О. Сыт

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ И ПЕРЕОХЛАЖДЕНИЯ

BIOLOGICAL EFFECTS OF FREEZING AND SUPERCOOLING

by

AUDREY U. SMITH
D.Sc., M.B., B.S.
National Institute for Medical Research,
Mill Hill, London

EDWARD ARNOLD (PUBLISHERS) LTD
LONDON, 1961

О. СМИТ

Биологическое действие ЗАМОРАЖИВАНИЯ *и* ПЕРЕОХЛАЖДЕНИЯ

Перевод с английского
Э. И. ГРОССМАН

Под редакцией и с предисловием
проф. В. А. НЕГОВСКОГО

ИЗДАТЕЛЬСТВО
ИНОСТРАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ
Москва 1963

Книга посвящена одной из актуальных проблем современной медицины и биологии — возможности использования низких температур для сохранения физиологической активности отдельных клеток, тканей и даже целого организма. В ней на основании работ самого автора и новейших литературных данных описаны методы переохлаждения различных тканей и жидкостей организма, после которого их жизнеспособность может быть восстановлена.

Предназначена для научных работников в области медицины, биологии и зоотехнии.

Редакция биологической литературы

ПРЕДИСЛОВИЕ К РУССКОМУ ИЗДАНИЮ

Книга «Биологическое действие замораживания и переохлаждения» написана видным английским биологом Одри Смит, отдельные работы которой уже печатались в советских журналах. О. Смит принадлежит заслуга выявления защитных свойств глицерина при консервации живых клеток и тканей с помощью очень низких температур. Эти защитные свойства глицерина она с успехом использует в своих опытах по замораживанию и длительному хранению эритроцитов, бычьих сперматозоидов и других клеток, применяя при этом разработанную ею совместно с К. Полджем методику охлаждения и оттаивания.

Работы автора настоящей книги в значительной степени перекликаются с исследованиями, проводимыми в различных научно-исследовательских учреждениях нашей страны (Центральном институте переливания крови, Всесоюзном институте животноводства, Всесоюзном институте экспериментальной биологии, Институте глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова и многих других). Результаты этих исследований уже нашли широкое практическое применение. Переливание крови, консервированной в условиях низких температур, использование замороженной спермы в целях искусственного осеменения сельскохозяйственных животных, пересадка консервированных тканей — все эти мероприятия приняты на вооружение современной медицинной и биологией. Опубликовано уже немало работ, в которых сообщается об успешной разработке и применении в Советском Союзе метода длительного хранения замороженной спермы в содержащей глицерин среде при температуре —78°, о поисках способов увеличения продолжительности хранения и выборе оптимальных сред, способствующих выживанию клеток и т. п. В частности, разрабатывается методика консервации сперматозоидов сель-

скохозяйственных животных в жидком азоте при температуре —196°. Большое внимание уделяют советские исследователи и вопросу консервации крови. Еще до начала Великой Отечественной войны в 1938 г. в Ленинградском институте переливания крови был организован «кабинет трупной крови». Тогда же в этом институте была создана установка для лиофилизации плазмы крови и проводились опыты по лиофилизации кожи.

В настоящее время в этой области достигнуты большие успехи. Однако дальнейшее усовершенствование указанных методов и расширение сферы их применения ставят перед исследователями труднейшие задачи. Если в отношении пересадки роговицы глаза благодаря работам академика В. П. Филатова и его учеников удалось добиться блестящих результатов и вернуть зрение многим тысячам людей, если больших успехов добилась медицина в области гомотрансплантации кожной и костной ткани, кровеносных сосудов и т. п., то очень далека еще от разрешения сложная и увлекательная проблема пересадки и замены целых органов. Здесь в первую очередь необходимо преодолеть такую преграду, как тканевая несовместимость, и ключ к решению этой задачи, по-видимому, может быть найден лишь совместными усилиями ученых многих стран. Вместе с тем и в данной области имеются определенные успехи. Представляют интерес работы советского исследователя В. П. Демихова, которому удалось подсадить и приживить собаке второе сердце. Недалеко, возможно, то время, когда благодаря успешному разрешению проблемы тканевой несовместимости замена «вышедших из строя» органов будет зависеть только от наличия какого-то запаса (банка) законсервированных, хорошо сохранившихся органов — трансплантатов. Отсюда огромное значение приобретает выбор наиболее рационального способа хранения предназначенных для трансплантации клеток, тканей, органов. С этой точки зрения работа Одри Смит представляет большой интерес для советского читателя. Автор не только знакомит нас с применяемыми ею методиками замораживания и оттаивания клеток и полученными результатами. Она приводит огромное количество работ других исследователей (главы о замораживании

рыб, насекомых, дрожжевых клеток и др.), обобщая полученные ими данные в области биологического действия охлаждения на живые организмы и на различные водные и физиологические среды. Остается лишь пожалеть, что среди этой обширной литературы не цитируются многие работы советских авторов, сыгравших важную роль в развитии проблемы использования низких температур (Л. К. Лозино-Лозинский, А. Н. Филатов, К. Н. Шамов, С. С. Юдин, В. К. Милованов, Б. И. Бланков, Х. Хабибуллин и др.).

Очень интересны работы автора по оживлению млекопитающих, перенесших клиническую смерть, вызванную глубоким охлаждением. Здесь уместно сказать, что нам кажутся не совсем точными цитированные в книге высказывания английского биолога Паркса: «Смерть представляет собой такое состояние, при котором оживление целого организма существующими в настоящее время средствами невозможно». Смерть, понимая под этим биологическую смерть, всегда будет представлять собой необратимое явление. Ни в настоящее время, ни в будущем человек не будет обладать такими средствами, которые позволят ему «воскрешать» мертвый организм. Следовательно, речь идет о продлении сроков наступившей клинической смерти, т. е. о поисках средств, тормозящих гибель тканей в этот период и увеличивающих продолжительность переходного состояния между жизнью и смертью.

В опытах на крысах, проведенных совместно с югославским ученым Р. Анджусом, а затем в опытах на хомячках О. Смит охлаждала животных на длительный срок до температур, близких к нулю (когда у них полностью прекращались сердечная деятельность и дыхание) и согревала с помощью диатермии или лампы, добиваясь полного восстановления жизненных функций. Эти работы являются как бы одним из звеньев в целой цепи исследований по восстановлению организма, все функции которого были временно прекращены под влиянием глубокого охлаждения.

Книга О. Смит дает новый богатый фактический материал для дальнейшего углубления наших представлений об анабиозе, что имеет не только теоретическое

значение — для познания сущности жизни,— но и прямое практическое значение, и прежде всего для оживления и анестезиологии. К сожалению следует отметить, что хотя автор в ряде мест и цитирует работы русского ученого П. П. Бахметьева, в книге не показана в полной мере его роль как основоположника учения об анабиозе, который еще в конце XIX и в начале XX века проводил опыты по оживлению летучих мышей, подвергшихся глубокому охлаждению. Не упоминается также положение П. П. Бахметьева о значении углекислоты при охлаждении. Между тем именно это положение было использовано впоследствии в ряде исследований по глубокому охлаждению и оживлению млекопитающих как в нашей стране, так и за рубежом. К числу недостатков книги, нам кажется, следует отнести ограниченное использование автором огромной научной литературы, изданной в Советском Союзе за многие годы изучения затронутой в книге проблемы.

Применение низких температур в целях снижения интенсивности происходящих в живых тканях обменных процессов, по-видимому, открывает огромные перспективы для дальнейшего развития ряда отраслей науки. Имеющиеся в настоящее время методики глубокого охлаждения, а также лиофилизации, предназначенные для сохранения исходной жизнеспособности охлаждаемых тканей, еще далеки от совершенства. Как добиться устранения губительного действия внутриклеточной кристаллизации льда, наступающей в процессе замораживания? Какой метод охлаждения и согревания способствует более длительной консервации живых клеток? Такие и многие подобные вопросы возникают при чтении этой интересной книги.

Если даже по вполне понятным причинам мы не находим в монографии О. Смит какого-то готового «рецепта» наиболее эффективных методов, то сама постановка и детальное исследование этих вопросов несомненно представляют собой весьма полезный вклад в изучение проблемы биологического действия замораживания и переохлаждения на живые клетки и ткани.

Москва, 15.IV-63 *В. А. НЕГОВСКИЙ*

ПРЕДИСЛОВИЕ К АНГЛИЙСКОМУ ИЗДАНИЮ

Проблема биологического действия охлаждения привлекала к себе внимание многих выдающихся ученых, и немало наблюдений было сделано на протяжении многих веков. Однако, не считая работы Спалланцани, литература на эту тему вплоть до последних двух десятков лет была крайне скудной и в основном носила анекдотический характер. Конец такому положению вещей положило опубликование в 1940 г. книги Люйета «Жизнь и смерть при низких температурах». С тех пор было проведено огромное количество подробных исследований, посвященных биологическому действию охлаждения. Для многих из них толчком послужили наблюдения Одри Смит и Кристофера Полджа о замечательных свойствах глицерина, защищающего живые клетки от губительного действия замораживания и оттаивания. Современные работы в этой области рассматривались на Симпознумах, организованных Институтом биологии в 1951 и 1958 гг., конференции Лондонского Королевского общества в 1957 г. и различных коллоквиумах Ciba Foundation и т. д. Опубликованные в печати материалы всех этих совещаний представляют большой интерес, но неизбежно содержат лишь отрывочные сведения. Прошло более 20 лет с момента появления в свет первого обстоятельного и разностороннего научного труда, принадлежащего перу крупного специалиста в области биологического действия замораживания и переохлаждения. Эти годы оказались исключительно плодотворными для развития проблемы в целом. И, конечно, особым и заслуженным авторитетом пользуются научные исследования д-ра О. Смит. Она является соавтором открытия защитных свойств глицерина (точнее говоря, «вторичного откры-

тия», если принять во внимание отдельное и мало кому известное наблюдение Ростана, сделанное им несколько лет назад на сперматозоидах лягушки). Она — также соавтор исследования по применению этих свойств глицерина в целях консервации сперматозоидов быка. Д-р Смит первая использовала такую методику для хранения эритроцитов. Ей же принадлежат замечательные исследования, проведенные на золотистых хомячках, охлажденных до температур ниже нуля. Ее вклад в изучение вопроса о биологическом действии низких температур неоценим.

Одна из отличительных черт современной криобиологии заключается в том, что клетки различных типов поразному реагируют на низкие температуры, поэтому все выведенные закономерности могут носить лишь общий характер. Лавлок как-то заметил, что все свое время он тратит на объяснение биофизических положений, уже открытых эмпирически. Даже сейчас мы вынуждены решать большинство вопросов тут же, на месте, в процессе экспериментирования, и в наших практических знаниях существует много пробелов, которые зачастую ставят нас в тупик. Например, до сих пор еще не разработана такая методика замораживания сперматозоидов обычных лабораторных млекопитающих, которая обеспечивала бы сохранение их способности к оплодотворению. Это, в частности, представляет собой серьезное препятствие для использования кроликов, которые являются особенно хорошим объектом для проведения опытов по консервации сперматозоидов in vitro. В отношении же сперматозоидов человека, отличающихся необычайной, хотя и далеко не полной устойчивостью к замораживанию и оттаиванию при исследовании грубыми методами, применение среды, содержащей глицерин, почти не дает никакого улучшения в результатах.

На что же можно рассчитывать в ближайшие десять лет, учитывая стремительное развитие и все умножающиеся достижения науки? Безусловно, все клетки и ткани самых различных типов должны быть подвергнуты криобиологическому испытанию. Значительно расширится, по-видимому, сеть банков для хранения замороженных клеток и тканей, в том числе и костного мозга.

Возможно, удастся сохранять для последующей трансплантации и целые органы. Однако в настоящее время еще нет данных, что хранение при низких температурах поможет преодолеть основное препятствие, а именно иммунологическую реакцию. Создание банков не разрешит также проблемы снабжения нужными органами. Вряд ли в ближайшем будущем можно рассчитывать и на разработку метода неограниченного во времени хранения интактного гомойотермного животного в состоянии приостановленной (с помощью охлаждения) жизни.

Я рекомендую монографию д-ра Смит всем, кого интересует эта область науки, потому что это единственная существующая в настоящее время работа такого рода, в ней систематизировано огромное количество данных, изложенный материал всесторонне проанализирован и принадлежит эта книга перу моего весьма уважаемого коллеги.

Июнь 1961 г. *А. С. ПАРКС*

Глава 1

ВВЕДЕНИЕ

Современные направления в исследовании влияния низких температур

За последние годы физика низких температур достигла огромных успехов. Для создания температуры в пределах одной миллионной градуса абсолютного нуля (0°К или —273°С) использовано явление электронного парамагнетизма. Обнаружены интересные изменения в поведении веществ при очень низких температурах, причем некоторые из них имеют большое практическое значение. Сверхпроводимость металлов при температуре ниже 4°К, вероятно, будет использована при создании малогабаритных электронных вычислительных машин с большим объемом памяти, имеющей минимальное время выборки информации. Применение таких вычислительных машин на спутниках и ракетах облегчит передачу информации на Землю и обеспечит полную автономность управления этими летательными аппаратами. Недалеко то время, когда люди, идя по стопам Гагарина, будут свободно путешествовать в космосе и самостоятельно управлять своими кораблями. Они окажутся, однако, в очень тяжелом положении, если предварительно не будет полностью изучено влияние на организм излучения, невесомости, низких температур и других необычных для нас условий, с которыми человек может столкнуться в космических пространствах и на далеких планетах.

Огромные достижения в области техники, физики и химии, которые сделали возможным исследование космоса с помощью ракет и обеспечили нашу планету но-

выми неисчерпаемыми источниками энергии, в какой-то степени «затмили» успехи, достигнутые в биологических науках. А между тем и в этой области совсем недавно были получены очень важные практические результаты. Например, современные исследования в области физиологии дыхания привели к созданию легких кислородных приборов, которые могут быть использованы в условиях низкого атмосферного давления и низких температур. Благодаря такому прибору, по крайней мере частично, стало возможно покорение Джомолунгмы. Знания о влиянии холода на человека, а также о способах борьбы с ним имели существенное значение для успешных переходов в Антарктике и для проведения там геофизических исследований. Такие знания потребовались и для открытия на Крайнем Севере областей, где хранятся еще не использованные человеком огромные природные богатства.

Много разнообразных сведений относительно физиологических и патологических явлений, возникающих при действии низких температур, собрано в одной ранней монографии Физиологического общества, принадлежащей перу Бартона и Эдхолма [2]. В дальнейшем было опубликовано немало исследований, посвященных механизму устойчивости к холоду у арктических млекопитающих и у людей, проживающих в холодных странах. Процесс адаптации и акклиматизации к холоду изучали не только на животных, но и на людях — участниках экспедиций в Северную Норвегию, Лапландию, Гренландию, Северную Канаду, Аляску, Антарктику и т. п. Кроме того, действие холода на животных и людей исследовали в лабораторных условиях. В результате были получены существенные данные относительно отморожения и его лечения. Поскольку эти данные уже рассматривались в «Annual Reviews of Physiology», а также на ряде конференций, нет никакой надобности вновь на них останавливаться.

В последние годы медицина сильно шагнула вперед. На основе фундаментальных исследований в различных областях биологии и физиологии выявлена сущность многих заболеваний и разработаны методы их лечения. Замечательных успехов добилась и хирургия. Например,

сейчас уже возможно лечить врожденные и приобретенные пороки сердца путем хирургического вмешательства, при котором вскрывают предсердия и желудочки. Прогресс в этой области зависит прежде всего от наших знаний относительно физиологического действия низких температур тела.

У млекопитающих при понижении температуры внутри тела до 20—30° потребление кислорода отдельными тканями и органами также уменьшается. У собак и у человека при температуре тела 28—30° можно выключать сердце примерно на 8 *мин* без какого-либо повреждения головного мозга и других жизненно важных органов в результате прекращения доступа артериальной крови. При этом хирургические операции можно осуществлять на сравнительно обескровленном сердце. Физиологию гипотермии всесторонне изучали, и результаты подробно рассмотрены на конференциях Национальной академии наук [4] и Нью-Йоркской академии наук [16], на двух последних Международных физиологических конгрессах [13, 14] и во многих обзорных работах [3, 5—7, 12, 15, 17]. Поэтому нет никакой необходимости приводить их здесь. Следует только упомянуть о результатах, имеющих отношение к проблеме оживления млекопитающих, охлажденных до таких температур, которые раньше считались летальными и при которых прекращается дыхание и сердечная деятельность. Ряд хирургов, в том числе Кенион, Дрью и Льюис, уже признал, что применение гипотермии в таких условиях дает определенные преимущества (см. гл. 10). Одна из проблем, подлежащих разрешению, заключается в оживлении млекопитающих после частичного замораживания или переохлаждения до температуры внутри тела ниже нуля (см. гл. 10). Это приобретает особую важность в связи с проблемой оживления замерзших людей. Отсюда возникают принципиальные вопросы относительно природы и определения смерти.

Другое достижение современной хирургии заключается в замене обтурированных или поврежденных артерий трубками из синтетических материалов (терилена, тефлона и т. п.) или же лиофилизированными, а затем увлажненными человеческими артериями. Можно также

пересаживать и кости после лиофилизации. Трансплантаты такого типа представляют собой благоприятную среду, в которой разрастаются клетки хозяина, причем наличие живых клеток в имплантируемом материале не обязательно. В противоположность этому хорошие функциональные результаты при пересадке роговицы, вероятно, зависят от жизнеспособности клеток в пересаживаемой ткани. В связи с этим проблема хранения тканей в живом виде приобретает большое практическое значение. Охлаждение до температур чуть выше нуля удлиняет срок жизни клеток роговицы, кожи и других тканей, но не допускает длительного их хранения. Ранние попытки сохранить живыми ткани млекопитающих при низких температурах потерпели неудачи.

Сроки хранения скоропортящихся пищевых продуктов значительно увеличились благодаря охлаждению их до температур от —20 до —40°. Однако при этом сохранялись лишь вкусовые качества продукта, но не жизнеспособность растительных и животных тканей.

Новые перспективы открылись перед исследователями в связи с выявлением защитных свойств глицерина против летального действия низких температур на сперматозоиды птиц и быков при замораживании, хранении и оттаивании. В скотоводстве глицерин уже нашел широкое применение (см. гл. 2). Затем его стали использовать для продолжительного хранения при низких температурах кровяных клеток млекопитающих (см. гл. 3). К сожалению, еще не удалось добиться успеха в применении данного метода для сохранения изолированных яиц млекопитающих (см. гл. 5). Тем не менее какое-то число яиц, развивающихся в ткани яичника, переживает воздействие низких температур, а в трансплантатах обработанной глицерином ткани яичника, хранившейся много месяцев при низких температурах, восстанавливается эндокринная активность и способность к овуляции (см. гл. 6). На основании этого были разработаны методы хранения тканей других эндокринных органов в целях последующей пересадки их животным. Теперь аналогичные методы с успехом используют при консервации для нужд хирургии роговицы, костного мозга и других тканей человека (см. гл. 7). Кроме того, глицерин облегчает сохранение при низкой температуре некоторых простейших. До настоящего времени ряд болезнетворных микроорганизмов удавалось сохранять в живом состоянии только с помощью крайне трудоемкой методики пересева культур или же путем прививки их животным (см. гл. 4).

Многие более сложные виды пойкилотермных животных в зимнее время подвергаются воздействию сильного холода в природных условиях. Исследование механизма выживаемости представляет большой интерес с точки зрения как экологии в целом, так и общей физиологии. До недавнего времени полагали, что выживаемость морозоустойчивых насекомых зависит от их способности при переохлаждении впадать в спячку. Теперь же известно, что бо́льшая часть воды в организме зимующих куколок и личинок вымерзает. Крайне интересно, что у некоторых морозоустойчивых видов обнаружено высокое содержание глицерина (см. гл. 9). Этот факт представляет собой первое связующее звено между устойчивостью животных к замораживанию в естественных условиях и защитой живых клеток и тканей во время хранения их при низких температурах в условиях лаборатории. В настоящее время представляется маловероятным, чтобы глицерин был универсальным защитным средством. Большой интерес поэтому представляет дальнейшее изучение животных литоральной зоны, которые дважды в сутки в течение многих месяцев подвергаются замораживанию и оттаиванию. Когда было установлено, что глубоководные рыбы арктических морей, находящиеся всегда в переохлажденном состоянии, полностью сохраняют жизнедеятельность, в физиологии низких температур возникла еще одна новая концепция (см. гл. 9).

Несмотря на интенсивные исследования, до сих пор не до конца поняты основные причины повреждения живых клеток во время замораживания их до низкой температуры, последующего хранения и оттаивания (см. гл. 12, а также [11]). Неизвестно, всегда ли летально образование кристаллов внутри клеток, и если да, то что вызывает повреждение — сами кристаллы или же остаточная концентрированная жидкость в цитоплазме. При проведении исследований на эритроцитах было

установлено несколько путей, посредством которых глицерин защищает живые клетки от повреждения во время замораживания и оттаивания, но полученные данные применимы не ко всем живым клеткам (см. гл. 3 и 12).

Многие другие нейтральные растворенные вещества оказывают некоторое защитное действие на клетки млекопитающих во время замораживания и оттаивания, однако они более токсичны и менее эффективны, чем глицерин. Тем не менее не исключена возможность, что какое-то другое, еще не испытанное в лабораторных условиях вещество окажется более действенным (см. гл. 12). Если это летучее вещество, его можно удалять вместе с молекулами льда путем возгонки в вакууме при низкой температуре. Клетки, в которых вымерзла вода, теоретически уже высушены. Следовательно, для их потенциальной жизнеспособности безразлично, останутся ли кристаллы льда на месте или их удалят. После удаления кристаллизованной воды материал можно хранить при комнатной температуре, не опасаясь биохимического или биофизического повреждения клеток. Такую методику в течение многих лет успешно применяли для консервации многих видов микроорганизмов. Однако впоследствии установили, что в лиофилизированных препаратах бактерий, в которых находили жизнеспособные клетки, оставалось какое-то остаточное количество влаги и при продолжительном хранении большое число клеток погибало. Позднее метод лиофилизации стали применять для консервации эритроцитов. При восстановлении высушенного материала смесью, содержащей декстран, эритроциты увлажнялись без возникновения гемолиза. Имеется сообщение [10] о выживании сперматозоидов млекопитающих, высушенных согласно той же методике и в том же самом приборе. Остается выяснить, сохраняют ли высушенные клетки жизнеспособность в течение такого же периода времени, какой они переживают при низкой температуре в среде, содержащей глицерин. Во всяком случае, перед исследователями поставлен вопрос, имеющий большое принципиальное значение.

Основной принцип хранения живых клеток заключается в прекращении процесса старения и перерождения. В охлажденных живых клетках биохимические процессы, связанные с дыханием, обменом веществ и всеми другими сторонами взаимодействия между цитоплазмой клеток и окружающей средой, замедляются. При охлаждении клеток примерно до —79°, когда углекислота и другие газы затвердевают или сжижаются, все химические реакции должны или замедлиться во много раз, или же полностью прекратиться. В этом случае процесс старения, по-видимому, подавляется, и клетки можно хранить при этой температуре бесконечно долго. После согревания до нормальной температуры активность клеток полностью восстанавливается, и они доживают положенный им срок при условии, конечно, что не были повреждены ни во время охлаждения, ни во время оттаивания. В конце XIX в. ученые имели уже в своем распоряжении жидкий воздух и жидкий водород и с успехом использовали их для хранения бактерий и семян (см. гл. 4). В обезвоженных живых клетках биохимические взаимодействия, включая связанные с процессом распада, не могут происходить, так как они всегда зависят от присутствия воды. До недавнего времени полагали, что выживание после высушивания возможно только у растительных семян, спор плесневых грибов и бактерий и у некоторых особенно устойчивых бактерий и простейших (в том числе инфузорий) и нематод.

Проблему создания анабиоза, или латентной жизни, путем высушивания, сильного охлаждения и т. п. сравнительно недавно рассмотрел проф. Кейлин [8]. Он обрисовал историю этого вопроса с момента открытия Левенгуком (250 лет назад), что крошечные животные, обитающие в сточных водах, продолжают жить в сухом осадке, остающемся после полного удаления влаги испарением. Их активность восстанавливается, как только этот осадок взвешивают в кипяченой дождевой воде. Когда впоследствии Нидхэм, а затем Бейкер и Спалланцани обнаружили, что безжизненные сухие волокна испорченных семян пшеницы при увлажнении проявляли признаки жизни и активно сокращались, вопрос о сущности жизни и смерти вызвал к себе особый интерес. Более столетия ученые не могли прийти к единому мнению относительно возможности восстановления жизни после полного ее прекращения. Появилось много проти-

воречивых сообщений относительно устойчивости растений и животных к сильному холоду. Подробный обзор их приведен в классических монографиях Белерадека [1], а также Люйета и Гехенио [9]. Поэтому при описании различных направлений в развитии физиологии и биологии низких температур достаточно будет упомянуть лишь основные исторические вехи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bělehrădek J., Temperature and Living Matter, Protoplasma Monographien, No. 8, Berlin, Borntraeger, 1935.
2. Burton A. C., Edholm O. G. Man in a Cold Environment, Monographs of the Physiological Society, No. 2, London, Edward Arnold, 1955. (А. Бартон, О. Эдхолм, Человек в условиях холода, ИЛ, М., 1957).
3. Cooper K. E., Physiology of hypothermia, Brit. J. Anaesth., **31**, 96—105 (1959).
4. Dripps R. D., The Physiology of Induced Hypothermia. Washington, National Academy of Sciences — National Research Council (1956).
5. Giaja J., La Physiologie de la profonde hypothermie et ses perspectives, Rev. Path. comp., **55**, 690—703 (1955).
6. Gollan F., Physiology of Cardiac Surgery; Hypothermia, Extracorporeal Circulation an Expracorporeal Cooling, Oxford, Blackwell Scientific Publications (1959).
7. Kayser C., Physiological aspect of hypothermia. Ann. Rev. Physiol., **19**, 32—58 (1957).
8. Keilin D., The Leeuwenhoek Lecture. The problem of anabiosis or latent life: history and current concept. Proc. Roy. Soc., B, **150**, 149—191 (1959).
9. Luyet B. J., Gehenio P. M., Life and Death at Low Temperatures. Normandy, Missouri, Biodynamica (1940).
10. Meryman H. T., Kafig E., Survival of spermatozoa following drying. Nature, Lond., **184**, 470—471 (1959).
11. Smith A. U., Effects of low temperature on living cells and tissues. Biological applications of freezing and drying, Chap. I, ed. Harris R. J. C., New York, Academic Press, 1954. (О. Смит, Влияние низких температур на живые клетки и ткани. См. «Применение замораживания — высушивания в биологии», под ред. Р. Харриса, стр. 9—90, ИЛ, М., 1956).

12. Smith A. U., The resistance of animals to cooling and freezing Biol. Rev., **33**, 197—253 (1958).
13. Symposium. Reactions of the non-hibernating homeotherm to hypothermia. XX th int. Physiol Congr., Brussels (1956).
14. Symposium. Hypothermia. XXI st int. Congr. Physiol Sci., Buenos Aires, pp. 70—87 (1959).
15. Virtue R. W., Hypothermic. Anaesthesia. Springfield, Illionois, Thomas (1955).
16. Whitelock O. V. st., Hypothermia, Ann. N. Y. Acad. Sci., **80**, 285—550 (1959).
17. Wylie W. D., Churchill-Davidson H. C., Practice of Anaesthesia, London, Lloyd-Luke (1959).

Глава 2

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЗАМОРОЖЕННЫХ СПЕРМАТОЗОИДОВ

Устойчивость сперматозоидов человека к замораживанию

В 1866 г., когда еще и сам механизм действия сперматозоидов в процессе оплодотворения был совершенно неясен, Мантегацца [62] сообщил, что сперматазоиды человека переживают замораживание при —17°. Он предсказал, что сперму быков и лошадей будут перевозить на большие расстояния, чтобы для более успешного разведения этих животных проводить с ее помощью искусственное оплодотворение. Мантегацца высказал также предположение, что от людей, погибших на поле боя, и после их смерти можно будет получить законное потомство. Эпиграфом к своей статье он поставил изречение: «Honi soit qui mal y pense»[1].

Однако Мантегацца значительно опередил свое время. Только в конце XIX в. биологи для приостановки биохимических изменений стали применять в своих исследованиях достаточно низкие температуры, а искусственное оплодотворение скота широко вошло в практику не ранее 1924 г. [107].

Изложение работы Мантегацца Давенпортом в 1897 г. [15], по-видимому, не привлекло большого внимания современников, хотя в это время уже было поставлено много опытов по изучению воздействия низких температур на живые клетки. Никаких других исследований по

[1] «Да будет стыдно тому, кто дурно об этом подумает» — девиз английского ордена Подвязки. — *Прим. ред.*

замораживанию сперматозоидов не проводили до 1938 г., когда Янель [41] попытался консервировать *Treponema pallidum* при очень низких температурах. Он отметил, что, хотя все спирохеты погибали, часть человеческих сперматозоидов в тех же самых пробах переживала замораживание и последующее хранение при температуре —79, —196 и —269° [41]. Два года спустя результаты Янеля подтвердил Шеттлс, который замораживал неразведенную сперму в капиллярах и обнаружил, что до 10% человеческих сперматозоидов переживали кратковременное охлаждение твердой углекислотой (—79°), жидким азотом (—196°) и жидким гелием (—265°) [105]. При этом наблюдались индивидуальные различия в чувствительности к сильному холоду у сперматозоидов, взятых от различных доноров. В только что взятых пробах от одного и того же донора относительное количество сперматозоидов, переживших пребывание в холодной среде в течение 5 *мин*, было одинаковым независимо от температуры охлаждения (—79, —196 или —269°). Если сперму перед замораживанием выдерживали несколько часов in vitro, относительное количество выживших сперматозоидов в пробах, охлажденных до указанных выше температур, уменьшалось. Уменьшалось оно и в пробах, хранившихся продолжительное время при температуре —79° [105].

