычленив из организма орган и создавая ему условия для дальнейшего существования, мы можем ожидать, что и на этом уровне организации сохранен тот же принцип потенциальной автономности и что изолированный от управляющих воздействий организма орган проявит свои потенции. Возможно, среди них окажутся и такие, которые не выявляются в условиях организма, где они подавлены действием его репрессоров.

Неясной остается конкретная роль и механизм регулирующего действия нервной системы на метаболизм висцеральных органов. Их изоляция и наблюдение в культуре позволяют методом исключения приблизиться к пониманию роли центральной нервной системы в управлении метаболизмом органов. Возможны экспериментальные варианты с сохранением нервной связи с донорским организмом при переводе его на искусственную перфузию.

Если же на этом пути будут встречены неудачи, то в конечном счете и они будут полезны для прогресса в основном направлении — понимании механизма управления органами, так как неудача будет означать, что при вычленинии из организма нами расчленена какая-то неизвестная и потому некомпенсированная в искусственной системе связь, без которой этот орган не функ-

ционирует. Неудача будет побуждать к выявлению таких связей. Таковы основания нашего оптимизма.

Почему же, однако, несмотря на, казалось бы, очевидную и многостороннюю перспективность метода культуры изолированных органов, его применение в физиологических исследованиях очень ограничено? В нашей стране можно насчитать не более десятка физиологических лабораторий, постоянно использующих культуру изолированных органов, да и во всем мире число таких лабораторий вряд ли превышает два десятка.

Причин, на наш взгляд, две — одна из них субъективна и потому легче преодолима, вторая — объективна. Субъективная причина заключается в том, что в физиологических лабораториях непривычна, а для физиолога зачастую обременительна, техника и методика, требуемые культурой органов: очень высокий уровень стерильности, обширная биохимическая «кухня», сложная механика и электроника, необходимые для управления системой культивирования. Каждый из этих элементов по отдельности достаточно часто может быть встречен в лаборатории современного физиолога, но взятые вместе они образуют сложное хозяйство, обслуживание которого требует участия квалифицированного и многочисленного персонала. В непрерывном многосуточном культивировании участвует не менее 4—6 человек.

Естественно, что такой метод будет внедряться постепенно, по мере того как получаемые результаты будут убеждать в целесообразности затрат. Вместе с тем, по мере расширения круга пользующихся методом исследователей, он будет совершенствоваться и упрощаться.

Но есть и объективные затруднения. Перечислим в порядке возрастающей трудности те из них, которые представляются нам, на основании собственного опыта, наиболее существенными. Вследствие того что физиологические реакции во многих органах развиваются медленно, для полного исследования часто необходимо многосуточное культивирование. Примером может служить костный мозг, в котором регенераторная реакция кроветворной ткани появляется в первые часы после раздражения, но полного развития достигает лишь на третьи сутки. При культивировании, длящемся более 6—8 час., и в особенности при многосуточном процессе, представляющем наибольший интерес, необходима высокоэффективная защита от чужеродных организмов — бактерий, вирусов, грибков, вторжению которых подвергается орган, лишенный естественной защиты со стороны организма. Обычные методы хирургической асептики и антисептики здесь обязательны, но недостаточны, массивные дозы антибиотиков не всегда допустимы из-за действия на клетки органов. Достаточно простая и надежная система поддержания стерильности длительно культивируемого органа пока еще не разработана. Особую проблему представляет опасность активации в изолированном органе бактерий и вирусов, латентно инфицирующего организм донора. Воз-

можно, что для культуры некоторых органов, например кишечника, нужно будет пользоваться донорами — гнотобионтами. Современная гнотобиология и техника асептики дают возможности решить задачу стерильного культивирования органов.

Другая, еще не до конца решенная задача — техническая: создание разветвленной системы автоматического непрерывного слежения за состоянием органа в культуре по многим параметрам. Надобность в этой системе двойкая. Во-первых, лишенный гомеостазирующей среды, которую обеспечивает ему в норме организм, изолированный орган требует компенсации со стороны системы культивирования. Для того чтобы такую компенсацию осуществить, необходимо следить за состоянием органа и его реакциями на изменения среды. Во-вторых, конечным результатом эксперимента является информация о состоянии и реакциях наблюдаемого органа. Для ее получения необходимы соответствующие датчики, следящие за органом. Кроме соответствия функциональному назначению, датчики не должны повреждать орган, за которым они следят, и длительно работать в автоматическом режиме. На ближайшее будущее разумным пределом длительности культивирования, видимо, будут дни, реже — недели. На такую длительность непрерывной безотказной работы должны рассчитываться датчики. В гл. II описана применявшаяся нами система слежения. Однако возможности, представляемые современной техникой измерений, в ней еще далеко не полностью использованы. Чем более разносторонне информационной будет следящая система, тем более будет оправдан труд, вложенный в культивирование органов.

Другая техническая задача — создание газообменника и насоса, которые по безвредности для клеток крови приблизились бы к природным сердцу и легким. Все современные газообменники и насосы несравненно более травматичны. Это и неудивительно. Они создавались для аппаратов искусственного кровообращения на время операции, рассчитывались на применение в течение часов и обеспечивали допустимый за это время уровень гемоллиза. В системах культивирования органов, за отсутствием других, используются те же аппараты. Задача создания специального атравматичного аппарата «сердце—легкие» для управляемого культивирования органов еще не решена. Когда такой аппарат будет создан, он найдет разнообразные применения не только для культуры органов, но и в интенсивной терапии, да и хирургия не откажется заменить оксигенаторы, травмирующие клетки, более физиологичными.

И, наконец, последней из видимых крупных задач, которые предстоит решить, и наиболее сложной из них является разработка системы, гомеостазирующей среду культивирования. Эта проблема — главный камень преткновения при непрерывном культивировании любых объектов — бактерий, водорослей, грибов или многоклеточных. Но для изолированного органа ее ре-

шение особенно сложно. Находясь в составе организма, каждый орган с характерными для него скоростями, которые могут быть и переменными, поглощает из крови одни вещества и выделяет в нее другие; спектры этих веществ специфичны для каждого органа, но еще почти не изучены. Несмотря на активный метаболизм органов, который должен был бы исказить состав крови, внутренняя среда организма остается неизменной и оптимальной для жизнедеятельности органов, вопреки их же возмущающему воздействию.

Заметим, что сама кровь является лишь пассивным транспортирующим и буферным средством, и не она обеспечивает эффект гомеостаза. Гомеостатирование достигается тем, что для каждого органа все остальные органы образуют как бы обменный противовес своим совокупным метаболизмом, поглощая из крови все, что этот орган туда выделяет, и выделяя все, что он потребляет. Сбалансированность скоростей этих процессов обеспечивает постоянство состава крови. Точность действия этой системы в организме позволяет поддерживать концентрацию метаболитов на низком уровне, несмотря на то что их межорганный обмен может быть очень интенсивным. Так, например, за сутки в теле человека транспортируется около 500 г сахара, но одновременно в крови находится не более 10 г при концентрации не выше 120 мг%.

Будучи вычленимым из организма, орган лишается этого обменного противовеса, и если исследователь ставит задачу обеспечить органу адекватную среду для длительного существования, функции такого противовеса должны быть переданы системе культивирования. В этом состоит ее основная и наиболее сложная задача, гораздо более трудная, чем обеспечение оптимального уровня физических параметров культиватора, которое, на первый взгляд, представляется основным.

Компромиссное решение этой задачи, используемое до сих пор, — это создание сред, обогащенных питательными компонентами, по крайней мере теми из них, которые сегодня известны. Таковы все рекомендованные для культуры животных клеток прописи сред: знаменитая среда 199 и др. Использование нативной плазмы или цельной крови не решает задачи, так как запаса веществ в ней почти нет. Кроме того, есть вторая сторона проблемы — накопление в среде экзометаболитов органа, которые обычно обладают ретроингибирующим действием и наиболее токсичны для выделяющих их клеток. Для очень разбавленных культур отдельных клеток такие накопительные среды приемлемы, так как объем жидкости многократно превосходит массу клеток и служит буфером. Но для органа, масса которого сопоставима с объемом среды, процесс не может быть длительным, да и не может считаться адекватным, так как идет в условиях меняющегося состава среды, в противоположность строго постоянному составу крови в организме.

Ближайший выход заключается в частой смене среды. Так и приходится делать в настоящее время. Однако как кардинальное решение этот путь непригоден: он ведет к потере накапливающихся в среде метаболитов, которые могут представлять основной интерес. Кроме того, этот способ крайне расточителен. Например, как следует из приведенного выше расчета, для обеспечения сахаром в течение суток массы метаболизирующей ткани, равной весу человеческого тела, кровь пришлось бы заменить не менее 50 раз, т. е. израсходовать около четверти тонны крови.

Радикальный выход заключается в создании системы регенерации среды, которая должна измерять скорость потребления одних метаболитов и выделения других, и по командам от датчиков, следящих за концентрациями этих веществ, избирательно удалять и вводить их в среду. При этом нет необходимости следить за потоками всех метаболитов, которыми обмениваются орган и среда. В силу координированности метаболических реакций между скоростями обмена многих веществ существует жесткая корреляция, позволяющая свести слежение к немногим индикаторным показателям. Это существенное упрощение переводит задачу из необозримой и безнадежно сложной в разряд задач, лежащих в пределах возможностей современной аналитической и препаративной биохимии. Программы такой коррекции будут, однако, довольно сложными и специфичными для каждого органа. Возможно, их реализацию будет целесообразно поручать ЭВМ.

Заметим еще, что в отличие от обычных питательных сред кровь и плазма сами являются живыми тканями, имеющими собственный метаболизм и стареющими в процессе эксплуатации и в зависимости от ее темпа. Эти процессы также должны учитываться системой слежения.

Заключая рассмотрение трудностей, преодоление которых представляется первоочередной необходимостью для создания управляемой адекватной культуры органов, можно констатировать, что среди них нет задач явно неодолимых современными средствами. Это позволяет признать реальной задачей создания управляемой культуры органов и осуществление рассмотренной перспективы этого метода еще до начала нашего столетия, если только не окажется, что для управления жизнедеятельностью органов в организме используются какие-то принципиально иные средства, о существовании которых мы пока ничего не знаем. Но обнаружение такого фундаментального факта оправдывает все усилия, потраченные на создание культуры органов.

ЛИТЕРАТУРА

- Агапов Ю. Я. Кислотно-щелочной баланс. М., 1968, 184 с.
- Аладжалова Н. А. Динамика ранних сдвигов в коре головного мозга при локальном воздействии рентгеновскими лучами на брюшную область и голову. — Биофизика, 1956, т. 1, № 1, с. 49—56.
- Амосов Н. М., Лиссов И. Л., Сидоренко Л. Н. Операции на сердце с искусственным кровообращением. Киев, 1962.
- Ананьев М. Г., Мушегян С. А., Левицкая Л. А., Вайприб Е. А., Фрид Е. А., Козлов Ю. Д., Мартынов А. Н. Аппарат искусственного кровообращения научно-исследовательского Института экспериментальной хирургической аппаратуры и инструментари. — Экспер. хир., 1958, т. 3, № 3, с. 25—31.
- Аничков С. В., Беленький М. Л. Фармакология хеморецепторов каротидного клубочка. Л., 1962, 200 с.
- Аничков С. В., Хлопин Н. Г. Переживание органов и культура тканей вне организма. Л., 1925, 98 с.
- Астахова Т. Н., Мамышева Т. К. Применение посмертного костного мозга при лучевых поражениях. — В кн.: Вопросы трансплантации костного мозга при лучевых поражениях. Л., 1965, с. 21.
- Ахметов А. Г., Стахов А. А., Валлахметов Г. В., Васильев Ж. Х., Розанов С. В. Измерение концентрации водородных ионов и направление углекислого газа в крови. — Мед. техника, 1971, № 2, с. 14—16.
- Баллюзек Ф. В. Особенности устройства аппаратов для искусственного кровообращения. — В кн.: Искусственное кровообращение. Л., 1962а, с. 10—40.
- Баллюзек Ф. В. Искусственное кровообращение при операциях на открытом сердце. Автореф. дис. Л., 1962б.
- Баллюзек Ф. В., Костин Э. Д., Малахов С. Ф., Рябонь Р. В. Методика экстракорпоральной перфузии для сохранения функционирующего органа. — В кн.: Экстракорпоральное подключение изолированных органов. Л., 1970, с. 3—4.
- Баллюзек Ф. В., Скорик В. И. Физиология искусственного кровообращения. — В кн.: Искусственное кровообращение. Л., 1962, с. 41—89.
- Баллюзек Ф. В., Фаршатов М. И. Регионарная перфузия в хирургии конечностей. Л., 1965, 139 с.
- Баллюзек Ф. В., Фаршатов М. И. Действительность и перспективы управления кровообращением и метаболизмом изолированной конечности. — В кн.: Реплантация конечности. Матер. 1-го симпозиума. М., 1970, с. 89—90.
- Баранов Ю. Н. Линейные скорости подачи крови в организм при искусственном кровообращении. — Экспер. хир., 1959, т. 4, № 5, с. 38—43.

