

О ПУТЯХ И СРОКАХ ВЫВЕДЕНИЯ ПЕРФТОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ (ПФОС) ИЗ ОРГАНИЗМА ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

Н.Л.Крылов, В.В.Мороз, Г.Р.Иваницкий, А.М.Голубев, Е.И.Маевский

ГВКГим. Н.Н.Бурденко, Москва, НИИОР РАМН, Москва, ИТЭБ РАН, Пущино.

Перфторан, являясь кровезаменителем с функцией транспорта кислорода, широко применяется при острой и хронической гиповолемии, нарушении микроциркуляции, для коррекции тканевого газообмена и метаболизма при кровопотере, шоке различной этиологии, интоксикациях, нарушениях коронарного и мозгового кровообращения, для противоишемической защиты донорских органов, кардиоплегии, регионарной перфузии [2, 4-7].

Появившиеся в последние годы данные позволяют более детально рассмотреть вопрос о сроках выведения перфторуглеродов из организма животных и человека. В данном сообщении представлены результаты морфологических исследований органов экспериментальных животных и впервые - органов больных, умерших от различных заболеваний, которым прижизненно вводили перфторан.

Материал и методы исследования

Морфологическому и газохроматографическому исследованию подвергнуты внутренние органы более 700 экспериментальных животных (крыс и кроликов). Животным замещали 50-60% объема циркулирующей крови эмульсией перфторан. В 70 экспериментах перфторан вводили внутрибрюшинно. Продолжительность экспериментальных исследований колебалась от 1 сут до 1 г. Исследовались органы больных людей (49 наблюдений), причиной смерти которых были злокачественные новообразования, болезни сердца, сосудистой системы, желудочно-кишечного тракта и др. (табл. 1). Больным прижизненно с целью улучшения оксигенации, реологических свойств крови и детоксикации вводили от 400 до 3200 мл перфторана. Сроки наблюдения составили от одного дня до 6,5 мес, у одного больного до 2 лет. Перфторан вводили 26 больным внутривенно: одноразово в дозе от 400 до 1750 мл во время операций или в послеоперационном периоде; 12 больным дважды в суммарной дозе от 800 до 1000 мл с интервалом 2-3 сут; 7 больным - трижды в суммарной дозе 1100 и 1900 мл с интервалом от 1-9 сут; 3 больным - 4-кратно в дозе по 400 либо 600 мл с интервалом в 1-3 сут и одной больной - 6 раз в дозе по 400 мл, всего 2400 мл с интервалом 2-15 сут.

Для газохроматографического исследования содержания перфторуглеродов ткани обрабатывали по методике Яманочи [8]. Анализ проводили на газовом хроматографе "Хром-4" с пламенно-ионизационным детектором. Применялись следующие методы морфологического исследования: окрашивание срезов гематоксилин-эозином, суданом-3, ШИК-реакция, реакция на суммарный белок, нуклеиновые кислоты, цитологические и морфометрические методы исследований [3].

Результаты исследования

1. Экспериментальные данные. Газохроматографический анализ биологических жидкостей и органов экспериментальных животных свидетельствует о том, что из кровеносного русла крыс 50% перфторорганических соединений (ПФОС), входящих в состав перфторана, выводится в течение 8 ч. Через 3 сут в крови ПФОС практически не определяются. В органах, в которых ПФОС задерживаются более длительно (в печени и селезенке кумулируются около 1/3 дозы ПФОС, введенных в организм), наблюдается следующая динамика их выведения. ПФД из печени и селезенки выводится полностью в течение 2 мес, а через 1 мес после введения перфторана в этих органах определяется 0,5%

ПФД от введенной дозы. Через 2 мес в печени и селезенке содержится 8%, а через 6 мес - 2% ПФМЦП от введенной дозы. Через 8 мес ПФМЦП в этих органах газохроматографическим методом не определяется.

Отмечена четкая корреляция сроков выведения ПФОС в зависимости от введенной дозы. Так, после введения эмульсии перфторан в дозе 10,8 ПФОС на 1 кг массы тела, срок выведения ПФОС из организма составляет 20 мес. При введении эмульсии с содержанием ПФОС 1,92 г/кг массы тела выведение перфторуглеродов из организма животных осуществляется в течение 8 мес. В перерасчете на перфторан, содержащий 10 об.% ПФОС, это составляет в первом случае около 100 мл эмульсии на 1 кг массы тела, а во втором - 20 мл.