Витрификация («остеклененне») сперматозоидов

В 1938 г. Люйет и Ходдэп [56] сообщили о том, что большое число сперматозоидов лягушки оживало после пребывания в жидком воздухе при температуре —192°. Для этого необходимо было обезводить сперматозоиды в крепком растворе сахарозы, а затем очень быстро охладить и согреть микроскопическое количество пробного материала. По мнению авторов, остаточная вода переходила в стекловидное состояние и обратно без образования кристаллов льда, которые, как полагают, убивают живые клетки [52]. У сперматозоидов петуха, частично обезвоженных путем добавления к сперме левулозы, после быстрого замораживания при —76° и от-

таивания при температуре 42—45° восстанавливалась подвижность. Когда пробы в течение многих дней или нескольких месяцев хранили при температуре —76°, оживало около 30% сперматозоидов [104]. Из 48 яиц, снесенных курами, которые были осеменены замороженной спермой, 12, казалось, были оплодотворены, но развитие эмбриона в них, наблюдавшееся невооруженным глазом, продолжалось не более 10—15 *час* [103]. Когда в дальнейшем некоторые исследователи пытались применять методику витрификации человеческой спермы по Люйету, лишь у незначительного числа сперматозоидов, охлажденных до очень низких температур, после согревания восстанавливалась подвижность [38]. Не лучшие результаты были получены в аналогичных опытах со сперматозоидами других млекопитающих.

Паркс частично разъяснил причину различий в результатах предшествующих исследователей. Он показал, что высокий процент человеческих сперматозоидов выживает после охлаждения до —79 или —196° и живет в течение длительного времени лишь в том случае, когда сравнительно большие пробы спермы охлаждают в ампулах или в широких пробирках. Очень быстрое охлаждение микроскопически малых проб в тонких капиллярах или в виде пленки не дает эффекта [77]. Это послужило первым несомненным доказательством того, что быстрое охлаждение и согревание может принести вред сперматозоидам или другим клеткам млекопитающих. Сперматозоиды других млекопитающих не переносили быстрого охлаждения до очень низких температур даже в тех случаях, когда замораживали большие пробы спермы. Однако в то время не видели никакой опасности в само́м сверхбыстром охлаждении. Наоборот, глубоко укоренилось мнение, что основной причиной повреждения живых клеток в процессе замораживания и оттаивания является образование кристаллов льда. Витрификацию же воды при сверхбыстром охлаждении считали весьма существенной для выживания в условиях очень низких температур.

Открытие защитного действия глицерина на птичьи сперматозоиды при низких температурах

В 1948 г. нельзя было рассчитывать на какие-то перспективы в отношении использования низких температур для продолжительной консервации живых клеток. Наши попытки повторить опыты Шаффнера, Хендерсона и Карда [104] по замораживанию птичьих сперматозоидов не имели большого успеха. В пробах спермы, обработанных левулозой и быстро охлажденных в виде тонкой пленки или в капиллярах до температуры —79 или —196°, погибали все сперматозоиды, а при замораживании в ампулах или в маленьких пробирках подвижность восстанавливалась лишь у очень немногих. При окрашивании проб обнаружили, что у большинства сперматозоидов шейка и головка полностью разрушены. Тогда мы поместили концентрированный раствор левулозы в холодильник, а сами стали изыскивать другие методы хранения спермы петуха in vitro. После нескольких месяцев напряженной работы мы так и не добились сохранения оплодотворяющей способности у спермы петуха in vitro в течение более 8—12 *час* при любой температуре выше нуля и поэтому вернулись к проблеме хранения сперматозоидов при низких температурах. Мы извлекли из холодильника колбу с этикеткой «левулоза» и начали опять применять последнюю в качестве разбавителя спермы. Против всяких ожиданий сперматозоиды выживали после охлаждения до температуры —79° и последующего согревания. Между тем свежие растворы левулозы по-прежнему совершенно не оказывали защитного действия против повреждений, вызываемых замораживанием и оттаиванием. Вначале у нас возникло подозрение, что изменения биологических свойств раствора и отсутствие в нем редуцирующих сахаров обусловлены появлением за время хранения плесени. Д-р Д. Эллиот подверг раствор анализу и обнаружил в нем около 10% глицерина и 1% альбумина. Мы были поражены полученными результатами, пока до нашего сознания не дошло, что мы замораживали сперматозоиды в мейеровском белковом растворе,

который ранее применяли для обработки мазков сперматозоидов при подготовке их к окрашиванию и микроскопии. Этот раствор, в который не добавили, как обычно, кристалла тимола, препятствующего росту бактерий и плесени, поместили в холодильник вместе с раствором левулозы. Впоследствии об этом забыли, а во время хранения этикетки с колб, очевидно, упали и их случайно поменяли местами.

Мы проверили отдельно защитные свойства глицерина и яичного альбумина. Пробы спермы петуха разбавили в маленьких пробирках в равных объемах раствора Рингера, содержащего 20—40% глицерина. Затем их погрузили в замораживающие смеси с температурой —79°. После оттаивания у сперматозоидов наблюдалась нормальная подвижность. Морфологически они ничем не отличались от незамороженных контрольных сперматозоидов (фото 1) [1]. Другие пробы разбавили растворами белка, заморозили и согрели аналогично первым. При этом сперматозоиды разрушились и погибли. Не лучше обстояло дело с восстановлением подвижности у сперматозоидов петуха и в тех случаях, когда к раствору Рингера, содержащему глицерин, добавили белок. Ни один сперматозоид не пережил замораживания в растворе Рингера. Отсюда стало ясным, что именно глицерин защищает клетки от повреждений, вызываемых охлаждением до очень низких температур и последующим согреванием.

Интересно, что в присутствии глицерина большая часть сперматозоидов петуха переносила удаление 80—90% воды при низких температурах. Обезвоживание осуществляли путем возгонки в высоком вакууме. При этом температура образца повышалась от —79 до —25°. Предварительные испытания показали, что сперматозоиды кролика не переносят присутствия в обычном разбавителе спермы более 5% глицерина. Лишь немногие из них пережили быстрое охлаждение до —79° и последующее согревание. В то же время относительное количество сперматозоидов человека, перенесших охлаждение до —79°, значительно увеличивалось, когда в разбавитель добавляли 5 или 10% глицерина [91].

[1] Все фото см. в конце книги.— *Прим. ред.*

Защитное действие глицерина мы обнаружили совершенно случайно, хотя в то время уже было опубликовано немало работ, которые могли бы послужить для нас указанием. Однако мы не имели об этих работах ни малейшего представления. Не попали они в поле зрения и других исследователей. Так, например, мы не знали, что Ростану удавалось сохранять подвижность у сперматозоидов лягушки в течение 6—20 дней при температуре от —4 до —6° в частично замороженной среде, содержащей 10—20% глицерина. Вместе с тем Ростан отмечал, что в подобных же условиях глицерин не оказывал никакого защитного действия на сперматозоиды млекопитающих [93]. Еще в 1912 г. Н. А. Максимов использовал глицерин для защиты растительных тканей от повреждений, наступающих во время замораживания и оттаивания. Однако он нашел, что в этом отношении глицерин менее эффективен, чем сахара [64].

На мысль о целесообразности применения глицерина могли бы натолкнуть также работы Люйета и Хартунга [53—55]. Эти авторы показали, что предварительная обработка этиленгликолем увеличивала процент выживания уксусных угриц, подвергшихся сверхбыстрому охлаждению до температуры жидкого азота с последующим согреванием. Позднее мы вспомнили, что как этиленгликоль, так и глицерин представляют собой многоатомные спирты, используемые в качестве антифриза, и подумали, что, возможно, глицерин оказывает защитное действие на сперматозоиды человека и птиц, подавляя образование кристаллов льда и способствуя витрификации воды, согласно теории Люйета [91]. Однако вскоре в результате изучения процесса замораживания под микроскопом и других исследований мы вынуждены были отказаться от этого предположения (см. гл. 12).

Оплодотворяющая способность замороженных сперматозоидов петуха

Первые опыты показали большую активность сперматозоидов петуха в 20-процентных растворах глицерина при комнатной температуре или при температуре тела, но пробы спермы, содержащие более 2% глицерина, ут-

рачивали оплодотворяющую способность. Лишь очень немногие сперматозоиды переживали охлаждение до температуры ниже —79° при концентрации глицерина менее 5%. Тем не менее из 600 яиц, снесенных курами, которые были осеменены спермой, замороженной в присутствии 1—2% глицерина, вылупилось 3 нормальных цыпленка. Аналогично этому присутствие в растворе 10—20% этилен- или пропиленгликоля настолько подавляло оплодотворяющую способность незамороженной спермы петуха, что из 400 яиц, снесенных искусственно осемененными курами, только 3 оказались оплодотворенными — из двух яиц вылупились живые цыплята, а в одном был мертвый зародыш.

Описанные опыты натолкнули на мысль, что очень низкие температуры, возможно, не будут подавлять оплодотворяющую способность спермы, если удастся преодолеть вредное действие глицерина и родственных ему веществ при нормальной температуре [108, 109]. Примерно в это же время мы обнаружили, что в эритроцитах млекопитающих, взвешенных в среде, содержащей глицерин, и перенесенных в среду, лишенную глицерина, наступал гемолиз (см. гл. 3). Сперматозоиды петуха, чрезвычайно активные в 10- или 20-процентных растворах глицерина, полностью утрачивали подвижность при резком снижении концентрации глицерина в сперме. По-видимому, сперматозоиды становились неподвижными после искусственного введения их в половые пути также в результате резкого падения концентрации глицерина в окружающей среде. Глицерин можно было медленно удалить путем диализа, не повреждая эритроцитов [106] или сперматозоидов петуха. Сперма петуха, разбавленная до концентрации глицерина 15% и инкубированная в течение 30—60 *мин* при температуре —79°, обладала нормальной оплодотворяющей способностью, если перед осеменением из нее путем диализа удаляли глицерин [81]. К сожалению, потенциальная оплодотворяющая способность и подвижность сперматозоидов петуха, обработанных глицерином, постепенно снижались при хранении их в течение недель или месяцев при температуре —79°. Оплодотворяющая способность снижалась гораздо медленнее в пробах, хранившихся при температуре

—190°. Из яиц, оплодотворенных сперматозоидами петуха, хранившимися в течение года при этой температуре, вылупились нормальные цыплята (фото 2). Казалось невероятным, чтобы при температуре твердой углекислоты и жидкого воздуха в клетках происходили какие-то биохимические изменения. И тогда впервые возникло предположение, что физические процессы, происходящие в условиях низких температур, могут привести к старению и смерти клеток [78, 87].

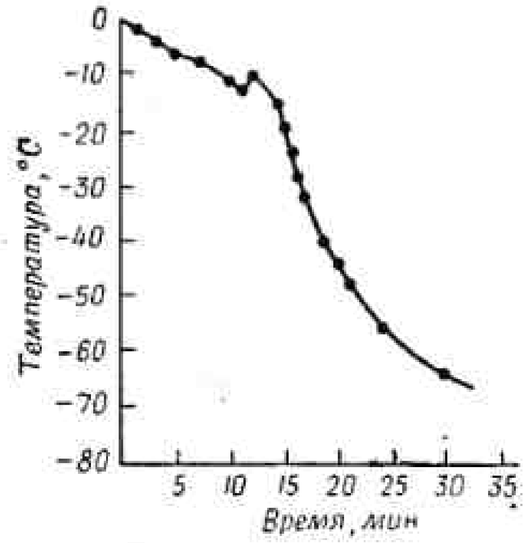
Действие глицерина на сперматозоиды млекопитающих

Попытки использовать глицерин для хранения спермы лабораторных животных (грызунов) и других млекопитающих (в частности, домашних животных) поставили перед исследователями новые вопросы и в какой-то степени пролили свет на всю проблему в целом. Когда сперматозоиды кролика или морской свинки взвешивали в разбавителе спермы, содержащем 10—15% глицерина, они становились неподвижными, а их акросомы, как было обнаружено с помощью ультрафиолетовой микроскопии, сморщивались (фото 3). Установлено также, что сперматозоиды кролика переносят присутствие 20 или даже 30% глицерина, если его добавляют медленно путем диализа или если среда совершенно не содержит солей (например, 20% глицерина в 0,25-процентном растворе гуммиарабика; 30% глицерина в 0,1-процентном растворе метилцеллюлозы). Сперма кролика в отличие от спермы петуха сохраняла нормальную оплодотворяющую способность и в присутствии глицерина. Однако после быстрого охлаждения ее до температуры —79° большинство сперматозоидов становилось неподвижным, их акросомы сморщивались (фото 4,*А*) и сперма утрачивала оплодотворяющую способность. Сперматозоиды кролика, подвергшиеся диализу против 20-процентного раствора глицерина, были подвижны, а некоторые из них сохраняли почти нормальный внешний вид и подвижность после медленного охлаждения до —79° (фото 4,*Б*). Сперматозоиды быка, нечувствительные к резкому повышению концентрации глицерина в окружающей

среде, сохраняли высокую активность, когда сперму разбавляли цитратным буфером с глицерином так, что она после разбавления содержала 10—15% глицерина. Однако, когда ту же методику применили по отношению к сперме человека и петуха, не более 10% сперматозоидов пережило быстрое охлаждение до —79° и последующее согревание.

Предотвращение температурного шока посредством медленного охлаждения

В результате проведения всех описанных выше опытов мы пришли к выводу, что сперматозоиды быка, которым резкое падение температуры от 37 до 0° наносит необратимые повреждения, вряд ли способны перенести



Фиг. 1. Скорость замораживания 1,0 *мл* 15-процентного раствора глицерина в ампуле диаметром 1 *см*, заключенной в изолированный охлаждающий сосуд, который погружают в баню с температурой —79° [86].

С такой же скоростью при применении того же самого метода охлаждали бычью сперму.

быстрое охлаждение до температуры ниже 0°. В соответствии с этим пробы спермы быка, содержащие после разбавления 15% глицерина, медленно охлаждали от 0 до —79°. В тех случаях, когда оттаивание осуществлялось быстро, процент оживших сперматозоидов был значительно выше. В пробах, охлажденных со скоростью 1° в 1 *мин* от 0 до —15°, а затем со скоростью 5° в 1 *мин* от —15 до —79° (фиг. 1), у большинства сперматозоидов подвижность восстанавливалась при оттаивании их спустя 10 *мин*, 2 *час* или 24 *час*.

Подобные же результаты были получены при охлаждении обработанной глицерином спермы козла. Мы испробовали также много других многоатомных спиртов и родственных им соединений и убедились, что лучше всех защищает клетки от повреждений во время замораживания и оттаивания все же глицерин [108, 109].

Важное значение медленного замораживания проб спермы, предварительно обработанной глицерином, а также преимущество глицерина в качестве защитного средства по сравнению с другими многоатомными спиртами вскоре подтвердили Эмменс и Блэкшоу [24]. Они установили, что снижение концентрации глицерина от 15 до 7,5—10% и добавление в разбавитель спермы 1,25% арабинозы или какой-либо другой пентозы, увеличивало подвижность сперматозоидов баранов и быков после замораживания их при температуре —79° и оттаивания [24].

Оплодотворяющая способность замороженной спермы быка

Используя описанную выше методику, Стюарт произвел искусственное оплодотворение пяти коров спермой, охлажденной до —79°. Среда содержала в конечной концентрации 16% глицерина, 0,86% цитрата натрия и 40% (по объему) яичного желтка. Одна из коров, осемененная спермой, которую хранили 48 *час* при —79°, забеременела и родила нормального теленка [112]. Подопытных коров содержали отдельно, и поэтому была исключена всякая возможность естественной случки или же оплодотворения незамороженной спермой.

Исследования, проведенные позднее в более широком масштабе, в племенном хозяйстве в Кэмбридже, показали, что присутствие 15% глицерина не снижает оплодотворяющей способности незамороженной спермы. В ранних опытах по консервации клеток в замороженном состоянии сперму охлаждали медленнее, чем мы рекомендуем сейчас, и температуру в течение многих часов постепенно понижали от +30 до —79°. В результате оттаявшие сперматозоиды были малоподвижными и ни одна из осемененных ими коров не забеременела

[88]. Тогда в методику были внесены некоторые изменения. В сперму добавляли равный объем цитратно-желточного разбавителя и охлаждали ее до +5° в течение более 4 *час*. Затем при этой же температуре добавляли равный объем цитратного буфера, содержавшего 20% глицерина.

Несколько проб неумышленно оставили на ночь при температуре +5°. На следующее утро в пробах спермы (содержащих 10% глицерина), находившихся в течение 20 *час* при температуре +5°, после согревания до +37° наблюдалась исключительно высокая активность сперматозоидов. Другие пробы охладили до —79° и затем согрели до температуры +37°. И в этом случае сперматозоиды сохранили необычную подвижность. Одной из таких проб осеменили корову, у которой искусственно вызвали овуляцию. Спустя 48 *час* корову забили и при вскрытии нашли в ее половых путях два дробящихся яйца.

Другие пробы спермы [88, 89] оставили при температуре +5° на 12—20 *час* для достижения равновесного состояния между сперматозоидами и глицерином, содержавшимся в разбавителе из яичного желтка. Затем пробы охладили и хранили при температуре —79° в течение различного времени от 2 *час* до 8 дней. Непосредственно перед использованием ампулы согрели, погружая их в воду с температурой +40°. Из 38 осемененных коров 30 забеременели и дали всего 27 телят, один из которых показан на фото 5. Мы организовали «банк» длительного хранения спермы при температуре —79° и разработали простое автоматическое приспособление для охлаждения ее до —79° со скоростью, оптимальной для последующего успешного восстановления ее оплодотворяющей способности (см. фиг. 1). Обработанную описанным способом сперму хранили продолжительное время, а затем спустя различные промежутки времени ею осеменяли коров. Результаты этих опытов представлены в табл. 1. Они показывают, что 75% коров, осемененных спермой, хранившейся в течение одного года при температуре —79°, забеременели.

На протяжении этого периода никаких признаков снижения оплодотворяющей способности спермы при удлинении срока хранения [90, 98] не наблюдалось. В пробах спермы той же партии, хранившихся в течение 4,5 лет при температуре —79°, отмечалось незначительное снижение оплодотворяющей способности: забеременели 66,7% осемененных коров [84, 97]. В ранних опытах пробы спермы содержали больше оплодотворяющих сперматозоидов, чем принято в обычной практике. Поэтому пробы спермы перед охлаждением до —79° разбавили в различной степени. Затем их после хранения в замороженном состоянии в течение 24 дней согрели и немедленно осуществили осеменение. Как показывают данные, представленные в табл. 2, оплодотворяющая способность спермы, которая до замораживания была разбавлена цитратно-желточной средой, содержащей глицерин, не снизилась даже при разбавлении в 40 и 100 раз [90, 98].

ТАБЛИЦА 1

Результаты осеменения коров спермой быка, длительно хранившейся при температуре —79° (разбавление в 4 раза; концентрация глицерина в сперме 10%).

Возраст спермы, недели	Число коров	Оплодотворение, %	Возраст спермы, недели	Число коров	Оплодотворение, %
1—4	16	50	29—32	16	56
5—8	16	69	33—36	16	69
9—12	16	63	37—40	16	69
13—16	16	63	41—44	16	56
17—20	16	50	45—48	16	75
21—24	16	69	49—52	16	75
25—28	16	38			
			Всего 208 коров		В среднем 65%

Ранние опыты по замораживанию бычьей спермы

Таким образом, был открыт путь для использования в животноводстве метода длительного хранения бычьей спермы при очень низких температурах. Кроме того, ука-

ТАБЛИЦА 2

Результаты осеменения коров спермой быка, замороженной после соответствующего разбавления (максимальный возраст спермы 10 дней)

Разбавление	Число коров	Число забеременевших коров	Разбавление	Число коров	Число забеременевших коров
1 : 10	12	6	1 : 40	11	7
1 : 20	11	7	1 : 100	12	7
1 : 30	11	9			

занные выше исследования побудили многие племенные хозяйства приступить к изучению наиболее эффективных способов сохранения подвижности и оплодотворяющей способности сперматозоидов.

По единодушному мнению всех исследователей того времени, оплодотворяющая способность разбавленной бычьей спермы, хранившейся при +5°, не снижалась при добавлении 10—15% глицерина [9, 20, 39, 40, 113]. При наличии в разбавителе глицерина живые сперматозоиды после окрашивания не отличались от мертвых [96, 100] поэтому их выживаемость после замораживания и оттаивания можно было определить лишь по подвижности, а сохранение функциональной активности — только по результатам осеменения. В некоторых ранних опытах было установлено, что 70—75% коров забеременели в результате искусственного оплодотворения спермой, хранившейся в течение 1 месяца при температуре —79°; тем самым были подтверждены результаты, полученные Полджем и Раусоном [39, 40, 113, 114].

Различные последующие изменения, внесенные в методику Полджа, только ухудшили результаты. Так, при замене цитрата натрия в желточном разбавителе фосфатными буферами уменьшился процент сперматозоидов, переживших замораживание [71]. Добавление к разбавителю сульфамидов значительно снижало степень подвижности и оплодотворяющую способность обработанной глицерином спермы, хранившейся при температуре —79° [20, 40]. Уменьшение концентрации глицерина до 5% понижало процент сперматозоидов, восстанавливавших активность после оттаивания [39]. Было установлено, что оптимальная концентрация глицерина составляет 6—8% [67]. Если охлаждение от +5° до —79° продолжалось более 1 *час*, подвижность и оплодотворяющая способность спермы после оттаивания снижались [39, 71, 82]. Попытки хранить замороженную сперму при более высоких температурах показали, что в обработанных глицерином пробах сперматозоиды теряли подвижность спустя 30 *час* при —20° [19] или спустя 5 дней при —23, —37 или —51°, хотя при этих же температурах спустя 1 *час* активность сперматозоидов была примерно такой же, как и в пробах, хранившихся при —65 или —79° [67].

Однако некоторые изменения, внесенные в первоначальную методику, не вызвали такого ухудшения результатов или даже дали кое-какие преимущества. Например, по-видимому, не имеет решающего значения продолжительность периода, в течение которого концентрация глицерина в разбавленной сперме повышается до 10% [39, 71]. Яичный желток в растворителе можно заменить молоком [32]. Оказалось возможным также сократить период уравновешивания спермы с глицерином с 20 до 6 и даже до 0,5 *час* до ее замораживания, не подавляя подвижности сперматозоидов после оттаивания; правда, оплодотворяющую способность таких сперматозоидов не испытывали [9, 82].

Можно в известных пределах изменять скорость охлаждения и применять прибор, отличающийся от использованного Полджем и Лавлоком [86].

Важно избежать температурного шока, для чего сперму сначала медленно охлаждают до —15°, а затем ускоряют процесс охлаждения, особенно в критическом диапазоне температур от —15 до —25°, когда медленное замораживание приносит больше всего вреда [82]. В литературе описаны различные варианты проведения такого охлаждения [9, 71, 113]. Существенно также в пределах указанной температурной зоны как можно быстрее повышать температуру во время оттаивания [82]. В пробах, оттаявших в воде с температурой +20°, сперматозоиды

обладали нормальной подвижностью, причем сперматозоидов, двигавшихся в обратном направлении и по кругу или же обладавших другими дефектами, было меньше, чем в пробах, оттаявших в воде с температурой +40° [113]. При оттаивании в воде с температурой +5° подвижность сперматозоидов была также больше и дольше сохранялась, чем при оттаивании в воде с температурой +38° [67, 68]. Независимо от температуры оттаивания спермы (+4 или +40°) процент забеременевших коров был всегда одинаковым (84%) [19]. В пробах, взятых от одного и того же животного в разные дни и подвергшихся одинаковой обработке, замораживание и оттаивание переживало обычно одинаковое относительное количество сперматозоидов. В то же время при одинаковой обработке проб, взятых от разных быков, относительное количество переживших сперматозоидов варьировало. В сперме некоторых быков независимо от метода ее замораживания и оттаивания подвижность восстанавливалась лишь у незначительного числа сперматозоидов. Однако в большинстве случаев можно было наблюдать полное восстановление активности и оплодотворяющей способности сперматозоидов, когда замораживание и оттаивание проводили по оригинальному или слегка модифицированному методу Полджа [19, 40, 82, 113, 114].

Потенциальные преимущества хранения спермы при —79°

В начале 1953 г. стало очевидным, что многие практические и теоретические детали процесса замораживания бычьей спермы еще подлежат дальнейшему исследованию, а разработанный метод, по-видимому, не является ни единственным, ни самым лучшим. Тем не менее в различных районах Англии в центрах по разведению крупного рогатого скота были организованы банки замороженной спермы, которые стали действовать уже в феврале 1953 г. [71, 96, 113, 114]. Фермеры могли выбирать по желанию сперму любого быка-производителя в тех случаях, когда они не могли получить самого быка. Ценная сперма больше не будет растрачиваться зря. Сперму быков, племенные качества которых еще не известны,

можно хранить в течение нескольких лет, пока их потомство не вырастет и не подвергнется проверке в отношении удойности и других качеств. Другое потенциальное преимущество данного метода заключается в том, что во время различных инфекционных эпидемий, например ящура, всегда имеется запас заранее заготовленной спермы, которую можно использовать, пока не исчезнет опасность заражения. Банки для спермы, хранящейся при низких температурах, позволяют сократить в стране число быков-производителей. Кроме того, возникает возможность оживленной международной торговли замороженной спермой в целях улучшения пород скота во всем мире [87—90, 96]. Некоторые достоинства метода хранения замороженной бычьей спермы уже подтвердились на практике за последние 7 лет.

Использование замороженной спермы в скотоводстве

Преимущества использования замороженной спермы быстро были оценены по достоинству. В течение трех лет после опубликования полученных в Англии результатов бычью сперму обрабатывали глицерином, медленно охлаждали и хранили при очень низких температурах для последующего искусственного оплодотворения в большинстве стран с развитым скотоводством. Кроме того, замороженную сперму, которую для поддержания температуры на уровне ниже —70° помещали в твердую углекислоту, транспортировали из Англии в Южную Африку и Новую Зеландию, из Канады в Англию, из Италии в Эфиопию и Эритрею и т. п. И всегда осеменение давало удовлетворительные результаты [8, 42, 58, 59, 117].

Успешное оплодотворение коров замороженной спермой в различных районах составляло 50—80%, что мало отличается от результатов, получаемых при использовании спермы, хранившейся различные периоды времени (до 72 *час*) при +5°. В Канаде применение замороженной спермы настолько себя оправдало, что одна ассоциация скотоводов с 1954 г. совершенно отказалась от

использования свежей спермы, причем это не повлекло за собой ни уменьшения рождаемости телят, ни чрезмерного повышения рыночных цен [36, 110]. Некоторая нота сомнения прозвучала, правда, в высказываниях отдельных авторов [17], которые полагают, что в процессе замораживания и оттаивания погибало так много сперматозоидов, что продуктивность их племенного хозяйства в целом снизилась.

Изменение и усовершенствование методики

С 1952 г. проводятся интенсивные исследования, посвященные методике обработки бычьей спермы глицерином, ее охлаждения и хранения при очень низкой температуре, а также последующего ее оттаивания и осеменения. В настоящее время имеется обширная литература, посвященная этой теме, в том числе целый ряд обзорных работ [10, 17, 63, 79, 84, 97].

Несомненно, в результате некоторых изменений методики качество спермы после оттаивания улучшилось. Тем не менее основные положения остались без изменений и, как правило, мотивы, которыми руководствуются некоторые исследователи, внося те или иные исправления, не всегда бывают убедительными. В процессе новых исследований вскрыта сложная взаимосвязь между различными факторами, включая количественное соотношение яичного желтка, глицерина, цитрата натрия и других компонентов среды, продолжительность обработки глицерином перед замораживанием и скорость охлаждения до —79°. Судя по проценту сперматозоидов, у которых после оттаивания восстановилась подвижность, изменение любого из этих факторов влечет за собой изменение оптимальных величин всех других факторов. Однако пробы, сохранившие наибольшую подвижность после замораживания и оттаивания, не всегда обладают наиболее высокой оплодотворяющей способностью. Все эти осложнения не были еще полностью оценены, когда раздались первые голоса о настоятельной необходимости усовершенствования методики. В настоящее время некоторые положения уже достаточно определились, и, несмотря на трудность интерпретации, мы считаем необходимым рассмотреть их несколько подробнее.

Метод разбавления и состав разбавителей

Учитывая, что лецитин защищает сперматозоиды от температурного шока при температуре выше нуля, свежие пробы следует разбавлять в 10 или 20 раз цитратно-желточным разбавителем или пастеризованным снятым молоком. В разбавитель следует добавить пенициллин и стрептомицин. Сульфамиды использовать нельзя, так как они вызывают повреждение сперматозоидов во время замораживания и хранения при низких температурах.

Большинство авторов рекомендует перед добавлением глицерина в свежеотобранную и разбавленную сперму охлаждать последнюю в течение 5—6 *час* до +5°. В конце этого периода разбавленную сперму с температурой +5° надо смешать с равным объемом содержащей глицерин среды, имеющей такую же температуру [5, 18]. При этом следует применять только хорошо очищенный высококачественный глицерин, так как осадки, которые бывают иногда в некоторых сортах глицерина, снижают выживаемость сперматозоидов при хранении их в условиях очень низких температур [21]. Важным усовершенствованием методики является введение в разбавитель, содержащий глицерин, яичного желтка или молока. Это исключает возможность резкого падения содержания липидов и липопротеидов в разбавленной сперме при добавлении глицерина [34, 35, 97]. Точно так же, если в исходный разбавитель входят пентозы или гексозы, на данной стадии эти сахара следует добавлять в соответствующем количестве, чтобы поддержать их концентрацию на первоначальном уровне. Вместе с тем при добавлении глицерина в сперме может повыситься содержание цитрата натрия [35]. В ранних опытах бычью сперму разбавляли до окончательной концентрации глицерина 10 и 15% и цитрата натрия около 3% [82, 88—90, 108, 109]. В дальнейшем ряд исследователей показал, что наибольший процент сперматозоидов с восстановившейся подвижностью наблюдался при оттаивании спермы в среде, содержащей 6—8% глицерина [68, 72]. Необходи-

мо, однако, всегда иметь в виду, что оптимальная концентрация глицерина зависит от относительного содержания в среде молока или яичного желтка [29, 45, 101], а также от концентрации цитрата натрия и других компонентов [13, 51].

Удовлетворительное уравновешивание различных компонентов достигается при содержании в разбавленной сперме 25% яичного желтка, 2% цитрата натрия и 7,5% глицерина [13, 84]. Если же сперму разбавляют молоком, то она должна содержать 10—13% глицерина [29, 75, 101]. Некоторые исследователи предпочитают добавлять разбавитель с глицерином очень медленно, тогда как другие получают одинаково хорошие результаты, добавляя его не постепенно, а сразу. Вероятно, целесообразнее было бы принять своего рода компромиссное решение, а именно разделить весь объем среды с глицерином на три части и вводить их в разбавленную сперму с интервалами в 10 *мин*, слегка взбалтывая ее при каждом добавлении. Всю процедуру проводят при температуре +5°.