- Б а р а ш к о в В. А., Г и т е л ь з о н И. И., Н е ф е д о в В. П.,
Т р у б а ч е в И. Н. Динамика аминокислотного состава среды
при культивировании органов методом управляемой перфузии. —
Бюлл. exper. биол. и мед., 1975, т. 69, № 7, с. 36—38.
- Б а у э р Э. С. Физические основы в биологии. М., 1930.
- Б и о л о г и ч е с к а я кибернетика. М., 1972, 381 с.
- Б и р ю к о в В. В. Особенности периодических реакторов как объектов
регуляции температуры. — Хим. пром., 1963, № 6, с. 53—57.
- Б л и н о в М. Н. Энергетический обмен трупного костного мозга, получен-
ного путем компрессии и аспирации. — Бюлл. exper. биол. и мед.,
1964, т. 58, № 1, с. 51—54.
- Б о б р о в Б. С., Т у р ч а н и ц о в а Г. И. Новая конструкция тепло-
обменника, встроенного в оксигенатор пенно-пленочного типа. —
Мед. техника, 1968, № 3, с. 37—40.
- Б о ш н я к Л. Л., Б ы з о в Л. Н. Турбинно-тахометрические расходо-
меры для измерения малых потоков жидкостей и газов. — В кн.:
Теплоэнергетические и химико-технологические приборы и регуля-
торы. Л., 1968, с. 132—138.
- Б р а ж н и к о в Е. М., К у з н е ц о в В. А., М а м л и н а В. И.,
П и с а р е в с к и й А. А., Р у с с я н Е. К. Пузырьковый окси-
геногенатор крови с повышенным давлением кислорода. — Мед. техника,
1971, № 5, с. 26—30.
- Б р а ж н и к о в Е. М., М а м л и н а В. И., П и с а р е в с к и й А. А.,
Р у с с я н Е. К., Ч е р е п н и н а О. О. Новый способ полного
и вспомогательного искусственного кровообращения. — Мед. техника,
1974, № 2, с. 9—12.
- Б р а й н и с С. Н., С в е ч и н с к и й В. Б. Принципы организации
сложных биологических систем управления. — В кн.: Вопросы био-
ники. М., 1967, с. 287—291.
- Б р о д с к и й В. Я. Цитофотометрия в видимой и ультрафиолетовой
частях спектра. — В кн.: Руководство по цитологии. Т. 1. М.—Л.,
1965, с. 85—98.
- Б р ю х о н е н к о С. С., П е р е с т о р о п и н С. А. Аппарат искус-
ственного кровообращения. — Заявка № 690400/31 от 23 XII 1960.
Авт. свидет. № 150594 от 29 VII 1962.
- Б р ю х о н е н к о С. С., Ч е ч у л и н С. И. Опыты по изолированию
головы собаки (с демонстрацией прибора). — Тр. II Всесоюзн. съезда
физиол. Л., 1926, с. 289—290.
- Б р ю х о н е н к о С. С., Ч е ч у л и н С. И. Опыты по изолированию
головы (собаки). — Тр. Научн. химико-фармацевт. ин-та., вып. 20,
М., 1928, с. 7—43.
- Б р ю х о н е н к о С. С., Я н к о в с к и й В. Д. Заявка № 19380 от
31 III 1937. Авт. свидет. № 61321 от 31 V 1942.
- Б р ю х о н е н к о С. С., Я н к о в с к и й В. Д. Прибор для аэрации
крови. — В кн.: Искусственное кровообращение. М., 1964, с. 117—121.
- Б у р л а к о в а Е. В., К о л ь с О. Р. Изучение электропровод-
ности печени облученных животных. — Биофизика, 1960, т. 5, № 2,
с. 194—201.
- Б у т о м о Н. В., З а й ц е в а К. К., П е т к е в и ч Н. В. Особен-
ности развития лучевой болезни при пересадке костного мозга. —
В кн.: Вопросы трансплантации костного мозга при лучевых пораже-
ниях. Л., 1965, с. 19—20.
- Б у т о м о Н. В., З а й ц е в а К. К., П е т к е в и ч Н. В., С у х а -
н о в М. П. Трансплантация трупного костного мозга и оценка его
способности к приживлению. — Матер. докл. 3-й Всесоюзн. конфер.
по пересадке органов и тканей. Ереван, 1963, с. 196.
- В а й п р и б Е. А., Ф р и д Е. А. Некоторые вопросы теории аппаратуры
искусственного кровообращения. — Экспер. хир., 1958, т. 3, № 3,
с. 9—15.

- Башков В. И., Рамкова Н. В., Масленников Ю. И., Вышегородская Р. А., Кривошосов А. И., Лиманова В. Е. Стерилизация изделий медицинского назначения из термолабильных материалов растворами химических препаратов. — Мед. техника, 1974, № 6, с. 9—11.
- Винников А. А., Харнас С. Ш. Искусственное кровообращение и гипотермия в хирургии открытого сердца. М., 1968, 295 с.
- Вознесенский В. Л. Измерение интенсивности фотосинтеза по изменению электропроводности поглощающего раствора щелочи. — Тр. Бот. ин-та АН СССР, сер. IV, экстер. бот., вып. 4, 1960, с. 258—283.
- (Вознесенский В. Л.) Voznesensky V. L. Conductometric apparatus for determining photosynthetic rate. — Biol. Plantarum (Praha), 1964, t. VI, № 2, p. 79—83.
- Вознесенский В. Л. Кондуктометрический прибор для измерения фотосинтеза и дыхания растений в полевых условиях. Л., 1967.
- Вознесенский В. Л. Кондуктометрический прибор для измерения фотосинтеза и дыхания растений в полевых условиях. Л., 1971, 44 с.
- Волков В. Б. Принципы адекватности перфузии и автоматизация управления искусственным кровообращением. — В кн.: Хирургия сердца. Куйбышев, 1971, с. 79—86.
- Георгиевская Л. М. Регуляция газообмена при хронической сердечной и вентиляционной недостаточности. Л., 1960, 223 с.
- Гительзон И. И., Ковров Б. Г., Терсков И. А. Закономерности процесса непрерывного культивирования микроводорослей. — Тез. докл. совещ. по пробл.: Управляемый биосинтез и биофизика популяций. Красноярск, 1965, с. 8.
- Гительзон И. И., Нефедов В. П. Изучение различных уровней структуры надклеточных регуляторов регенераторной реакции гемопоэтической ткани. — Тез. III Всесоюзн. совещ. по пробл.: Управляемый биосинтез и биофизика популяций. Красноярск, 1973, с. 16—17.
- Гительзон И. И., Нефедов В. П., Садовская Г. М. Глубинная культура клеток линии HeLa в проточной и накопительной системах. — Тез. докл. совещ. по пробл.: Управляемый биосинтез и биофизика популяций. Красноярск, 1965, с. 28.
- Гительзон И. И., Нефедов В. П., Самойлов В. А., Ясников И. Л., Мельник А. В., Дубынин В. И., Петушков В. Н. Исследование гуморальной и нервной регуляции при запуске регенераторной реакции в перфузируемой кровеносной ткани. — Пробл. гематол. и перелив. крови, 1974, т. 19, № 11, с. 39—43.
- Гительзон И. И., Терсков И. А. Эритрограммы как метод клинического исследования крови. Красноярск, 1959, 246 с.
- Гительзон И. И., Терсков И. А., Гомзякова Н. В., Сидько Ф. Я., Ивкина Л. П., Черепанов О. А. Количественные цитохимические и морфологические методы исследования кинетики созревания клеток крови. — Тез. докл. IV Междунар. биофиз. конгр. Т. 3. М., 1972, с. 447—448.
- Гомзякова Н. В., Сидько С. Ф., Бураева Л. Б. Исследование клеток крови и костного мозга методом цитоспектрофотометрии. — Пробл. гематол. и перелив. крови, 1973, т. 18, № 3, с. 39—42.
- Гуланян С. А., Андрианов В. К., Курелла Г. А., Литвин Ф. Т. Электрометрический метод непрерывной регистрации обмена углекислого газа при фотосинтезе. — Биол. науки, 1970, № 3, с. 106—111.
- Гуланян С. А., Курелла Г. А., Аворьянов А. А., Титова З. В. Техника изготовления электродной системы для определения парциального давления кислорода в жидкой и газообразной среде. — Биол. науки, 1973, № 1, с. 131—136.

- Демидов В. П. Пересадка жизненно важных органов в эксперименте. М., 1960, 258 с.
- Демидов В. П., Зарецкая Ю. М. Методика гомопластической пересадки грудины на сосудистой ножке. — Тез. II конфер. по пробл. тканевой несовместимости, консервации и трансплантации тканей и органов. Одесса, 1961.
- Жиронки А. Г. К анализу действия повышенного давления кислорода на организм. Автореф. дис. Л., 1956.
- Жиронки А. Г., Бреслав И. С., Роговенко Е. С., Шмелева А. М. О влиянии на организм обезьян длительного пребывания в среде с повышенным содержанием кислорода. — Бюлл. экпер. биол. и мед., 1966, т. 61, № 2, с. 25—28.
- Жиронки А. Г., Панин А. Ф., Сорокин П. Н. Влияние повышенного парциального давления кислорода на организм человека и животных. Л., 1965, с. 188.
- Залкинд С. Я., Заславский В. Г. Проблема адаптации клеток к условиям культивирования вне организма. — Цитология, 1962, т. 4, № 5, с. 519—529.
- Иванов Ю. Н. Особенности дыхательных движений у собак с измененной рецепторной системой при повышенном содержании углекислого газа и кислорода во вдыхаемом воздухе. Дис. Куйбышев, 1958.
- Иерусалимский Н. Д. Основы физиологии микробов. М., 1963, 242 с.
- Искусственное кровообращение в хирургии сердца и магистральных сосудов. Л., 1962, 303 с.
- Кандрор И. С., Новосельцев В. Н. Цит. по: Шумаков В. И., Новосельцев В. Н., Сахаров М. П., Штейнгольд Е. Ш. М., 1971.
- Капичников М. М., Сушко Н. Г., Скрыбина Э. Г., Суворова Н. Г. Биологическая оценка жизнеспособности консервированного костного мозга в эксперименте. — Матер. 3-й Всесоюзн. конфер. по пересадке тканей и органов. Ереван, 1963, с. 202.
- Караванов Г. Г. Материалы к свободной пересадке костного мозга. М., 1940, 232 с.
- Кирпатовский И. Д., Семенова Э. Д. Основы оперативной техники пересадки органов, М., 1972, 260 с.
- Кирюшина И. Н. Влияние гипер- и гипоксии на кровоснабжение сердца и реактивность коронарных сосудов. Дис. М., 1964.
- Кисин И. Е. Влияние коронарорасширяющих средств на кровоснабжение и энергетику сердца. Автореф. дис. Л., 1964, 21 с.
- Ковалевский К. Л. Лабораторное животноводство. М., 1958, 323 с.
- Коваленко Е. А. О теории динамики кислорода в тканях. — В кн.: Кислородный режим организма и его регулирование. Киев, 1966, с. 167.
- Коваленко Е. А. О теории динамики газов в организме. — В кн.: Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. М., 1973, с. 193.
- Коваленко Е. А., Березовский В. А., Эпштейн И. М. Полярографическое определение кислорода в организме. М., 1975, 230 с.
- Коваленко Н. П., Николаев Н. М. Аппаратура, методика и результаты перфузии трупных почек. — Матер. IV Всесоюзн. конфер. по трансплантации органов и тканей. М., 1966, с. 413.
- Кованов В. В., Кирпатовский И. Д. Проблема реплантации конечности и пути ее дальнейшего развития. — В кн.: Реплантация конечности. М., 1970, с. 5—8.
- Ковров Б. Г., Мельников Е. С., Белянин В. Н., Терсков И. А., Спидько Ф. Я., Ерошин Н. С., Гительзон И. И., Фильмопов В. С., Штоль А. А. Культиватор для интенсивного непрерывного выращивания микроводорослей. — В кн.: Непрерывное управляемое культивирование микроорганизмов. М., 1967, с. 14—30.