Значительная часть ПФОС (около 80%) выводится легкими [1]. Определенная роль в выведении ПФОС принадлежит клеткам печени. Другая часть перфторорганических соединений поглощается системой мононуклеарных фагоцитов селезенки, печени, костного мозга, легких, лимфатических узлов.

Таблица 1 Локализация перфторофагов в органах больных людей, которым был а/в введен перфторан

| Инициалы больных, возраст, диагноз | Количество введенной в/в эмульсии перфторан, мл | Длительность наблюдения | Органы, в которых выявлены перфторофаги |
|--|--|-------------------------|---|
| С., ИБС, 71 год | 1800 | 1 сут | Легкие |
| К., язвенная болезнь 12 ПК, 61 год | 700 | 2 сут | Легкие |
| С., рак прямой кишки, 70 лет | 700 | 2 сут | Нет |
| С., холецистит, 76 лет | 700 | 2 сут | Нет |
| В., опухоль головного мозга, 66 | 900 | 4сут | нет |
| К., язвенная болезнь 12ПК, 48 лет | 1750 | 5 сут | Нет |
| К, синдром Лериша, 48 лет | 500 | 5 сут | Легкие |
| Б., рак желудка, 59 лет | 900 | 5 сут | Нет |
| Т., хронический гломерулонефрит, 63 года | 740 | 6 сут | Легкие |
| Г., рак желчных протоков, 39 лет | 1000 | 7 сут | Нет |
| З., панкреатит, 72 года | 1950 | 9 сут | Нет |
| Ч., рак прямой кишки, 58 лет | 1100 | 10 сут | Рыхлая соединительная ткань в зоне операции |
| К., болезнь Вебера-Кристчена, 26 | 400 | 11 сут | Нет |
| К., атеросклероз аорты, 62 года | 1900 | 20 сут | Нет |
| Л., гангренозный аппендицит, 21 год | 2200 (в т.ч. за сутки до смерти введено 600 мл эмульсии перфторан) | 22 сут | Легкие |
| С., перелом шейки бедра, 88 лет | 700 | 25 сут | Нет |
| К., рак яичников, 42 года | 3400 | 35 сут | Нет |
| Ш., атеросклероз аорты, 39 лет | 1700 | 37 сут | Нет |
| Л., опухоль головного мозга, 27 | 800 | 2 мес | Нет |
| И., облитерирующий атеросклероз сосудов нижних конечностей, 49 | 1200 | 4 мес | Нет |
| Д., флегмоноз, аппендицит, 80 лет | 400 | 8 сут | Нет |
| С., хр. пиелонефрит, 69 лет | 400 | 11 сут | Нет |
| П., спаечная непроходимость кишечника, перитонит, 87 лет | 400 | 2 сут | Нет |
| М., разлитой перитонит, множественные свищи после аппендэктомии, 34 года | 200 | 20 сут | Нет |
| Г., абсцесс правой ягодичной области, множественные абсцессы печени, сепсис, 18лет | 300 | 66 сут | Нет |