УРАВНОВЕШИВАНИЕ СПЕРМЫ СО СРЕДОЙ, СОДЕРЖАЩЕЙ ГЛИЦЕРИН

Существуют самые противоречивые мнения относительно продолжительности срока, в течение которого сперма должна контактировать с глицерином до замораживания. Метод Полджа с контактом в течение 18—24 *час* дает хорошие результаты, если судить по таким показателям, как подвижность сперматозоидов после замораживания и оттаивания и процент коров, забеременевших в результате искусственного оплодотворения. Согласно О'Деллу и Херсту [74], процент бычьих сперматозоидов, переживших замораживание в глицеринизированном цитратно-желточном разбавителе или в снятом молоке, был выше в пробах, замороженных вскоре после добавления глицерина, по сравнению с теми, которые уравновешивались со средой в течение 18 *час*. Эмменс и сотрудники утверждали, что для уравновешивания спермы с глицериновым разбавителем достаточно 30 *мин* [25]. Использованный ими разбавитель, помимо глицерина и цитрата натрия, содержал арабинозу и фосфатные буферы. Эти компоненты могут настолько изменить условия опыта, что немедленное замораживание становится возможным и даже желательным. Позднее, однако, Эмменс и Мартин [26] установили, что не наблюдалось различий в проценте забеременевших коров при осеменении спермой, пробы которой перед замораживанием уравновешивались с глицерином в течение нескольких часов, и спермой, замороженной после кратковременного уравновешивания. Сравнительно недавно Блекшоу и др. [6] сообщили, что уравновешивание в течение 18 *час* повышало выживаемость сперматозоидов в пробах, замораживавшихся для продажи. Большинство исследователей [10, 13, 68, 101] получали лучшие результаты при замораживании спермы после уравновешивания с глицерином на протяжении 6—18 *час*.

Полдж [84] показал, что оживление обработанных глицерином бычьих сперматозоидов после замораживания зависит от многих факторов, которые в свою очередь связаны со скоростью замораживания. Существует критическая температурная зона от —15 до —25°, в пределах которой повреждения, по-видимому, происходят вследствие или чрезмерно быстрого, или чрезмерно медленного охлаждения. Сперматозоиды, находившиеся 18 *час* в среде, содержавшей яичный желток, цитрат натрия и глицерин, были более устойчивы к повреждениям в критической температурной зоне (табл. 3). Сперматозоиды, находившиеся непродолжительное время в среде, содержавшей глицерин, могут быть устойчивы к повреждениям в этой температурной зоне лишь при очень быстром охлаждении. Следовательно, имеющиеся в литературе противоречия относительно важного значения уравновешивания с глицерином перед замораживанием, возможно, связаны с применением различных скоростей замораживания в пределах указанной критической температурной зоны. Полдж [84] отмечает, что положительное влияние, которое оказывает на сперматозоиды продолжительное уравновешивание со средой, вероятно, обусловлено действием не глицерина, а других компонентов. Например, защитное действие липидов и липопротеидов против температурного шока усилится,

ТАБЛИЦА 3

Подвижность сперматозоидов быка после замораживания при различной длительности контакта со средой [84]

Температура, °С	Подвижность *							
	длительность замораживания							
	5 *мин*		10 *мин*		30 *мин*		2 *час*	
	А	Б	А	Б	А	Б	А	Б
—10	8	8	7	8	6	7	6	6
—15	6	7	2	7	1	6	0	2
—20	7	7	4	7	1	5	0	3
—25	7	7	5	7	2	6	1	4
—30	7	7	7	7	6	7	3	6

* Подвижность сперматозоидов выражена в условных единицах; подвижность сперматозоидов до замораживания равна 8.

А—подвижность сперматозоидов, замороженных спустя 1 *час* после разбавления, Б—подвижность сперматозоидов, замороженных спустя 18 *час* после разбавления.

если сперматозоиды перед охлаждением будут более продолжительное время соприкасаться с этими веществами. В настоящее время известно, что в сперматозоидах и обмен липидов происходит весьма интенсивно [49].

СКОРОСТЬ ОХЛАЖДЕНИЯ И КРИТИЧЕСКАЯ ТЕМПЕРАТУРНАЯ ЗОНА

Было бы удивительно, если бы в метод охлаждения, созданный эмпирическим путем, нельзя было внести никаких усовершенствований. В течение нескольких лет, однако, общее мнение сводилось к тому, что вполне удовлетворительных результатов по переживанию сперматозоидов можно добиться, охлаждая обработанную глицерином бычью сперму со скоростью 1—2° в 1 *мин* от 0 до —15° и со скоростью 5° в 1 *мин* от —15 до —79° [108], но что можно применять и несколько ускоренные темпы охлаждения без какого-либо вреда для проб. Затем в 1955 г. Люйет и Кин [57] сообщили, что 75% сперматозоидов выживало в пробах спермы, быстро охлажденных до температуры —27° и затем сразу же помещенных в жидкий азот с температурой —196°.

Сперму разбавили цитратом натрия, яичным желтком и 7% глицерина. Приблизительно спустя 24 *час* смесь разлили порциями по 0.2 *мл* в пробирки диаметром 9 *мм*. Затем сперму заморозили, быстро погрузив закупоренные пробирки в спиртовые охлаждающиеся смеси с температурой от —20 до —50°. Спустя 5 *мин* пробирки переместили в жидкий азот (—196°). В тех случаях, когда температура первого этапа охлаждения была —20°, сперматозоиды совершенно не ожили. По мере снижения температуры на первом этапе охлаждения процент переживших сперматозоидов постепенно увеличивался и, наконец, при температуре —27° выживало 75% сперматозоидов. Авторы пришли к выводу, что —27° и есть та критическая температура, при которой сперматозоиды особенно чувствительны к чрезмерно быстрому охлаждению [57].

Приведенные результаты были подтверждены Полджем [84], который показал, что они соответствуют его более ранним наблюдениям. Полдж считает, что большая часть бычьих сперматозоидов, взвешенных в соответствующей смеси глицерина, яичного желтка и цитрата натрия, переживает резкое охлаждение сначала от 0 или +5 до —20° и затем до —79°. В то же время они не переживают быстрого охлаждения от —20 до —196° или от —15 до —79°. Когда ампулы перемещали из среды с температурой —15° в ванну с температурой —79°, они охлаждались со скоростью 1—2° в 1 *сек*. Сперматозоиды не переносили такого быстрого охлаждения при температуре от —15 до —20°. Опыты Полджа показывают также, что обработанные глицерином сперматозоиды быка переживают охлаждение со скоростью 15° в 1 *сек* при температуре ниже —30°, тогда как в пределах от —20 до —30° такая скорость охлаждения вызывает тяжелые повреждения клеток. Они переносят охлаждение со скоростью 1—2° в 1 *сек* от —20 и до —30°, но повреждаются при охлаждении с данной скоростью от —15 до —20°. Когда ампулу со сперматозоидами быка, взвешенными при температуре +5° в среде, содержащей глицерин, перемещают в ванну с температурой —27 или —30°, содержимое ее вначале быстро охлаждается, но в интервале температур от —15 до —20° скорость охлаж-

дения составляет 0,25—0,5° в 1 *сек*, а между —20 и —30° немного ниже. Сперматозоиды переносят охлаждение с такой скоростью в этом интервале температур. Когда ампулу перемещают из среды с температурой —30° в ванну, температура которой достигает —196°, ее содержимое охлаждается со скоростью около 15° в 1 *сек*, т. е. со скоростью, приемлемой для сперматозоида в данной температурной зоне. Интересно, что интервал температур, в пределах которого сперматозоиды, по-видимому, особенно подвержены температурному шоку, точно соответствует температурной зоне, в которой наступает больше всего повреждений при продолжительном пребывании сперматозоидов в концентрированных солях. Сперматозоиды, охлажденные в два приема (по Люйету), не теряют подвижности после оттаивания, поскольку они не испытывают температурного шока в критической зоне ниже —30°. Кроме того, они не страдают от физико-химического воздействия концентрированных солей во время пребывания в критической температурной зоне от —15 до —25° [84]. Около 500 коров осеменили спермой, замороженной по двухступенчатому методу Люйета. Частота случаев успешного оплодотворения по существу не отличалась от той, которую можно было ожидать при использовании спермы, замороженной согласно общепринятому методу [85]. Полдж, однако, настаивает на проведении опытов в широком масштабе (на тысячах коров) для выявления различий в оплодотворяющей способности спермы, обработанной различными способами. Возможный недостаток более быстрого двухступенчатого метода заключается в том, что охлаждение трудно осуществить с необходимой точностью. Между тем ошибки, допустимые в отдельных опытах, могут иметь очень тяжелые последствия при массовом применении этого метода.

Условия, обеспечивающие продолжительное хранение спермы

В свое время предпринимались попытки хранить бычью сперму при температуре от —15 до —20° в обычных хозяйственных ледниках. Для сохранения подвижности сперматозоидов потребовались более высокие концентрации глицерина. Сперма, содержащая 20—25% глицерина, оказалась годной для оплодотворения после хранения ее в течение 72 *час* при температуре —15° [111]. Процент активных сперматозоидов снижался при продолжительном хранении при температуре выше —65 [116]. Поэтому исследователи направили свои усилия на усовершенствование методов хранения бычьей спермы при температуре ниже —70° и удлинения периода, в течение которого она совершенно не утрачивает оплодотворяющей способности. Добавление в среду различных сахаров и глицина не повышало оплодотворяющей способности спермы после продолжительного хранения, хотя сперматозоиды в некоторых случаях после оттаивания были более подвижными [28, 92].

В некоторых пробах, хранившихся в течение 7 лет при температуре от —70 до —79°, сохранилась высокая подвижность и оплодотворяющая способность сперматозоидов. В других же, хранившихся сравнительно короткий период времени (2—3 года), процент живых сперматозоидов снижался [84, 97]. Имеющиеся в нашем распоряжении данные позволяют предполагать, что число потенциально активных сперматозоидов, законсервированных при температуре —79°, с годами постепенно уменьшается. Такое снижение качества спермы, по-видимому, можно задержать или предотвратить с помощью более низких температур, используя для этой цели жидкие атмосферные газы [47]. В Северной Америке эту задачу решили за счет выпуска электрических рефрижераторов, в которых достигается температура —90° и даже ниже [30]. С 1955 г. создано несколько разновидностей таких рефрижераторов. Поскольку они оказались очень удобными для практического применения, многие большие племенные хозяйства полностью перешли на использование замороженной спермы [36, 110].

Скорость оттаивания

Не существует единого мнения относительно лучшего метода оттаивания проб спермы после хранения их при температуре —79, —90 или —190°. В некоторых племен-

ных хозяйствах путем медленного оттаивания удавалось сохранять более высокий процент подвижных и не утративших оплодотворяющей способности сперматозоидов.

Полдж [84] считал, что наилучший способ восстановления подвижности сперматозоидов после замораживания и хранения спермы при —79° заключается в погружении каждой ампулы в отдельности в теплую воду с температурой от +38 до +40°. Качество спермы не ухудшалось после оттаивания при условии, что ампулы извлекали из воды в момент плавления последней частицы льда, пока температура содержимого была лишь на несколько градусов выше нуля. Сперма, используемая для осеменения вскоре после проведенного таким образом оттаивания, отличалась высокой оплодотворяющей способностью и прекрасной подвижностью сперматозоидов, наблюдаемой под микроскопом при согревании спермы до +38°. Если же пробу после оттаивания согревали и выдерживали при +38° и особенно если ее затем быстро охлаждали с +38 до +20° (в связи с различными подготовительными процедурами при искусственном оплодотворении), число активных сперматозоидов быстро уменьшалось. Быстро оттаянная и затем согретая до температуры не выше +20° сперма портилась после пребывания при комнатной температуре в течение 1 *час*. Такую порчу спермы можно свести до минимума, если ее оттаивать и хранить при постоянной температуре +5° [68].

В связи с этим некоторые исследователи предпочитают отогревать ампулы со спермой, охлажденные до —79°, погружая их в воду с температурой +5 или +20° [10, 68, 69]. Таким образом, даже если сама процедура искусственного оплодотворения почему-либо откладывается, пробы спермы почти не разрушаются. При строгом соблюдении всех необходимых условий наилучшие результаты, однако, судя по числу забеременевших коров, дает оттаивание ампул со спермой при +40° так, чтобы температура внутри ампулы не превышала +5° [31, 34].

РАЗЛИЧНАЯ СТЕПЕНЬ УСТОЙЧИВОСТИ К ЗАМОРАЖИВАНИЮ У ОТДЕЛЬНЫХ ПРОБ БЫЧЬЕЙ СПЕРМЫ

В настоящее время пробы спермы быков большинства известных мясных и молочных пород хранят в замороженном состоянии при температуре ниже —70°, причем в результате последующего оттаивания происходит лишь небольшая потеря подвижности и потенциальной оплодотворяющей способности сперматозоидов. Однако сперма некоторых быков оказывается исключительно чувствительной к обработке глицерином, замораживанию и оттаиванию. Лишь незначительное число сперматозоидов переживает хранение при очень низких температурах в среде, содержащей глицерин. При этом оплодотворяющая способность оттаявшей спермы также сильно уменьшается. Незначительные усовершенствования в общепринятой методике добавления глицерина, охлаждения или оттаивания могут увеличить процент выживаемости сперматозоидов. В отношении же других проб спермы такие меры иногда не дают никакого эффекта, и эту сперму, конечно, не имеет смысла хранить при очень низких температурах для последующего оплодотворения. Часто невозможно обнаружить явную причину большого процента гибели сперматозоидов во время замораживания и оттаивания проб спермы. При наблюдении под микроскопом эти пробы выглядели иногда исключительно доброкачественными, судя по большому числу и хорошей подвижности сперматозоидов в свежесобранном материале [61, 66, 73].

Пробы спермы, взятые от одного и того же быка в различные дни, обычно одинаково реагируют на обработку глицерином, замораживание и оттаивание, но эякуляты, взятые последовательно у одного животного на протяжении дня, обладают различной устойчивостью к стандартной методике замораживания и оттаивания. Когда собирали два эякулята с интервалом в несколько минут, процент сперматозоидов, переживающих замораживание, был выше во второй пробе [61]. Это связано с различиями в устойчивости клеток в обеих пробах, а не с различиями в семенной плазме [119]. Когда отбирали 20 эякулятов в течение 4 *час*, процент переживших замораживание сперматозоидов до четвертой пробы увели-

чивался. Затем в последующих пробах он постепенно снижался [45]. Сперматозоиды, взятые из придатка, хуже переносили замораживание, чем сперматозоиды спермы, но зато переживали хранение при температуре —79° в течение 49—83 дней в молочном разбавителе, содержащем глицерин. При осеменении этими пробами 8 из 12 коров забеременели [2]. Сперматозоиды из хвоста придатка были более устойчивы к замораживанию, чем сперматозоиды, взятые из ампулы [119].

Действие глицерина и замораживания на патогенные микроорганизмы, присутствующие в бычьей сперме

Чаще всего в бычьей сперме можно обнаружить такие патогенные организмы, как *Vibrio foetus* и *Trichomonas foetus*. Из других патогенных микроорганизмов можно назвать *Brucella abortus, Erysipelothrix monocytogenes* и *Corynebacterium pyogenes*. Сперма, зараженная этими микроорганизмами, может инфицировать половые пути коровы и послужить причиной ее бесплодия или вызвать септический выкидыш.

Vibrio foetus, который особенно опасен в период беременности, подавляется пенициллином и стрептомицином, но может выжить в сперме, разбавленной глицерином или антибиотиками. После удаления пенициллина и стрептомицина путем центрифугирования или отмывания микробы оживают. Они оказывались жизнеспособными после инкубирования спермы в течение 3 дней при температуре +5° или 3—7 дней при температуре —79° [60]. Хьюз и Гилмен высказали предположение, что глицерин подавляет действие стрептомицина на вибрионы (см. [16]). Казалось бы, сперму, зараженную *V. foetus*, нет смысла обрабатывать глицерином и хранить в замороженном состоянии для последующего использования. Недавно, однако, было опубликовано сообщение, что при введении больших доз пенициллина и стрептомицина *V. foetus* не переживал замораживания и оттаивания в обработанных глицерином пробах зараженной спермы [80]. Ни одна из телок, осемененных этими пробами, не заразилась. В будущем, возможно, удастся ликвидировать бактериальную

инфекцию путем замораживания и хранения спермы при температуре —79°. Основная цель, однако, состоит в том, чтобы создать здоровые, не зараженные вибрионом стада (см. [16]).

Интересные исследования были проведены также в отношении выживаемости трихомонад после выдерживания их в различных средах с различными концентрациями глицерина, а также после охлаждения до низких температур с последующим оттаиванием (см. гл. 6).

Установлено, что *Trihomonas foetus* может погибнуть или, наоборот, сохранить жизнеспособность после воздействия глицерина и очень низких температур. Результат зависит от определенного состава среды. Наибольшее выживание можно получить, охлаждая микробы до —79° в молочных или желточных разбавителях, содержащих 7,5% глицерина и фосфаты в качестве буфера. Разрушение же их достигается путем взвешивания в среде, содержащей яичный желток, цитрат натрия и 10% глицерина, с последующим хранением в течение 18—24 *час* при температуре +5° перед охлаждением до —79° [43].

Сперматозоиды других животных

Сперма козла с концентрацией глицерина после разбавления 10—15% после медленного охлаждения до —79° по методике, применявшейся при охлаждении бычьей спермы, содержала весьма подвижные сперматозоиды [109]. В настоящее время, однако, получено еще мало данных относительно оплодотворяющей способности замороженной спермы козла. Возможно, это объясняется тем, что при разведении коз искусственное оплодотворение применяют сравнительно редко [14]. Большой подвижностью отличаются сперматозоиды барана после охлаждения до —79° в средах, аналогичных тем, которые использовали для бычьей спермы, и содержащих 5—25% глицерина. Досадно, что оплодотворяющая способность спермы, несмотря на большую подвижность сперматозоидов, значительно снижается после оттаивания. В некоторых сериях опытов забеременело только 5% овец, осемененных замороженной спермой [14, 25]. В одном опыте из 2000 овец, осемененных замороженной спермой,

забеременело 15—20% [23]. В Советском Союзе были получены несколько лучшие результаты: после осеменения спермой, хранившейся в замороженном состоянии, беременность наступала у 15—33,5% овец [46]. Примечательно, что между подвижностью сперматозоидов in vitro и оплодотворяющей способностью проб существует весьма слабая корреляция. Возможно, здесь имеет значение тот факт, что дыхание и гликолиз in vitro были сильно подавлены в пробах сперматозоидов барана, характеризовавшихся большой подвижностью и охлажденных до —79° [118]; среда в этих пробах отличалась от обычно используемых отсутствием в ней яичного желтка и молока, а также применением фосфатных, а не цитратных буферов. Когда удастся выяснить причину такой «идиосинкразии» сперматозоидов барана, несомненно, будут внесены надлежащие изменения в состав среды и разработана специальная методика, способствующая сохранению полной функциональной способности спермы при низких температурах.

Сравнительно мало использовали искусственное оплодотворение при разведении лошадей, свиней, собак и других домашних животных. Тем не менее имеются некоторые сведения относительно реакции на глицерин, а также о выживании сперматозоидов этих животных после воздействия низких температур. Так, большое число сперматозоидов жеребца не переживает замораживания, если всю сперму смешивают с содержащими глицерин разбавителями, применявшимися для разведения спермы быка. Когда сперматозоиды жеребца путем центрифугирования отделяли от плазмы семенной жидкости и взвешивали в среде с примесью глицерина, глюкозы и фосфатных буферов, только у 25% сперматозоидов после оттаивания восстанавливалась подвижность [108]. Не удавалось добиться лучших результатов и в тех случаях, когда сперматозоиды жеребца взвешивали в среде, содержащей яичный желток и цитрат натрия. В то же время подвижность сперматозоидов до замораживания полностью сохранялась в средах, содержащих яичный желток и глюкозу или яичный желток и глицин. При добавлении в эти среды 10% глицерина 80—100% сперматозоидов жеребца переживали медленное охлаждение до —79° и последующее оттаивание [84, 99, 115]. Сообщали об успешном оплодотворении лошади замороженными сперматозоидами, взятыми из придатка. Их взвешивали в разбавителе, содержащем глицерин и молоко, охлаждали до —79° и хранили при этой же температуре в течение 30 дней [3]. Применение искусственного оплодотворения свежей или замороженной спермой для разведения скаковых лошадей имеет своих противников. Известное сопротивление с их стороны, а также недостаточность средств и другие факторы экономического порядка могут задержать дальнейшее изучение физиологии сперматозоидов жеребца.

Сперматозоиды борова отличаются высокой активностью в среде, содержащей яичный желток и глюкозу или глицин [99], но их подвижность быстро снижается в присутствии 10% глицерина [83]. При концентрации глицерина выше 5% оплодотворяющая способность спермы также ухудшается [84]. Вместе с тем около 50% сперматозоидов борова переживали охлаждение до —79° в глицино-желточной среде с примесью 10% глицерина [99]. Когда концентрацию глицерина понижали до 7,5%, относительное количество подвижных сперматозоидов в оттаявших пробах уменьшалось до 30—40% [84]. Тем не менее осеменение свиноматок замороженной спермой, содержащей глицерин, вызывало у них беременность [37].

Сперматозоиды кролика особенно чувствительны к повреждениям, которые может вызвать воздействие гипертонических солевых растворов как при нормальной температуре [22], так и при температуре ниже 0°, когда среда концентрируется благодаря вымерзанию из нее воды [51]. Сперматозоиды кролика повреждаются также и при резком повышении концентрации глицерина в окружающей их среде [91, 108]. Только около 30% сперматозоидов переживали охлаждение до —79° в среде, содержащей 10% глицерина или 7,5% этиленгликоля [24, 108]. Когда глицерин добавляли постепенно путем диализа, сперматозоиды кролика сохраняли подвижность и оплодотворяющую способность даже при концентрации глицерина 30%. Большой процент их сохранял активность после охлаждения до —79°, но сперма утрачивала свою

оплодотворяющую способность после замораживания и оттаивания. Тем не менее Соколовской и Смирнову удалось получить нормальное потомство от самок кроликов, осемененных замороженной спермой (см. [46]).

Если судить по сохранению подвижности после оттаивания, сперматозоиды человека более устойчивы к замораживанию, чем сперматозоиды всех других млекопитающих, на которых проводили соответствующие опыты. Однако до настоящего времени крайне мало исследовали их оплодотворяющую способность после замораживания и оттаивания.

Имеется сообщение о четырех случаях беременности женщин в результате оплодотворения замороженной спермой, обработанной глицерином [11, 12]. Во всех этих случаях рождались вполне здоровые дети. Авторы указанного сообщения полагают, что данный метод может найти применение при некоторых случаях бесплодия у человека. Например, пробы семени, взятые у мужчины с олигоспермией, можно хранить в замороженном состоянии, затем оттаивать их, концентрировать и осуществлять оплодотворение в наиболее благоприятную фазу менструального цикла [11].

Некоторые авторы указывают на несоответствие между подвижностью и оплодотворяющей способностью сперматозоидов у определенных видов холоднокровных позвоночных. Так, Ростан [94] сообщил, что сперматозоиды лягушки и жабы сохраняли подвижность после инкубирования в течение многих дней при температуре от —4 до —6° в присутствии 20% глицерина, но утрачивали способность оплодотворять яйца. Инкубирование в присутствии глицерина при температуре выше нуля также подавляло оплодотворяющую способность. В то же время сперматозонды сельди сохраняли оплодотворяющую способность после обработки глицерином и переживали хранение при температуре —79° в разбавленной морской воде с 12,5% глицерина. В связи с этим впервые появилась возможность произвести осеменение икры весеннего нереста осенними молоками и наоборот [7]. Применение методики замораживания сперматозоидов открывает широкие перспективы для изучения возможности перекрестного оплодотворения как близкородственных, так и состоящих в отдаленном родстве видов рыб и животных, размножающихся в различное время и в различных местах. В некоторых случаях это поможет выяснить вопрос о принадлежности их к одному и тому же виду (см. [7]).

В настоящее время результаты замораживания сперматозоидов различных видов животных представляют собой весьма пеструю картину. Два положения, однако, вырисовываются достаточно четко: а) глицерин повышает выживаемость после воздействия низких температур у сперматозоидов всех испытывавшихся видов животных и б) охлаждение не должно быть слишком быстрым [84]. Можно ускорить процесс разработки методик замораживания и хранения различных сперматозоидов при низких температурах, изучая их реакцию на изменения в составе суспензионной среды при температуре выше 0°. Тогда удастся избежать токсического действия некоторых веществ и преципитации других, а также изменений pH и других потенциально вредных физико-химических влияний замораживания среды (см. гл. 11). Полезно будет определить температурную зону, в пределах которой сперматозоиды получают повреждения при слишком медленном охлаждении в различных средах, а также температурную зону, в которой они чувствительны к слишком быстрому охлаждению. Большую пользу принесло бы лучшее понимание сущности и природы температурного шока при температурах выше и ниже нуля. Исследования с помощью электронной микроскопии и тонких физико-химических методов анализа также могут пролить свет на данную проблему. С точки зрения физиологии было бы целесообразно выявить причину несоответствия между подвижностью и оплодотворяющей способностью сперматозоидов в свежих и замороженных пробах спермы различных видов животных.

Не исключено, что диметилсульфоксид, который предохранял сперматозоиды быка от повреждений во время замораживания и оттаивания [50], или какое-нибудь другое нейтральное растворимое вещество будут лучше, чем глицерин, защищать сперматозоиды различных видов животных во время охлаждения и хранения при низких температурах.

Лиофилизация сперматозоидов

С теоретической точки зрения клетки, которые переживают вымерзание воды при низкой температуре, не должны повреждаться и при последующем удалении льда. Вирусы и бактерии многих видов, переживающие замораживание, высушивают путем возгонки льда в вакууме при низких температурах и хранят при температуре выше нуля. После увлажнения и помещения в питательную среду у них восстанавливаются специфические физиологические функции, включая рост и размножение. Хранение при нормальной температуре в высушенном состоянии экономичнее и удобнее, чем консервация в замороженном состоянии при низких температурах. В последние годы было предпринято с переменным успехом много попыток хранить сперматозоиды быка и других млекопитающих после лиофилизации. Так, Лейдл [48] наблюдал живых сперматозоидов в бычьей сперме, которую лиофилизировали до такой степени, что содержание воды в ней составляло около 5%, а глицерина — не более 50%. Однако сперматозоиды выживали лишь в пробах, увлажненных тотчас же после завершения лиофилизации. Другие авторы [4] использовали различные методики лиофилизации бычьей спермы, но никогда не обнаруживали живых сперматозоидов в восстановленном материале, из которого выделилось более 70% воды. Олбрайт и сотрудники [1] разбавляли бычью сперму цельным молоком, добавляя в него глицерин до конечной концентрации 10%. Ампулы с материалом они, как обычно, медленно охлаждали до —50°, затем помещали их примерно на 45 *мин* в прибор для лиофилизации. Лиофилизированные пробы тотчас же увлажняли, быстро добавляя в них 3% фруктозы при температуре +38°. Примерно у 5—10% сперматозоидов восстанавливались быстрые поступательные движения.

Сперматозоиды, высушенные в среде, содержащей глицерин, взвешивали в концентрированном глицерине, который при нормальной температуре мог бы им нанести повреждения.

Меримэн и Кейфиг [65] сообщили, что в бычьей сперме, разведенной цитратно-желточным разбавителем, после высушивания при температуре —30° сохранялось около 40—50% очень активных сперматозоидов. Сперму, помещенную на салфетку из нейлоновой марли, быстро охладили в вакууме от +25 до —10 или —15°. Температура ее сразу резко упала до —6°. Затем ее в течение 5 *сек* охладили до —30°. После высушивания в течение 5—6 *мин* температуру повысили до комнатной. В полученный порошок немедленно ввели остатки исходного разбавителя. Для осеменения использовали 1 *мл* увлажненной спермы, содержащий приблизительно 1 млн. сперматозоидов, у 30% которых наблюдалась постепенно возрастающая подвижность, и, как полагают авторы, все коровы забеременели [65]. В материале же, увлажненном лишь спустя 1—7 дней, только изредка попадались подвижные сперматозоиды.

Ющенко [44] указывает, что лиофилизированная сперма кроликов, обработанная глицерином, сохраняла оплодотворяющую способность: из 55 осемененных самок кроликов 18 забеременели и родили 94 крольчат. Часть проб хранили до осеменения в течение 30 дней, а остальные — 62 дня. Ющенко обнаружил также подвижные сперматозоиды в пробах бычьей спермы, лиофилизированной таким же способом. Особенность его методики заключается в том, что он вместо разбавителя с глицерином использовал смесь фреона и гептана, которые выделяются вместе со льдом во время возгонки в высоком вакууме при низких температурах [44].

Приведенные результаты указывают на возможность оживления сперматозоидов после кратковременных периодов высушивания. Хранение в высушенном состоянии ставит перед нами новые проблемы. Изучение поведения лиофилизированных бактерий показало высокую их смертность при хранении в высушенном виде. Бактерии не всегда переживают удаление всей воды. Существуют какие-то сложные взаимодействия между высушенными организмами и средой, которые могут привести к постепенной потере жизнеспособности [33, 102]. Подобные реакции, вероятно, происходят и в препаратах высушенных сперматозоидов. Таким образом, хранение при низких температурах в присутствии глицерина или какого-либо другого защитного вещества, по-видимому,

останется наиболее эффективным способом продолжительного сохранения жизнеспособности сперматозоидов до тех пор, пока не будут проведены более фундаментальные исследования относительно оптимальных условий их высушивания и последующего хранения.

Методика хранения бычьей спермы в замороженном состоянии уже произвела целую революцию в практике скотоводства. Она изменила также наши взгляды на физиологию размножения. Паркс выразил это в следующих словах: «Размножение млекопитающих обычно требует одновременного и тесного взаимодействия со стороны двух различных полов. Метод искусственного оплодотворения вообще устраняет это требование, а в скотоводстве реальная возможность эффективного использования спермы, длительное время хранившейся в замороженном состоянии, в огромной степени расширила сферу применения этого метода. В самом деле, можно сказать, что в области разведения крупного рогатого скота мы устранили факторы времени и пространства. Эти изумительные практические результаты не должны, однако, заслонять от нас тот факт, что с точки зрения науки исследования бычьей спермы представляют собой лишь маленькую и относительно второстепенную часть задачи, которая стоит перед нами в связи с открытием защитных свойств глицерина» [79].