- К о з и н е ц Г. И. Применение меченых соединений для оценки жизне- способности костномозговых клеток. — В кн.: Современные проблемы гематологии и переливания крови. Вып. 36. М., 1964, с. 418.
- К о н р а д и Г. П. Регуляция сосудистого тонуса. Л., 1973, 324 с.
- К о н р а д и Г. П., Л е в т о в В. А., Т е п л о в С. И. Регионарное кровообращение как физиологическая проблема. — В кн.: Вопросы регуляции регионарного кровообращения. М., 1969, с. 3—17.
- К о н р а д и Г. П., П а р о л л а Д. И. Аппарат для измерения объемной скорости кровотока при перфузии под постоянным давлением. — Физиол. журн. СССР, 1967, т. 3, № 7, с. 847.
- К р а в к о в Н. П. Основы фармакологии. Ч. 1, 2. СПб., 1911, 805 с.
(К р а в к о в Н.) K r a w k o w N. Uber die functionellen Eigenschaften der Blutgefäße isolierter (normaler und pathologischer) Organe von Tieren und Menschen. — Zschr. Exper. Med., 1922, v. 27, № 1, p. 127.
- К р е м л е в с к и й П. П. Расходомеры. М.—Л., 1963, 656 с.
- К р ы в ч о н к о А. И. Непрерывная количественная регистрация P_{CO_2} в биологических тканях и других средах. Автореф. дис. Л., 1971, 17 с.
- К р и г е р Ю. А., Е л х о в с к а я Е. С. Изменение физико-химических свойств эритроцитов при действии γ -лучей. — Биофизика, 1958, т. 3, вып. 6, с. 711—716.
- К р и ч е в с к и й А. Л., К а з а н ц е в а В. Г., Л о ц а т и ц А. Г. Некоторые показатели функционального состояния гомопечени, временно включенной в перфузионный контур травмированной конечности при длительном раздавливании ее мягких тканей. — В кн.: Экстракорпоральное подключение изолированных органов. Л., 1970, с. 22—24.
- К р ы л о в С. Е. Фармакологический и электрофизиологический анализ чувствительности хеморецепторных приборов каротидных клубочков. Дис. Л., 1962.
- К у з н е ц о в В. Н., Ш и ф р и н Э. Г., М а х л и н Н. В., К р е м л и С. М. К вопросу об оценке жизнеспособности печени. — В кн.: Оценка жизнеспособности органов и тканей. М., 1970, с. 29—30.
- К у л и к А. М. Регуляция дыхания при разных воздействиях на организм. Дис. М., 1967.
- К у л я б к о А. А. Дальнейшие опыты оживления сердца. — Изв. Росс. Акад. наук, 1902 а, сер. 5, т. 16, с. 175.
- К у л я б к о А. А. Дальнейшие опыты оживления сердца. — Изв. Росс. Акад. наук, 1902 б, сер. 5, т. 17, с. 189.
- К у р д и н о в с к и й Е. М. 1903. Цит. по: К р а в к о в Н. П. 1911.
- Л а в р и к С. С., П р и б ы л ь с к и й В. И., Г л у х е ц ь к а я Г. Т. Сопоставление и сравнительная оценка некоторых методов определения жизнеспособности клеток консервированного костного мозга. — В кн.: Современные проблемы гематологии и переливания крови. Вып. 36. М., 1964, с. 362.
- Л а в р и к С. С., Т р и п ч е н к о А. Н. Имплантация клеток костного мозга в селезенку как тест на определение их жизнеспособности. — 43-й пленум Уч. совета ЦОЛИПК. Тез. докл. Т. 2. М., 1967, с. 280—282.
- Л а п ч и н с к и й А. Г. Аппарат для консервации целых органов охлаждением с искусственным кровообращением и его применение в опытах пересадки конечностей и почек у собаки. — В кн.: Новые хирургические аппараты и инструменты и опыт их применения. Вып. 1. М.—Л., 1957, с. 189—203.
- Л а у э р Н. В., К о л ч и н с к а я А. З. О кислородном режиме организма. — В кн.: Кислородный режим организма и его регулирование. Киев, 1966, с. 3.
- Л е в и ц к а я Л. А., С у п е р Н. А. К функциональной оценке эффективности оксигенаторов пенно-пленочного типа. — Мед. техника, 1971, № 5, с. 21.

- Левтов В. А. Химическая регуляция местного кровообращения. Л., 1967, 197 с.
- Лондон Е. С. Ангио- и органостомия и органный метаболизм. Избр. тр. Л., 1968, с. 344—356.
- Лопухин Ю. М. Экспериментальная хирургия. М., 1971, 344 с.
- Лопухин Ю. М., Коган Э. М. Критерии жизнеспособности органов и тканей перед трансплантацией. М., 1975, 278 с.
- Лопухин Ю. М., Лопаткин Н. А., Шеметов Л. Д. Значение ферментов в оценке жизнеспособности трупной почки после пересадки. — В кн.: Оценка жизнеспособности органов и тканей. М., 1970, с. 36—37.
- Луговой А. А. О зональном кровообращении мозга и почки. Дис. М., 1966.
- Макаров А. К., Свердлин В. М. Приборы для измерения рН. Л., 1970, 92 с.
- Макаров Л. В., Супер Н. А. К выбору структурной схемы искусственного сердца мембранного типа. — Мед. техника, 1970, № 3, с. 18—22.
- Макарычев А. Н., Неговский В. А., Владимиров Н. Н. Перфузионный аппарат. — Вопр. нейрохир., 1939, т. 3, вып. 6, с. 76—78.
- Мануйлов И. А. Реакция сосудов конечности на повышение температуры крови. — В кн.: Вопросы регуляции регионарного кровообращения. М., 1969, с. 131—134.
- Маргулис М. С., Розенталь Р. Л., Сандоре А. А., Крыдов И. И. Экстракорпоральное кровообращение изолированных органов — эффективный метод сохранения их жизнеспособности и функциональной активности. — В кн.: Оценка жизнеспособности органов и тканей. М., 1970, с. 71—73.
- Маршак М. Е. Регуляция дыхания у человека. М., 1961, 267 с.
- Маршак М. Е. Физиологические значения углекислоты. М., 1969, 144 с.
- Медведев П. М., Депп М. Е., Денъмухамедов С. Р., Мельникова В. Н., Виноградова С. В., Монахенко И. В. Применение маннитола при перфузии изолированных почек. — В кн.: Осмотические диуретики. Л., 1971, с. 72—76.
- Мефедова Н. А. Фагоцитарная способность клеток костного мозга плодов человека. — Пробл. гематол., 1962, т. 7, № 12, с. 47—50.
- Мефедова Н. А. Определение жизнеспособности клеток консервированного костного мозга с помощью метода культуры ткани. — В кн.: Современные проблемы гематологии и переливания крови. Вып. 36. М., 1964, с. 358.
- Мишин Л. Н. Техника суспензионного культивирования клеток. — В кн.: Радиоэлектроника в медицине. Вып. 2. М., 1968, с. 104—130.
- Москаленко Ю. Е., Вайнштейн Г. Б., Демченко И. Т., Кисляков Ю. Я., Кривченко А. И. Внутречерепная гемодинамика. Биофизические аспекты. Л., 1975, 201 с.
- Мушеган С. А. Опыт разработки аппаратуры и методики искусственного кровообращения (экспериментальные хирургические исследования). Автореф. дис. М., 1962.
- Навратил М., Кадлец К., Днум С. Патофизиология дыхания. М.—Прага, 1967, 372 с.
- Насонов Д. Н., Александров В. Я. Реакция живого вещества на внешние воздействия. М., 1940, 252 с.
- Непрерывное управляемое культивирование микроорганизмов. М., 1967, 196 с.
- Нефёдов В. П. Изменение щелочной и осмотической резистентности клеток асцитной опухоли Эрлиха при некоторых воздействиях. — Цитология, 1967, т. 9, № 5, с. 609—612.
- Нефёдов В. П. Исследование регуляции эритропоэза методом перфузии изолированных органов. Дис. Л., 1975.

- Нефёдов В. П., Гомзякова Н. В., Сомова Л. А., Садовская Г. М. Определение функционального состояния животных клеток методами витальных красителей и люминесцентной микроскопии в условиях переживания и роста в перевиваемой культуре. — В кн.: Непрерывное управляемое культивирование микроорганизмов, М., 1967, с. 191—194.
- Нефёдов В. П., Петушков В. Н., Гуревич Ю. Л., Самойлов В. А., Ясников И. Л. Об автоматической регистрации кинетики кислотной стойкости популяции эритроцитов. — Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1970, т. 64, № 9, с. 122—124.
- Нефёдов В. П., Самойлов В. А., Дубынин В. Н., Ясников И. Л., Михайлов В. И., Кудякова Н. Н., Петушков В. Н. Надклеточные регуляторы запуска механизма регенераторной реакции в эритропоэтической ткани. — Физиол. журн. СССР, 1972а, т. 58, № 1, с. 156—160.
- Нефёдов В. П., Самойлов В. А., Дубынин В. Н., Ясников И. Л., Петушков В. Н. Изолированный перфузируемый кроветворный орган — экспериментальная модель для изучения гуморальных регуляторов гемопоэза. — В кн.: Материалы симпозиума гуморальной регуляции кроветворения. Ереван, 1972б, с. 68—69.
- Нефёдов В. П., Самойлов В. А., Ивченко А. Ф. Конструкция установки для тканевого и органного культивирования костного мозга. — В кн.: Тез. докл. 2-го Всесоюзн. совещ. по управляемому биосинтезу и биофизике популяций. Красноярск, 1969, с. 376.
- Нефёдов В. П., Самойлов В. А., Ивченко А. Ф. Изменение эритроцитов при длительном экстракорпоральном кровообращении. — В кн.: Труды XII Международного конгресса по переливанию крови. М., 1972в, с. 33—34.
- Нефёдов В. П., Самойлов В. А., Кудякова Н. Н., Дубынин В. Н., Петушков В. Н., Ясников И. Л., Михайлов В. И., Хрусталева В. Ф. Культивирование костного мозга *in vitro* методом перфузии изолированного органа. — Изв. АН СССР, сер. биол., 1971, т. 2, с. 179—191.
- Нефёдов В. П., Самойлов В. А., Ясников И. Л., Мельник А. В., Петушков В. Н., Дубынин В. Н., Лукьянова Т. В., Скобелева С. Ю., Моргулис И. И. Исследование неопосредованного гуморального взаимодействия «костный мозг—почка». — Тез. III Всесоюзн. совещ. по пробл.: Управляемый биосинтез и биофизика популяций. Красноярск, 1973, с. 254—255.
- Нечаев Г. К. Полупроводниковые термосопротивления в автоматике. Киев, 1962, 254 с.
- Оксман Т. М. Регуляция состояния мышечной и сосудистой системы ишемизированной конечности методом изолированной перфузии. — Матер. II Всесоюзн. совещ. по пробл.: Управляемый биосинтез и биофизика популяций. Красноярск, 1969, с. 373—375.
- Оксман Т. М. Изолированная нормотермическая перфузия как метод компенсации функции ишемизированной конечности перед реплантацией. — Матер. I симпозиум по реплантации конечности. М., 1970, с. 90—92.
- Павлов И. П. Живосечение. Избр. тр. М.—Л., 1949.
- Петров И. О., Карташевский Н. Т. Трансплантация костного мозга в эксперименте и клинике. М., 1967, 184 с.
- Петровский Б. В., Соловьев Г. М. Современные принципы искусственного кровообращения при операциях на открытом сердце. — В кн.: Современные вопросы искусственного кровообращения. М., 1966, с. 388.
- Писаревский А. А. Методы искусственного кровообращения в хирургии сердца и грудной аорты (клинико-экспериментальное исследование). Дис. М., 1967.