| | | | |
|---|------|---------|--------|
| В., о. кишечн. непроходимость, ущемл. пах-мошоночн. грыжа, 79 лет | 900 | 8 сут | Нет |
| Г., ЗЧМТ, 19 лет | 600 | 21 сут | Нет |
| Д., закрытый перелом правого бедра | 400 | 19 сут | Нет |
| В., о. панкреатит, 80 лет | 300 | 30 сут | Нет |
| Б., о. панкреатит, жировой панкрео-некроз, 67 лет | 1500 | 10 сут | Нет |
| М., рак сигмовидной кишки, 77 лет | 800 | 10 сут | Нет |
| О., расслаивающая аневризма брюшного отдела аорты, 73 лет | 2100 | 5 сут | Нет |
| Л., гемор. инсульт, ГБ, 63 лет | 400 | 4 сут | Нет |
| П., о.инфекционный полирадикулоневрит, 23 лет | 400 | 28 сут | Нет |
| М., опухоль левой почки, 37 лет | 600 | 3 сут | Легкие |
| М., рак прямой кишки 4 ст., 52 лет | 300 | 6,5 мес | Нет |
| Л., о.калькуль.перфторатив. холецистит | 300 | 5 сут | Нет |
| М., интоксикация, о.сердечн. недостаточность, менингокок, инфекция, | 400 | 1 сут | Легкие |
| М., язвен.болезнь желудка, 61 лет | 2400 | 1,5 мес | Нет |
| К., рак правой почки, 55 лет | 800 | 3 мес | Нет |
| М., тотальный панкреонекроз, 70 лет | 800 | 7 сут | Нет |
| М., сочет.травма груди, живота и конечностей, 39 лет | 1000 | 3 сут | Легкие |
| Б., рак яичников, 50 лет | 600 | 3 мес | Нет |
| У., перфар.язва 12 п.к., 75 лет | 700 | 17 сут | Нет |
| Д., облитер.атероскл. артерий пр.н/конечн., 61 лет | 1250 | 2 года | Нет |
| Ф., рак почки, 71 лет | 800 | 5 мес | Нет |
| С., рак верхней доли левого легкого, 47 лет | 400 | 40 сут | Нет |
| С., опухоль головного мозга, 62 лет | 1200 | 12 сут | Нет |
| Ч., хронический гломерулонефрит, ХПН, 49 лет | 2100 | 3 сут | Легкие |

Цитоплазма макрофагов, фагоцитировавших ПФОС, становится вакуолизированной (рис.1). Захват частиц перфторуглеродов приводит к образованию в клетках многочисленных "перфторосом", которые затем перемещаются в апикальную часть макрофагов, граничащую с просветами поверхности ткани [9]. Далее следует выброс перфторуглеродов путем экзоцитоза. При анализе паренхиматозных клеток отмечено включение ПФОС в гепатоциты.

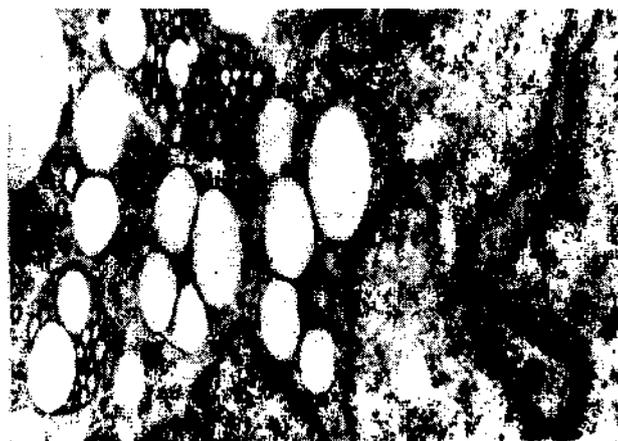


Рис. 1. Вакуолизированная цитоплазма макрофага, содержащего перфторорганические соединения. Электронограмма x 20000

Наибольшее количество макрофагов, кумулировавших ПФОС, которые мы обозначили как перфторофаги [3], обнаруживается в селезенке и печени. Значительно меньшее количество макрофагов, содержащих ПФОС, выявляется в лимфатических узлах. У экспериментальных животных перфторофаги постоянно обнаруживаются в межальвеолярных перегородках легких. В легких перфторофаги выявлялись преимущественно в первые 7 сут после введения перфторана, а через 2 мес от начала наблюдения они отсутствовали. Единичные макрофаги, фагоцитировавшие ПФОС, встречались в тимусе, корковом слое надпочечников, островках Лангерганса поджелудочной железы. Через 1-2 мес перфторофаги в указанных органах не обнаруживались.

В селезенке и печени у экспериментальных животных перфторофаги образуют скопления, формирующие гранулемы, которые постепенно замещаются лимфомакрофагальными элементами (рис. 2, 3). Число перфторофагов постоянно уменьшается, и через 6-8 мес в этих органах макрофаги с вакуолизированной цитоплазмой практически не обнаруживаются. В последующие сроки в органах, содержащих перфторофаги, не отмечается дистрофических изменений, пролиферации паренхиматозных клеток, появления атипичных клеток, формирования склероза (рис. 4). По всей видимости, макрофаги, содержащие ПФОС, мигрируют по кровеносной и лимфатической системе, достигают легких, где и выводят ПФОС посредством экзоцитоза. Подсчет объемной доли перфторофагов в печени и селезенке крыс свидетельствует о постоянном снижении величины объемной доли, занимаемой перфторофагами в этих органах. Данные морфологического исследования хорошо согласуются с результатами газохроматографического анализа.