ЛИТЕРАТУРА

1. Albright J. L., Erb R. E., Ehlers M. H., Freeze-drying bovine spermatozoa, J. Dairy Sci., **41**, 206—207 (1958).
2. Barker C. A. V., Low temperature preservation of bovine epididymal spermatozoa, Canad. J. comp. Med., **18**, 390—393 (1954).
3. Barker C. A. V., Candier J. C., Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa, Canad. J. comp. Med. **21**, 47—51 (1957).
4. Bialy G., Smith V. R., Rapid rates for freezing bull semen, J. Dairy Sci., **40**, 622 (1957).
5. Blackshaw A. W., Factors affecting the revival of bull and ram spermatozoa after freezing to −79° C. Aust. Vet. J., **31**, 238—241 (1955).

6. Blackshaw A. W., Emmens C. W., Martin I., Heyting J., The preparation of deep frozen semen, A. I. Digest, **5**, 6—8 (1957).
7. Blaxter J. H. S., Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn sprawning herring, Nature, Lond., **172**, 1189—1190 (1953).
8. Bonnadonna T., The possibilities of using deep-frozen bull semen in tropical countries, Fortpfl. Zuchthyg. Haustierbesam., **5**, 131—134 (1955).
9. Bruce W., The storage of bull semen at low temperatures, V. Vet, Rec., **65**, 562—563 (1953).
10. Bruce W., The application of the low temperature storage of bull semen for artificial insemination, Proc. III int. Congr. Anim. Reprod., Cambridge, Section 3, pp. 27—29, 1956.
11. Bunge R. G., Keettel W. C., Sherman J. K., Clinical use of frozen semen, Report of four cases, Fertility and Sterility, **5**, 520—529 (1954).
12. Bunge R. G., Sherman J. K., Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa, Nature, Lond., **172**, 767—768 (1953).
13. Cragle R. G., Myers R. M., Waugh R. K., Hunter J. S., Anderson R. L., The effects of various levels of sodium citrate glycerol and equilibration time on survival of bovine spermatozoa after storage at −79° C, J. Dairy Sci., **38**, 508—514 (1955).
14. Dauzier L., Quelques resultats sur l'insemination artificielle des brebis et des chevres en France, Proc. III int. Congr. Anim. Reprod., Cambridge, Section 3, pp. 12—14, 1956.
15. Davenport C. B. Experimental Morphology. Pt. 1. Effect of chemical and physical agents upon protoplasm, New York, Macmillan, 1897.
16. Dunn H. O., The problem of disease organisms in frozen semen, Proc. 8th Ann. Convention N. A. A. B., pp. 196—199, 1955.
17. Dunn H. O., Hafs C., A study of variation in the numbers of live sperm surviving freezing and six months' storage at −79° C, Proc. III int. Congr. Anim. Reprod., Cambridge, Section 3, pp. 37—39, 1956.
18. Dunn H. O., Hafs H. D., Extenders and techniques for freezing bovine spermatozoa, J. Dairy Sci., **96**, 576 (1953).
19. Dunn H. O., Hafs H. D., Young G. F., Laboratory and field studies wtih frozen semen, J. Anim. Sci., **12**, 893—894 (1953).

20. Dunn H. O., Larson G. L., Willett E. L., The effects of freezing bovine spermatozoa in extenders containing antibacterial agents, J. Dairy Sci., 36, 728—732 (1953).
21. Dyrendahl I., Some studies of the methods of freezing bull semen. I. The influence of different brands of glycerol on the survival of spermatozoa, Nord. Vet. Med., 6, 780—784 (1954).
22. Emmens C. W., The effect of variations in osmotic pressure and electrolyte concentration on the motority of rabbit spermatozoa at dfferent hydrogen-ion concentrations, J. Physiol., 107, 129—140 (1948).
23. Emmens C. W., Discussion following papers by Professor Almquist and Russian speakers, Proc. III int. Congr. Anim. Reprod., Cambridge, Plenary papers, p. 68, 1956.
24. Emmens C. W., Blackshaw A. W., The low temperature storage of ram, bull and rabbit spermatozoa, Aust. vet. J., 26, 226—228 (1950).
25. Emmens C. W., Blackshaw A. W., The fertility of frozen ram and bull semen, Aust, vet. J., 31, 76—79 (1955).
26. Emmens C. W., Martin I., The controlled introduction of deepfreeze techniques into artificial insemination, Proc. III int. Congr. Anim. Reprod., Cambridge, Section 3, pp. 18—21 (1956).
27. Emmens C. W., Martin I., The fertility of bull semen deepfrozen by two different techniques, Aust, vet. J., 33, 63—67 (1957).
28. Erickson W. E., Studies concerning frozen bovine spermatozoa, Diss. Abstr., 17, 1853—1854 (1957).
29. Erickson W. E., Graham E. F., Frederick E. C., The effect of antibiotics, levels of glycerol and rates of freezing on revival rate of bovine spermatozoa in yolk citrate and milk extenders, J. Dairy Sci., 37, 651 (1954).
30. Etgen W. M., Ludwick T. M., Hess E. A., The use of mechanical refrigeration for storage of frozen semen, J. Dairy Sci., 38, 604 (1955).
31. Foote R. H., Dunn H. O., Buffers, extenders and methods of freezing semen, Mimco Routine Lab. Procedure, Cornell Univ. and N. Y. A. B. C., No. 11 (1955).
32. Graham E. F., Marion G. B., A technique of freezing and factors affecting the revival of bovine spermatozoa, J. Dairy Sci., 36, 597 (1953).
33. Greaves R. I. N., Some factors which influence the stability of freeze-dried cultures, Recent Research in Freezing and Drying, ed. Parkes A. S. and Smith A. U., pp. 203—215, Oxlord, Blackwell Scientific Publications, 1960.
34. Hafs N. D., Elliott F. I., Effect of thawing temperatures and extender composition on the fertility of frozen bull semen, J. Anim. Sci., 13, 958 (1954).
35. Hafs N. D., Elliott F. I., The effect of methods of adding egg yolk and monosaccharides on the survival of frozen bull spermatozoa, J. Dairy Sci., 38, 811—815 (1955).
36. Henderson J. A., Macpherson J. W., Shyder R. C., The use of frozen semen in routine insemination of cattle, Proc. III int. Congr. Anim. Reprod., Cambridge, Section 3, pp. 15—18, 1956.
37. Hess E. A., Teague N. S., Ludwick T. M., Martig R. C., Swine can be bred with frozen semen, Fm. Home Res., 42, 100 (1957).
38. Hoagland H., Pincus G., Revival of mammalian sperm after immersion in liquid nitrogen, J. gen. Physiol., 25, 337—344 (1942).
39. Holt A. F., The effect of glycerolisation of bull semen on fertility, Vet. Rec., 65, 624—625 (1953).
40. Holt A. F., The storage of bull semen at low temperatures, IV. Vet. Rec., 65, 561—562 (1953).
41. Jahnel F. Uber die Widerstandslähigkeit von menschlichen Spermatozoen gegenüber starker Kälte. Widerauftreten der Beweglichkeit nach Abkühlung auf —196° C (flüssiger Stickstoff) und —269,5° C, etwa 3,7° vom absoluten Nullpunkt entfernt (flüssiges Helium), Klin. Wschr., 17, 1273—1274 (1938).
42. James J. P., Fyvie A. A., Techniques and results of low temperature bull semen storage, Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod., 15, 126—130 (1955).
43. Joyner L. P., Bennett G. H., Observations on the viability of *Trichonomas* foetus during the process of freezing to —79° C and tha wing in the presence of glycerol, J. Hyg., Cambridge, 54, 335—341 (1956).
44. Ющенко Н., Высушивание — новый метод хранения семени животных, Наука и передовой опыт в сельском хозяйстве, 3, 45—48 (1959).
45. Kinney W. C., jr., van Demark N. L., The effect of yolk and citrate levels and stage of maturity on the survival of bull

spermatozoa at subzero storage temperatures, J. Dairy Sci., 37, 650 (1954).
46. Кузнецов М., Artificial insemination of Sheep in the U.S.S.R., Proc. III int. Congr. Anim. Reprod., Cambridge, Plenary papers, pp. 64—68, 1956.
47. Larson G. L., Graham E. F., Effects of low temperatures on storage of bovine semen, A. I. Digest, **6**, 6—8 (1958).
48. Leidl W., Experiments in freeze-drying of bull semen, Proc. III int. Congr. Anim. Reprod., Cambridge, Section 3, pp. 39—41, 1956.
49. Lovelock J. E., Denaturation of lipid-protein complexes as a cause of damage by freezing, Proc. Roy. Soc. B., **147**, 427—433 (1957).
50. Lovelock J. E., Bishop M. W. H., Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide, Nature, **183**, 1394—1395 (1959).
51. Lovelock J. E., Polge C., The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol, Biochem. J., **58**, 618—622 (1954).
52. Luyet B. J., Gehenio P. M., Life and Death at Low Temperatures, Normandy, Missouri, Biodynamica (1940).
53. Luyet B. J., Hartung M. C., Survival of *Anguillula aceti* after solidification in liquid air, Biodynamica, **3**, 353—362 (1941).
54. Luyet B. J., Hartung M. C., Factors in revival of *Anguillula aceti* after its solidification in liquid air, Amer. J. Physiol., **133**, 368 (1941).
55. Luyet B. J., Hartung M. C., Death by devitrification in the nematode *Anguillula aceti*, Biodynamica, **3**, 363—367 (1941).
56. Luyet B. J., Hodapp E. L., Revival of frog's spermatozoa vitrifield in liquid air, Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., **39**, 433—434 (1938).
57. Luyet B. J., Keane J., A critical temperature range apparently characterized by sensitivity of bull semen to high freezing velocity, Biodynamica, **7**, 281—292 (1955).
58. Macpherson J. W., The effect of storage time on frozen bovine semen, Canad. J. comp. Med., **18**, 323—325 (1954).
59. Macpherson J. W., Use of frozen semen in Canada, Proc. VII Conv. nat. Ass. artif. Breed., U.S.A., pp. 201—203 (1954).
60. Macpherson J. W., Fish N. A., The survival of pathogenic

bacteria in bovine semen preserved by freezing, Amer. J. vet. Res., **15**, 548—550 (1954).
61. Madden D. H. L., An analysis of results obtained with frozen bovine semen, Proc. III int. Congr. Anim. Reprod., Cambridge, Section 3, pp. 33—36 (1956).
62. Mantegazza P., Sulla sperma umano, R. C. Ist. lombardo, **3**, 183—196 (1866).
63. Martin I., Emmens C. W., Factors affecting the fertility and other characteristics of deep-frozen bull semen, J. Endocrin., **17**, 449—455 (1958).
64. Максимов Н. А., Chemische Schutzmittel der Pflanzen gegen Erfrieren, Ber. dtsch. Ges., 30, 52—65; 293—305; 504—516 (1912).
65. Meryman H. T., Kafig E., Survival of spermatozoa following drying, Nature, Lond., **184**, 470—471 (1959).
66. Milk Marketing Board (England and Wales), Observations on the freezing, storage and use of bovine semen, Rep. Div. Milk Marketing Bd., **6**, 71—79 (1956).
67. Miller W. J., van Demark N. L., Factors affecting survival of bull spermatozoa at subzero temperatures, J. Dairy Sci., **36**, 577 (1953).
68. Miller W. J., van Demark N. L., The influence of glycerol level, various temperature aspects and certain other factors on the survival of bull spermatozoa at subzero temperatures, J. Dairy Sci., **37**, 45—51 (1954).
69. Mixner J. P., Processing, storing and shipping frozen bull semen, Circ. N. J. agric. Exp. Sta., No. **573**, 3—16 (1955).
70. Mixner J. P., Saroff J., Interference by glycerol with differential staining of bull spermatozoa as used with semen thawed from the frozen state, J. Dairy Sci., **37**, 1094—1098 (1954).
71. Moss J. A., The storage of bull semen at low temperatures. VII., Vet. Rec., **65**, 564 (1953).
72. N. A. A. B., Research on frozen semen. Committee report, Proc. VIII Conv. nat. Ass. artif. Breed., U.S.A., pp. 186—189 (1955).
73. New Zealand, Department of agriculture. Experiments in the deep freezing of semen, Rep. Der. Agric., N. Z., 1953—1954, p. 47 (1954).
74. O'Dell G. D., Hurst V., The effect of glycerol equilibration time on the freezing of bovine spermatozoa in egg yolkcitrate and skim milk semen diluters, J. Dairy Sci., **38**, 623 (1955).
75. O'Dell W. T., Almquist J. O., Techniques for freezing bull

spermatozoa in heated milk and preliminary breeding results, J. Dairy Sci., **37**, 652 (1954).
76. O'Dell W. T., Almquist J. O., Freezing bovine semen. 1. Techniques for freezing bovine spermatozoa in milk diluents, J. Dairy Sci., **40**, 1534—1541 (1957).
77. Parkes A. S., Preservation of human spermatozoa at low temperatures, Brit. med. J., ii, 212—213 (1945).
78. Parkes A. S., Preservation of spermatozoa, red blood-cells and endocrine tissue at low temperatures, In Freezing and Drying, ed. Harris R. J. C., pp. 99—105, London, Institute of Biology, 1951.
79. Parkes A. S., Preservation of living cells and tissues at low temperatures, Proc. III int. Congr. Anim. Reprod., Cambridge, Plenary papers, pp. 69—75, 1956.
80. Plastridge W. N., Stula E. F., Survival of *Vibrio fetus* in frozen semen, A. I. Digest, **6**, 7—9 (1958).
81. Polge C., Functional survival of fowl spermatozoa after freezing at —79° C, Nature, Lond., **167**, 949—950 (1951).
82. Polge C., The storage of bull semen at low temperatures, I. Vet. Rec., **65**, 557—559 (1953).
83. Polge C., Artificial insemination in pigs, Vet. Rec., **68**, 62—76 (1956).
84. Polge C., Low temperature storage of mammalian spermatozoa, Proc. Roy. Soc., B, **147**, 498—508 (1957).
85. Polge C., Personal communication, 1959.
86. Polge C., Lovelock J. E., Preservation of bull semen at —79° C, Vet. Rec., **64**, 396—398 (1952).
87. Polge C., Parkes A. S., Possibilities of long-term storage of spermatozoe at low temperatures, Anim. Breed. Abstr., **20**, 1—5 (1952).
88. Polge C., Rowson L. E. A., Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at —79° C, Nature, Lond., **169**, 626—627 (1952).
89. Polge C., Rowson L. E. A., Long-term storage of bull semen frozen at very low temperatures (—79° C), Proc. II int. Congr. Anim. Reprod., Copenhagen, Section 3, pp. 90—98 (1952).
90. Polge C., Rowson L. E. A., Results with bull semen stored at —79° C, Vet, Rec., **64**, 851 (1952).
91. Polge C., Smith A. U., Parkes A. S., Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures, Nature, Lond., **164**, 666 (1949).

92. Rakes J. M., Stallcup O. T., Use of glycine in bovine semen extenders stored at 5° C and —79° C, Science, **123**, 224—225 (1956).
93. Rostand J., Glycérine et résistance du sperme aux basses températures, C. R. Acad. Sci., Paris, **222**, 1524—1525 (1946).
94. Rostand J., Sur le refroidissement des cellules spermatiques en présence de glycérine, C. R. Acad. Sci., Paris, **234**, 2310—2312 (1952).
95. Rostand J., Effet protecteur de l'alcool à l'égard de la congélation des cellules spermatiques d'amphibiens, C. R. Acad. Sci., Paris, **240**, 243—244 (1955).
96. Rowson L. E. A., The storage of bull semen at low temperatures, II. Vet. Rec., **65**, 559—560 (1953).
97. Rowson L. E. A., The low temperature preservation of germinal cells, Proc. III int. Congr. Anim. Reprod., Cambridge, Plenary papers, pp. 75—80 (1956).
98. Rowson L. E. A., Polge C., Storage of bull semen at —79° C and fertility results for up to 12 months, Vet. Rec., **65**, 677—679 (1953).
99. Roy A., Storage of boar and stallion spermatozoa in glycine-egg-yolk medium, Vet. Rec., **67**, 330—331 (1955).
100. Saroff J., Mixner J. P., The relationship of diluter composition and glycerol equilibration time to survival of bull spermatozoa after freezing to —75° C, J. Dairy Sci., **37**, 651 (1954).
101. Saroff J., Mixner J. P., The relationship of egg yolk and glycerol content diluters and glycerol equilibration time to survival of bull spermatozoa after low temperature freezing, J. Dairy Sci., **38**, 292—297 (1955).
102. Scott W. J., A mechanism causing death during storage of freezedries micro-organisms, Recent Research in Freezing and Drying, ed. Parkes A. S. and Smith A. U., pp. 188—202, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1960.
103. Shaffner C. S., Longevity of fowl spermatozoa in frozen condition, Science, **96**, 337 (1942).
104. Shaffner C. S., Henderson E. W., Card C. C., Viability of spermatozoa of the chicken under various environmental conditions. Poultry Sci., **20**, 259—265 (1941).
105. Shettles L. B., The respiration of human spermatozoa and their reponse to various gases and low temperatures, Amer. J. Physiol., **128**, 408—415 (1940).
106. Sloviter H., Recovery of human red blood cells after freezing Lancet, **i**, 823—824 (1951).

107. Smith A. U., Effects of low temperature on living cells and tissues. Biological Applications of Freezing and Drying, Chap. i. ed. Harris, R. J. C., New York, Academic Press, 1954. (О. Смит, Влияние низких температур на живые клетки и ткани. См. «Применение замораживания — высушивания в биологии», под ред. Р. Харриса, стр. 9—90, ИЛ, М., 1956.)
108. Smith A. U., Polge C., Survival of spermatozoa at low temperatures, Nature, Lond., **166**, 668—669 (1950).
109. Smith A. U., Polge C., Storage of bull spermatozoa at low temperatures, Vet. Rec., **62**, 115—116 (1950).
110. Snyder R., Problems encountered in converting to an all-frozen semen programme, Proc. VIII Conv. nat. Ass. artif. Breed., U.S.A., pp. 199—203 (1955).
111. Stallcup O. T., McCartney H. K., Ratcliff L., The storage of bovine semen at low temperatures (—15° C), J. Dairy Sci., **36**, 577 (1953).
112. Stewart D. L., Storage of bull spermatozoa at low temperatures, Vet. Rec., **63**, 65—66 (1951).
113. Stower J., The storage of bull semen at low temperatures. III. Vet. Rec., **65**, 560—561 (1953).
114. Swanney J. M., The storage of bull semen at low temperatures, VI. Vet. Rec., **65**, 563 (1953).
115. Szumowski P., The deep-freezing of stallion semen, C. R. Acad. Agric., France, **40**, 156—162 (1954).
116. Van Demark N. L., Kinney W. C. jr., The freezability of bull sperm as affected by interactions of glycerol levels, rates of freezing and subzero temperatures, J. Anim. Sci., **13**, 1034 (1954).
117. Van Rensburg S. W. J., Rowson L. E. A., The fertilising capacity of frozen bull semen after long distance aerial transport, Vet. Rec., **66**, 385—386 (1954).
118. White I. G., Blackshaw A. W., Emmens C. W., Metabolic and motility studies relating to the low temperature storage of ram and bull spermatozoa, Aust. vet. J., **30**, 85—94 (1954).
119. Willett E. L., Ohms J. I., Influence of seminal plasma and maturity of bovine spermatozoa upon their freezability, J. Dairy Sci., **41**, 90—95 (1958).

Глава 3

ЭРИТРОЦИТЫ

Развитие метода переливания крови

ИСТОРИЧЕСКАЯ СПРАВКА

Еще в древних мифах времен Овидия (43 г. до н. э. и 15 г. н. э.) заложено представление о том, что переливание крови может оживить раненого, вылечить тяжело больного и омолодить старика. Однако практические успехи стали возможны только после того, как Гарвей в 1628 г. описал систему кровообращения. В Англии первое переливание крови осуществил в 1665 г. Лоуэр, который поддерживал жизнь у обескровленных собак, переливая им кровь, взятую у других собак. Вскоре Дени во Франции и Лоуэр в Англии произвели переливание людям сравнительно больших количеств овечьей крови. В дневнике Пепи, относящемся к этому же периоду времени, уже имеется упоминание о человеке — доноре крови. Первые переливания крови людям не дали удовлетворительного эффекта в связи с различными не понятыми тогда осложнениями. В результате метод получил дурную славу и от его применения отказались почти на 250 лет [11, 53].

За это время выявили химический состав плазмы и дыхательную функцию эритроцитов. Были изучены процессы, связанные со свертыванием крови, и разработаны различные методы предотвращения коагуляции цельной крови при хранении ее in vitro [9]. Уже в начале XX в. хорошо осознавали опасность заражения в результате переливания крови. Хирурги прониклись взглядами Листера о заражении бактериями и их размножении.

В 1901 г. Ландштейнер [17] сделал жизненно важное открытие — установил группы крови. Крайлу [7] удалось подобрать доноров, эритроциты и сыворотка которых были совместимы с этими же элементами крови отобранных реципиентов.

Используя результаты успешных работ Карреля по трансплантации кровеносных сосудов, Крайл разработал методику переливания крови непосредственно из сосудистой системы донора в сосуды реципиента. В 1906 г. он сообщил о первых 6 успешных случаях переливания крови у людей [7].

Впоследствии применение прибора для стерилизации позволило проводить взятие крови и ее переливание как отдельные операции. В 1914—1918 гг. методика переливания крови была упрощена, и с ее помощью удалось спасти жизнь многих раненых бойцов [31].

Организация банков крови

Во время войны 1914—1918 гг. благодаря использованию цитрата натрия в качестве антикоагулянта стало возможным переливание крови, предварительно взятой у донора и хранившейся непродолжительное время in vitro. Методика непрерывного капельного вливания крови, предложенная Марриоттом и Кекуиком [26] в 1935 г., в значительной степени облегчила введение больших объемов крови. В 1939 г. в России, США и Англии были организованы банки для хранения крови при температуре +5°. Однако допустимый срок хранения при такой температуре не превышал одной недели (предпочтительнее — не более 72 *час*) [39]. В начале второй мировой войны доноров обычно доставляли к постели каждого больного. Их подбирали по группам крови; у донора с соответствующей группой брали кровь и тут же переливали ее больному. Переливание крови рассматривали как крайнюю меру. Кровь переливали только таким тяжелым больным, которые в противном случае погибли бы от кровопотери, шока или тяжелого заболевания крови. Использование цитрата натрия в качестве антикоагулянта и добавление к крови декстрозы удлиняли допустимый срок хранения ее при температуре 4—5° от

одной недели до трех [18]. Примечательно, что продолжительность жизни эритроцитов in vitro все еще была значительно короче периода, в течение которого они циркулируют в кровяном русле (100 дней). Тем не менее применение кислого цитратно-декстрозного разбавителя (лимоннокислой декстрозы — ЛКД) и повышение жизненности хранившейся в нем крови открыли широкие терапевтические возможности. Были организованы специальные учреждения для сбора и хранения крови; аппаратура и сама методика переливания были упрощены и стандартизированы.

В 1946 г. переливание консервированной крови уже рассматривали как одну из основных процедур в комплексе общепринятых лечебных мероприятий в самых разнообразных условиях хирургического и терапевтического лечения как на войне, так и в мирной обстановке. В связи с этим возникла насущная потребность в разработке метода увеличения продолжительности жизни in vitro различных компонентов крови во избежание излишнего расхода материала и в целях расширения области применения переливания крови.

Замораживание и лиофилизация плазмы

Отделенную от эритроцитов плазму можно заморозить и хранить продолжительное время при низких температурах. После удаления льда путем возгонки в вакууме при низких температурах оставшийся плотный материал сохраняется без ущерба для него в течение многих месяцев и даже лет при комнатной температуре [12, 50, 51]. Увлажненную после лиофилизации плазму применяли с хорошими результатами при хирургическом шоке. В других условиях, однако, успех переливания крови зависит от целостности эритроцитов и от продолжительности их жизни в кровяном русле реципиента.

Замораживание, оттаивание и витрификация эритроцитов

Особенно трудной оказалась проблема увеличения продолжительности жизни эритроцитов in vitro. Биохимические процессы в крови можно остановить путем

охлаждения ее до очень низких температур. Однако при замораживании до температуры ниже — 3° и последующем оттаивании клетки гемолизировались, а в процессе высушивания при любой температуре разрушались. Продолжительность жизни эритроцитов in vitro увеличивалась лишь незначительно, когда кровь хранили по методу Струмиа, т. е. при —3 вместо +4°. Тонкую пленку крови, подвергшуюся сверхбыстрому охлаждению в жидком азоте, можно хранить при этой температуре бесконечно долго без каких-либо признаков распада [25]. Такая методика представляла чисто академический интерес; до недавнего времени она не находила широкого применения при создании банков крови [27, 28]. В 1949 г., казалось, было мало надежд разработать какой-нибудь удовлетворительный способ продолжительного хранения цельной крови или отдельных эритроцитов. Новые перспективы открылись в связи с выявлением того факта, что глицерин защищает сперматозоиды птиц от вредного действия процессов замораживания, хранения и оттаивания. Это повлияло косвенным образом на активизацию исследований по замораживанию эритроцитов.

Действие глицерина на эритроциты при нормальной температуре, а также во время замораживания и оттаивания

В противоположность сперматозоидам петуха сперматозоиды кролика, морской свинки и других лабораторных животных становились неподвижными, как только их быстро помещали в среды, содержащие более 5% глицерина. Исследования с помощью фазово-контрастного микроскопа показали, что при резком повышении в среде, в которой находятся сперматозоиды грызунов, концентрации глицерина до 10—15%, хрупкое вещество акросомы сперматозоида сморщивается (см. фото 3). Это позволяло предполагать, что среда была гипертонична, что акросома, а может быть, и вся головка сперматозоида и даже его хвост были обезвожены. Нам пришло в голову, что эритроциты млекопитающих можно использовать для проверки осмотического эффекта разбавителей спермы, содержащих глицерин. К нашему

удивлению, оказалось, что эритроциты кролика, морской свинки и человека при взвешивании их при +20° в среде, содержащей 10—15% глицерина, сморщивались лишь незначительно и на короткое время; через несколько минут под микроскопом уже не наблюдалось никаких изменений ни формы, ни размера эритроцитов [47]. Это показывало, что у данных видов глицерин свободно проникал через оболочку эритроцита и между цитоплазмой и окружающей средой быстро устанавливалось осмотическое равновесие. Вполне допустимо, что сперматозоиды лабораторных животных не пропускают глицерин и, таким образом, повреждаются в силу осмотического давления, тогда как сперматозоиды птиц проницаемы для глицерина, подобно эритроцитам млекопитающих, на которых мы ставили опыты. Возникает еще один вопрос. Не является ли эта проницаемость по отношению к глицерину необходимой, для того чтобы он мог оказать защитное действие от вредного влияния замораживания? В связи с этим мы испытали влияние замораживания на обработанные глицерином эритроциты. После замораживания их в присутствии 10—15% глицерина при —20, —40 или —79° и последующего оттаивания подавляющее большинство эритроцитов не имело повреждений. В то же время эритроциты, взвешенные в среде без глицерина, полностью гемолизировались при замораживании и оттаивании. Бóльшая часть эритроцитов не изменилась по внешнему виду после хранения их в течение различных периодов времени — от 5 *мин* до 3 месяцев — при температуре — 79° в плазме, содержащей 15% глицерина [47]. Возможно, защита от повреждений в ходе замораживания и оттаивания зависела от присутствия глицерина не только в окружающей их среде, но и в самих эритроцитах [49]. Это предположение впоследствии подтвердил Лавлок [20, 21] (см. гл. 12). Изучение процесса замораживания под микроскопом показало, что глицерин влиял на рисунок кристаллов льда. Они принимали перистую форму или форму листьев папоротника с тонкими веточками, отходящими в стороны от главного ствола (фото 6, *А* и *Б*), тогда как в солевом растворе без примеси глицерина кристаллы льда имели вид широких пластинок неправильной формы. При тем-

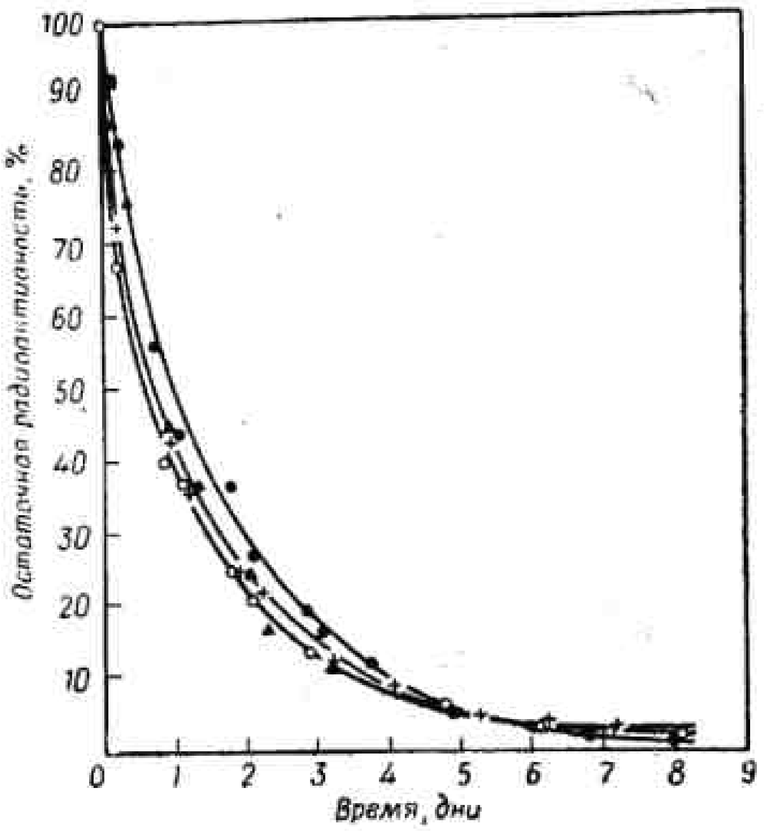
пературе — 40° эритроциты располагались в сравнительно широких канальцах, образованных между краями кристаллов льда. Они не приобретали зубчатых контуров ни во время замораживания, ни при оттаивании (фото 6, *А*, *В* и *Г*). По-видимому, глицерин, присутствующий и в эритроцитах и в окружающей их среде, защищал их от действия повышающейся концентрации солей в окружающей среде после выделения воды в виде льда. После оттаивания бóльшая часть эритроцитов не носила следов повреждений (фото 6, *В* и *Г*). Вполне возможно, что глицерин особенно эффективно защищал оболочку клетки от влияния химических изменений, а также механических воздействий в процессе образования и растворения кристаллов льда [20, 21]. Нам не удалось выявить, происходит ли кристаллизация внутри эритроцитов, обработанных глицерином и охлажденных до температуры ниже нуля [49]. Описанные предварительные опыты на эритроцитах имеют большое значение по многим причинам. В них установлено, что глицерин оказывает защитное действие при низких температурах не только на сперматозоиды; на основании этих опытов возник ряд принципиальных вопросов относительно механизма действия глицерина, которые было бы очень трудно разрешить, если бы мы ограничились только исследованиями спермы. Наконец, эти опыты открыли нам путь к разрешению проблемы увеличения длительности жизни эритроцитов in vitro.