- Писаревский А. А., Тишочкин Ю. В., Стороженко Л. Н. Методика испытаний и функциональная оценка перфузионных насосов для крови. — Мед. техника, 1969, № 5, с. 31—35.
- Писаревский А. А., Тишочкин Ю. В., Кравченко Р. В., Стороженко Л. Н. Анализ гидравлических циклограмм перфузионных насосов для крови. — Мед. техника, 1970, № 1, с. 22—28.
- Плих М. Б. Изучение функции денервированной печени при изолированной перфузии ее в условиях нормо- и гипотермии. — В кн.: Экстракорпоральное подключение изолированных органов. Л., 1970, с. 34—35.
- Полнова Б. И. Температурная зависимость электропроводности клеточных суспензий. — Биофизика, 1969, т. 14, № 3, с. 506—509.
- Пронин Ю. Б., Соколова М. Н., Фрогт О. И. Динамические методы определения некоторых газов в воздухе. — Тр. хим. лабор. Ленингр. ин-та организации экономики и охраны труда ВЦСПС, 1934, т. 7, вып. 8, с. 37—39.
- Пхрикия Ж. А. Некоторые вопросы консервации костного мозга у трупов. — Матер. докл. 3-й Всесоюзн. конфер. по пересадке тканей и органов. Ереван, 1963, с. 225.
- Пхрикия Ж. А. О консервации посмертного костного мозга на растворах. — В кн.: Современные проблемы гематологии и переливания крови. Вып. 26. М., 1964, с. 388.
- Пчелин В. А. Измерение активности водородных ионов (рН), окислительно-восстановительных потенциалов и потенциометрического титрования. М., 1955, 207 с.
- Раевский В. С., Мямлина Т. А., Сумбатов Л. А., Качалов В. К., Страхов С. Н., Шалыбкова О. П., Ащеулова Е. Н., Соболева Е. З. Современные вопросы искусственного кровообращения. М., 1966.
- Регирер С. А. Некоторые вопросы гидродинамики кровообращения. — В кн.: Гидродинамика кровообращения. М., 1971, с. 242—258.
- Розенталь Р. Л. Экстракорпоральная перфузия изолированной печени и перспективы ее применения при лечении острой печеночной недостаточности. Автореф. дис. Рига, 1972, 29 с.
- Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. М., 1973, 220 с.
- Рывкнц А. В. Об артерио-венозных анастомозах малого круга кровообращения. Сообщ. I. — Архив патол., 1948, т. 10, № 3, с. 24.
- Рыжова Н. М. Механизм действия углекислоты на сосуды конечности кошки. — Бюлл. экспер. биол. и мед., 1962, т. 53, № 4, с. 12, 15.
- Самойлов В. А. Контроль и регулирование параметров среды при культивировании перфузируемых изолированных органов. — Матер. III Всесоюзн. совещ.: Управляемый биосинтез и биофизика популяций. Красноярск, 1973, с. 260—261.
- Самойлов В. А., Доррер Г. А., Нефёдов В. П. Некоторые вопросы оценки качества управления процессом культивирования животных клеток и изолированных органов. — В кн.: Анализ регуляции в системе красной крови. Красноярск, 1975, с. 241—251.
- Самойлов В. А., Дубынин В. Н., Ивченко А. Ф., Нефёдов В. П. Разработка автоматической системы слежения за параметрами среды при перфузии изолированной конечности. — В кн.: Реплантация конечности. М., 1970, с. 103.
- Самойлов В. А., Мельник А. В., Нефёдова В. В. Кинетика кроветворения в изолированном перфузируемом органе. — Матер. III Всесоюзн. совещ. по пробл.: Управляемый биосинтез и биофизика популяций. Красноярск, 1973, с. 262—263.
- Соргневский М. В. О регуляции дыхания в норме и патологии. — В кн.: Регуляция дыхания в норме и патологии. Куйбышев, 1968, с. 75.

- Сергиевский М. В., Песков Б. Я., Меркулова Н. А. Дыхательный центр. — В кн.: Физиология дыхания. Л., 1973, с. 204—216.
- Серебряник К. Е. 1948. Цит. по: Маршак М. Е. 1969.
- Сеченов И. М. Замечания о газах крови. — Военно-мед. ж., 1890, т. 77, № 3, с. 297—326.
- Соколова Н. Н. Динамика локального изменения напряжения кислорода в тканях при подкожном введении CO_2 и O_2 . Дис. М., 1967.
- Сорокин А. А. Влияние вдыхания кислорода при нормальном и повышенном давлении на гемодинамику и ЭКГ у человека. — В кн.: Функции организма в условиях измененной газовой среды. Т. 2. М.—Л., 8, с. 46.
- Сорокин А. А. Изменение электрической активности сердца у животных при действии высокого давления кислорода. — В кн.: Функции организма в условиях измененной газовой среды. Т. 3. М.—Л., 1964, с. 116.
- Спижарская Л. М. Изменение гемопоэтических клеток трупного костного мозга в процессе хранения по данным люминесцентной микроскопии. — В кн.: Вопросы гематологии, консервирования крови и тканей. Л., 1961, с. 139—144.
- Спижарская Л. М. Некоторые морфофункциональные исследования клеток посмертного костного мозга в процессе консервации. — Матер. докл. 3-й Всесоюзн. конфер. по пересадке тканей и органов. Ереван, 1963, с. 235.
- Спижарская Л. М. Некоторые морфофункциональные исследования клеток посмертного костного мозга в процессе консервирования. — В кн.: Современные проблемы гематологии и переливания крови. Вып. 36. М., 1964, с. 356—358.
- Спижарская Л. М. Цит. по: Петров И. В., Карташевский Н. Г. 1967.
- Супер Н. А., Левицкая Л. А., Касулин В. С. Пути совершенствования отечественных оксигенаторов пенно-пленочного типа. — Мед. техника, 1970, № 5, с. 11—15.
- Сыркина П. Е. Газовый анализ в медицинской практике. М., 1956.
- Тарусов Б. Н. Электропроводность как метод определения жизнеспособных тканей. — Арх. биол. наук, 1938, т. 52, № 2, с. 178—181.
- Теодорович В. И. 1962. Цит. по: Петров И. О., Карташевский Н. Т. 1967.
- Теребинский Н. Н. Об экспериментальном воспроизведении пороков клапанов сердца. — ДАН СССР, 1930, т. 22, № 2, с. 601—603.
- Терентьева Э. И., Дульцина С. М., Евдокимова А. И. Цитохимические и электрофотометрические исследования эритроцитов при гемолитических анемиях у детей. — В кн.: Биофизика, физиология и патология эритронов. Красноярск, 1974, с. 79—83.
- Терсков И. А., Гительзон И. И. Метод химических (кислотных) эритрограмм. — Биофизика, 1957, т. 2, № 2, с. 259—266.
- Терсков И. А., Гительзон И. И. Применение непрерывного плотностатного процесса для управляемого культивирования микроорганизмов. — В кн.: Непрерывное управляемое культивирование микроорганизмов. М., 1967, с. 3—13.
- Терсков И. А., Гительзон И. И., Нефёдов В. П., Самойлов В. А., Дубынин В. Н., Михайлов В. И., Петушков В. Н., Ясников И. Л. Управляемые системы для перфузионного органного культивирования костного мозга. — Тез. докл. IV Междунар. биофиз. конгр. Т. 4. М., 1972, с. 347.
- Трошихин Г. В. Газообмен в некоторые функции центральной нервной системы при длительном пребывании животных в атмосфере с высоким содержанием кислорода. Автореф. дис. Л., 1967.
- Тярасов Г. П. Новые перфузионные планговые насосы. — В кн.: Экстракорпоральное подключение изолированных органов. Л., 1970, с. 8.

- Управляемое культивирование микроводорослей. М., 1967, 173 с.
- Управляемый биосинтез. М., 1966, 370 с.
- Флатов А. Н., Баллюзек Ф. В. Управляемая гемодилюция. Л., 1972, 208 с.
- Хаятин В. М. Сосудодвигательные рефлексы. М., 1964, 375 с.
- Хаятин В. М., Дапчанов В. М., Цатуров В. Л. Перфузионный насос для измерения сопротивления (тонуса) сосудов. — Бюлл. exper. биол. и мед., 1958, т. 45, № 2, с. 117—121.
- Хромов Б. М., Короткевич Н. С., Павлова А. Ф., Пояркова М. С., Шейко В. З. Анатомия собаки. Л., 1972, 232 с.
- Цпон И. Ф. 1898. Цит. по: Cappel A., Lindbergh Ch. 1938.
- Чарный А. М. Патопфизиология гипоксических состояний. М., 1961, 342 с.
- Черниговский В. Н. Аfferентные системы внутренних органов. Киров, 1943, 129 с.
- Чистович Н. Я. 1883. Цит. по: Демихов В. П. 1960.
- Шахламов В. А. Ультраструктура артериального и венозного отделов кровеносных капилляров. — Арх. анат., гистол. и эмбриол., 1967, т. 52, № 1, с. 24—31.
- Шкавера Г. Л., Кузнецов А. И. 1923. Цит. по: Апичков С. В. 1966.
- Шумаков В. И., Зубарев В. А., Касымов А. Х., Касьяненко В. В., Светлов В. П., Крол А. Д. Пути создания и совершенствования мембранных оксигенаторов. — Мед. техника, 1974, № 4, с. 39—41.
- Шумаков В. И., Онищенко Н. А., Расторгуев Б. П., Штейнгольд Е. Ш., Куваев А. Е. Непрерывный динамический контроль и управление жизнедеятельностью консервируемых органов. — В кн.: Экстракорпоральное подключение изолированных органов. Л., 1970, с. 11—12.
- Шумаков В. И., Новосельцев В. Н., Сахаров М. П., Штейнгольд Е. Ш. Моделирование физиологических систем организма. М., 1971, 351 с.
- Шумаков В. И., Штейнгольд Е. Ш., Онищенко Н. А. Консервация органов. М., 1975, 250 с.
- Эпштейн И. М. Факторы кислородного питания тканей и полярографические методы их исследования. Автореф. дис. М., 1968.
- Янковский В. Д., Кречетов Н. В., Холоденко И. П., Левинтан Ц. С., Рекашова А. Ф., Ломовицкая А. Д. О возможности восстановления некоторых функций центральной нервной системы после длительных сроков смерти. — В кн.: Первая сессия Московского общества физиологов, биохимиков и фармакологов. М.—Л., 1941, с. 310—312.
- Abbott W. M., Sell K. W. Tunetionol in vitro analysis as a key to organ storage. — In: Organ perfusion and preservation. N. Y., 1968, p. 487—513.
- Allgöver M. 1952. Цит. по: Klen R. 1962.
- Alvegyd A., Brody S. Cardiovascular and respiratory changes in man during oxygen breathing. — Acta Physiol. Scand., 1948, v. 15, № 2, p. 140—149.
- (Ardenne M., von Böhme G.) Арден М., Бо́ме Г. Автоматическое управление параметрами системы кровообращения. — В кн.: Достижения медицинской и биологической техники. М., 1971, с. 461—462.
- (Ashby) Эшби У. Р. Введение в кибернетику. М., 1959, 432 с.
- Asmussen E., Chioldi H. The effect of hypoxemia on ventilation and circulation in man. — Amer. J. Physiol., 1941, v. 132, № 2, p. 426.
- Bakey M. E., de. Simple continuous flow blood transfusion instrument. — New Orleans Med. Surg. J., 1934, v. 87, p. 386—389.