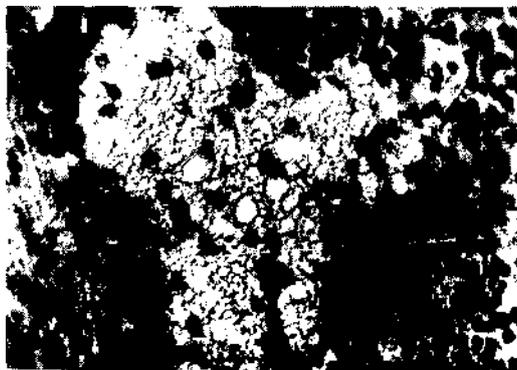


Рис.2. Скопление вакуолизированных макрофагов в селезенке крысы через 7 дней после внутривенного введения эмульсии перфторан. Окрашивание гематоксилин-эозином x 80



Рис.3. Макрофагальная гранулема в печени крыс через 2 мес после внутривенного введения эмульсии перфторан. Отмечается частичное замещение вакуолизированных макрофагов, содержащих ПФОС, лимфоидными клетками. Окрашивание гематоксилин-эозином x 200

При внутрибрюшинном введении крысам эмульсии перфторан отмечается иной характер распределения перфторофагов в организме экспериментальных животных. В первые трое суток, как показывают цитологические исследования, в брюшной полости появляется большое количество макро- и микрофагов, кумулирующих ПФОС, в результате чего в их цитоплазме обнаруживается большое количество вакуолей. В последующем эти клетки покидают брюшную полость и с током лимфы достигают легких. В результате в первые 7 сут эксперимента в межальвеолярных перегородках легких обнаруживаются макрофаги с вакуолизированной цитоплазмой, располагающиеся одиночно или небольшими группами. Некоторые макрофаги с вакуолизированной цитоплазмой выявляются в просвете альвеол. При внутрибрюшинном введении перфторана в селезенке, печени и других внутренних органах перфторофаги не обнаруживаются. По всей видимости, важное значение в данном случае имеет особенность миграции ПФОС (лимфатическая система), а их концентрация в кровеносном русле является невысокой.

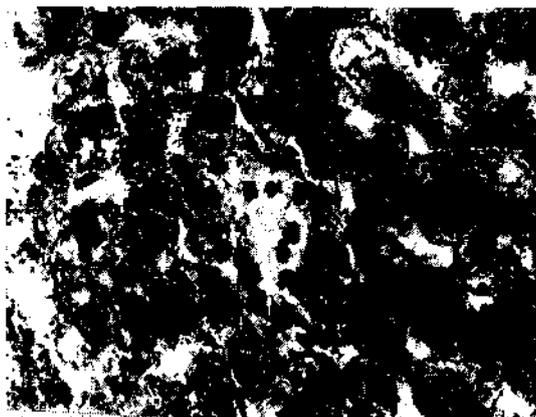


Рис. 4. Заключительная стадия регрессии макрофагальной гранулемы в печени крысы через 6 мес после внутривенного введения эмульсии перфторан. Отсутствует формирование соединительной ткани в участке локализации гранулемы. Окрашивание гематоксилин-эозином x 200

Таким образом, данные литературы и наши исследования свидетельствуют о том, что различные перфторорганические соединения, входящие в состав эмульсии перфторан, с неодинаковой скоростью выводятся из организма экспериментальных животных [3]. ПФД покидает органы (печень и селезенку) в течение 2 мес после введения животным больших доз перфторана в результате замены 50-60% объема циркулирующей крови. ПФМЦП выводится из указанных органов в течение 6-8 мес. Через 3-5 сут после внутривенного введения перфторана 40% ПФОС выводится через легкие. Другая часть ПФОС элиминируется печенью с желчью. Длительность этой фазы составляет 2-3 мес. Та часть ПФОС эмульсии перфторан, которая фагоцитируется системой мононуклеарных фагоцитов, выводится из организма экспериментальных животных в течение 6-8 мес. Наиболее быстро ПФОС покидают легкие (через 2 мес) и более длительно содержатся в селезенке (до 8 мес). Из крови ПФОС удаляются в течение 3 сут. По данным литературы [1], в желчи следы ПФД определяются через 30 дней, а через 60 дней ПФД в желчи не выявляется. ПФМЦП в желчи в небольших количествах обнаруживается через 3 мес от начала эксперимента.