Предварительные опыты по переливанию замороженных эритроцитов

Еще не так давно не было твердой уверенности в том, что переливание замороженных и оттаянных в присутствии глицерина эритроцитов действительно безопасно и может дать положительные результаты. Когда обработанные глицерином эритроциты вводили в плазму или в физиологический раствор, они быстро гемолизировались. По-видимому, это происходило потому, что молекулы воды проникали в клетки быстрее, чем из них выделялись молекулы глицерина, вследствие чего эритроциты набухали. Указанная трудность была преодолена Словитером [41, 42], который по предложению Чарлза Харингтона удалял глицерин постепенно путем диализа. Словитер нашел, что небольшие пробы человеческой крови, содержавшие после разбавления 15% глицерина, переживали замораживание при —79° и последующее оттаивание. После удаления глицерина диализом и повторного взвешивания в плазме 80—90% эритроцитов оказывались неповрежденными и, по-видимому, совершенно нормальными [42]. Обработанные глицерином эритроциты кролика, замороженные при —79°, оттаянные и освобожденные от глицерина, метили радиоактивным фосфором (P^{32}) и вводили в вену донора. Скорость потери радиоактивности клетками циркулирующей крови была почти такой же, как и при введении меченых, но незамороженных эритроцитов (фиг. 2).

Еще более широкий размах приобрели опыты, проводимые отделом переливания крови Медицинского научно-исследовательского совета [33]. К 250 *мл* человеческих эритроцитов добавляли равный объем 0,85-процентного раствора хлористого натрия, содержащего 30% глицерина, и смесь охлаждали до —79°. При вращении контейнера в замораживающей смеси при температуре —79° вся масса застывала приблизительно за 10 *мин*. Ее выдерживали при этой температуре несколько часов, а затем оттаивали как можно быстрее при +37°. Обработанные глицерином эритроциты диализировали при температуре +4° против 0,85-процентного раствора хлористого натрия, содержащего 6% глицерина. Диффузат постепенно разбавлялся, и к концу суток концентрация в нем глицерина составляла менее 0,5%. Диализ продолжали еще 12 *час* против 0,85-процентного раствора NaCl. После удаления таким путем глицерина эритроциты вновь взвешивали в исходной плазме и пробы воссозданной крови культивировали аэробно и анаэробно, тогда как всю массу инкубировали при +4°. Через 5 дней культуры были стерильными. Замороженные эритроциты, принадлежавшие к группе А типу N, Rh +, вводили больным с той же группой крови, типом М или MN, Rh —. Больной, страдавший тяжелым хроническим лейкозом получил 100 *мл* взвеси предварительно замороженных эритроцитов. При этом не наблюдалось никаких

неблагоприятных реакций [33]. Испытания по методу дифференциальной агглютинации [8] показали, что число чужеродных эритроцитов в кровеносной системе приблизительно равно числу, которое можно было ожидать, если бы переливали свежую, незамороженную кровь.



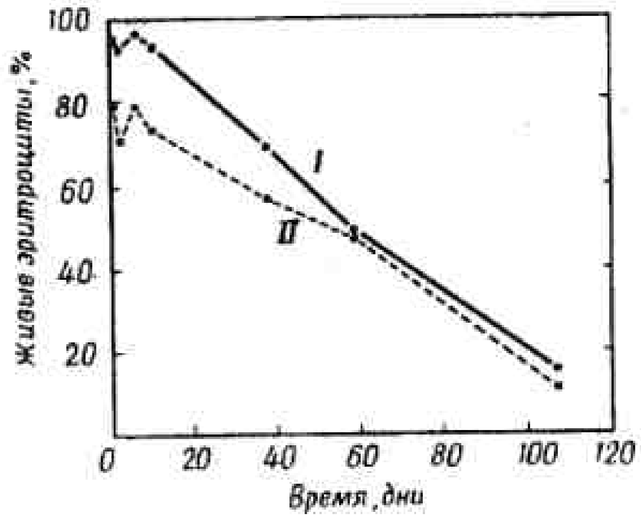
Фиг. 2. Остаточная радиоактивность циркулирующих в крови эритроцитов после введения клеток, меченных P^{32} [42].

● — незамороженные эритроциты; ○ — замороженные эритроциты (хранившиеся в течение 2 *час*); + — замороженные эритроциты, хранившиеся в течение 20 дней; ▲ — замороженные эритроциты, хранившиеся в течение 42 дней.

После этого провели более точные испытания — вводили большие количества замороженных эритроцитов вместе с таким же количеством незамороженных. Было выбрано трое больных, страдающих железодефицитной анемией. Как незамороженные эритроциты (группа О, тип М), так и замороженные (группа А, тип N) хранили перед вливанием в течение примерно 11 дней при температуре +4°.

Замороженные эритроциты, кроме того, обрабатывали глицерином и инкубировали 2—3 *час* при температуре —79°.

После оттаивания глицерин удаляли, как описано выше. В каждой группе концентрацию переживших клеток группы О (контрольные) и группы А, типа N (замороженные) определяли по агглютинации в последующие за переливанием дни. Общий объем эритроцитов у каждого реципиента вычисляли спустя 24 или



Фиг. 3. Процент выживания замороженных (*I*) и контрольных (*II*) эритроцитов в различные сроки после переливания [33].

48 *час* после переливания по методу Рива и Вилла [38], вводя небольшое количество эритроцитов, меченных P^{32}. Таким способом можно определить как относительное число замороженных и незамороженных клеток, так и абсолютное число живых эритроцитов [33]. Полученные данные показали, что число выживших замороженных клеток немногим отличается от числа контрольных клеток, а в одном случае первых было больше, чем вторых (фиг. 3). Установлено, что из всего количества эритроцитов, замороженных перед переливанием, 76—96% присутствовало в крови спустя 24 *час*. Словитер показал также, что 70% обработанных глицерином эритроцитов человеческой крови можно восстановить после

хранения в течение 6—9 месяцев при температуре —79° [43]. Из эритроцитов, хранившихся от 3 до 8,5 месяцев при —79°, удаляли глицерин и те из них, которые не имели никаких повреждений, использовали для переливания. Затем определяли число переживших эритроцитов в кровотоке и сравнивали с числом выживших свежесобранных эритроцитов разных групп крови, использованных для переливания в то же самое время. Оказалось, что спустя 24 *час* после переливания число выживших эритроцитов, хранившихся при —79° в течение 3—6 месяцев, составляло 72—92% числа выживших контрольных эритроцитов. После этого и контрольные и замороженные клетки удалялись из кровотока с одинаковой скоростью [34]. Контрольными служили только что собранные эритроциты, тогда как замороженные хранились после оттаивания в течение 11 дней при +4°. Очевидно, что выживаемость эритроцитов, которым удалось избежать лизиса в ходе замораживания при —79°, хранения и оттаивания, а также в процессе удаления глицерина, если и снижалась, то крайне незначительно.

В ранних опытах относительно небольшое число эритроцитов восстанавливалось после хранения при —15° в среде, содержащей глицерин. Так, около 50% клеток восстанавливалось после хранения в течение 29 дней при —15° и только 20% — после пребывания в течение 80 дней при той же температуре. Тем не менее восстановленные и освобожденные от глицерина клетки после переливания жили в кровяном русле нормальный, положенный им срок. Это показывает, что даже при температуре —15° скорость старения понижалась [34]. Можно было сделать вывод, что эритроциты, восстановленные после продолжительного хранения в замороженном состоянии, имели после введения их в кровоток нормальную продолжительность жизни. Поскольку какая-то часть клеток разрушалась во время хранения в процессе удаления глицерина, необходимо было уменьшить эти потери, чтобы массовое хранение эритроцитов стало возможным и было использовано при создании банков крови.

Оптимальная концентрация глицерина для защиты эритроцитов при —79°

Когда эритроциты, взвешенные в 0,85-процентном растворе хлористого натрия, содержащем 15% глицерина, замораживали при —79° и затем оттаивали, гемолиз в большей степени происходил в больших пробах (500 *мл*), а не в малых (2—5 *мл*). Это натолкнуло на мысль о том, что повреждения могли возникнуть вследствие более медленного охлаждения и таяния в больших пробах.

Лавлок исследовал причины гемолиза человеческих эритроцитов во время замораживания и таяния, а также механизм защитного действия глицерина, предотвращающего гемолиз [20, 21]. Он показал, что повреждение эритроцитов в среде, не содержащей глицерина, во многом обусловлено действием более высоких концентраций солей, чем 0,8 *M* NaCl, во время вымораживания воды при температуре от —3 до —40° (см. гл. 12).

Гемолиза удавалось избежать, когда вследствие быстрого замораживания и оттаивания длительность воздействия крепких растворов хлористого натрия была менее 3 *сек*. В присутствии глицерина концентрация растворенной соли, уравновешенной со льдом, снижалась при любой температуре соответственно соотношению числа молекул глицерина и хлористого натрия в исходном растворе. В предварительных опытах разбавитель приготовляли, смешивая 30 объемов глицерина (удельный вес при 20° приблизительно 1,26) с 70 объемами 0,85-процентного раствора хлористого натрия при комнатной температуре. Таким образом, полученный раствор содержал около 38% (по весу) глицерина или был 4,0 *M*. Концентрация хлористого натрия снижалась приблизительно до 0,6% (примерно 0,1 *M*). К этому разбавителю добавляли равный объем цельной крови [41, 42]. Конечная концентрация глицерина в смеси была примерно 2 *M* (15% по объему или 19% вес/объем).

Лавлок [21] подсчитал, что для предотвращения повышения концентрации хлористого натрия от 0,15 *M* до критической (вызывающей повреждение) 0,8 *M* при температуре ниже —40° во время медленного выделения

льда при охлаждении больших объемов эритроцитов до —79° требуется 2,9 *М* (20-процентный по объему или 25-процентный вес/объем) раствор глицерина. По его мнению, целесообразно понижать начальную концентрацию хлористого натрия до 0,12 *М*.

Примерно в это же время Чаплин и Моллисон [4] нашли, что интенсивность гемолиза, наступающего во время замораживания и оттаивания крови, в равной степени зависит от конечной концентрации глицерина и от скорости замораживания. Повышение концентрации глицерина (до 20—30% по объему) увеличивало процент восстановленных клеток при замораживании больших объемов крови. Эти авторы также нашли, что понижение концентрации хлористого натрия давало положительный эффект. Они хранили 420 *мл* человеческой крови, смешанной со 120 *мл* стандартного кислого цитратно-декстрозного раствора, при температуре +4° не более 7 дней. Из этой смеси удаляли 240 *мл* цитратной плазмы, а оставшиеся 300 *мл* клеточной взвеси разбавляли 200 *мл* смеси, содержащей 50% (по объему) глицерина и 0,425% хлористого натрия. Таким образом, конечная концентрация глицерина составляла приблизительно 20% по объему или 25% по весу, а конечная концентрация хлористого натрия — около 0,2%. При вращении колб с разбавленной таким образом кровью в ванне с температурой —79° их содержимое застывало в течение 8—10 *мин*, а без вращения — в течение 15—20 *мин*. Гемолиз после оттаивания был незначительным и не превышал 5% независимо от скорости охлаждения колб с кровью [4].

Браун и Хардин [1], проводившие независимо аналогичные исследования, установили, что интенсивность гемолиза, возникающего во время охлаждения эритроцитов до —79° и последующего оттаивания, можно значительно уменьшить путем повышения концентрации глицерина в суспензионной среде. При замораживании в присутствии глицерина в более высоких концентрациях можно было, не вызывая гемолиза, увеличить количество клеток по отношению к суспендирующей жидкости и уменьшить скорость охлаждения и оттаивания. Авторы показали, что эритроциты человека, помещенные непосредственно в 30—35-процентный (вес/объем) раствор глицерина (3,2—3,8 *М* глицерин), не гемолизируются в течение 2 *час* при температуре +5°. Клетки, предварительно уравновешенные с данной концентрацией глицерина, можно переносить в 0,16 *М* раствор лактата натрия, содержащий до 56,25% (вес/объем) глицерина (6,0 *М*), без возникновения гемолиза. Затем эритроциты охладили до —70° и хранили при этой температуре. Спустя 6,25 месяца из общего числа клеток восстановилось 94%. Глицерин удаляли, отмывая порциями гипертонического раствора лактата натрия, содержащими глицерин в понижающейся концентрации. После переливания отмытых от глицерина оттаянных клеток количество переживших клеток в кровотоке реципиента варьировало у отдельных лиц от 49 до 90%, составляя в среднем 62%. Большинство погибших клеток исчезало из кровяного русла уже спустя 24 *час* после переливания. Данные о влиянии осмотического давления на эритроциты in vitro позволяют предполагать, что их распад связан с осмотическим эффектом, обусловленным неполным удалением внутриклеточного глицерина перед введением эритроцитов в кровоток [1].

Дальнейшие исследования в поисках оптимальной концентрации глицерина и различных компонентов человеческой крови, подлежащей хранению при —79°, проводили Моллисон и сотрудники [3]. Колбы, содержащие 120 *мл* лимоннокислой декстрозы и 420 *мл* цельной крови, центрифугировали для уплотнения эритроцитов. Затем эритроциты взвешивали в одном из 5 разбавителей, содержащих в различных соотношениях глицерин и хлористый натрий или цитраты. Некоторые растворы были слегка подкислены. Один из них был забуферен фосфатами до pH 6,9. Колбы с обработанными глицерином эритроцитами замораживали при —70 или —79° и выдерживали при этой температуре от 1 дня до 21 месяца. После оттаивания определяли процент восстановившихся клеток. Затем их отмывали в серии растворов цитрата натрия с понижающейся концентрацией глицерина и еще раз определяли процент сохранившихся клеток. После этого эритроциты суспендировали в солевом растворе так, чтобы объем уплотненных клеток в

различных пробах составлял примерно 40%. Некоторые пробы пометили Cr^{51}. Оттаянные и отмытые эритроциты вводили в кровоток реципиента и спустя 24 *час*, а затем через различные интервалы времени определяли число выживших эритроцитов либо по методу дифференциальной агглютинации, либо с помощью измерения радиоактивности в пробах крови [35]. В некоторых случаях число переживших замораживание эритроцитов определяли обоими методами [3].

Полученные результаты показали, что эритроциты, хранившиеся в течение года при —79° в физиологическом растворе, содержащем 15% (по объему) глицерина, сильно повреждались. После оттаивания гемолизировалось 68% эритроцитов, а после удаления глицерина сохранилось лишь 25%. Однако эти клетки выживали после переливания их реципиенту.

Лучшие результаты получали при повышении конечной концентрации глицерина до 28% по весу (3 *М*) и понижении конечной концентрации хлористого натрия примерно до 0,2%. Так, когда 180 *мл* уплотненных эритроцитов и 120 *мл* цитратной плазмы разбавили 200 *мл* раствора, содержащего 62% (вес/объем) глицерина и 0,425% хлористого натрия, за 1 год при температуре —79° гемолизировалось лишь 5% эритроцитов. После удаления глицерина восстановилось 70—90% эритроцитов, а 82% пережили переливание.

Более 90% клеток переживало замораживание и хранение при —79° в течение 1 года в щелочной среде, содержащей цитрат натрия (в этой среде конечная концентрация глицерина составляла около 30%), но спустя 24 *час* после переливания в кровотоке осталось только 70% клеток.

Когда разбавитель содержал цитрат калия и был забуферен фосфатами до pH 6,9 или 7,0, а конечная концентрация глицерина в самих клетках и вокруг них достигала примерно 30% (3 *М*), около 95% эритроцитов, хранившихся при —79°, восстанавливалось после оттаивания. Из них 91—97% оставалось в кровотоке спустя 24 *час* после переливания, причем эти эритроциты были вполне жизнеспособными [3]. Весьма обнадеживало то обстоятельство, что увеличение периода

хранения при —79° от 1 недели до 2 лет не влияло на выживание эритроцитов человека и на продолжительность их жизни в кровеносной системе. Несомненно, потенциальную жизнеспособность можно продлить на многие годы, в частности путем хранения клеток при низких температурах. В США уже используют охлаждение до температуры от —80 до —120° для хранения обработанных глицерином эритроцитов [52]. В Англии этот метод еще не нашел широкого применения. Это объясняется частично тем, что в Англии служба крови пока удовлетворяет существующую потребность в крови, а частично высокой стоимостью установки и эксплуатации больших холодильников, в которых можно поддерживать столь низкую температуру. Поэтому были предприняты попытки хранить кровь в замороженном состоянии при температурах, создаваемых обычными морозильными камерами.

Хранение обработанных глицерином эритроцитов при температуре —15, —20 и —45°

Результаты первых опытов по хранению обработанных глицерином эритроцитов человека при —15° были не очень обнадеживающими. Цитратную кровь, из которой удалили около половины надосадочной плазмы, обрабатывали равным объемом 30-процентного раствора глицерина в физиологическом растворе и оставляли в морозильной камере с температурой —15° [34]. Замораживание происходило медленно, и эритроциты, проходя через канальцы, образовавшиеся между кристаллами льда, постепенно оседали в виде слоя под этими кристаллами. При оттаивании через 29 дней гемолизовалось около 50% эритроцитов, а при оттаивании через 80 дней восстановилось всего лишь около 20%. После удаления глицерина посредством диализа эритроциты переливали вместе с незамороженными контрольными клетками. Результаты опыта показали, что клетки, восстановившиеся после хранения в течение 29—84 дней при температуре —15°, вели себя нормально в кровотоке реципиентов (табл. 4).

ТАБЛИЦА 4

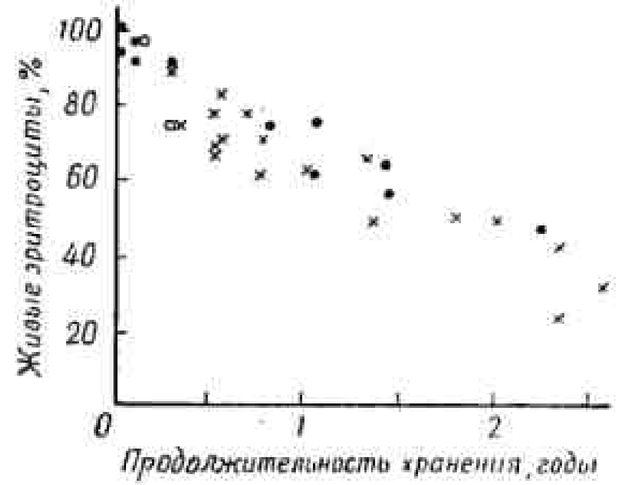
Выживание замороженных эритроцитов в кровотоке реципиентов спустя различные сроки после переливания [34]

Продолжительность хранения при —15°, дни	Выжившие предварительно замороженные эритроциты % от выживших свежесобранных					
	немедленно	спустя 1 день	спустя 2 дня	спустя 6—9 дней	спустя 13—16 дней	спустя 35—36 дней
29	82	77	76	74	—	88
77	100	95	86	92	98	89
84	106	75	70	70	82	91

Браун и Хардин [1] сообщили, что при хранении эритроцитов в течение 50 дней при —15° в 0,16 *М* растворе лактата натрия, содержащем 50% (вес/объем) глицерина, восстанавливалось 79% клеток. Однако после переливания жизнеспособными были только 47% эритроцитов, вероятно вследствие слишком высокой концентрации глицерина, вызвавшей их повреждение [15].

Эритроциты, взвешенные в 3-процентном растворе цитрата натрия или калия, содержащем 30% глицерина, при температуре —20°, после переливания быстро утрачивали жизнеспособность. Возможно, это было обусловлено щелочностью раствора, поскольку эритроциты, взвешенные в 30-процентном растворе глицерина в цитрате калия, забуференном до pH 6,9, или в 30-процентном растворе глицерина в цитратной плазме с pH 7,4, отличались почти нормальной жизнеспособностью, когда их переливали после хранения в течение 3 месяцев при температуре —20°. Затем они начали постепенно разрушаться, и через 30 недель инкубирования при температуре —20° лишь около 50% клеток сохраняли жизнеспособность после переливания [2]. Спустя год эритроциты, хранившиеся при этой температуре, все еще сохраняли свою антигенную специфичность. Такую методику широко применяют для хранения небольших проб крови редких групп для диагностических целей [37]. При —20° биохимические процессы полностью еще не прекращаются и эритроциты медленно используют декстрозу. Это может служить, хотя бы отчасти, причиной их разрушения при данной температуре [2].

В последующих опытах в растворы цитрата натрия или калия, забуференные фосфатами до pH ~ 7,0, добавляли 0,005 *М* глюкозу, а также глицерин в различных концентрациях. Эритроциты взвешивали в различных средах и хранили при температуре от —20 до —45° в течение 3 лет. Обычно 85—95% первоначально замороженных эритроцитов восстанавливалось после отмывания их в растворах с понижающейся концентрацией глицерина [15].

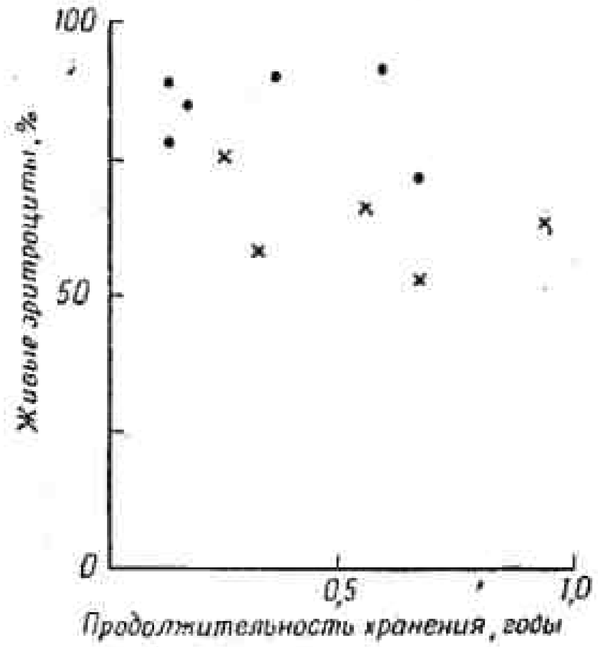


Фиг. 4. Процент выживания эритроцитов, хранившихся в различные сроки при —20° в разных глицеринсодержащих растворах, спустя 24 *час* после переливания [15].
× — раствор 1 (цитрат калия, фосфаты натрия); ● — раствор 2 (цитрат калия, фосфаты калия); ○ — раствор 3 (цитрат натрия, фосфаты натрия).

Результаты этих опытов были лучше, чем те, которые получали при хранении эритроцитов при температуре —20° в растворах, не содержащих глюкозы. Самопроизвольный гемолиз, наступающий во время хранения при —20°, был наименьшим в средах с конечной концентрацией глицерина 6,5 *М* и наибольшим при концентрации глицерина 2,5 *М*. Если эритроциты хранили в этих растворах при —45°, гемолиз был весьма незначительным, когда концентрация глицерина составляла 4,0 *М* и выше. Спустя 1 год хранения при температуре —45° после отмывания от глицерина восстанавливалось 96—100% эритроцитов, замороженных ранее в 4,5 или 7,0 *М* растворе глицерина [15].

Эритроциты, хранившиеся при температуре —20°, отмывали от глицерина и вводили реципиенту. Затем сле-

дили за продолжительностью их жизни в кровотоке. Данные, приведенные на фиг. 4, показывают, что после хранения в течение 6 месяцев при температуре —20° спустя 24 *час* после переливания в кровяном русле обнаруживается 60—85% эритроцитов. Потеря клеток была



Фиг. 5. Процент выживания эритроцитов от одного донора, хранившихся различные сроки при —45°, спустя 24 *час* после переливания [15].

● — 4,5 *М* раствор глицерина; × — 7,0 *М* раствор глицерина.

слишком велика, чтобы можно было рекомендовать продолжительное хранение крови, предназначенной для переливания, при температуре —20° [15].

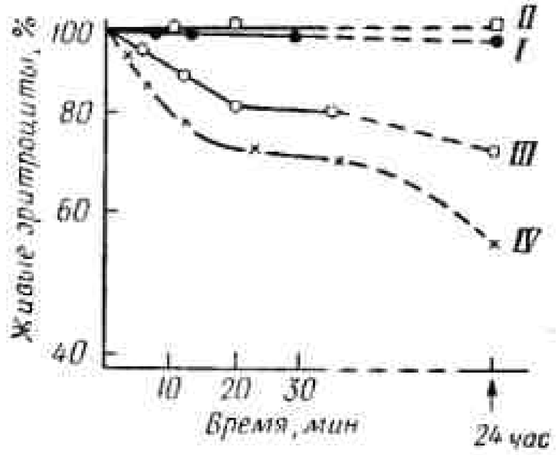
Когда кровь, хранившуюся при температуре —45°, отмывали от глицерина и переливали в кровоток реципиента, последующее выживание эритроцитов зависело от концентрации глицерина, воздействию которого они подвергались. Эритроциты, хранившиеся в 4,5 *М* растворе глицерина в течение различных периодов времени (до 8 месяцев), лишь незначительно утрачивали жизнеспособность. Гораздо меньшее число эритроцитов от того же донора переживало такой же срок хранения при температуре —45° в 7,0 *М* растворе глицерина (фиг. 5). Кратковременное воздействие глицерина в концентрации более 6,0 *М* при температуре выше нуля наносило повреждение эритроцитам, у которых после удаления глицерина как in vitro, так и после переливания наблюдался гемолиз (фиг. 6). Концентрация глицерина в

клетках после отмывания составляла всего 0,002 *М*, так что быстрое разрушение их после введения в кровоток отнюдь не было результатом неполного удаления глицерина, как предполагали Браун и Хардин [1].

Описанные выше исследования показали, что эритроциты человека можно сохранять в течение 1 года без

Фиг. 6. Процент выживания эритроцитов, подвергавшихся в течение 1 *час* воздействию глицерина и вновь введенных донору, в различные сроки после переливания [15].

I—без глицерина; *II*—5,15 *М* раствор глицерина; *III*—6,0 *М* раствор глицерина; *IV* — 6,85 *М* раствор глицерина.



последующей большой потери их жизнеспособности в средах с относительно умеренным содержанием глицерина при температуре —45°. Однако нет никаких сомнений, что в пределах температур от —80 до —120° продолжительность хранения можно увеличить [52].

Методы удаления глицерина из эритроцитов

Эритроциты человека, взвешенные в средах с высокой концентрацией глицерина, не подвергаются воздействию избыточного наружного осмотического давления, поскольку глицерин проникает в клетки до тех пор, пока внешняя и внутренняя концентрации его не сравняются. Эритроциты, перенесенные в среды с такой же концентрацией электролитов, но без глицерина, быстро набухают и гемолизируются, потому что молекулы воды быстрее проникают через оболочку в клетку, чем покидают ее молекулы глицерина. Глицерин и воду можно «обменять» с помощью диализа, но этот процесс протекает крайне медленно, причем возникает опасность бактери-

альной инфекции. Тогда исследователи направили усилия на поиски различных методов удаления глицерина. Ни глюкоза, ни цитрат натрия не способны быстро проникнуть в эритроциты. Их можно использовать для повышения осмотического давления в окружающей эритроциты среде. Так, добавление 1,0 *М* глюкозы или 0,33 *М* цитрата натрия приблизительно в семь раз увеличивает наружное осмотическое давление в клетках, которые были предварительно взвешены в среде, содержащей 0,16 *М* соли и 2,0 *М* глицерин. В результате глицерин и вода покидают клетки и внутриклеточная концентрация солей повышается. Лавлок охарактеризовал этот процесс как «осмотическое сжатие» [19]. После установления осмотического равновесия содержание воды и глицерина в клетках уменьшается примерно до $^1/_7$ исходной величины. Если после этого эритроциты перенести в физиологический раствор или в плазму, они будут быстро впитывать воду, пока не восстановится их первоначальный размер, а также нормальное содержание воды и солей. Эритроциты, обработанные таким способом, внешне не изменялись, и, судя по специальным пробам, их осмотическая резистентность оставалась в норме [19].

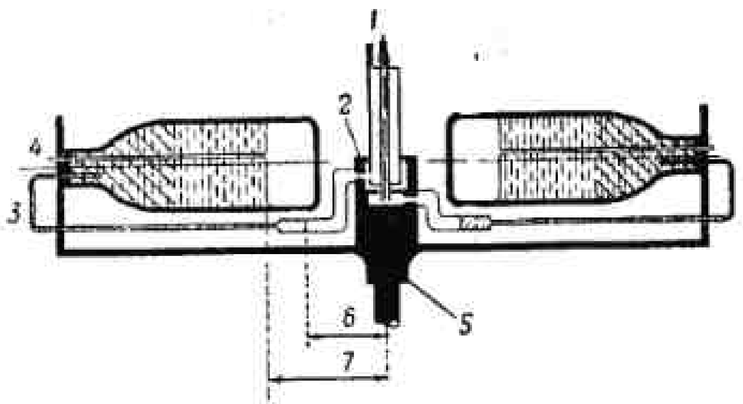
Браун и Хардин [1] применили такой же принцип для удаления глицерина из замороженных эритроцитов. Они использовали концентрированный раствор лактата натрия для поддержания достаточно высокого осмотического давления в среде, окружающей оттаянные клетки. Тем самым предотвращался гемолиз в процессе отмывания растворами с постепенно понижающейся концентрацией глицерина. Всего лишь около 64% замороженных клеток, освобожденных таким путем от глицерина, не были повреждены после переливания. Объясняется это тем, что или находившийся внутри клеток глицерин не был полностью удален [1], или же эритроциты были повреждены в результате воздействия слишком высоких концентраций глицерина еще до замораживания [15].

Словитер изучал возможное токсическое действие остаточного глицерина в замороженной крови и нашел, что низкая концентрация глицерина в переливаемой крови не сокращает продолжительности жизни клеток и не вызывает никаких нежелательных явлений у реципиентов [44, 45]. Он обрабатывал уплотненные эритроциты равным объемом раствора, содержащего на 100 *мл* 40 *г* глицерина, 25 *г* цитрата натрия и 0,2 *г* лимонной кислоты. После хранения при температуре —20° в течение 1—210 дней эритроциты согревали при +40°. К оттаявшим эритроцитам добавляли в соотношении 1:2 раствор, содержащий на 100 *мл* 50 *г* глюкозы и 0,9 *г* хлористого натрия. Спустя 10 *мин* взвесь разбавляли двойным объемом 0,9-процентного раствора NaCl, так что концентрация глицерина понижалась примерно до 4,5%. Когда пробы эритроцитов, взвешенные в растворах, содержащих около 4,5% глицерина, вводили в большие объемы плазмы, 3,7—9,8% клеток гемолизировалось. При переливании других проб кроликам никаких вредных влияний, обусловленных остаточным глицерином или гемолизом, не отмечалось [44].