- Ballinger W. F., Erslev A. T., Solitt R. W., Camishion R. C., Amsel S., Ilda T. Erythropoietin in vitro. III. Perfusion of a lungkidney preparation. — Amer. J. Physiol., 1965, v. 208, № 6, p. 1153—1157.
- Barrcroft J. The Respiratory Function of the Blood. Cambridge University Press, 1925, v. 1, 207 p.
- Barkin M., Katz S., Daloisio J., Kerr W. Normothermic perfusion of the isolated dog kidney on a pumpoxygenator system. — Surg. Gynec. Obstet., 1963, v. 117, № 2, p. 161.
- Barnes D. W. H., Corp M. S. C., Loutit C. J. F. Treatment of murine leukaemia with X-rays and homogous marrow. — Brit. Med. J., 1956, № 4993, p. 626—627.
- (Barnet F.) Барнет Ф. Клеточная иммунология. М., 1971, 542 с.
- Barthel D. Das hogen-poiseuillesche gesetz, seine grenzen und erweiterungen. Theoretische Betrachtungen zum strömungsgesetz des blutkreislaufes. In: Physikalische Grundlagen der Medizin VEB Georg Thieme. Leipzig, 1960, H. 1, S. 9—33.
- Bass A. Energy metabolism in denervated muscle. — In: The Denervated Muscle. Prague, 1962, 486 p.
- (Bayer W. 1960) Байер В. Биофизика. Введение в физический анализ свойств и функций живых систем. М., 1962, 431 с.
- Bayliss L. E. 1952. Цит. по: Erey - Wyssling A. 1952.
- Belt A. E., Smith H. P., Whipple G. H. Factors concernd in the perfusion of living organs and tissues. — Amer. J. Physiol., 1920, v. 52, № 1, p. 101.
- Belzer F. O., Ashby B. S., Gulyassy P. F. Successful 17 hour preservation and transplantation of human — Cadaver kidneys. — New Engl. Med., 1968a, v. 278, № 3, p. 608—610.
- Belzer F. O., Ashby B. S., Huang T. S., Dunphy T. E. Etiology of rising perfusion pressure in isolated organ perfusion. — Ann. Surg., 1968b, v. 168, p. 382—391.
- Belzer F. O., Ashby B. S., May R. E., Dunphy J. E. Isolated perfusion of whole organs. — In: Organ Perfusion and Preservation. N. Y., 1968c, p. 3—11.
- Bernthal T., Green W., Jr., Revzin A. M. Role of carotid chemoreceptors in hypoxic cardiac acceleration. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1951, v. 76, № 1, p. 121.
- Binit L., Burstein M. Action du CO₂ sur le tonus des vaisseaux périphériques. — C. R. Soc. Biol., 1947, v. 141, № 9110, p. 488—490.
- (Bladergroen W.) Бладергреен В. Физическая химия в медицине и биологии. М., 1951, 452 с.
- Björk V. O. Brain perfusions in dogs with artificially oxygenated blood. — Acta Chir. Scand., Suppl., 1948a, № 37, p. 96.
- Björk V. O. An artificial heart or cardiopulmonary machine. — Lancet, 1948b, v. 255, № 6526, p. 491—493.
- (Björk V. O.) Бьерк В. О. Дискуссия по насосам. — В кн.: Искусственное кровообращение. М., 1960, с. 25—27.
- Björklund B., Björklund V., Paulsson T. E. The cytostat an apparatus for automatically controlled continuous propagations of suspended cells. — Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 1961, v. 108, № 2, p. 385—390.
- Bounous G., Shumacher H. B., King H. Studies in renal blood flow. — Ann. Surg., 1960, v. 151, № 1, p. 47—58.
- Bounous G., Onnis M., Shumcker H. B., Nash F. 1960. Цит. по: Galletti P. M., Brecher G. A. 1966.
- Brodie T. G. 1905. Цит. по: Galletti P. M., Brecher G. A. 1966.
- Brown M. B. 1955. Цит. по: Петров И. Р., Карташевский Н. Г. 1967.
- Brown-Sequard E. J. 1858. Цит. по: Брюхоецко С. С. 1964.

- Burton A. C. Temperature, operating characteristics of the human thermoregulatory mechanism. N. Y., 1941, 600 p.
- Cain J. R., Maxwell L. C. An electrolytic resistance method for determining carbon in steel. — J. Indiana. Engl. Chem., 1919, t. II, p. 852—860.
- Carstae et al. 1968. Цит. по: Лоухин Ю. М. и Коган Е. М. 1975.
- Carrel A., Lindbergh Ch. The Culture of Organs. N. Y., 1938, 221 p.
(Clark L. C.) Кларк Л. С. Оптимальная объемная скорость кровотока при перфузии. — В кн.: Искусственное кровообращение. М., 1960, с. 140—151.
- Clark L. C., Gollan F., Gupta V. The oxygenation of blood by gas dispersion. — Science, 1950a, v. 111, № 1, p. 85.
- Clark L. C., Gupta V., Gollan F. Dispersion oxygenation for effecting survival of dogs breathing pure nitrogen for prolonged periods. — Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 1950b, v. 74, № 2, p. 268.
- Clark L. C., Helmsworth J. A., Kaplan S., Sherman R. T., Taylor Z. Polarographic measurement of oxygen tension in whole blood and tissues during total by-pass of the heart, — Surg. Forum, 1953, v. 4, № 1, p. 93—96.
- Clark L. C., Hooven F., Gollan F. A large capacity, allglass dispersion oxygenation and pump. — Rev. Sci. Instr., 1952, v. 23, № 12, p. 748—753.
- Clark L., Sacks G. The Bioelectrodes. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1968, v. 148, p. 133—158.
- (Clegg P., Clegg A.) Клегр П., Клегр А. Гормоны, клетки, организм. М., 1971, 279 с.
- Clowes G. H., Jr., Hopkins A. Z., Holobow T. Oxygen diffusion through plastic films. — Trans Amer. Soc. Art. Int. Organs, 1955, v. 1, № 1, p. 23—24.
- Clowes G. H. A., Hopkins A. Z., Neville W. E. An artificial lung dependent upon diffusion of oxygen and carbon dioxide through plastic membranes. — J. Thoracic. Sur., 1956, v. 32, № 4, p. 630—635.
- Cohen R. D., Ilbes R. A., Lloyd M. H. Perfusion of the isolated rat liver. — In: Isolated organ perfusion. London, 1973, p. 120—134.
- Cole R. B., Bishop T. M. Effect of varying inspired O_2 tension on alveolar-arterial O_2 tension difference in man. — J. Appl. Physiol., 1963, v. 18, № 6, p. 1043—1048.
- Cole R. B., Bishop T. M. Variation in alveolar-arterial O_2 tension difference at high levels of alveolar O_2 tension. — J. Appl. Physiol., 1967, v. 22, № 4, p. 685.
- Collste H., Björken C., Norr A., Groth C. G. Renal preservation: Perfusion with albumin solutions. A preliminary report. — Acta Chir. Scand., 1971, v. 137, № 4, p. 381.
- Comroe J. H., Jr. The location and function of the chemoreceptors of the aorta. — Amer. J. Physiol., 1939, v. 127, № 1, p. 176.
- (Comroe J., Forster R., Dubois A., Briscoe W., Carlsson E.) Комрой И., Фостер Р., Дюбуа А., Бриско В., Карлсон Э. Легкие. Клинические и физиологические функциональные пробы. М., 1961, 196 с.
- Cooper P. D., Wilson T. N., Burt A.-M. The bulk growth of animal cells in continuous culture. — J. Gen. Microbiol., 1959, v. 21, № 3, p. 702—720.
- Cooperman A. M., McGrath D. C., Holley K. E. Successful 24-hour preservation of canine kidneys. — Surgery, 1971, v. 70, № 3, p. 399.
- Coulter N. A., Pappenheimer T. R. Development of turbulence in flowing blood. — Amer. J. Physiol., 1949, v. 159, № 2, p. 401—408.

- Crafford C., Norberg B., Senning A. Clinical studies in extracorporeal circulation with a heart-lung machine. — *Acta Chir. Scand.*, 1957, v. 112, № 1, p. 220—245.
- Crosbie E. J., Hardy J. D., Fessenden E. Electrical analog simulation of temperature regulation in man. — *IRE Trans. Bio-Med. Electron.*, 1961, v. 8, № 4, p. 234.
- Cross E. S., Berne R. M., Hirose Y., Jones R. D., Kay E. B. Evaluation of a rotating disc type reservoir-oxygenator. — *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 1956, v. 93, № 2, p. 210.
- Daly W. T., Bondurant S. Effects of oxygen breathing on the heart rate, blood pressure and cardiac index of normal non-resting with reactive hyperemia and after atropin. — *J. Clin. Invest.*, 1962, v. 41, № 1, p. 126—132.
- Dennis C. Certain methods for artificial support of the circulation during open intracardiac surgery. — *Surg. Clin. J. Amer.*, 1956, v. 36, № 3, p. 423—436.
- (Dennis C., Karlson K.) Деннис К., Карлсон К. Оксигенатор с вращающимися дисками. — В кн.: Искусственное кровообращение. М., 1960, с. 67—77.
- Dennis C., Spreng D. S., Jr., Nelson G. E., Karlson K. E., Nelson R. M., Thomas T. V., Eder W. P., Varco R. L. Development of a pump-oxygenator to replace the heart and lungs: an apparatus applicable to human patients and application to one case. — *Ann. Surg.*, 1951, v. 134, № 4, p. 709—721.
- Davidson W. M., Smith D. R. A morphological sex difference in the polymorphonuclear neutrophil leucocytes. — *Brit. Med. J.*, 1954, v. 2, № 4852—4903, p. 6.
- Dornfest B. S., Handler E. S., Handler E. E. Reticulocyte sequestration in spleens of normal, anaemic and leukaemic rats. — *Brit. J. Haematol.*, 1971, v. 21, № 1, p. 83—94.
- Dornfest B. S., Lobus T., Handler E. S., Gordon A. S., Quastler H. Mechanism of leucocyte production and release. I. Factors influencing leucocyte release from isolated perfused rat femurs. — *Acta Haematol.*, 1962, v. 28, № 1, p. 42—60.
- Drew G. E. Profound hypothermia in cardiac surgery. — *Brit. Med. Bull.*, 1961, v. 17, № 1, p. 37—42.
- Drinker C. K., Katherine R., Lund Ch. C. The circulation in the mammalian bone-marrow. — *Amer. J. Physiol.*, 1922, v. 62, № 1, p. 1—92.
- Eagle H. The specific amino acid requirements of a mammalian cell (strain L) in tissue culture. — *J. Biol. Chem.*, 1955, v. 214, № 2, p. 839.
- Ebert T. D. The effects of chorioallantoic transplants of adult chicken tissues on homologous tissues of the host chick embryo. — *Acad. Sci. Wash.*, 1954, v. 40, № 5, p. 337—347.
- Eiseman B., Lien D., Raffucci P. Heterologous liver perfusion in treatment at hepatic failure. — *Ann. Surg.*, 1965, v. 162, № 3, p. 329.
- Erslev A. J., Solit R. W., Camishion R. C., Amsel S., Ilda J., Ballinger W. F. Erythropoietin in vitro. III. Perfusion of a lung-kidney preparation. — *Amer. J. Physiol.*, 1965, v. 208, № 6, p. 28—35.
- Evans K. 1914. Цит. по: Лопухин Ю. М. 1971.
- (Extracorporeal circulation) Искусственное кровообращение. М., 1960, 462 с.
- Fales J. T., Heisey S. R., Ziegler K. L. Dependancy of oxygen consumption of skeletal muscle on number of stimuli during work in the dog. — *Amer. J. Physiol.*, 1960, v. 198, № 6, p. 1333—1342.
- Ferrebee T. W., Thomas E. D. Radiation injury and marrow replacement: factors affecting survival of the host and the bromograft. — *Ann. Intern. Med.*, 1958, v. 49, № 5, p. 987—1003.