По скорости выведения перфторосом (или перфторофагов) из органов экспериментальных животных в зависимости от вида ПФОС их можно расположить в следующем порядке: легкие, тимус, лимфоузлы, костный мозг, печень, селезенка.

На пути миграции ПФОС в организме животных существенное влияние оказывает способ введения эмульсии. При внутрибрюшинном введении эмульсии перфторофаги с током лимфы попадают в легкие, где и выявляются в течение первой недели эксперимента. При таком способе введения перфторана перфторофаги в селезенке и печени не обнаруживаются. По всей видимости, ПФОС достигают кровотока в низкой концентрации,

что и отражается на их распределении в органах.

2. Клинические наблюдения. В данном сообщении впервые приводятся результаты морфологического исследования органов больных людей, которым внутривенно вводился перфторан.

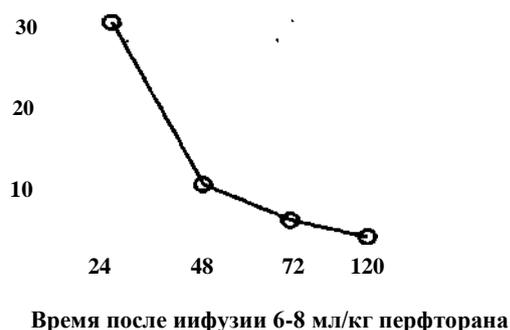


Рис. 5. График 1. Динамика концентрации перфторана в крови больных

Анализ проведен с точки зрения выявления перфторофагов в органах, содержащих большое количество мононуклеарных фагоцитов. Из 49 больных 15 страдали злокачественными новообразованиями, 7 - заболеваниями сердечно-сосудистой системы, 10 - болезнями желудочно-кишечного тракта, 3 - хроническим гломерулонефритом и пиелонефритом, 2 - переломом бедра, 1 - болезнью Вебера-Кристчена, 3 - панкреатитом, 1 - абсцессом печени, 1 - закрытой травмой головного мозга, 1 - острым менингитом, 1 - геморрагическим инсультом, 1 - сочетанной травмой органов груди и живота, 1 - инфекционным полирадикулоневритом, 1 - острым перфоративным холециститом, 1 - менингококковой инфекцией. Сроки наблюдения 37 больных составили от 1 сут до 1 мес и у 12 больных от 1 мес до 2 лет. Количество введенного внутривенно перфторана колебалось от 400 до 3400 мл (см. табл. 1). Во всех случаях причинами смерти явились тяжесть и характер основного заболевания и его осложнения.

ПФОС, входящие в состав эмульсии перфторан, циркулируют в кровеносном русле человека несколько суток. После введения 6-8 мл/кг веса перфторана внутривенно через 24 ч в кровотоке циркулирует около 30%, через 48 ч - 13%, а через 120 ч - менее 1% ПФОС (рис. 5. график 1).



Рис. 6. Вакуолизированные макрофаги в просвете бронха. Окрашивание гематоксилин-эозином x 400

Результаты морфологического исследования свидетельствуют о том, что в органах, содержащих большое количество макрофагов (селезенка, печень), перфторофаги не обнаруживались. Макрофаги с вакуолизированной цитоплазмой выявлялись в легких в

первые 1-6 сут после введения перфторана. Эти макрофаги локализовались в стенках и просветах альвеол (рис. 6). В частности, аналогичные макрофаги обнаружены у больного, причиной смерти которого явились осложнения гангренозного аппендицита, и которому в общей сложности в течение 22 сут было введено 2200 мл перфторана, в том числе за сутки до летального исхода было введено 60 мл перфторана. В одном случае перфторофаги были обнаружены у больной, перенесшей операцию по поводу рака прямой кишки и которой было перелито 110 мл перфторана. В последнем случае перфторофаги были выявлены в рыхлой соединительной ткани, формирующейся в зоне операции: макрофаги располагались небольшими группами или одиночно (рис. 7).