Эритроциты человека, хранившиеся в среде с примесью глицерина в течение 4 месяцев при —20° или в течение 18 месяцев при —79°, а затем обработанные концентрированной глюкозой с целью снижения содержания глицерина приблизительно до 5%, метили радиоактивным хромом (Cr^{51}). После переливания клетки нормально функционировали в кровотоке реципиента [45].

Большинство терапевтов, хирургов и физиологов предпочитают перед переливанием согретых эритроцитов полностью удалять глицерин. В настоящее время его можно быстро и хорошо отмыть путем центрифугирования, начиная с концентрированного раствора какой-либо соли, которая, как предполагает Лавлок, не проникает в клетки. Первый прибор для центрифугирования был несложным по конструкции и состоял из конусообразного сосуда, насаженного на вращающийся диск и имеющего выходные отверстия вблизи горловины. Кровь, содержащую 30% глицерина, обрабатывали соответствующим количеством гипертонического раствора цитрата натрия [4] и давали ей вытекать по капле в смесительную камеру, в которую добавляли равный объем 0,85-процентного раствора хлористого натрия. Из смесительной камеры кровь вытекала во вращающийся сосуд, эритроциты отбрасывались на стенки сосуда, а жидкость вытекала через верхние выходные отверстия. Отмывание 0,85-про-

центным раствором хлористого натрия продолжали до полного удаления глицерина и цитрата [6]. Браун и Хардин [1] приспособили для этой цели обычную насадку центрифуги, но получили не очень хорошие результаты ввиду неравномерного отмывания во всех четырех сосудах. Впоследствии была сконструирована специальная насадка, которую можно приспособить к обычной лабораторной центрифуге. На ней закреплены горловинами наружу 2 сосуда для крови емкостью по 550 *мл* каждый.



Фиг. 7. Схема расположения сосудов в насадке центрифуги и циркуляции через них жидкости при отмывании эритроцитов путем центрифугирования [32].

1 — трубка, подающая жидкость из резервуара; *2* — кольцевидное пространство; *3* — трубка, подводящая жидкость в сосуд; *4* — трубка, отводящая жидкость из сосуда; *5* — ротор центрифуги; *6* — расстояние от оси центрифуги до уровня жидкости в трубке *3*; *7* — расстояние от оси центрифуги до уровня жидкости, достигаемого в сосуде.

Как показано на фиг. 7, сосуды заполняются независимо друг от друга из двух отдельных резервуаров. Отмывать начинают средой, содержащей глицерин в более низкой концентрации, а цитрат натрия в более высокой, чем среда, в которой были заморожены клетки. Концентрация глицерина и цитрата в отмывающей жидкости постепенно понижается. Из верхнего резервуара емкостью 2 *л* физиологический раствор поступает в меньший резервуар, в котором находится и 5-процентный раствор цитрата натрия, содержащий 16% (вес/объем) глицерина. Трубка, отходящая от этой системы, подведена к сосуду с кровью. В обычном опыте прохождение 1250 *мл* отмывающей жидкости в течение 2,5 *час* понижало концентрацию глицерина в клетках с 30 до 0,6%, причем

95% эритроцитов не повреждалось. Гемолиз можно было полностью предотвратить, изолируя насадку центрифуги от мотора или же используя рефрижераторную центрифугу [32]. Для удаления глицерина из замороженных клеток приспособили также центрифугу Кона и получили прекрасные результаты [16].

Биохимические изменения в эритроцитах при воздействии глицерина и во время хранения на холоду

Низкие температуры используют для предотвращения или задержки биохимических изменений, которые способствуют старению и разрушению клеток во время хранения их при температуре выше нуля. В связи с этим возникает следующий вопрос: удастся ли нам добиться этой цели при консервации эритроцитов? Вполне вероятно, что применение среды с высокой концентрацией глицерина будет тормозить нормальные метаболические процессы в клетках до и после оттаивания. Причины возникновения гемолиза и утраты жизнеспособности эритроцитами, хранившимися в определенных условиях, можно выявить только в результате специальных биохимических исследований. Возникает также настоятельная необходимость в разработке какого-нибудь лабораторного метода определения потенциальной жизнеспособности эритроцитов in vivo перед переливанием крови.

гликолиз

При хранении крови в стандартном кислом цитратно-декстрозном растворе при + 4° глюкоза исчезает со скоростью около 0,4 *ммоль* на 1 *л* эритроцитов в день.

При температуре + 38 или + 4°, когда эритроциты взвешены в средах, содержащих 1,0—4,0 *М* глицерин, гликолиз почти не нарушается. Если же концентрация глицерина превышает 5,0 *М*, гликолитические процессы подавляются, а при 6,0 *М* и выше они фактически полностью прекращаются [15]. Предотвращение гликолиза способствует переживанию эритроцитов in vitro, но клетки,

подвергшиеся воздействию 5,0 и 6,0 *М* глицерина, не выживают после переливания.

Когда эритроциты выдерживали при температуре — 20° в нейтральных или подкисленных средах, содержащих 2—4 *М* глицерин, скорость гликолиза понижалась до 0,005 *ммоль* глюкозы на 1 *л* эритроцитов в день. Скорость исчезновения глюкозы понижалась в 80 раз по сравнению со скоростью, наблюдавшейся при + 4°. Продолжительность жизни клеток, согретых после хранения при температуре — 20°, была в 18 раз больше по сравнению с длительностью жизни клеток, хранившихся при + 4°. Все сказанное говорит о том, что интенсивность гликолиза не может служить показателем для определения потенциальной жизнеспособности клеток и что на разрушение клеток при температуре — 20° влияют какие-то другие процессы [15].

АДЕНОЗИНТРИФОСФАТ И ДРУГИЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ ФОСФАТЫ

Аденозинтрифосфат (АТФ) нужен для фосфорилирования глюкозы эритроцитами. Повреждение клеток, хранившихся при + 4°, начинается с того момента, когда разрушение АТФ превалирует над синтезом, и становится необратимым, когда содержание АТФ падает ниже определенного уровня [10]. До достижения этого критического уровня нормальное состояние клеток можно восстановить путем добавления аденозина.

В какой же степени распад клеток во время хранения при температуре — 20° связан с потерей АТФ? В тех случаях, когда эритроциты хранили при — 20° в средах с примесью примерно 3,0 *М* глицерина, содержание АТФ снижалось медленно и через 1,5 года составляло приблизительно 50% нормальной величины. Между содержанием АТФ в эритроцитах и их жизнеспособностью существовала определенная корреляция, о которой можно было судить по проценту клеток, оставшихся живыми спустя 24 *час* после переливания [15]. Когда эритроциты перед переливанием инкубировали с аденозином, содержание в них АТФ значительно повысилось. Вместе с тем выживаемость увеличилась в меньшей степени, чем можно было ожидать, судя по результатам, полученным на клетках, хранившихся при + 4°. Содержание АТФ в эритроцитах, хранившихся в 4,5 *М* растворе глицерина при — 45°, снижалось очень медленно: в период между 4-м и 10-м месяцами консервации наблюдались лишь очень незначительные изменения. Когда же эритроциты взвешивали в среде с примесью 7,0 *М* глицерина при — 45°, содержание АТФ в них очень быстро достигало низкого уровня, но при длительном хранении при этой температуре изменения в клетках были незначительными. При непродолжительном хранении длительность жизни после переливания сильно уменьшалась и мало изменялась при продолжительном хранении [15].

Когда эритроциты обрабатывали растворами с концентрацией глицерина выше 6,0 *М* при температуре + 20 или + 37°, содержание АТФ быстро понижалось. Возможно, это было частично обусловлено подавлением гликолиза, который имеет существенное значение для поддержания содержания АТФ на определенном уровне. Выживаемость эритроцитов спустя 24 *час* после переливания уменьшалась, даже если содержание АТФ нормализовали путем введения аденозина [15].

Результаты этих опытов представляют определенный интерес, поскольку они показывают, что выживаемость эритроцитов после переливания в некоторой степени зависит от содержания в них АТФ. Кроме того, они показывают, что во время хранения при низких температурах происходят и такие повреждения биохимических систем, которые не имеют отношения к энергетическому обмену в условиях нормальной температуры.

ИСЧЕЗНОВЕНИЕ КАЛИЯ ВО ВРЕМЯ ХРАНЕНИЯ

Чаплин и др. [5] изучали исчезновение калия из эритроцитов, хранившихся при температуре от — 20 до — 45° в течение различных периодов времени (до двух лет) в средах, содержащих 30% глицерина и цитрат натрия или калия. В течение первых 6 недель хранения в незабуференных растворах исчезало 70% внутриклеточного калия. Исчезновение калия значительно усиливалось, когда незабуференные взвеси перед замораживa-

нием насыщали кислородом. Вредящее действие кислорода можно было устранить с помощью таких антиоксидантов, как гидрохинон или аскорбиновая кислота, или же путем добавления буферной системы, поддерживающей pH почти на нейтральном уровне. Чаплин и сотрудники нашли, что и гемолиз, и исчезновение калия были значительно слабее во время хранения при температуре — 45°, но клетки все же постепенно разрушались. Эти исследователи считают, что предельный срок эффективного хранения эритроцитов при — 45° составляет пять лет. Исчезновение внутриклеточного калия должно отражать изменения в проницаемости оболочки эритроцитов. Эти изменения изучали с помощью физико-химических методов.

Биохимические изменения в эритроцитах во время хранения при низких температурах

Физико-химическое действие замораживания подробно рассмотрено в гл. 12. Здесь же мы хотим лишь обобщить положения, касающиеся продолжительного хранения эритроцитов при низких температурах.

Во время замораживания эритроциты подвергаются воздействию повышенных концентраций электролитов, поскольку вода из них вымораживается. Когда лед тает, соли вновь растворяются, образуя концентрированный раствор, который постепенно разбавляется. В результате воздействия концентрированного раствора хлористого натрия липиды и липопротеиды клеточной оболочки растворяются, так что проницаемость оболочки для катионов повышается. После полного разбавления среды клетки впитывают воду, набухают и гемолизируются.

При продолжительном воздействии высоких концентраций солей клетка может полностью раствориться [20]. В тех случаях, когда в состав среды входит глицерин, концентрация электролитов, уравновешенных со льдом, снижается при любой температуре во время замораживания или оттаивания. Если число молекул глицерина достаточно велико по отношению к молекулам солей, концентрация электролитов не достигает критического

уровня, при котором клетки быстро разрушаются. Это, вероятно, представляет собой один из важнейших факторов защитного действия глицерина, предотвращающего повреждение живых клеток во время замораживания и оттаивания [21, 22] (см. также гл. 12).

Присутствие глицерина полностью не исключает повышения концентрации солей при замораживании или возможности их физического воздействия на оболочку клетки во время продолжительного хранения при низких температурах. Глицерину присуще одно свойство: он остается в жидком состоянии при температурах до —80°. Вопрос о том, связывает ли глицерин воду, препятствуя ее замораживанию, обсуждается в гл. 12. Даже при полном удалении воды в растворе глицерина при температуре — 79° присутствуют еще хлористый натрий и другие соли. Клетки, хранящиеся продолжительное время при температурах ниже — 80° в средах, содержащих глицерин, непрерывно подвергаются неизбежному вредному воздействию окружающей среды. При обычной температуре метаболические процессы поддерживают нормальную структуру эритроцитов в состоянии динамического равновесия с окружающей средой различного состава. По мере снижения температуры эти биохимические процессы постепенно замедляются, а иногда и полностью прекращаются. В подобных условиях невозможно сохранить нормальную структуру клетки. Такие физические процессы, как случайное беспорядочное движение молекул, диффузия и растворение, при снижении температуры мало замедляются. Сравнительно небольшие потери и перемещение молекул на поверхности или внутри оболочек таких маленьких тел, как эритроциты, могут иметь гибельные последствия, если этим процессам не оказывается никакого противодействия или если они не регулируются. Оболочка эритроцита состоит из белков и липидов. Согласно Московицу и Кэлвину [36], основным ее компонентом являются фибриллы липопротеида эленина, которые располагаются параллельно поверхности клетки и скреплены друг с другом растворимыми в эфире липидами. Лавлок [22, 23] показал, что при благоприятных условиях хранения при температурах выше и ниже нуля происходит избирательное исчез-

новение лецитина и выделение из эритроцитов холестерина и азотсодержащих липидов. Лавлок [24] утверждает, что разрушение эритроцитов во время хранения наступает в результате утраты липидов поверхностью оболочки. Тогда непосредственному воздействию среды подвергаются уже нижележащие липопротеиды, которые отделяются и рассеиваются в среде. Если среда не насыщена липидными компонентами оболочки, процесс отделения липопротеидов не прекратится до тех пор, пока не наступит полный распад клеток. Распад клеток во время хранения при низких температурах можно предотвратить, применяя такие среды, в которых хлористый натрий заменен цитратами, а скорость дисперсии липидов и липопротеидов из клеточной оболочки снижена. Положительное действие оказывает также присутствие плазмы или фосфолипидов плазмы. Быстрое исчезновение калия из клеток, хранившихся при —20°, и более медленное при температуре —45°, вероятно, связано с утратой липидов клеточной оболочкой.

Процент выживания эритроцитов после продолжительного хранения мог бы быть выше, если бы не существовало остаточной жидкой фазы, благодаря которой возможны такие физические процессы, как диффузия и растворение. Полностью устранить эту фазу можно, охлаждая обработанные глицерином эритроциты до таких температур (ниже —80°), при которых глицерин переходит в твердое состояние. Некоторую надежду в этом отношении дают попытки заменить глицерин лактозой в среде, в которой охлаждают кровь [40].

Сохранение эритроцитов при помощи быстрого замораживания или быстрой лиофилизации без глицерина

В 1955 г. Меримэн и Кейфиг [30] сообщили, что им удалось заморозить маленькие пробы цельной крови, разбрызгивая ее пульверизатором на поверхности жидкого азота при —196°. Кровь разбавляли кислым раствором цитрата натрия, содержащим глюкозу. Охлаждение производили достаточно быстро во избежание повреждений, которые вызывает продолжительное воздействие концентрированных солей во время замораживания. Быстрое оттаивание осуществляли путем распыления замороженного порошка в плазме или физиологическом растворе при +42°. Затем пробы крови метили Cr^{51} и переливали реципиентам. Хотя в последующие 2 недели эритроциты исчезали быстрее, чем в норме, какая-то часть их выживала. Было бы крайне интересно проследить результаты переливания больших количеств крови, хранившейся продолжительное время при температуре —196° после быстрого замораживания по методу Меримэна. Здесь могут возникнуть затруднения в связи с тем, что эритроциты чувствительны к чрезмерно быстрому охлаждению (см. гл. 12). Кроме того, трудно выдерживать оптимальную скорость охлаждения в тех случаях, когда требуется распылять большие объемы крови. Однако тот факт, что в таких условиях ни до, ни после замораживания не требуется проводить никаких дополнительных операций (ничего не надо добавлять в кровь или выделять из нее), представляет собой достаточно большое преимущество, и это преимущество перевешивает некоторые технические трудности, связанные с очень быстрым замораживанием и оттаиванием больших объемов крови без заражения или повреждения клеток.

В 1950 г. мы совместно с Полджем попытались консервировать эритроциты при помощи высушивания. Высушивание путем возгонки льда из тонкой пленки крови, замороженной до температуры от —20 до —40°, не представляло затруднений, но как только остаток увлажняли водой, физиологическим раствором, плазмой или гипертоническим раствором, немедленно наступал гемолиз. Все попытки провести регидратацию посредством распыления или восстановления льда с помощью обратного процесса возгонки также потерпели неудачу.

Недавно Кейфиг обнаружил, что большинство лиофилизированных эритроцитов оставались неповрежденными, когда их восстанавливали изотоническим солевым раствором с добавлением 40% декстрана (см. [29]). Суспензию крови наносили на салфетку из нейлоновой марли, подвешенную в сушильной камере. В результате понижения давления вода испарялась, температура

падала и кровь замерзала. Возгонку льда осуществляли при температуре —30° в течение первых 3—4 *мин.* Затем температуру повышали до комнатной. Когда в высушенное вещество вводили 40% декстрана, восстанавливались абсолютно все клетки. Эритроциты высушивали и увлажняли вышеуказанным образом, метили Cr^{51} и вводили внутривенно животным; при этом их жизнеспособность в кровяном русле реципиента полностью сохранялась. К сожалению, не измеряли остаточного количества воды в пробах крови. Меримэн [29] отмечает, что при увеличении продолжительности высушивания (до 1 *час* и более), увлажняя сухой остаток растворами с высокой концентрацией декстрана, уже нельзя было получить неповрежденные клетки. Если высушенный материал до увлажнения оставляли на несколько часов в атмосфере с низким давлением водяного пара, некоторые неповрежденные клетки восстанавливались. Лиофилизированные эритроциты человека хранили в сухом состоянии свыше 1 года. После восстановления их с помощью декстрана неповрежденной оставалась лишь небольшая часть клеток.

До настоящего времени эти важные результаты не подтверждены другими исследователями. Мы не знаем, чему должна равняться остаточная влажность клеток. Для того чтобы проверить жизнеспособность лиофилизированных, а затем увлажненных эритроцитов человека, необходимо провести опыты по введению их в кровяное русло. Возможно, длительное хранение эритроцитов сопряжено с определенными трудностями, особенно при критическом уровне остаточной влажности, как это имеет место при хранении высушенных бактерий. Может быть, пройдет еще много времени, прежде чем метод консервации с помощью низких температур в средах, содержащих глицерин, уступит место методу лиофилизации. Тем не менее уже сейчас перед нами открываются заманчивые перспективы. Поставлены и ждут своего разрешения вопросы, имеющие важнейшее принципиальное значение. В первую очередь они касаются оптимальных условий сохранения структурной целостности клеток и их биохимических компонентов, включая

липопротеиды и другие комплексы молекул, которые в чистом виде в процессе лиофилизации теряют присущие им свойства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brown I. W., Hardin H. F., Recovery and in vivo survival of human red cells, Arch. Surg., Chicago, **66**, 267—291 (1953).
2. Chaplin H. Jr., Crawford H., Cutbush M., Mollison P. L., Post-transfusion survival of red cells stored at —20° C, Lancet, **i**, 852—858 (1954).
3. Chaplin H. Jr., Crawford H., Cutbush M., Mollison P. L., Preservation of red cells at —79° C, Clin. Sci., **15**, 27—39 (1956).
4. Chaplin H. Jr., Mollison P. L., Improved storage of red cells at —20° C, Lancet, **i**, 215—216 (1953).
5. Chaplin H. Jr., Schmidt P. J., Steinfeld J. L., Storage of red cells at sub-zero temperatures. Further studies, Clin. Sci., **16**, 651—661 (1957).
6. Chaplin H. Jr., Veall N., Removal of glycerol from previously frozen red cells, Lancet, **i**, 218—219 (1953).
7. Crile C., Direct transfusion of blood in the treatment of hemorrhage; preliminary clinical note, J. Amer. med. Ass. **47**, 1482—1484 (1906).
8. Dacie J. V., Mollison P. L., Survival of normal erythrocytes after transfusion to patients with familial haemolytic anaemia (acholuric jaundice), Lancet, **i**, 550—552 (1943).
9. Evans C. L., Principles of Human Physiology, 9th Edn., London, Churchill, 1945.
10. Gabrio B. W., Finch C. A., Huennekens F. M., Erythrocyte preservation: a topic in molecular biochemistry, Blood, **11**, 103—113 (1956).
11. Garrison F. H., An Introduction to the History of Medicine, 3rd Edn., Philadelphia, Saunders, 1921.
12. Greaves R. I. N., The preservation of proteins by drying, with special reference to the production of dried human serum and plasma for transfusion, Spec. Rep. Ser. med. Res. Coun., Lond., No. 258 (1946).
13. Griffiths J. J., Hornibrook J. W., Downs J. J., Freezing and thawing red blood cells, In Preservation of the Formed

Elements and of the Proteins of the Blood, pp. 167—168, Washington, American Red Cross, 1949.
14. Hennessey M., Finch C. A., Gabrio B. W., Erythrocyte preservation. VIII. Metabolic degradation of nucleosides in vitro and in vivo, J. clin. Invest., **36**, 429—433 (1957).
15. Jones N. C. H., Mollison P. L., Robinson M., Factors affecting the viability of erythrocytes stored in the frozen state, Proc. Roy. Soc., B, **147**, 476—497 (1957).
16. Ketchel M. M., Tullis J. L., Tinch R. J., Driscoll S. G., Snegenor D. M., Use of bio-mechanical equipment for the long-term preservation of erythrocytes, J. Amer. med. Ass., **168**, 404—408 (1958).
17. Landsteiner K., Ueber Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes, Wien, klin. Wschr., **14**, 1132—1134 (1901).
18. Loutit J. F., Mollison P. L., Young I. M., Citric acid-sodium citrate-glucose mixtures for blood storage, Quart. J. exp. Physiol., **32**, 183—202 (1943).
19. Lovelock J. E., Resuspension in plasma of human red blood cells frozen in glycerol, Lancet, **i**, 1238 (1952).
20. Lovelock J. E., The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing, Biochim. biophys., Acta, **10**, 414—426 (1953).
21. Lovelock J. E., The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing, Biochim. biophys. Acta, **11**, 28—36 (1953).
22. Lovelock J. E., Physical instability and thermal shock in red cells, Nature, Lond., **173**, 659—661 (1954).
23. Lovelock J. E., The physical instability of human red blood cells, Biochem. J., **60**, 692—696 (1955).
24. Lovelock J. E., The physical instability of human red blood cells and its possible importance in their senescence, Ciba Foundation Coll., Ageing, **2**, 215—232, 1956.
25. Luyet B. J., Ultra-rapid freezing as a possible method of blood preservation, In Preservation of the Formed Elements and of the Proteins of the Blood, pp. 141—146, Washington, American Red Cross, 1949.
26. Marriott H. L., Kekwick A., Continuous drip blood transfusion Lancet, **i**, 977—981 (1935).
27. Meryman H. T., Physical limitation of the rapid freezing method, Proc. Roy. Soc., B, **147**, 452—459 (1957).
28. Meryman H. T., The Mechanisms of freezing in biological

systems, Recent Research in Freezing and Drying, pp. 23—39, ed. Parkes A. S. and Smith A. U., Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1960.
29. Meryman H. T., Drying of living mammalian cells, Ann. N. Y. Acad. Sci., **85**, 729—734 (1960).
30. Meryman H. T., Kafig E., Rapid freezing and thawing of whole blood, Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., **90**, 587—589 (1955).
31. Mollison P. L., Blood Transfusion in Clinical Medicine, Oxford Blackwell Scientific Publications, 1951.
32. Mollison P. L., Lister W. C., Roth A. F., Smith F., Centrifugal washing of red blood cells, Brit. J. Haematol., **4**, 256—260 (1958).
33. Mollison P. L., Sloviter H. A., Successful transfusion of previously frozen human red cells, Lancet, **ii**, 862—864 (1951).
34. Mollison P. L., Sloviter H. A., Chaplin H. Jr., Survival of transfused red cells previously stored for long periods in the frozen state, Lancet, **ii**, 501—505 (1952).
35. Mollison P. L., Veall N., The use of the isotope Cr^{51} as a label for red cells, Brit. J. Haematol., **1**, 62—74 (1955).
36. Moskowitz M., Calvin M., On the components and structure of the human red cell membrane, Exp. Cell Res., **3**, 33—46 (1952).
37. Race R. R., Sanger R., Blood Groups in Man, 2nd Edn. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1954.
38. Reeve E. B., Veall N., A simplified method for the determination of circulating red-cell volume with radioactive phosphorus, J. Physiol., **108**, 12—23 (1949).
39. Riddell U. H., Blood Transfusion, Oxford, University Press, 1939.
40. Rinfret A. P., Factors affecting the erythrocyte during rapid freezing and thawing, Ann. N. Y. Acad. Sci., **85**, 576—594 (1960).
41. Sloviter H. A., In vivo survival of rabbits' red cells recovered after freezing, Lancet, **i**, 1350—1351 (1951).
42. Sloviter H. A., Recovery of human red blood-cells after freezing, Lancet, **i**, 823—824 (1951).
43. Sloviter H. A., Recovery of human red cells after prolonged storage at —79° C, Nature, Lond., **169**, 1013—1014 (1952).
44. Sloviter H. A., A method for preparing thawed erythrocyte-glycerol mixtures for transfusion, Amer. J. med. Sci., **231**, 437—440 (1956).

45. Sloviter H. A., Effects of the intravenous administration of glycerol solutions to animal and man, J. clin. Invest., 37, 619—626 (1958).
46. Sloviter H. A., The transfusion of erythrocyte-glycerol mixtures after prolonged storage at low temperatures, Proc. XV int. Congr. milit. Med., Beograd, pp. 429—432 (1959).
47. Smith A. U., Prevention of haemolysis during freezing and thawing of red blood-cells, Lancet, ii, 910—911 (1950).
48. Smith A. U., Effects of low temperature on living cells and tissues, Biological Applications of Freezing and Drying, Chap. I ed. Harris R. J. C., New York, Academic Press, 1954. (О. Смит, Влияние низких температур на живые клетки и ткани. См. «Применение замораживания — высушивания в биологии», под ред. Р. Харриса, стр. 9—90, ИЛ, М., 1956.)
49. Smith A. U., Polge C., Smiles J., Microscopic observation of living cells during freezing and thawing, J. R. micr. Soc., **71**, 186—195 (1951).
50. Strumia M. M., Preservation of blood for transfusion, Blood, **9**, 1105—1119 (1954).
51. Strumia M. M., The preservation of blood plasma and blood products by freezing and drying, Biological Applications of Freezing and Drying, Chap. 4. ed. Harris R. J. C., New York, Academic Press, 1954. (М. Струмиа, Консервирование кровяной плазмы и компонентов крови путем замораживания и высушивания. См. «Применение замораживания — высушивания в биологии», под ред. Р. Харриса, стр. 182—209, ИЛ, М., 1956.)
52. Tullis J. L., Ketchel M. M., Pyle H. M., Pennell R. B., Gibson J. G., Tinch R. J., Driscoll S. G., Studies on the in vivo survival of glycerolized and frozen human red blood cells, J. Amer. med. Ass., **168**, 399—404 (1958).
53. Wiener A. S., Blood Groups and Transfusion, Springfield, Illinois, Thomas, 1943.

Глава 4

ВЛИЯНИЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ И ОТТАИВАНИЯ НА МИКРООРГАНИЗМЫ БАКТЕРИИ

Ранние исследования по замораживанию бактерий

Первые попытки Кайетэ и Пиктэ сжижать атмосферные газы не имели успеха. Эти авторы не получили жидкости в измеримом объеме, а смогли лишь превратить газы в туман в условиях очень низких температур. Тем не менее Пиктэ и сотрудники испытывали действие полученной таким путем холодной среды на бактерии различных видов и обнаружили, что последние переживали пребывание при температуре —70° в течение 3 дней, а при —120° в течение 36 *час* [35, 36]. Аналогичные опыты были проведены на семенах, которые впоследствии проросли. Де Кандоль пришел к выводу, что метаболическая активность вряд ли возможна в организмах, подвергающихся воздействию очень низких температур, и сравнил их с взрывчатыми смесями, хранящимися при таких температурах, при которых компоненты этих смесей утрачивают способность взаимодействовать (см. [3]).

В 1900 г. Линде и Дьюар получили уже в больших объемах жидкий воздух, жидкий азот и жидкий водород. Макфэдиен [27], работавший в лаборатории Дьюара, выдерживал культуры 10 различных организмов в жидком воздухе при температурах от —182 до —190° в течение 20 *час*. После оттаивания он получал свежие культуры всех организмов, включая холерный вибрион, а также тифозную и дифтерийную палочки. У *Proteus vulgaris* и *Escherichia coli* наблюдались обычные биохимические, в том числе и ферментативные, реакции.

Staphylococcus aureus сохранял способность образовывать пигмент, а бациллы сибирской язвы и их споры оставались патогенными для животных. Светящиеся бактерии *Bacillus phosphorescens* и *Photobacterium balticum* в замороженном состоянии не светились, но после оттаивания интенсивность свечения у них, по-видимому, не снижалась и в культурах восстанавливалась нормальная функциональная активность. Последующие опыты показали, что жизнеспособность этих и многих других микроорганизмов, включая дрожжи, не пострадала после пребывания в течение 7 дней при температуре —190° [28, 29]. Когда большой объем воздуха сгустили в стеклянном баллоне до жидкого состояния, а затем дали ему испариться, температура упала до —210°. Тем не менее в остаточной среде в баллоне были обнаружены 44 вида микроорганизмов, в том числе плесневые грибы, бациллы, кокки и дрожжи [27].

Эти первые опыты наглядно показали, что самые различные виды бактерий и других микроорганизмов способны переживать охлаждение и хранение в замороженном состоянии при очень низких температурах. Постепенно, однако, стало ясным, что чувствительность микроорганизмов к замораживанию и оттаиванию сильно варьирует в зависимости от принадлежности их к тому или иному виду [4—6, 11, 12, 26]. Накапливались данные о том, что при температуре ниже нуля большинство кишечных и тифозных палочек, а также других микроорганизмов погибает [22].

Процент выживающих организмов зависел от индивидуальных особенностей различных видов, от продолжительности хранения при данной температуре и от среды, в которой они были взвешены [13, 19, 22, 46, 50]. Кейт [22] показал, что при замораживании кишечной палочки и хранении ее при температуре —20° в обыкновенной воде через 5 дней оставалось менее 1% жизнеспособных бактерий, а через несколько недель они все погибали. В противоположность этому большой процент бактерий пережил охлаждение до этой же температуры не в воде, а в молоке. Если молоко разбавляли, процент смертности увеличивался. Кейт сделал еще одно важное наблюдение: когда готовили взвесь кишечной палочки

в смесях, содержащих 5—42% глицерина, большое число их переживало хранение при температуре —20° в течение не менее 6 месяцев. Он нашел также, что исходные культуры многих микроорганизмов, в том числе *Bacillus subtilis, B. megaterium, B. proteus* и *Sarcinae*, переживают воздействие температуры —10° при посеве на косом агаре, покрытом 10-процентным раствором сахарозы. В течение примерно 40 лет исследователи, по-видимому, не вспоминали о защитном действии глицерина на бактерии, находящиеся в частично замороженной среде. Систематические испытания стали проводить вновь только после появления сообщений о консервации сперматозоидов (см. гл. 2) и эритроцитов (см. гл. 3) при очень низких температурах в средах, содержащих глицерин.