- Finnerty F. A., Jr., Winkin L., Fazekas T. F. Acute hypotension and cerebral hemodynamics; preliminary report. — Med. Ann. Dis. of Columbia, 1953, v. 22, № 115, p. 167.
- Finsterebusch W. D., Long M., Sellers R. D., Amplatz K., Zillehei C. W. Renal arteriography during extracorporeal circulation in dogs, with a preliminary report upon the effects of flow molecular weight dextran. — J. Thorac. Surg., 1961, v. 41, № 2, p. 252—262.
- Firrog B. 1930. Цит. по: Баллюзек Ф. В. 1962а.
- Fisher J. W., Lajtha L. G., Butto A. S., Porteous D. D. Direct effects of erythropoietin on the bone marrow of the isolated perfused hind limbs of rabbits. — Brit. J. Haemat., 1965, v. 11, № 3, p. 342—349.
- Fisher J. W., Langston J. W. Effects of testosterone, cobalt and hypoxia on erythropoietin production in the isolated perfused dog kidney. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1968, v. 149, № 1, p. 75—87.
- Fisher J. W., Roh B. L., Couch C., Hightingale W. O. Influence of cobalt, sheep erythropoietin and several hormones on erythropoiesis in bone marrow of isolated perfused hind limbs of dogs. — Blood, 1964, v. 23, № 1, p. 87—98.
- Fleischman M., Scott F., Hadly F. Effect of pH change upon systemic large and small vessel resistance. — Circul. Res., 1957, v. 5, № 3, p. 602—606.
- Folkow B., Neil E. Circulation. N. Y., 1971, 462 p.
- Ford C. E., Hamerton J. L., Barnes D. W. H. Cytological identification of radiation-chimeras. — Nature, 1956, v. 177, № 8, p. 452—454.
- Frey M., Gruber M. Untersuchungen über den stoffwechsel isolirter organe. — Arch. Physiol., 1885, S. 519—532.
- Frey-Wyssling A. Deformation and flow in biological systems. N. Y., 1952, 145 p.
- Frohlich E. D. Vascular effects of the Krebs intermediate metabolites. — Amer. J. Physiol., 1965, v. 208, № 1, p. 149—153.
- (Galletti P. M., Brecher G. A., 1962). Галлетти П. М., Бричер Г. А. Основы и техника экстракорпорального кровообращения. М., 1966, 294 с.
- Geber W. F., Schwinghamer J. M. Evaluation of local ischemia, general anoxia and vasodilators in reactive hyperemia. — Angiology, 1965, v. 16, № 5, p. 256—266.
- Geyer R. P., Monroe R. G., Taylor K. Survival of rats totally perfused with a Fluorocarbon detergent preparation. — In: Organ perfusion and preservation. N. Y., 1968, p. 85—96.
- Gellhorn E. On the physiological action of carbon dioxide on the cortex and hypothalamus. — EEG Clin. Neurophysiol., 1953, v. 5, № 3, p. 401.
- Gibbon J. H. Artificial maintenance of circulation during experimental occlusion of pulmonary artery. — Arch. Surg., 1937, v. 34, № 6, p. 1105.
- Gibbon J. H. Application of a mechanical heart lung apparatus to cardiac surgery. — Min. Med., 1954, v. 37, № 1, p. 171—180.
- Gibbs A. 1930. Цит. по: Баллюзек Ф. В. 1962а.
- Gimbel H., Engelberg J. 1954. Цит. по: Galletti P. M., Brecher G. A. 1966.
- Gleason T. L., Edwards R. H. Chimpanzee physiological tolerance to breathing 100% oxygen at 15 psi. — U. S. Air Force Tech. Doc. Rept., 1963, v. 1, № 2, p. 84—86.
- (Glenn Y., Gentch T., Kussroу B., Bonn R., Huуsh M.) Гленн У., Гентч Т., Кьюссроу Б., Бонн Р., Хьюш М. Вечный кровоток во время искусственного кровообращения. — В кн.: Искусственное кровообращение. М., 1960, с. 323—338.
- Gollan F. Physiology of cardiac Surgery (hypothermia, extracorporeal circulation and extracorporeal cooling). Springfield, 1959a, 350 p.
- Gollan F. Physiology of cardiac Surgery. Springfield, 1959b, 96 p.

- Gomori G. T. The distribution of phosphatase in normal organs and tissues. — *Cell Comp. Physiol.*, 1941, v. 17, № 1, p. 71.
- Gordon A. S. Hemopoietine. — *Physiol. Rev.*, 1959, v. 39, № 1, p. 5—30.
- Gordon A. S., Lobue J., Dorfest B. S., Cooper L. W. Reticulocyte and leukocyte release from isolated perfused rat legs and femurs. — In: *Erythropoiesis*. N. Y., 1962, 370 p.
- Grana L., Ahrens J., Donellan W. L., Swenson O. Enzyme patterns after hepatic ischemia. — In: *Organ perfusion and preservation*. N. Y., 1968, p. 551—572.
- (Grodins F. S.) Гродинз Ф. Теория регулирования и биологические системы. М., 1966, 254 с.
- Grundmann R., Pichlmaier M. LDH-release in various experimental conditions as criterion for viability of the hypothermic perfused kidney. — *Res. Exper. Med.*, 1973, v. 159, № 4, p. 298.
- Gullino P. M. In vitro perfusion of tumors. — In: *Organ perfusion and preservation*. N. Y., 1968, p. 877—898.
- Guyton A. *Circulatory physiology*. N. Y., 1963, 471 p.
- Halley M. M., Reemtsma K., Grech O. Hemodynamics and metabolism of individual organs during extracorporeal circulation. — *Surgery*, 1959, v. 46, № 3, 1128—1134.
- Hamel K. 1888. Цит. по: Galletti P., Brecher G. 1966.
- Harper H. A. The chemistry of respiration. — In: *Review of Physiological Chemistry*. California, 1967, p. 193—202.
- (Harvey W. 1686) Гарвей У. Анатомическое исследование о движении сердца и крови у животных. Л., 1948, 234 с.
- Hathaway W. E., Newby L. A., Githens T. H. The acridine orange viability test applied to bone marrow cells. I. Correlation with trypan blue and eosin dye exclusion and tissue culture transformation. — *Blood*, 1964, v. 23, № 4, p. 517.
- Hayek S. 1940. Цит. по: Георгиевская Л. М. 1960.
- Henry L., Jouvalet P. Appareil a transfusion du sang. — *Bull. Acad. de Med., Paris*, 1934, v. 111, № 3, p. 312—319.
- Heymans C., Neil E. *Reflexogenic areas of the Cardiovascular System*. London, 1958, 281 p.
- (Heurovsky J., Kuta J.) Гейровский Я., Кута Я. Основы полярографии. М., 1965, 559 с.
- Hill A. W. The diffusion of oxygen and lactic acid through tissues. — *Proc. Roy. Soc., Ser. B*, 1928, v. 104, № 728, p. 39—96.
- (Hillman H.) Хильман Г. Определенность и неопределенность в биохимических методах. М., 1975, 158 с.
- Hodges P. C., Gardozo R., Thevenet A., Lillehei C. W. Comparison of relative merits of occlusive and nonocclusive pumps for open-heart surgery. — *J. Thorac. Surg.*, 1958, v. 36, № 4, p. 470—478.
- (Holm J. R.) Холм Дж. Молекулярные основы жизни. М., 1965, 484 с.
- Hooker. 1910. Цит. по: Galletti P. M., Brecher G. A. 1966.
- Horsburgh H. Possible role of free fatty acids in kidney preservation media. — *Nature New Biol.*, 1973, v. 242, № 117, p. 122.
- Hüfner G. 1894. Цит. по: Коржув П. А. Гемоглобин. М., 1964, 286 с.
- Humphries A. Z., Ostafin R. R., Goodrich S. M., Moretz W. H. Successful reimplantation of dog kidney after 24-hour storage. — *Surg. Forum*, 1962, v. 13, p. 380.
- Hutson D., Rutledge R., Gollan F. Perfusion of isolated hearts with emulsions of plant oils. — In: *Organ perfusion and preservation*. N. Y., 1968, p. 77—83.
- Human. Цит. по: Galletti P. M., Brecher G. A. 1966.
- Jakoby C. 1890. Цит. по: Galletti P. M., Brecher G. A. 1966.
- Jongbloed J. Mechanical heart-lung system. — *Surg. Gynec. Obstet.*, 1949, v. 89, № 4, p. 684.

- Jordan L. 1958. Цит. по: Galletti P. M., Brecher A. G. 1966.
- Kaltenbach J. P., Kaltenbach H. M., Lyons W. B. Nigrosin as a dye for differentiating live and dead ascites cells. — *Exper. Cell Res.*, 1958, v. 15, p. 112.
- Kauffman H. M., Rodgers R. E., Gross W. S., Shreff B. M. Human kidney preservation and shipping. — *Transplantation*, 1973, v. 15, № 5, p. 465.
- Kay. 1828. Цит. по: Galletti P. M., Brecher G. A. 1966.
- Kestens P., Dermott Mc. Perfusion and replacement of the canine liver. — *Surgery*, 1961, v. 50, № 1, p. 196.
- Kety S. S. Theory and applications of exchange of inert gas at lungs and tissues. — *Pharm. Rev.*, 1951, v. 3, № 1, p. 1—41.
- (Khurie R.) Хурн Р. Ионоселективные электроды в медико-биологических исследованиях. — В кн.: Ионоселективные электроды. М., 1972, с. 280—338.
- (Klen R.) Клен Р. Заготовка и консервирование тканей. Прага, 1962, 316 с.
- Kolff W. J., Berk H. T. Y. Artificial kidney dialyser with great area. — *Acta Med. Scand.*, 1944, v. 117, № 2, p. 121—127.
- Kolff W. J., Balzer R. R. The artificial cell lung. — *Trans. Amer. Soc. Int. Organs*, 1955, v. 1, p. 39—42.
- Kolobov T., Zapol W., Marcus G. Development of a disposable membrane lung for organ perfusion. — In: *Organ perfusion and preservation*. N. Y., 1968, p. 155—175.
- Krogh A. The supply of oxygen to the tissues and regulation of the capillary circulation. — *J. Physiol.*, 1919, v. 52, № 3, p. 457—474.
- Krogh A. Studies on the physiologie of capillaries. II. The reactions to local stimuli of the blood vessels in the web of frog. — *J. Physiol.*, 1921, v. 55, № 5—6, p. 412—422.
- Kugelmass N. *Biochemistry of Blood in Health and Disease*. Springfield, 1959, 543 p.
- Kuna S., Gordon A. S., Morse B. S., Lane F. B., Charipper H. A. Bone marrow function in perfused isolated hind legs of rats. — *Amer. J. Physiol.*, 1959, v. 196, № 4, p. 769—794.
- Kuratowska L., Lewartowski B., Michalak E. Studies on the production of erythropoietin by isolated perfused organs. — *Blood*, 1961, v. 18, № 5, p. 527—534.
- Laborde. 1885. Цит. по: Брюхоненко С. С. 1964.
- Lambersten Chr. Carbon dioxide and respiration in acid-base homeostasis. — *Anesthesiologie*, 1960, v. 21, № 6, pt. 1—2, p. 642.
- Landis E., Pappenheimer T. R., Lowson H. C. The volume of blood — a critical examination of methods for its measurements. — *Hand. of Physiol.*, Sect. II, 1962, v. 1, p. 29—49.
- Langendorff O. Über physiologische Untersuchungen an überlebenden Organen. — *Königsb. Schr.*, 1888, Bd. 28, № 1, S. 3—5.
- Langerova A., Abraham S. Preservation of haemopoietic tissues for the therapy of radiation disease and indirect test of their viability. — *Fol. Biol. (CSR)*, 1960, v. 6, № 1, p. 16—20.
- (Laut T.) Лаут Т. Использование ионоселективных электродов для производственного анализа и контроля технологических процессов. В кн.: Ионоселективные электроды. М., 1972, с. 339—362.
- Legallois J. J. C. Le sang est identique dans tous les vaisseaux qu'il parcourt? Diss. Paris, 1801.
- Legallois J. J. C. Expériences sur la principe de la vie. Paris, 1812.
- Legallois J. J. C. Experiments on the principle of life and particularly on the principle of the motions of the heart and on the seat of this principle. Philadelphia, 1813.
- Lewis B. M., L. Sokoloff R. L. Wechsler, Wentz W. B., Kety S. S. A method for the continuous measurements of cerebral