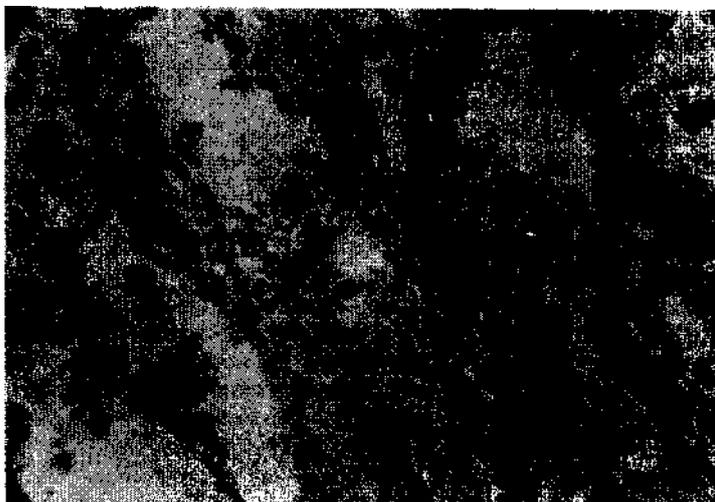


Рис. 7. Вакуолизованные макрофаги в рыхлой соединительной ткани. Окрашивание гематоксилин-эозином $\times 400$

Эти исследования свидетельствуют о том, что распределение и сроки выведения ПФОС из органов больных людей, которым внутривенно вводили перфторан, имеют иной характер. В отличие от экспериментальных животных в печени и селезенке людей перфторофаги не обнаруживались. В межальвеолярных перегородках легких выявлялись макрофаги с вакуолизированной цитоплазмой в течение первой недели после внутривенного введения перфторана. Возможно, эти макрофаги содержат вакуоли ПФОС и являются перфторофагами. По всей видимости, у человека функционирует мощная система выведения ПФОС легкими и печенью (с желчью), позволяющая в короткие сроки удалить из организма перфторорганические соединения. В этом случае элиминация ПФОС из кровотока системой мононуклеарных фагоцитов с последующим их распределением в печени, селезенке, костном мозге и формированием гранул не имеет существенного значения.

Поскольку перфторуглероды являются химически устойчивыми, а в организме млекопитающих не существует ферментных систем, способных подвергать фторуглероды метаболическим превращениям, скорость метаболизма в данном случае не влияет на скорость их выведения [11]. Перфторированные соединения покрыты "шубой" из фтора, имеют нейтральный заряд и слабые межмолекулярные взаимодействия, что делает жидкие перфторуглероды по их физическим свойствам весьма похожими на газ. Возможно, основным органом, через который удаляются из организма млекопитающих перфторуглероды, являются легкие. Среди поверхностей организма, контактирующих с внешней средой, наибольшую поверхность имеют именно они. Например, в обоих легких взрослого человека находится свыше 700 млн. альвеол, общая дыхательная поверхность которых около 90 м^2 , т.е. примерно в 45-50 раз больше других поверхностей тела, контактирующих с внешней средой. Для сравнения поверхность кожи человека составляет всего $1,5-2 \text{ м}^2$, поверхности других, контактирующих с внешней средой органов, на порядок меньше. К тому же необходимо учесть и наличие принудительной вентиляции легких в процессе дыхания. Через кожу человека во внешнюю среду может выделяться не более 1-2%

перфторуглеродов.

Поскольку перфторуглероды частично растворяются в липидах, то наряду с учетом поверхностей выведения для более точной оценки необходим учет вариаций фосфолипидов по различным видам животных и их органам, а также сродство этих мембран к перфторуглеродам, используемым в кровезамещающей эмульсии.

Тем не менее, приведенные данные свидетельствуют о том, что перфторуглероды покидают организм человека с иной скоростью, возможно, быстрее, чем организм мелких лабораторных животных. Поэтому распространенное мнение (опирающееся на эксперименты на крысах и кроликах), что перфторуглероды длительное время задерживаются в организме человека, нуждается в серьезной проверке. Необходимо проведение исследований по изучению механизма выведения ПФОС из биологических жидкостей и органов человека с использованием газохроматографического метода с учетом биофизики процесса. Экстраполяция на человека данных, полученных на мелких лабораторных животных, необоснованна. С учетом вышеизложенного материала необходимо внести соответствующие поправки в статью Фармакологического комитета относительно сроков выведения ПФОС из организма человека.