В этих первых опытах большое число микроорганизмов погибало в процессе замораживания, тогда как во время хранения при любой температуре смерть наступала не так быстро. Чем ниже была температура хранения, тем позднее погибали организмы [22]. Последующие опыты заставили предположить, что в некоторых случаях на выживание бактерий после замораживания, особенно в условиях очень низких температур, влияла скорость охлаждения и согревания [23, 48, 49]. Нет данных, что переживание зависит от витрификации. Действительно, чрезмерно быстрое охлаждение до очень низких температур сопровождалось высоким процентом гибели кишечной палочки, тогда как снижение скорости охлаждения увеличивало долю микроорганизмов, переживших медленное согревание. Наиболее высокий процент гибели, согласно Вейзеру и Харгису [49], наблюдался при чрезмерно быстром охлаждении с последующим медленным оттаиванием. Эти авторы, по-видимому, не испытывали действия на кишечную палочку медленного охлаждения и быстрого согревания. Быстрое оттаивание обычно являлось существенной предпосылкой для восстановления максимального числа жизнеспособных бактерий [23, 48, 49]. Очевидно, повреждения, возникающие во время хранения при любой температуре, следует отличать от повреждений, которые появляются в процессе замораживания и оттаивания [12, 50]. К числу других факторов, влияющих на выживание после кратковременного или

длительного воздействия низких температур, нужно отнести возраст культуры, концентрацию в ней микроорганизмов, состав суспензионной смеси или культуральной среды [18, 19, 40].

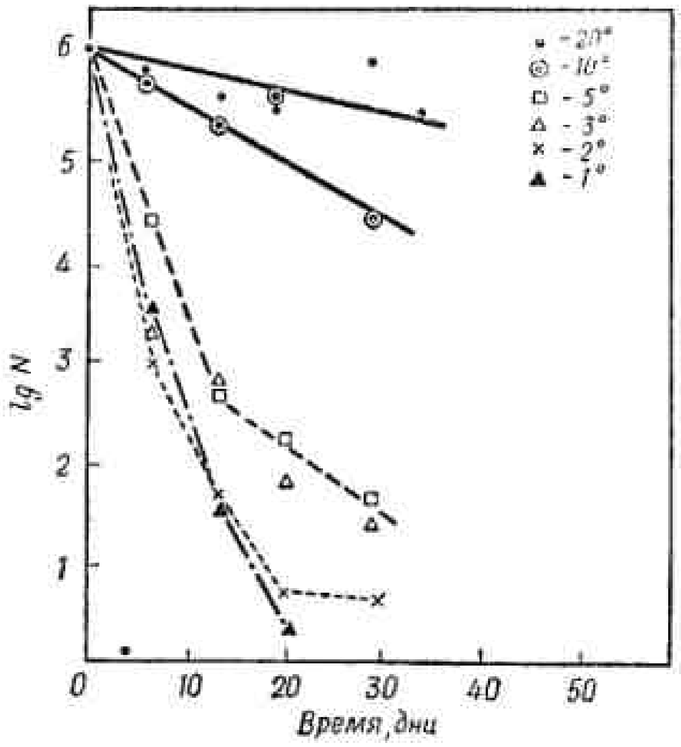
Сэндерсон [41] одним из первых выявил влияние повторного замораживания и оттаивания на число жизнеспособных клеток в культуре. Когда культуру *Escherichia coli* охлаждали до —78° и затем оттаивали, 84% микроорганизмов переживало один цикл охлаждения и оттаивания, тогда как только 10% переживало 10 циклов и лишь 6% микроорганизмов переживало 15 циклов охлаждения и оттаивания. Неоднократно замораживаемые и согретые различные бактериофаги не утрачивали активности. В то же время Риверс [40] показал, что бактериофаг кишечной палочки в результате неоднократного замораживания и оттаивания утрачивал активность по крайней мере на 99%. Процент разрушенных фаговых частиц заметно возрастал при разбавлении фильтрата физиологическим раствором или раствором Ложка. Другие вирусы также инактивировались при соответствующем числе циклов замораживания и оттаивания. Вирус коровьей оспы отличался большой устойчивостью, однако и его фильтрат, разбавленный в 100 000 раз физиологическим раствором, терял свою активность после 34-го цикла замораживания до —185° и последующего оттаивания. Инактивация комплемента сыворотки и трипсина посредством многократного замораживания и оттаивания показывает, что такая инактивация не представляет собой свойства исключительно живых организмов, как полагал Сандерсон (см. [40]).

К 1949 г. уже существовала обширная литература, посвященная влиянию замораживания и оттаивания на бактерии различных родов и видов. Многие работы вошли в литературный обзор, составленный Энгли [4—6]. Некоторые из них были предприняты с целью выяснения оптимальных условий хранения пищевых продуктов на холоду. Здесь следовало иметь в виду два обстоятельства. Во-первых, во время хранения пищи или культур в течение продолжительного времени при температуре ниже нуля некоторые виды микроорганизмов размножаются [11, 44]. Если не понизить температуру до уровня,

несовместимого с их ростом, эти микроорганизмы могут изменить вкусовые качества и внешний вид пищевых продуктов или выработать токсические вещества. Во-вторых, иногда небольшое число патогенных микроорганизмов может пережить охлаждение и начать размножаться уже после согревания или после попадания их в организм человека с едой [6, 17]. Задача других опытов заключалась в разработке методов хранения бактериальных культур in vitro, позволяющих избегать дополнительного труда, расходов и осложнений, связанных с многократным пересевом или пассажами на животных. Некоторые виды микроорганизмов оказались крайне чувствительными к замораживанию и оттаиванию и, по-видимому, неспособными их переживать. Другие сохраняли жизнеспособность при замораживании до низких температур или после лиофилизации. Однако в обоих случаях процент смертности бактерий был очень высок [5].

Для определения факторов, влияющих на разрушение бактерий при низких температурах, было проведено много капитальных физиологических исследований [12, 18, 47—50]. У некоторых организмов повреждения наступали при резком охлаждении их до температуры ниже нуля в критической фазе роста [18, 43]. Однако обычно повреждения происходили в случае замерзания окружающей среды. Так, например, некоторые виды бактерий хорошо переносили переохлаждение до температуры на несколько градусов ниже нуля, не теряя жизнеспособности при согревании, если окружающая их среда не кристаллизовалась [50, 51]. Создается впечатление, что повреждения могут быть двух типов: одни наступают во время замораживания и оттаивания, другие — во время хранения при низкой температуре. В период между 1900 и 1949 гг. высказывались самые различные предположения относительно возможной причины гибели замороженных бактерий. Многие исследователи придерживались выдвинутой Кейтом теории механического повреждения бактерий кристаллами льда, согласно которой кристаллы сдавливают или прокалывают клетки снаружи или же, разрастаясь внутри самой клетки, приводят к ее разрыву [4—6, 19, 38]. В то же время Хайпс [12] не получил данных, подтверждающих эту гипотезу. Он показал,

что для *Bacillus pyocyancus (Pseudomonas aeruginosa)* температура —2° уже является критической. При этой температуре наблюдалась максимальная смертность, хотя микроорганизмы были взвешены в незамороженной среде и не соприкасались с кристаллами льда (фиг. 8). Белки бактерий полностью сохранялись как при быстром замораживании и хранении при очень низких температурах,



Фиг. 8. Гибель *Bacillus pyocyaneus* в замороженной взвеси, хранившейся при различных температурах [12].
N — число выживших бактерий.

так и при хранении после лиофилизации. Хайнс высказал предположение, что бактерии и их белки чувствительны к концентрации солей или к pH среды, изменяющимся после вымерзания при —2° большей части воды. Другое предположение заключалось в том, что клетки, находившиеся в частично замерзшей среде при относительно высоких температурах, погибали вследствие накопления продуктов обмена; при низких же температурах смерть наступала позже вследствие замедления метаболических процессов [2].

Вейзер и Остеруд [50] не согласны с тем, что образование кристаллов льда внутри клеток обусловливает их гибель во время замораживания. Клетки погибали при температуре выше той, при которой можно было бы ожидать кристаллизации цитоплазмы. Вейзер и Харгис [49], по-видимому, не сомневаются в том, что при образовании льда вне клеток при температуре ниже —110° внутреннее содержимое бактерий переходит в стекловидное состояние. Эти авторы полагают, что механическое действие внеклеточного льда служит основной причиной гибели бактерий во время замораживания, поскольку наибольшая смертность наблюдалась в последних стадиях кристаллизации, когда слой жидкости между отдельными кристаллами уменьшался и не мог предохранить клетки от сдавливания. По их мнению, существуют различные факторы, способствующие гибели бактерий во время хранения при низких температурах. Они нашли, что при —30° смертность резко понижалась, и считают, что эта температура совпадает с эвтектической точкой, когда выделяются последние остатки воды и солей. Ниже этой температуры клетки уже не подвергаются воздействию концентрированных электролитов. Вейзер и Остеруд [50] высказали предположение, что повышенная концентрация растворенных веществ в жидкости между кристаллами может служить одним из факторов, способствующих гибели бактерий во время хранения их при температурах выше эвтектических точек для различных солей, присутствующих в данной среде.

Современные исследования по влиянию замораживания и оттаивания на бактерии

В последнее время вновь наблюдается повышенный интерес к вопросу о действии замораживания и оттаивания на бактерии [51]. Отчасти это вызвано высоким процентом гибели культур в процессе лиофилизации и во время хранения в высушенном состоянии, а отчасти — успешным применением глицерина для консервации сперматозоидов и эритроцитов млекопитающих в замороженном состоянии при очень низких температурах. Так, например, Холлендер и Нелл [20] нашли, что в тех

случаях, когда проводили несколько циклов замораживания и оттаивания культур *Escherichia coli* и *Streptococcus pneumoniae* в бульоне, погружая их на 5 *мин* то в спиртовую баню, насыщенную твердой углекислотой с температурой —78°, то в водяную баню при +30°, число жизнеспособных клеток быстро сокращалось.

В культурах пневмококков число поврежденных в каждом цикле бактерий было выше, чем в культурах кишечной палочки (табл. 5) (фиг. 9). Когда бактерии тех

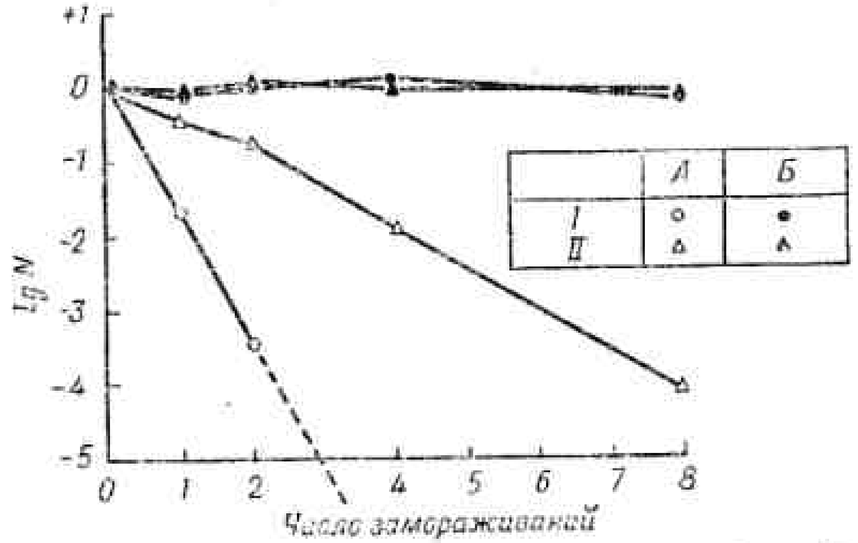
ТАБЛИЦА 5

Защитное действие глицерина на *Escherichia coli* и *Streptococcus pneumoniae* при неоднократном замораживании и оттаивании [20]

Число замораживаний	Число выживших клеток			
	в бульоне		в бульоне с глицерином	
	E. coli	*Str. pneum.*	*E. coli*	*Str. pneum*
0	750 000	1 500 000	760 000	620 000
1	320 000	35 000	750 000	610 000
2	161 000	590	890 000	680 000
4	980	0	790 000	760 000
8	7	0	550 000	430 000

же видов взвешивали в бульоне, содержащем 15% глицерина, число жизнеспособных бактерий не уменьшилось после 8 циклов замораживания и оттаивания. *Rhodospirillum rubrum*, по-видимому, не размножался в среде, содержащей глицерин. Подвижность отдельных микроорганизмов снижалась во взвесях в бульоне, содержащем 15% глицерина. Тем не менее глицерин предотвращал высокую смертность бактерий, которая была бы неизбежна при неоднократном замораживании и оттаивании. После 8 циклов число подвижных микроорганизмов не уменьшилось, а после перенесения их в среду, не содержащую глицерина, число живых *R. rubrum* было сравнимо с числом бактерий в незамороженных обработанных глицерином контрольных пробах. На основании этого было высказано предположение, что, хотя глицерин защищает микроорганизмы во время замораживания и

оттаивания, продолжительное контактирование с ним вызывает разрушение [20]. Интересно было бы узнать, можно ли избежать этого вредного влияния глицерина, постепенно удаляя его из среды. В противоположность *R. rubrum Treponema pallidum* переживала высокие концентрации глицерина, не теряя подвижности (табл. 6). В присутствии 15—25% глицерина спирохеты переносили 8 циклов замораживания и оттаивания без снижения



Фиг. 9. Защитное действие глицерина на *Escherichia coli (I)* и *Streptococcus pneumoniae (II)* при неоднократном замораживании и оттаивании [20].

N — доля исходной популяции бактерий, пережившая замораживание. *А* — в бульоне; *Б* — в бульоне с глицерином.

активности. Когда кролику вводили взвеси спирохет, содержащие глицерин, инкубационный период не увеличивался. Если взвеси в сыворотке или солевом растворе один-два раза перед прививкой замораживали и оттаивали, инкубационный период значительно удлинялся, а после 4-го замораживания и оттаивания микроорганизмы совершенно утрачивали вирулентность. И наоборот, обработанные глицерином взвеси, 4 раза замороженные и оттаянные, судя по продолжительности инкубационного периода, оставались вирулентными. Когда прививали обработанный глицерином материал, перенесший 16 циклов замораживания и оттаивания, инкубационный период удлинялся в среднем на 4 дня. Это свидетельствовало об утрате вирулентности приблизительно

ТАБЛИЦА 6

Влияние глицерина на подвижность *Treponema pallidum* после замораживания и оттаивания

Число замораживаний	Подвижность при различной концентрации глицерина в среде, %					
	0%	5%	10%	15%	20%	25%
0	96	—	100	—	—	96
1	36	84	84	100	100	88
2	10	68	92	92	88	92
4	2	56	76	92	88	88
8		12	56	84	80	92
16		2	32	48	34	22

на 90%. Однако смертность спирохет в данном случае может быть связана с продолжительностью периода оттаивания, поскольку незамороженные микроорганизмы, находившиеся в течение такого же периода времени при комнатной температуре, также теряли вирулентность. Когда взвеси *T. pallidum* хранили 2 месяца при температуре —70° в смеси сыворотки с физиологическим раствором, содержащей 15% глицерина, они не утрачивали вирулентности, о чем можно было судить по продолжительности инкубационного периода после прививки их кроликам (табл. 7). При хранении обработанного глицерином материала при —40° вирулентность утрачивалась. Тёрнер и сотрудники [47, 48] еще раньше установили, что спирохеты возвратного тифа и *T. pallidum* сохраняли вирулентность при температуре —79° продолжительное время, но их методика не была достаточно надежной. Только применение глицерина и низких температур разрешило задачу сохранения вирулентных спирохет в лабораторных условиях, устраняя, таким образом, дополнительный труд и опасность, связанные с пересевом культур или прививкой их подопытным животным. Многие виды других микроорганизмов, включая *Vibrio foetus, Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis* и *N. gonorrhoeae*, которые, по существовавшему ранее мнению, были крайне чувствительны к замораживанию и оттаиванию, также хорошо сохранялись при температуре —10 или —40° в средах, содержащих глицерин [21].

Холлендер и Нелл [20] полагали, что бактерии разрушаются во время замораживания в результате механического сдавливания, обусловленного расширением воды, превращающейся в лед; глицерин же защищает их, предотвращая это расширение. Сдавливание кристаллами

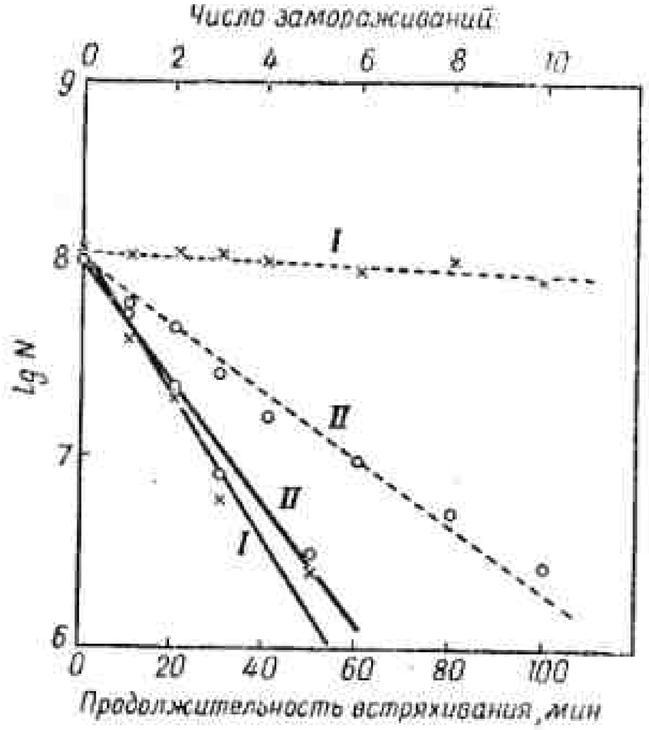
ТАБЛИЦА 7

Влияние глицерина на продолжительность инкубационного периода сифилиса у кроликов после прививки им взвеси *Treponema pallidum*, хранившейся в замороженном состоянии

Температура охлаждения (°С) и длительность хранения (месяцы)	Продолжительность инкубационного периода, дни							
	смесь сыворотки и физиологического раствора				смесь сыворотки и физиологического раствора, содержащая глицерин			
Не замораживали	12	15	16	16	14	15	16	17
Замораживали, не хранили	23	24	26	26	14	15	15	17
—15°, 1 месяц	Поражения не возникали; проба на инфекционность с регионарными лимфатическими узлами отрицательна				Поражения не возникали			
—15°, 2 месяца	Пассаж не производили				Поражения не возникали			
—40°, 1 месяц	Поражения не возникали				24	40	Поражения не возникали	
—40°, 2 месяца	Пассаж не производили				Поражения не возникали			
—70°, 1 месяц	24	38	Поражения не возникали		14	14	16	16
—70°, 2 месяца	Пассаж не производили				13	14	16	16

льда, однако, не объясняет линейной зависимости инактивации от температуры, а подобная зависимость обнаруживается при замораживании бактерий, различных бактериофагов и вирусов до различных температур и последующем оттаивании этих микроорганизмов [51]. Трудно понять также, каким образом такие маленькие по сравнению с кристаллами льда организмы могут пострадать от сдавливания, особенно если инактивация наступает при сравнительно высоких температурах, когда между кристаллами еще имеется незамороженная, но сильно

концентрированная среда [51]. В то же время маленькие размеры и относительно простая структура микроорганизмов делают белковые вещества чрезвычайно чувствительными к повышенной концентрации электролитов при вымораживании воды. В результате добавления в среду глицерина концентрация электролитов после достижения



Фиг. 10. Сравнение выживаемости аэрированных (*I*) и неаэрированных (*II*) культур *Escherichia coli* после неоднократном замораживания и оттаивания и после встряхивания вместе со стеклянными бусинами в гомогенизаторе Микла [16].

N — число выживших бактерий в 1 *мл*; — — — — при неоднократном замораживании и оттаивании; ——— при встряхивании со стеклянными бусинами.

равновесного состояния с льдом при любой температуре понижается (см. гл. 11 и 12). Глицерин предотвращает повышение концентрации солей до уровня, губительного для бактерий и других организмов во время замораживания [25, 51]. Харрисон и Черрони [16] утверждали, что если основной причиной летальности организмов при замораживании служит механическая травма, то различные виды организмов должны отличаться друг от друга не только чувствительностью к замораживанию, но и физической устойчивостью к механическим травмам любого вида. Они поставили серию опытов, в каждом из которых культуры двух различных организмов подвергли многократному замораживанию, оттаиванию и энергичному встряхиванию вместе с маленькими стеклянными бусинами в гомогенизаторе. Поскольку во всех опытах

использовали *Escherichia coli*, эти бациллы одновременно служили контролем. Они оказались более чувствительными к замораживанию при —22°, чем *Microbacterium flavum* или *Bacillus pumilus*. *Escherichia coli*, если судить по скорости разрушения бактерий в гомогенизаторе, лучше переносит механическую травму, чем *Microbacterium flavum*, и несколько хуже, чем *Bacillus pumilus*. *Escherichia coli* и *Lactobacillus fermenti* приблизительно в равной степени были чувствительны к замораживанию при —22° и последующему оттаиванию, хотя из этих двух организмов первый разрушался в значительно большей степени при механической травме [16]. Отсюда стало ясным, что между физической выносливостью клеток и их устойчивостью к разрушающему действию замораживания и оттаивания не существует никакой связи. Культуры *Escherichia coli* после аэрации лучше переносили замораживание и оттаивание, но оставались также чувствительными к механической травме (фиг. 10). Аэрация могла вызывать биохимические изменения в составе клеток, но вряд ли она влияла на физическую их выносливость [16]. Полученные результаты позволяют предполагать, что причиной разрушения клеток во время образования и растворения кристаллов льда могут быть какие-то особые биохимические процессы.

Харрисон [15] считал, что увеличение концентрации электролитов при замерзании питательной среды может служить основной причиной повреждения бактерий во время замораживания, хранения в замороженном состоянии и последующего оттаивания. Он провел ряд опытов, чтобы выявить, влияет ли снижение исходной концентрации на выживаемость бактерий, замороженных и хранящихся при температуре —22°. Результаты этих опытов, приведенные в табл. 8, показывают, что в соответствии с теорией при разбавлении питательной среды выживаемость *Escherichia coli* повышалась и была наибольшей, когда бактерии взвешивали в дистиллированной воде. Подобные же результаты были получены и с *Serratia marcescens (Bacterium prodigiosum)*. В опытах с *Lactobacillus fermenti* число жизнеспособных клеток во взвесях понижалось, когда среду разбавляли в 10 раз, но повышалось при разбавлении в 100 раз при использовании

ТАБЛИЦА 8

Выживаемость *Escherichia coli* в средах с различной концентрацией растворенных веществ при температуре —22°

Среда	Число живых клеток на 1 *мл* среды* после хранения в течение различных периодов времени		
	1 день	3 дня	1 недели
Неразбавленный бульон	$1{,}4 \cdot 10^7$	$1{,}9 \cdot 10^6$	$3{,}2 \cdot 10^5$
Бульон, разбавленный в 10 раз	$3{,}6 \cdot 10^7$	$9{,}8 \cdot 10^6$	$4{,}5 \cdot 10^6$
Бульон, разбавленный в 100 раз	$4{,}0 \cdot 10^7$	$3{,}2 \cdot 10^7$	$3{,}7 \cdot 10^7$
Дистиллированная вода	$1{,}2 \cdot 10^8$	$9{,}0 \cdot 10^7$	$9{,}6 \cdot 10^7$

* Исходное число живых клеток на 1 *мл* среды составляло $1{,}4 \cdot 10^8$.

дистиллированной воды в качестве суспензионной среды (табл. 9) [15].

В данной среде хлористый натрий присутствовал в более высокой концентрации, чем другие электролиты. Кроме того, он растворялся лучше других солей и имел сравнительно низкую эвтектическую точку. Харрисон установил, что 4,1 или 4,6 *М* раствор хлористого натрия не замерзает при длительном хранении при температуре —22°. Он сравнил выживаемость бактерий после замораживания до —22° в бульоне и после воздействия 4,6 *М* раствором NaCl при —22° в незамороженном состоянии. Кривые выживаемости в обеих сериях опытов не отличались друг от друга. В первый день пребывания микроорганизмов при температуре —22° наблюдалась высокая смертность. С течением времени интенсивность смертности понижалась как среди бактерий, находившихся в замороженном бульоне, так и среди бактерий, взвешенных в незамороженном солевом растворе при —22°, так что наклон кривых выживания непрерывно уменьшался. В обеих группах опытов процент переживших микроорганизмов зависел от первоначальной концентрации клеток. Как было показано ранее для взвесей, замороженных при —22°, смертность была тем выше, чем меньше было исходное число жизнеспособных бактерий [14, 15, 30]. Когда различные организмы предварительно культивировали в условиях усиленной аэрации, выживаемость повышалась независимо от того, замораживали ли их в бульоне при —22° или выдерживали в 4,6 *М* растворе хлористого натрия в незамороженном состоянии при температуре —22° [15].

ТАБЛИЦА 9

Выживаемость *Lactobacillus fermenti* в средах с различной концентрацией растворенных веществ при температуре —22°

Среда	Число живых клеток на 1 *мл* среды* после хранения в течение различных периодов времени			
	5 час	1 день	3 дня	1 неделя
Неразбавленный бульон	$4{,}4 \cdot 10^6$	$4{,}5 \cdot 10^6$	$4{,}6 \cdot 10^6$	$4{,}3 \cdot 10^6$
Бульон, разбавленный в 10 раз	$1{,}9 \cdot 10^6$	$2{,}5 \cdot 10^6$	$1{,}3 \cdot 10^6$	$1{,}0 \cdot 10^6$
Бульон, разбавленный в 100 раз	$7{,}1 \cdot 10^6$	$3{,}8 \cdot 10^6$	$2{,}7 \cdot 10^6$	$1{,}8 \cdot 10^6$
Дистиллированная вода	$1{,}8 \cdot 10^7$	$8{,}3 \cdot 10^6$	$8{,}8 \cdot 10^6$	$8{,}6 \cdot 10^6$

* Исходное число живых клеток на 1 *мл* среды составляло $5{,}6 \cdot 10^7$.

Выживаемость *Escherichia coli, Lactobacillus fermenti* и некоторых других микроорганизмов можно значительно повысить путем добавления в бульон, в котором они взвешены, глицерина. Харрисон [15] показал, что глицерин, кроме того, предотвращает летальное воздействие на эти организмы концентрированных незамороженных растворов хлористого натрия при температуре —22°. Он готовил 5,9 *М* раствор глицерина и 4,6 *М* раствор NaCl, которые не замерзали при —22°, и смешивал их в различных пропорциях. Затем взвешивал в этой смеси бактерии и хранил их при —22°. Результаты кратковременных опытов представлены в табл. 10 и 11. На-

личие 4,1 *M* глицерина снижало процент гибели *Escherichia coli* и *Lactobacillus fermenti*, инкубированных в 1,4 *M* NaCl при —22° в незамороженном состоянии. Интересно, что при высокой концентрации глицерина в дистиллиро-

ТАБЛИЦА 10

Выживаемость *Escherichia coli* после пребывания в течение 1,5 *час* при температуре —22° в незатвердевших взвесях, содержащих глицерин и NaCl [15]

Среда	Число жизнеспособных клеток на 1 *мл* среды*
4,1 *M* глицерин + 1,4 *M* NaCl	$6{,}9 \cdot 10^7$
4,1 *M* глицерин	$9{,}2 \cdot 10^7$
1,4 *M* NaCl	$3{,}7 \cdot 10^7$

* Первоначальное число жизнеспособных клеток на 1 *мл* среды составляло $9{,}3 \cdot 10^7$.

ТАБЛИЦА 11

Выживаемость *Lactobacillus fermenti* после пребывания в течение 1 *час* при температуре —22° в незатвердевших взвесях, содержащих глицерин и NaCl [15].

Среда	Число жизнеспособных клеток на 1 *мл* среды*
4,1 *M* глицерин + 1,4 *M* NaCl	$3{,}1 \cdot 10^7$
4,1 *M* глицерин	$8{,}0 \cdot 10^6$
1,4 *M* NaCl	$1{,}0 \cdot 10^7$
4,6 *M* NaCl	$1{,}2 \cdot 10^7$

* Первоначальное число жизнеспособных клеток на 1 *мл* среды составляло $3{,}9 \cdot 10^7$.

ванной воде наблюдалась гибель большого числа взвешенных бактерий *L. fermenti*, но такая же концентрация этого вещества при наличии хотя бы следов электролитов не была токсичной. Так, присутствие 0,05 *M* NaCl было

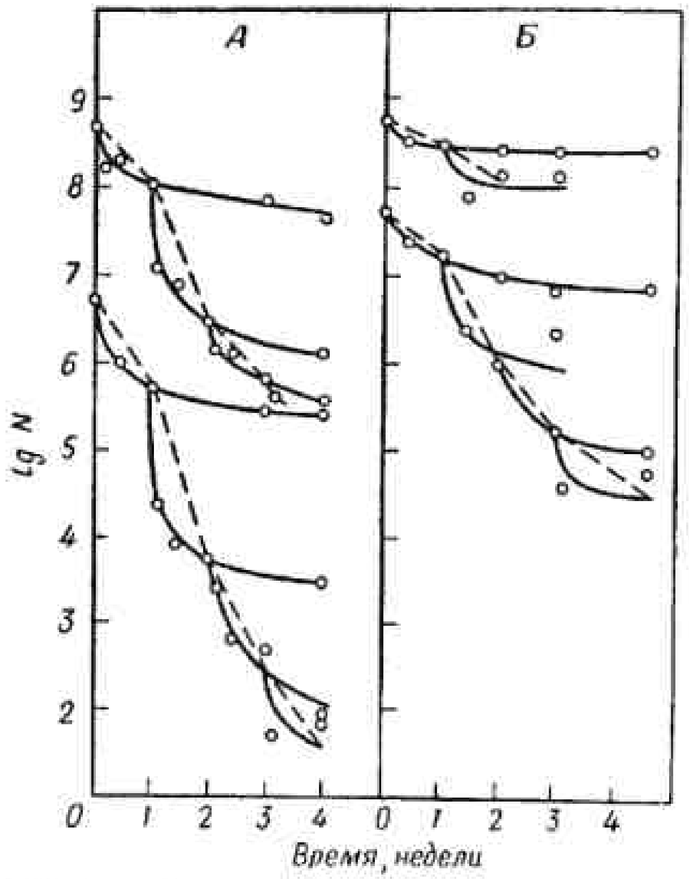
достаточным для обеспечения максимальной выживаемости *L. fermenti* в 5,9 *M* растворе глицерина при —22°.