- blood flow in man by means of radioactive krypton (Kr^{79}). — *J. Clin. Invest.*, 1960, v. 39, № 5, p. 707—716.
- Lewis S. P., Trobaugh F. E. The assay of the transplantation potential of fresh and stored marrow by two in vivo systems. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964, v. 114, pt. 1, p. 677.
- Linn B., Wolkoff M., Klemperer M., Viamonte M., Gollan F. Organic liquids as preservatives for organ storage. — In: *Organ perfusion and preservation*. N. Y., 1968, p. 97—103.
- (Lion K. S.) Лион К. С. Приборы для научных исследований. М., 1964, 276 с.
- Lobue J., Monette F. C., Comiscoll J. F., Gordon A. S., Chan P. C. Erythropoietin and erythropoiesis in isolated perfused hind legs of rats: preliminary study. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1969, v. 149, № 1, p. 257—265.
- Lochte H., Ferrebee F. T. In vitro studies on the preservation of marrow cells in glycerol at low temperatures. — *Lab. Clin. Med.*, 1959, v. 53, № 1, p. 117—126.
- Locke F. Towards the ideal artificial circulating fluid for the isolated frog's heart. — *J. Physiol.*, 1895, v. 18, p. 332.
- Loebell C. H. *Le conditionibus quibus secretiones in glandulis parficiuntur*. Diss. Marburg, 1849.
- (Loewy A., Siekevitz P.) Левин А., Сикевич П. Структура и функция клетки. М., 1971, 583 с.
- Ludwig K. F. W., Schmidt G. 1868. Цит. по: Galletti P. M., Brecher G. A. 1966.
- MacKay B., Moloney P. Y., Rix D. B. The use of electron microscopy in renal preservation and perfusion. — In: *Organ perfusion and preservation*. N. Y., 1968, p. 697—714.
- Mahoney E. B. 1962. Цит. по: Galletti P. M., Brecher G. A. 1966.
- Makinodan T., Anderson N. G. Physiological properties of circulating red blood cells of lethally X-irradiated mice treated with rat bone marrow. — *Blood*, 1957, v. 12, № 11, p. 984.
- Mannick T. A., Lochte H. L., Ashby Ch. A., Thomas E. D., Ferrebee J. W. Autographs of bone marrow in dogs after lethal total-body radiation. — *Blood*, 1960, v. 15, № 2, p. 255—266.
- Mathe G. 1959. Цит. по: Петров И. Р., Карташевский Н. Г. 1967.
- Mathe G., Amiel J. L., Schwarzenberg L., Cattani A., Schneider M. Haematopoietic chimera in man after allogenic (homologous) bone-marrow transplantation. — *Brit. Med. J.*, 1963, № 5373, p. 1633.
- McCoughan T. S., McMichael H., Shuder T. C., Kirby C. K. The use of a totally occlusive pump as a flowmeter with observations on hemolysis caused by occlusive and nonocclusive pumps and other pump-oxygenator components. — *Surgery*, 1958, v. 44, № 1, p. 210—219.
- McElroy W. T., Gerdes A. S., Brown E. B. Effect of CO_2 bicarbonate and pH on the performance of isolated perfused guinea pig hearts. — *Amer. J. Physiol.*, 1958, v. 195, № 2, p. 412—416.
- McLimans W. P., Giardinello P. E., Davis E. V., Kusera C. Y., Rane G. W. Submerged culture of mammalian cells: the liter fermenter. — *J. Bacteriol.*, 1957, v. 74, № 6, p. 768—776.
- (McMillan E.) Мак Миллан Я. Расходомеры. — В кн.: Искусственное кровообращение. М., 1960, с. 129—139.
- Melrose D. G. The principles of heart-lung machinery. — *Lectures on the scientific basis of Medicine*. V. 6. London, 1958, p. 85—89.
- (Melrose D. G.) Мелроуз Д. Насосы с непрерывным и пульсирующим потоками. — В кн.: Искусственное кровообращение. М., 1960, с. 19—24.

- (Milsom G.) Милсум Дж. Анализ биологических систем управления. М., 1968, 501 с.
- Mitchison N. A. The colonisation of irradiated tissue by transplanted spleen cells. — Brit. J. Exp. Path., 1956, v. 37, № 3, p. 239—247.
- Möller B. 1959. Цит. по: Ю. Я. Агапов. 1968.
- Molnar Y. J., Scott J. B., Frohlich E. D., Haddy F. J. Local effects of various anion and H^+ on dog forelimb and coronary vascular resistance. — Amer. J. Physiol., 1962, v. 203, № 2, p. 125—128.
- (Moore F.) Мур Ф. История пересадок органов. М., 1973, 220 с.
- Morgan T. F., Morton H. T., Parker R. C. Nutrition of animal cells in tissue culture. I. Initial studies on a synthetic medium. — Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 1950, v. 73, № 1, p. 1—10.
- (Morgis D., William O., Bender G., Kulie D., de Baakey) Моррис Д., Уильям О., Бендер Г., Кули Д., Де-Бэки М. Влияние искусственного кровообращения на функцию почек. — В кн.: Искусственное кровообращение. М., 1960, с. 277—286.
- Nahas G., Savent H. Cardiac depressant effect of CO_2 and its reversal. — Amer. J. Physiol., 1957, v. 190, № 3, p. 483—491.
- Nelemans F. A. Influence of coronary venous blood on the blood vessels of the lung. — Acta Physiol. Pharmacol. Neer., 1951, v. 2, № 1, p. 19—30.
- Nicol T., Girling F., Teocard W., Claxton E. B., Burton A. C. Fundamental instability of the small blood vessel and critical closing pressures in vascular beds. — Amer. J. Physiol., 1951, v. 164, № 2, p. 330.
- Nizet A., Snypers J., Winard R. Studies on isolated dog kidney submitted to an artificial perfusions. Factors regulating of diuresis. — In: Comp. Rend. 2 Congr. Int. Nephrs. Amsterdam—N. Y., 1964, p. 575.
- Nowel P. C., Cole L. J., Habermeyer J. F., Roan P. L. Growth and continued function of rat marrow cells in X-radiated mice. — Cancer Res., 1956, v. 16, № 3, p. 252.
- Organ perfusion and preservation. N. Y., 1968, 929 p.
- Pappas A. M., Vernon P., Wheeler T. E., Hyatt W. Bone marrow storage: current concepts. — Milit. Med., 1961, v. 126, № 5, p. 347—354.
- Pappenheimer T. R., Maes P. A. A quantitative measure of the vasomotor tone in the hindlimb muscles of the dog. — Amer. J. Physiol., 1942, v. 137, № 1, p. 187.
- Parker R. C. Methods of Tissue Culture. N. Y., 1961.
- Parson R. T., McMaster P. D. The effect of the pulse upon the formation and glow of lymph. — J. Exper. Med., 1938, v. 68, № 5—6, p. 353—376.
- Paton B. S., Groves P. L., Heron M. W., Bess H., Moore A. R. The use of nonionic detergent added to organ perfusates. — In: Organ perfusion and preservation. N. Y., 1968, p. 105—120.
- (Paul G. V. 1960.) Пол Д. Культура клеток и тканей. М., 1963, с. 103—104.
- Pegg D. E. The preservation of viable organs for transplantation. — Bio-Med. Eng., 1970, v. 5, № 6, p. 290—294.
- Pegg D. E. Vascular resistance of the isolated rabbit kidney. — Cryobiology, 1971, v. 8, № 5, p. 431—440.
- Perry V. P., Stevenson R. E., McFarland W., Zink G. A. Motility studies of human postmortem bone marrow. — Blood, 1960, v. 16, № 1, p. 1020.
- Porteus Y. Persistence of motility in bone marrow cells from the cadaver. — Nature, 1961, v. 192, № 4802, p. 569—570.
- Prupton C. F., Maron S. H. Fundamental Principles of Physical Chemistry. N. Y., 1958, 789 p.
- (Pzala Y.) Пшала Я. Роль селезенки в образовании ингибитора эритропоэза. — Матер. симпозиума по гуморальной регуляции кроветворения. Ереван, 1972, с. 76—77.

- Rahn H., Otis A. B. Man's respiratory response during and after acclimatization to high altitude. — Amer. J. Physiol., 1949, v. 157, № 3, p. 445—461.
- Rapola C. E., Machowicz P. P., Freeman G. Effect of CO₂ on autoregulation of cerebral blood flow. — Fed. Proc., 1963, v. 22, № 2, p. 344—350.
- Rein H. Einführung in die Physiologie des Menschen. Berlin, 1955.
- Rein H., Otto Y. 1955. Цит. по: Маршак М. Е. 1969.
- Reivich M. Arterial P_{CO₂} and cerebral hemodynamics. — Amer. J. Physiol., 1964, v. 206, № 1, p. 25—35.
- Remmle W. Die humorale Steuerung der Erythropoiese. Berlin, 1963, 274 с.
- Renkin E. M. Transport of potassium-42 from blood to tissue in isolated mammalian skeletal muscles. — Amer. J. Physiol., 1959, v. 197, № 6, p. 1205—1210.
- Renkin E. M., Rosell S. The influence of sympathetic adrenergic vasoconstrictor nerves on transport of diffusible solutes from blood to tissues in skeletal muscle. — Acta Physiol. Scand., 1962, v. 54, № 3—4, p. 223.
- Reynolds O. An experimental investigation of the circumstances which determine whether the motion of water shall be direct or sinusoid and of the law resistance in parallel channels. — Phil. Trans., 1883, v. 174, p. 935—982.
- (Risica Y.) Ржищца Я. Техника лабораторного непрерывного культивирования. — В кн.: Непрерывное культивирование микроорганизмов. М., 1968, с. 151—267.
- Ringer S. A further contribution regarding the influence of the contraction heart. — J. Physiol., 1883, v. 4, № 1, p. 29.
- Ritchie H. D., Hardcastle J. D., Ed. Isolated organ perfusion. London, Tokyo, 1973, 208 p.
- Rittel E. R. Pressure flow relation in the kidney alleged effects of pulse pressure. — Amer. J. Physiol., 1952, v. 168, № 2, с. 480—489.
- Robin J. 1961. Цит. по: Агапов Ю. Я. 1968.
- (Robinson J. R.) Робинсон Дж. Р. Основы регуляции кислотно-щелочного равновесия. М., 1969, 72 с.
- Rodbard S., Williams C. B., Rodbard D., Berglund E. Myocardial tension and oxygen uptake. — Circul. Res., 1964, v. 14, № 2, p. 139—149.
- Rongthong, Rupp. 1958. Цит. по: Galletti P. M., Brecher G. A. 1966.
- Ross. 1954. Цит. по: Galletti P. M., Brecher G. A. 1966.
- Rothel F., Selkurt E. Vasoactive agents in portal blood during hemorrhagic shock. — Amer. J. Physiol., 1961, v. 200, № 6, p. 1177.
- Schade H. 1923. Цит. по: Bladergroen W. 1951.
- Schmidt C. F. The cerebral circulation in health and disease. Springfield, 1950, 78 p.
- Schmiedeberg L. 1882. Цит. по: Galletti P. M., Brecher G. A. 1966.
- Schneider K. et al. 1955. Цит. по: Galletti P. M., Brecher G. A. 1966.
- Schreck K. A method for counting the viable cells in normal and in malignant cell suspensions. — Amer. J. Cancer, 1936, v. 28, № 2, p. 389—392.
- Schröder. Цит. по: Galletti P. M., Brecher G. A. 1966.
- (Schwabe K.) Швабе К. Основы техники измерений pH. М., 1962, 471 с.
- (Schwartz S. T., De Weese T. A., Niguadula F. N., Gabel P. V., Mahoney E. B.) Шварц С., Де Вис Т., Нигуадула Ф., Габель Ф., Махони И. Цит. по: Galletti P. M., Brecher G. A. 1966.