Выводы

1. При внутривенном введении больших доз перфторана экспериментальным животным (замещение 50-60% ОЦК) ПФОС из крови выводятся в течение 3 сут.

2. Из органов экспериментальных животных ПФОС, входящие в состав эмульсии перфторан, выводятся в сроки от 2 (легкие) до 6-8 мес (печень, костный мозг, селезенка). Отмечается полная корреляция между газохроматографическим и морфологическими методами исследования.

3. Одним из механизмов элиминации ПФОС из крови экспериментальных животных является их фагоцитоз системой мононуклеарных фагоцитов с образованием в печени и селезенке агрегатов (гранулем) из макрофагов (перфторофагов) содержащих ПФОС.

4. Количество перфторофагов в органах в течение всего периода наблюдения неизменно уменьшается, и через 6-8 мес они не обнаруживаются, не оставляя после себя структурных изменений.

5. После внутрибрюшинного введения эмульсии перфторан ПФОС обнаруживается в легких и практически отсутствует в тканях печени, селезенки и костного мозга.

6. Введение перфторана внутривенно больным в целях коррекции гемодинамических нарушений и гипоксических состояний не приводит к образованию в органах макрофагальных гранул. Макрофаги, содержащие вакуоли в цитоплазме и кумулирующие, по всей вероятности, ПФОС, обнаруживаются в легких лишь в течение первой недели после внутривенного введения перфторана.

7. При внутривенном введении эмульсии перфторан в дозе 6-8 мл/кг веса ПФОС в кровеносном русле человека циркулируют около 120 ч.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Апросин Ю.Д., Рыболовлев Ю.Т., Афонин А.И.* Исследование некоторых фармакокинетических характеристик эмульсий фторуглеродов // Медико-биологические аспекты изменения эмульсий перфторуглеродов. Пущино, 1983. С. 96-101.

2. *Воробьев С.И., Иваницкий Г.Р., Макаров К.Н., Мороз В.Н.* Перфторуглеродные эмульсии. Пущино, 1993. С. 33-46.

3. *Голубев А.М., Белоярцев Ф.Ф., Васильев А.Э., Покровский Ю.Э.* Реакция биологических систем при замещении крови эмульсиями фторуглеродов. М.: ТЭИС, 1993.

4. *Иваницкий Г.Р., Белоярцев Ф.Ф.* О развитии фундаментальных и прикладных исследований по проблеме "Перфторуглероды в биологии и медицине в СССР"//Медико-

биологические аспекты изменения эмульсий перфторуглеродов. Пушино, 1983. С.9-38.

5. Крылов Н.Л., Мороз В.В., Белоярцев Ф.Ф. Применение фторуглеродного кровезаменителя - перфторана в клинике // Военно-медицинский журн. 1985. № 8, С. 36-40.

6. Крылов Н.Л., Мороз В.В. Опыт клинического применения перфторана - кровезаменителя на основе перфторуглеродов // Физико-химические и клинические исследования перфторорганических соединений. Пушино, 1994. С. 33-50.

7. Мороз В.В., Крылов Н.Л. Некогда спорные, но сегодня решенные вопросы применения перфторана в клинике // Перфторорганические соединения в биологии и медицине. Пушино, 1999 г. С. 25-31.

8. Склифас А.И., Шibaев Н.В., Брустовецкий Н.А., Маевский Е.И. Содержание перфторуглеродов в органах животных после замещения массивных кровопотерь эмульсиями ПФОС // Медико-биологические аспекты применения эмульсий перфторуглеродов. Пушино, 1983. С. 90-95.

9. Шibaев Н.В., Попов В.И., Аллахвердов Б.Л. Ультраструктурный анализ внутриклеточного накопления и выведения ПФОС // Медико-биологические аспекты применения ПФОС. Пушино, 1983. С. 175-186.

10. Fluorin Chemistry (Ed. J. H. Simons). V.5 N.Y., Lond. Acad. Press. 1964.

11. Comparative animal Physiology (Ed. C. L. Prosser). W. B. Saunder Corn. Philadelphia, London, Toronto, 1973.