- Scott J. B., Dagherty R. M., Dabney J. M., Haddy F. J. Role of chemical factors in regulating of flow through kidney, hindlimb and heart. — Amer. J. Physiol., 1965, v. 208, № 5, p. 813—824.
- Selkurt E. E. Effect of pulse pressure and mean arterial pressure modification on real hemodynamics and electrolyte and water excretion. — Circulation, 1951, v. 4, № 4, p. 541—551.
- Selkurt E. E., Brecher G. A. Цит. по: Galletti P. M., Brecher G. A. 1966.
- Sen P., Parulkar G., Phalerao R. Experiences in canine and human liver perfusion and experimental study. — Indian J. Med. Res., 1965, v. 53, p. 1203.
- (Setlow R. B., Pollard E. C.) Сетлов Р., Поллард Э. Молекулярная биофизика. М. 1964, 436 с.
- Severinghaus S. W., Bradley A. F. Electrodes for blood P_{O_2} and P_{CO_2} determination. — J. Appl. Physiol., 1958, v. 13, № 3, p. 515—522.
- Shipley R. E., Gregg D. E., Schroeder E. F. An experimental study of glow patterns in various peripheral arteries. — Amer. J. Physiol., 1943, v. 138, № 5, p. 718—730.
- Simonsen M. The impact on the developing embryo and newborn animal of adult homologous cells. — Acta Path. Microbiol. Scand., 1957, v. 40, № 6, p. 480—500.
- Spoehr H. A., McGee J. M. Studies in plant respiration and photosynthesis. — Carnegie Inst. Wash. Pub., 1923, t. 325, p. 89.
- Spoehr H. A., McGee J. M. Investigation in photosynthesis. An electrometric method of determining carbon dioxide. — J. Ind. a. Eng. Chem., 1924, t. 16, p. 128—130.
- Stainsby W. N., Otis A. B. Blood flow, blood oxygen tension, oxygen and oxygen transport in skeletal muscle. — Amer. J. Physiol., 1964, v. 206, № 6, p. 858—862.
- Starling E. H. Linacre lecture on law of the heart. London, 1918.
- Starling E. M., Verney E. B. The secretion of urine as studied on the isolated kidney. — Proc. Roy. Soc., 1924, 97B, p. 321.
- Stern S. A., Rapaport E. Comparison of the reflexes elicited from combined of separate stimulation of the aortic and carotid chemoreceptors on myocardial contractivity, cardiac output and systemic resistance. — Circulat. Res., 1967, № 20, p. 214.
- Swan H., Wilkinson R. H. Visual repairs of congenital aortic stenosis during hypothermia. — J. Thorac. Surg., 1956, v. 35, № 2, p. 139.
- Telander R. L. Prolonged normothermic perfusion of the isolated baboon and sheep kidney with maintenance of function. — Surg. Forum, 1962, v. 13, p. 378.
- Telander R. L. Prolonged normothermic perfusion of the isolated primate and sheep kidney. — Surg. Gynec. Obstet., 1964, v. 11, p. 347.
- Telling R. C., Stone C. J. A method of automatic pH control of a bicarbonate CO_2 buffer system for the submerged culture of hamster kidney cell. — Biotechn. Bioeng., 1964, v. 6, № 2, p. 147—158.
- Thomas E. D., Ashby Ch. A., Lochte H. L., Jr., Saretzki A., Sahler O. D., Ferrebee S. W. Homografts of bone marrow on dogs after lethal total-body radiation. — Prod. Res., 1959, v. 14, № 6, p. 720.
- Thomas G. I., Chapman N. C., Merendino K. A. Experience with the extirpated canine lung as a biologic oxygenator. — Arch. Surg., 1957, v. 75, № 1, p. 61.
- Thomas J. A. Un appareil pour perfusion sterile et automatique de gros organes ou de parties d'organismes. — J. Physiol., 1939, v. 15, № 3, p. 432.
- Thomas J. A. Nouveaux procédés de perfusion physiologique et aseptique, permettant la survie prolongée d'organes ou d'organismes pesant plusieurs killogrammes. — J. Physiol., 1948, v. 40, № 2, p. 123—146.

- Thomas J. A. Coeur poumon à membrane pulmonaire artificielle. — C. R. Acad. Sci., 1958, v. 246, № 7, p. 1084—1087.
- Thomas J. A., Beaudoch P. J. Caractéristiques physiologiques du coeur poumon artificiel pour la perfusion au sang du corps humain. — J. Physiol., 1951, v. 43, № 2, p. 311—327.
- Thomas J. A., Salomon L., Salomon M. L. La survie des grands foetus de mammifères perfusés aseptiquement. — J. Physiol., 1948, v. 40, № 3/4, p. 233—250.
- Thomas J. A., Vaysse J. Resultats chirurgicaux obtenus avec le coeur poumon à membrane pulmonaire artificielle. — Mem. Acad. Chir., 1958, v. 84, p. 705—709.
- Thomas M. D., Hill G. R. Photosynthesis under field conditions. — In: Photosynthesis in Plants. Iowa, 1949, p. 19—52.
- Till I. E., McCulloch E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. — Radiat. Res., 1961, v. 14, № 2, p. 213—222.
- Tyrode M. V. The mode of action of some purgative salts. — Arch. Intern. Pharmacodyn., 1910, v. 20, p. 205.
- Vadot L. Цит. по: Galletti P. M., Brecher G. A. 1966.
- Vadot L. Essai de détermination de la résistance des hématies à l'hémolyse traumatique. Application à la construction d'une pompe occlusive pour circulation extracorporelle. — Path. Biol., 1960, v. 8, № 11, p. 1167—1174.
- Van Slyke D. D. The normal and abnormal variations in the acid base balance of the blood. — J. Biol. Chem., 1921, v. 48, № 1, p. 153—159.
- Varkarakis M., Sampson D., Abramczyk J., Murphy G. P. Successful 24-hour preservation of canine kidneys with intracellular electrolyte solution. — Amer. Surg., 1973, v. 39, p. 295.
- Wachstein M. J. Alkaline phosphatase activity in normal and abnormal human blood and bone marrow cells. — Lab. Clin. Med., 1946, v. 31, № 1, p. 1—17.
- Wall R. A., de Warden H. E., Gott V. Z., Read R. C., Varso R. Z., Lillenheim C. W. Total body perfusion for open cardiectomy utilizing the bubble oxygenator: physiologic responses in man. — J. Thorac. Surg., 1956, v. 32, № 3, p. 591.
- Wall R. A., Warden H. E., Read R. C., Gott V. L., Liegher N. R., Varco R. L., Lillenheim C. W. A simple expendable, artificial oxygenator for open heart surgery. — Surg. Clin. N. Amer., 1956, v. 36, № 4, p. 1025—1034.
- Wen Pen-Zin, Hupphries J. A., Rissel R. 48 hour storage of canine kidneys after brief perfusion with Collings' solution. — Ann. Surg., 1971, v. 173, № 5, p. 748.
- Weselowsky S. A., Saivage L. R., Pinc R. D. Extracorporeal circulation: the role of the pulse in maintenance of the systemic circulation during heart-lung bypass. — Surgery, 1955, v. 37, № 4, p. 663—682.
- Whalen W. J., Nair P. Skeletal muscle P_{O_2} : effect of inhaled and topically applied O_2 and CO_2 . — Amer. J. Physiol., 1970, v. 218, № 5, p. 973.
- White E. C. An apparatus for continuous gas analysis. — J. Amer. Chem. Soc., 1928, v. 50, № 8, p. 2148—2154.
- Whitmore R. L. Physiology of the Circulation. Oxford, 1968.
- Whittaker S. R. F., Winton F. R. The apparent viscosity of blood flowing in the isolated hind limb of the dog and its variations with corpuscular concentration. — J. Physiol., 1933, v. 78, № 3, p. 339—369.
- Whittlesey R. E. Dynamic changes in arterial pressure pulses produced by simulated saccular aneurysm. — Amer. J. Physiol., 1952, v. 168, № 1, p. 192—199.
- Wiggers C. T. Influence of vascular factors on mean pressure, pulse pressure and phasic peripheral flow. — Amer. J. Physiol., 1938, v. 123, № 3, p. 644—658.

- W i n t e r s t e i n H. Überleben eines menschliches Fötus bei Künstlicher
Durschspülung. — Zbl. Physiol., 1914, Bd. 28, № 12, S. 728.
- W r i g h t D. L., S o n n e n s c h e i n R. R. Relations among activity,
blood flow and vascular state in skeletal muscle. — Amer. J. Physiol.,
1965, v. 208, № 4, p. 782—789.
- W r i g h t G. W., P h e l p s K. Comparison of procedures for increasing
blood flow to limbs using improved optical plethysmograph. — J. Clin.
Invest., 1940, v. 19, № 2, p. 273—283.
- Z u h d i N., M c C o l l o u g h B., C a r e y J., G r e e r A. Double
helical reservoir heart-lung machine. — Arch. Surg., 1961, v. 82, № 2,
p. 320—325.

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
Предисловие	3
Введение	5
Глава I. История и задачи метода культивирования изолированных органов	8
Раздел 1. История культивирования органов	8
Раздел 2. Современное состояние проблемы культивирования органов: достижения и узловые задачи, подлежащие решению	15
Глава II. Техника культивирования изолированных органов	27
Раздел 1. Задача создания системы управляемого культивирования органов	27
Раздел 2. Выбор параметров регулирования для системы управляемого культивирования органов	32
1. Транспорт кислорода	32
2. Поддержание постоянства рН и транспорт углекислоты	58
3. Осмотическое равновесие	71
4. Температура	74
5. Определение функциональной активности и состояния тканей перфузируемого органа	83
6. Проблема регенерации химического состава крови (перфузата)	98
7. Адекватная перфузия как метод управляемого культивирования органов	105
8. Проблема объединения контуров регуляции и слежения по отдельным параметрам в систему	130
Глава III. Методика культивирования изолированных органов	135
Раздел 1. Методика проведения экспериментов с культивируемыми изолированными органами	135
1. Подготовка системы к перфузии. Методика запуска системы и обеспечение ее функционирования	146
Раздел 2. Частные методики	149
1. Культура почки	149
2. Культура печени	154
3. Культура костного мозга	156
4. Культура селезенки	158
5. Мультиорганные культуры	160
Глава IV. Перспективы метода культуры изолированных органов	166
Литература	174

**Иосиф Исаевич Гительзон, Владимир Прокопьевич Нефёдов,
Владимир Александрович Самойлов**

КУЛЬТУРА ИЗОЛИРОВАННЫХ ОРГАНОВ

В серии: Методы физиологических исследований

Утверждено к печати Научным советом по комплексным проблемам физиологии человека и животных Академии наук СССР

Редактор издательства А. А. Антонова. Художник Я. В. Таубвурцель.
Технический редактор Р. А. Кондратьева. Корректоры З. В. Гришина,
А. Х. Салтанова

Сдано в набор 14/II 1977 г. Подписано к печати 11/V 1977 г. Формат 60×90^{1/16}.
Бумага № 3. Печ. л. 12^{1/4} = 12,25 усл. печ. л. Уч.-изд. л. 13,61. Изд. № 6408.
Тип. зак. № 1780. М-17330. Тираж 2350. Цена 1 р. 32 к.

Ленинградское отделение издательства «Наука»
199164, Ленинград, В-164, Менделеевская линия, д. 1

1932r.