В других опытах на протяжении недели подсчитывали число жизнеспособных клеток во взвесях *Escherichia coli*, выдерживавшихся при температуре —20° в растворах с различным содержанием глицерина и хлористого натрия. Наибольший процент выживаемости был получен в чистых 5,9 *M* растворах глицерина. В растворах глицерина и хлористого натрия число выживших микроорганизмов было тем больше, чем выше было содержание глицерина по отношению к NaCl.

В тех случаях, когда взвеси бактерий несколько раз замораживали при —20°, хранили при этой температуре и затем оттаивали спустя различные периоды времени — от одного дня до нескольких недель, кривые выживания имели весьма своеобразный вид (фиг. 11). Почти аналогичные кривые были получены, когда взвеси *Lactobacillus fermenti* по нескольку раз инкубировали в незамороженных растворах концентрированного (4,6 *M*) хлористого натрия при —22° и в обычной бактериологической среде (фиг. 12). Полученные данные послужили дальнейшим подтверждением точки зрения, согласно которой во время замораживания и оттаивания некоторые виды бактерий разрушаются не в результате сдавливания кристаллами льда, а вследствие воздействия концентрированных растворов электролитов при температурах, превышающих их эвтектические точки. Процент гибели бактерий после неоднократных периодов пребывания в концентрированных растворах солей и в нормальной среде был значительно ниже при добавлении глицерина (см. фиг. 12).

Результаты, полученные Харрисоном, наглядно подтверждают данные Лавлока [24, 25], который показал, что первой и, вероятно, наиболее важной причиной повреждения эритроцитов во время замораживания и оттаивания служит повышение концентрации электролитов в среде и внутри клеток в результате вымораживания воды. Лавлок установил, что глицерин препятствует достижению того критического уровня концентрации хлористого натрия и других электролитов, при котором они оказывают вредное действие во время замораживания,

хранения при низких температурах и оттаивания. Впоследствии были высказаны предположения относительно других способов защитного действия глицерина (см. гл. 11 и 12). На некоторые клетки, устойчивые к высокой

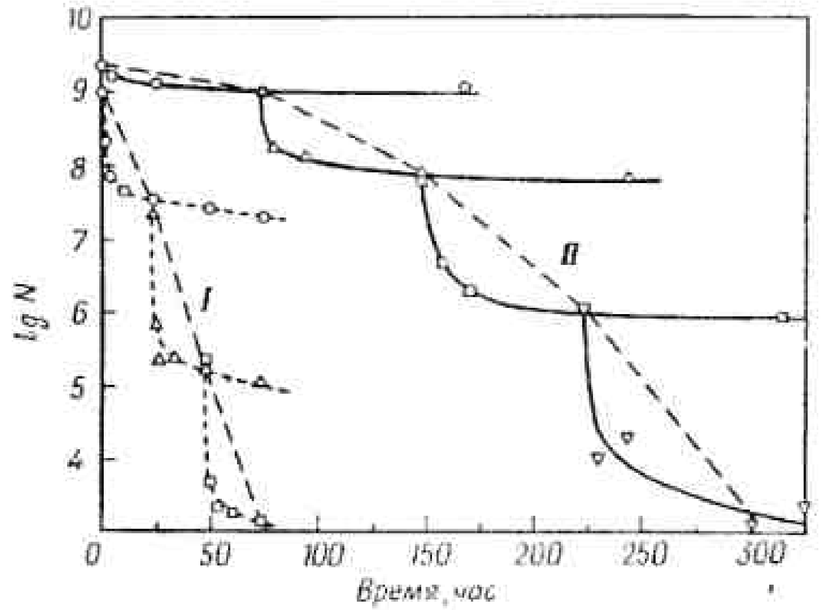


Фиг. 11. Выживание бактерий после неоднократного замораживания с интервалами в 1 неделю [14].
N — число выживших бактерий в 1 *мл*. *А* — *Lactobacillus fermenti* в бульоне. *Б* — *Escherichia coli* в воде.

концентрации солей, глицерин оказывает защитное действие во время замораживания и оттаивания, по-видимому, одним из этих способов.

Фокс и Хочкис [7] изучали изменения, происходившие в пневмококках, когда популяцию одного штамма обрабатывали дезоксирибонуклеиновой кислотой (ДНК) от штамма, обладающего другими генетическими признаками. Среди вновь образовавшихся клеток первого штамма проявлялись клетки с характерными признаками

того штамма, от которого была взята ДНК. Свойство восприимчивости к чужеродной ДНК в разрастающихся популяциях носит временный характер. Однако культуры, достигшие определенного физиологического состояния, выживали и сохраняли свойство восприимчивости в течение трех месяцев, если их взвешивали в среде с примесью 10% глицерина и хранили при температуре

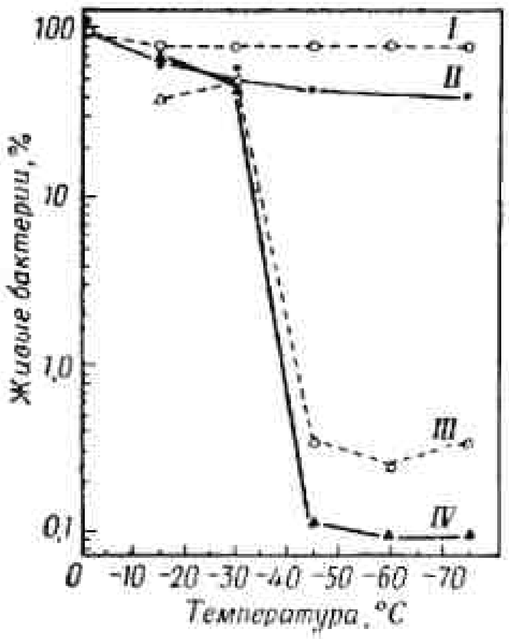


Фиг. 12. Выживание *Lactobacillus fermenti* при —22° после неоднократного воздействия 4,6 *M* раствора NaCl *(I)* или смеси 1,4 *M* NaCl и 4,1 *M* глицерина *(II)* [15].
N — число выживших бактерий в 1 *мл*; ○ — 1-е воздействие (пробирка 1); △ — 2-е воздействие (пробирка 2); □ — 3-е воздействие (пробирка 3); ▽ — 4-е воздействие (пробирка 4).

—20°. Такие клетки в присутствии глицерина сохраняли жизнеспособность при —20° в течение 18 месяцев, а после этого срока клетки, в основном утратившие свойство непосредственной восприимчивости, удавалось вновь активировать с помощью соответствующих мероприятий [7].

Кроме глицерина, существуют и другие нейтральные растворы, защищающие некоторые виды бактерий от повреждений во время замораживания и оттаивания. Иногда их действие выражается в понижении концентрации солей в среде, окружающей микроорганизмы. Для

ряда бактерий решающее значение имеет скорость охлаждения и согревания. Мазур и сотрудники [32, 33] нашли, что при охлаждении взвесей *Pasteurella tularensis* в физиологическом растворе, содержащем желатину, до температуры ниже —30° и последующем медленном согревании процент гибели был достаточно высоким. Когда же взвеси микроорганизмов охлаждали и согревали аналогичным образом в водных растворах, содержащих глюкозу или лактозу, процент гибели был ниже



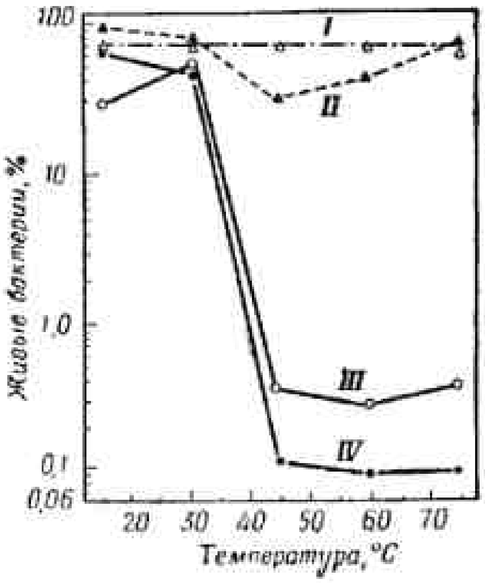
Фиг. 13. Выживание *Pasteurella tularensis* после охлаждения до различных температур и последующего медленного согревания [32, 33].

I — при медленном охлаждении в растворе глюкозы или лактозы; *II* — при быстром охлаждении в таком же растворе; *III* — при медленном охлаждении в физиологическом растворе, содержащем желатину; *IV* — при быстром охлаждении в этом же растворе.

(фиг. 13). Обезвоживание не оказывало влияния на защиту клеток ввиду эффективного действия изотонических и гипотонических растворов сахаров. Витрификация не могла происходить, так как разбавленные растворы сахаров были наиболее эффективны тогда, когда взвеси бактерий охлаждали медленно со скоростью 1° в 1 *мин* [33]. Скорость охлаждения и согревания сильно влияла на выживаемость *P. tularensis* при температуре ниже —20° в физиологическом растворе, содержащем желатину. Процент выживших клеток в этом растворе при любой данной температуре можно было повысить при помощи медленного охлаждения и быстрого оттаивания (фиг. 14). Использование в таких условиях в качестве среды водных растворов сахаров давало лишь незначи-

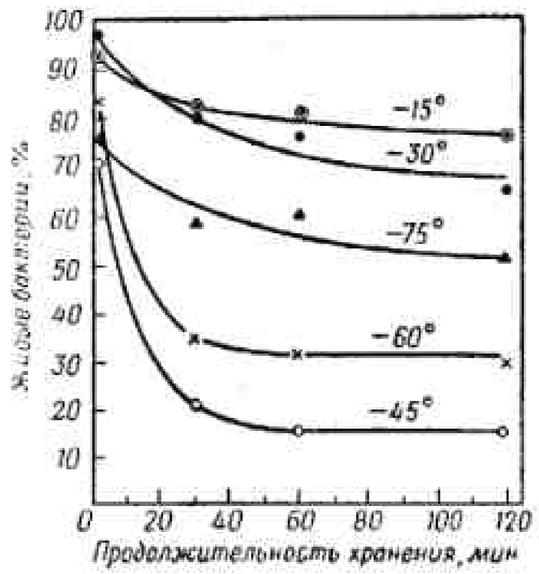
тельное преимущество. Наибольший процент гибели во время хранения наблюдался при —45°; при —75° он был ниже, чем при —60°. Гибель клеток была относительно небольшой в физиологическом растворе с желатиной при температуре —15 или —30° (фиг. 15).

На фиг. 16 показана взаимосвязь между различными факторами, влияющими на гибель *P. tularensis* после замораживания в физиологическом растворе с желатиной.



Фиг. 14. Выживание *Pasteurella tularensis* после воздействия низких температур [32, 33].

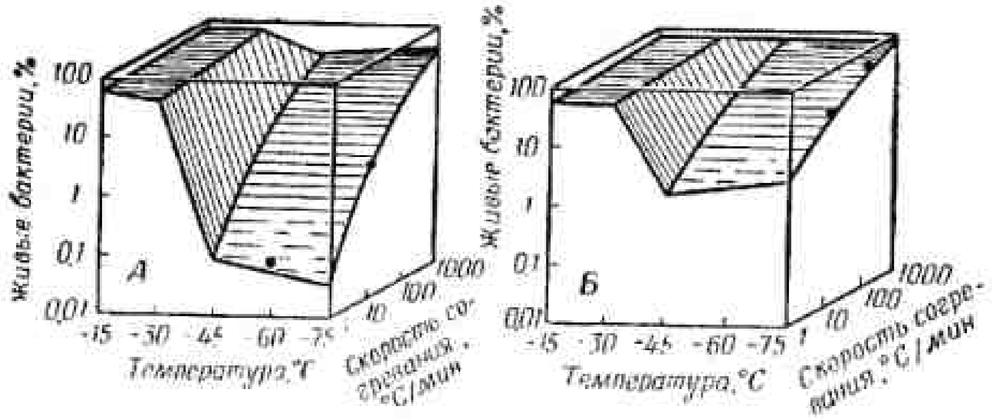
I — медленное охлаждение, быстрое согревание; *II* — быстрое охлаждение, быстрое согревание; *III* — медленное охлаждение, медленное согревание; *IV* — быстрое охлаждение, медленное согревание.



Фиг. 15. Выживание *Pasteurella tularensis* после хранения в течение различных периодов времени при постоянной низкой температуре (показано на кривых) при быстром охлаждении и согревании [32, 33].

Взвеси, охлажденные до температуры выше —30°, содержали большое число выживших клеток независимо от скорости их охлаждения и согревания. Выживание клеток, быстро замороженных при температуре ниже —45°, зависело от скорости согревания; процент выживших клеток был низким во взвесях, подвергавшихся медленному согреванию. Медленное согревание было несколько менее губительным для медленно охлаждавшихся клеток. При температуре от —30 до —45°, по-видимому, вступал в действие какой-то фактор, вредно влиявший на после-

дующее медленное согревание. Определение электрической проводимости взвеси при различных температурах показало, что эвтектическая точка лежит между —30 и —35°. Здесь медленное охлаждение оказывало положительное влияние, так как оно давало время для внеклеточной кристаллизации и постепенного обезвоживания



Фиг. 16. Выживание *Pasteurella tularensis* при быстром (*А*) и медленном (*Б*) охлаждении в зависимости от минимальной температуры охлаждения и скорости согревания [32, 33].

клеток. Быстрое же охлаждение приводило к внутриклеточной кристаллизации, а последующее постепенное оттаивание кристаллов внутри самих клеток повреждало последние [31]. Иногда медленное охлаждение приводило к переохлаждению клеток; тогда быстрое согревание уменьшало опасность внутриклеточной кристаллизации [32].

Большой интерес представляет то обстоятельство, что бактерии *P. tularensis*, подобно сперматозоидам, эритроцитам, клеткам яичников и многим другим тканям млекопитающих, лучше переносят низкие температуры при медленном охлаждении и быстром согревании. Следует подчеркнуть, однако, что клетки млекопитающих и бактерии чувствительны к быстрому охлаждению в различных температурных зонах и что механизмы температурного шока и инактивации во время медленного оттаивания у них могут отличаться. Как ни трудно дать объяснение полученным результатам, они все же могут иметь некоторое практическое значение; в частности, они об-

легчают диагносцирование туляремии — болезни, часто встречающейся у овец и грызунов и редко у человека. Диагносцирование этой болезни требует применения трудоемкой методики выделения возбудителя из пораженных желез. В настоящее же время ткань можно охладить, хранить при определенной температуре и в таком виде транспортировать в соответствующую лабораторию для анализа.

Многие виды бактерий переживают высушивание при обычной комнатной температуре [1] или же путем возгонки льда в вакууме при температуре ниже нуля [8]. Некоторые из них при консервации в высушенном состоянии сохраняют в какой-то степени жизнеспособность. У других процент гибели во время консервации очень высок [10, 34, 42]. Если нужно лиофилизировать культуры, необходимо свести гибель клеток во время замораживания до минимума. С практической точки зрения это один из наиболее важных доводов в пользу интенсивного изучения действия замораживания на бактерии различных родов и видов. Более того, некоторые микроорганизмы, погибающие при высушивании, можно хранить в замороженном состоянии при низких температурах либо в обычных средах, либо в средах, разбавленных глицерином или другими защитными агентами.

В настоящее время еще не получены достаточно убедительные данные о том, что во время замораживания бактерии погибают в результате раздавливания или какого-либо другого механического воздействия со стороны внеклеточных кристаллов льда. Возможно, что и внутриклеточная кристаллизация также представляет опасность, особенно при медленном оттаивании микроорганизмов. Бактерии некоторых видов гибнут при одной и той же температуре как в замороженных взвесях, так и в концентрированных, но не затвердевших растворах. Благодаря возможности производить точный подсчет бактерии представляют собой особенно подходящий объект для исследования действия любого физического или химического агента. Следует, однако, иметь в виду, что выводы, полученные в опытах на бактериях, не всегда можно применить к клеткам высших животных и

что у различных видов бактерий наблюдается различный процент гибели во время охлаждения и хранения при низких температурах.

ДРОЖЖИ

Ранние исследования по замораживанию дрожжей

Дрожжи были в числе первых организмов, на которых изучали сохранение жизнеспособности после воздействия очень низких температур. Еще в 1870 г. Мельзенс обнаружил устойчивость дрожжевых клеток к температуре —91°. Двадцать лет спустя Цопф сообщил, что вегетативные клетки и споры *Saccharomyces hansenii* переживали температуру —83° и оттаивание при комнатной температуре. Вскоре после этого Дёменс установил, что высушенные пивные дрожжи сохраняли жизнеспособность после пребывания в течение 6 *мин* в жидком воздухе при температуре —190°, однако их взвеси в воде погибали при замораживании при —190° и оттаивании в холодной воде [26]. Макфедиен [27] показал, что дрожжи, как и бактерии, размножались в культурах, взятых из осадка, который получали, сжижая и выпаривая комнатный воздух. Макфедиену и Раулэнду [28, 29] удалось сохранять один из видов *Saccharomyces* и дрожжи других родов в течение 7 дней в жидком воздухе при —190° и в жидком водороде при —252° без потери жизнеспособности или появления каких-либо изменений в ферментативных реакциях. В противоположность этому Шумахер в 1874 г. наблюдал гибель многих клеток при воздействии на свежие дрожжи температуры —113° в течение 15 *мин*. Несколько лет спустя Пиктэ и Юнг обнаружили, что пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, хранившиеся в течение 108 *час* при —70° и затем 20 *час* при —130°, утратили способность повышать всхожесть теста при выпечке хлеба [65]. Многие годы не предпринималось никаких попыток выяснить причину явных расхождений в результатах ранних исследований. Несмотря на наличие данных, говорящих против такого

мнения, было принято считать, что дрожжи отличаются большой устойчивостью по отношению к замораживанию, оттаиванию и хранению в условиях очень низких температур.

В 1929 г. Теппер и Уильямсон описали результаты своих опытов на 8 видах дрожжей, предпринятых с целью определить выживаемость дрожжей, замороженных до относительно высоких температур (от —13 до —15°). Авторы подсчитывали число жизнеспособных клеток в питательных средах и во взвесях в физиологическом растворе. Пробы хранили в запаянных ампулах в замороженном состоянии. Затем их оттаивали через различные промежутки времени (от 2 до 160 недель) и подсчитывали число клеток, переживших хранение при температуре от —13 до —15°. Наблюдалось резкое падение числа живых клеток после хранения в течение двух недель и постепенное уменьшение этого числа при дальнейшем хранении. Устойчивость дрожжей зависела от принадлежности их к тому или иному виду. Культуры *Pichia membranaefaciens*, *Torula rosea* и *Saccharomyces ellipsoideus*, судя по падению числа выживших клеток, отличались особенно низкой устойчивостью. Взвеси этих организмов в физиологическом растворе переживали хранение лучше, чем бульонные культуры. *Zygosaccharomyces mongolicus* и *Mycoderma vini* оказались немного более устойчивыми. *Saccharomyces cerevisiae*, *S. pastorianus* и *S. marxianus* обладали значительно большей устойчивостью к действию температуры от — 13 до —15°, но после хранения при таких температурах в течение 160 недель оставалось 0,1—1% исходного числа жизнеспособных клеток [71]. В то же время Смарт [68] показал, что дрожжи *Saccharomyces* размножались на косом агаре в течение 3 месяцев при температуре —8,9°.

Устойчивость *S. cerevisiae* к низким температурам изучал также Кэмпбелл [55], который показал, что кратковременное пребывание при температуре ниже —30° оказывает на эти дрожжевые клетки повреждающее воздействие. В одной группе опытов в пробирки разливали по 0,8 *мл* разбавленной культуры, а затем замораживали и оттаивали их по одному или даже по пять раз в жидком воздухе или в замораживающих смесях при

температуре —50 и —30°. После этого опытные и контрольные пробы разбавляли и тщательно взбалтывали, чтобы уничтожить образовавшиеся комочки и цепочки из дрожжевых клеток, и подсчитывали число клеток, переживших пребывание в жидком воздухе в течение 1 *мин*, при температуре —50° в течение 5 *мин* и при температуре —30° в течение 9 *мин*. Полученные результаты

ТАБЛИЦА 12

Действие одного и нескольких циклов замораживания и оттаивания на взвеси дрожжей при различных температурах

Температура	Выжившие клетки, %	
	после 1 замораживания	после 5 замораживаний
Температура жидкого воздуха	11,3	1,0
	20,0	2,8
	25,5	7,5
	6,2	0,0
	5,9	0,5
—50°	17,4	0,0
	34,7	0,0
	24,5	5,5
	44,9	20,8
	38,3	19,4
—30°	52,4	3,0
	13,9	0,4
	49,2	1,2
	48,4	1,7

приведены в табл. 12. Они показывают, что лишь 6—26% (в среднем 13,7%) клеток пережили однократное кратковременное пребывание в жидком воздухе. Число выживших клеток сократилось до 0—7,5% (в среднем до 2,4%) после 5 последовательных циклов замораживания и оттаивания. Замораживание до —50° с последующим оттаиванием пережили в среднем 32% клеток, а

43,5% были жизнеспособны после однократного воздействия температуры —30°. Повторные воздействия температур —30 или —50° значительно уменьшили число живых клеток. Когда готовили взвесь в дистиллированной воде из прессованных дрожжей без предварительного культивирования и замораживали ее в жидком воздухе, значительно большее число клеток переживало однократное и многократное воздействие жидкого воздуха. Баум [53] установил, что замораживание до —15 или —10° гораздо меньше повреждает *S. cerevisiae*, чем замораживание до более низких температур. Он показал также, что устойчивость культур, полученных от одной клетки, к замораживанию и оттаиванию варьирует в такой же степени, как и устойчивость гетерогенных культур, которыми пользовался Кэмпбелл.

Несмотря на высокий процент гибели дрожжевых клеток во время замораживания и оттаивания, культуры удавалось консервировать при помощи лиофилизации [72]. Это объясняется тем, что процесс высушивания происходит при сравнительно высоких температурах (от —15 до —20°), при которых процент гибели в результате замораживания и оттаивания невелик. В культурах дрожжей, высушенных при комнатной температуре, после их увлажнения также имеются живые клетки. Возможность хранения в высушенном состоянии представляет большой интерес для лабораторных исследований, для пивоварения и хлебопечения, а также для всех отраслей промышленности, связанных со сбраживанием. К 1950 г. в Национальной коллекции типовых культур было собрано и хранилось 405 культур 61 рода дрожжей и плесневых грибов. Все они были лиофилизированы и в таком виде хранятся уже длительное время (около 13 лет) [67]. Метод этот, однако, сопряжен с некоторым риском. Большая часть первоначальной популяции клеток гибнет в процессе лиофилизации, а у оставшихся в живых могут произойти тяжелые биохимические изменения. Аткинс и др. [52] изучали действие быстрого замораживания с последующей лиофилизацией в высоком вакууме на культурах пивных дрожжей *(S. cerevisiae)*. Во всех культурах в течение трех месяцев после обработки можно было обнаружить живые клетки. Процент выживших клеток,

однако, был очень низким — зачастую погибало 99,98% клеток. При культивировании выживших клеток получили удивительно много разновидностей. Например, у одной разновидности наблюдалась пониженная способность синтезировать пантотенат и слабый рост в среде, лишенной витаминов B_1 и B_6, тогда как у другой — полное прекращение роста в среде, в которой отсутствовали пантотенат, инозит и витамины B_1 и B_6. Некоторые же культуры лиофилизированных клеток приобретали способность размножаться в отсутствие различных факторов роста. В связи с этим Аткинс и др. [52] считали необходимым перед консервацией испытывать действие лиофилизации на каждый вид дрожжей в отдельности. Практическая необходимость в изучении влияния процесса замораживания и оттаивания на дрожжевые клетки утратила свою остроту, поскольку был разработан удовлетворительный способ хранения культур в течение 1—3 лет при комнатной температуре под слоем минерального масла [57, 61]. Однако многие основные проблемы остались нерешенными [54].

Современные исследования по замораживанию дрожжей

В связи с изучением замораживания сперматозоидов и эритроцитов млекопитающих и птиц с применением глицерина и без него возникло много различных подлежащих разрешению проблем (см. гл. 2 и 3). Так, например, не было ясно, изменяется ли биохимическая активность клеток в результате замораживания, высушивания и хранения при низкой температуре и полностью ли прекращаются в клетках метаболические процессы или они только сильно замедляются во время хранения при температуре —79 и —190°. Предварительные опыты на дрожжах [69] поставили перед исследователями новые проблемы и показали трудность применения готовых выводов, полученных при изучении одного вида клеток, к другим, даже близкородственным видам. В своих опытах мы использовали четыре штамма *Saccharomyces cerevisiae*, а именно: *S. cerevisiae* Thorne, *S. cerevisiae* Gebruder-Meyer, *S. cerevisiae* 212 и *S. cerevisiae* D. C. L., а кроме того, дрожжи других родов, в том числе *Pichia alcoholophila* (штамм Carlsberg), *Torulopsis utilis* var. *major* (штамм C. M. I. 33 552) и *Schizosaccharomyces octosporus* (штамм Beij. Galloway).

Качественные исследования показали, что в питательных средах, быстро охлажденных до температуры —79 или —190°, выживало очень мало клеток. Процент выживших клеток не увеличивался и тогда, когда осадок бульонных культур перед замораживанием вновь суспендировали, но уже в дистиллированной воде. Медленное оттаивание оказывало более разрушающее действие, чем быстрое.

Процент выживших клеток в пробах, согретых спустя 2 *час* и спустя сутки, был почти одинаковым. Предварительные исследования показали, что дрожжи всех штаммов и видов хорошо размножались в бульонной культуре, содержащей 15% глицерина. При быстром охлаждении таких культур до —79 или —190° выживало много клеток. Процесс гибели клеток в простом бульоне, а также в бульоне с примесью 15% глицерина повышался при медленном охлаждении до —79 или —190°. Некоторые характерные результаты представлены на фото 7 и 8.

Количественные исследования показали, что дрожжи различных штаммов и видов отличались по своей чувствительности к быстрому охлаждению. Из дрожжей вида *Saccharomyces cerevisiae* штамм Gebruder-Meyer оказался наиболее устойчивым к быстрому охлаждению в простом бульоне, а штамм 212 — наиболее чувствительным. Штамм Thorne был чувствительнее штамма Gebruder-Meyer, но устойчивее штаммов D. C. L. и 212. В различных опытах 99,5—99,98% клеток штамма Thorne погибло при быстром охлаждении до —79°. Чем сильнее было разбавление, тем больший процент клеток выживал. Очень мало клеток выживало при замораживании сухого остатка. Даже при самых лучших условиях в бульонных культурах штамма 212 погибало 99,99% клеток. Молодые (неспорообразующие) культуры *Schizosaccharomyces octosporus* оказались высокочувствительными к холоду, тогда как культуры, образующие большое количество спор, хорошо переносили быстрое охлаждение. *Torulopsis utilis* и *Pichia alcoholophila* переносили

охлаждение несколько лучше, чем *Saccharomyces cerevisiae* Thorne. Во всех случаях наибольшее число клеток погибало в сухих остатках и в концентрированных взвесях как при быстром замораживании, так и при медленном согревании. Процент дрожжевых клеток, переживших сверхбыстрое замораживание и оттаивание в пленках культуры на платиновых петлях, был меньше, чем при быстром охлаждении маленьких объемов культуры в узких пробирках.

При медленном охлаждении до —79° и быстром согревании в бульонных культурах различных видов дрожжей выживало довольно много клеток. В некоторых опытах, проведенных на разбавленных культурах, переживало 75% клеток *S. cerevisiae* Gebruder-Meyer и 25—75% *S. cerevisiae* Thorne. При медленном охлаждении бульонной культуры *S. cerevisiae* 212 до —79° выживало 50—90% клеток. При быстром же замораживании в пробах этих культур погибали все клетки. Число жизнеспособных клеток в бульонных культурах *Pichia alcoholophila*, *Torulopsis utilis* и *Schizosaccharomyces octosporus* увеличивалось при медленном охлаждении и быстром согревании и составляло 30—80% [69]. Приведенные данные свидетельствуют о поразительных отличиях в устойчивости близкородственных штаммов, видов и родов к замораживанию и оттаиванию.

За исключением молодых (неспорообразующих) культур *Schizosaccharomyces octosporus*, большой процент живых клеток обнаруживался в бульонных культурах дрожжей с примесью 15% глицерина при быстром охлаждении до —79°. Некоторые штаммы *Saccharomyces cerevisiae*, а также *Pichia alcoholophila* в таких условиях выживали лучше, чем в простых бульонных культурах, медленно охлаждаемых до —79°. Замораживание при —79° *Saccharomyces cerevisiae* D. C. L., разбавленных в культурах, содержащих 15% глицерина, не изменяло числа жизнеспособных клеток. При быстром охлаждении других штаммов и видов дрожжей в глицеринизированных культурах погибало 5—25% клеток. Значительно меньше погибало клеток при медленном охлаждении до —79°. У клеток различных видов и штаммов дрожжей, переживших быстрое или медленное охлаждение до низких температур, сохранялись характерные реакции сбраживания.

Отцентрифугированные осадки простых бульонных культур, вновь взвешенные в 15-процентном растворе глицерина, не испытывали губительного действия быстрого замораживания, если их выдерживали в этом растворе не менее 2—3 *час.* Судя по числу клеток, выживших в быстро охлажденных до —79° и затем согретых взвесях, оптимальный срок контактирования с 15-процентным раствором глицерина составлял 3—4 *час.* Отцентрифугированные осадки дрожжей, культивированные в 15-процентном растворе глицерина, не переживали быстрого охлаждения до температуры —79°. Когда из этих осадков перед замораживанием вновь готовили взвесь в простом бульоне, в ней обнаруживали незначительное число живых клеток. Полученные результаты навели на мысль о целесообразности использования глицерина для предохранения клеток от повреждений при быстром охлаждении [69].

Клетки дрожжей, культивированные или взвешенные в течение нескольких часов в бульоне, содержащем 5% глицерина, по всем признакам не были защищены от повреждений при быстром охлаждении. Лишь немногим выше была степень защитного действия и 7,5-процентного раствора глицерина на дрожжи некоторых видов и штаммов. Следовательно, минимальная эффективная концентрация глицерина для различных штаммов *S. cerevisiae*, а также для *Pichia alcoholophila* и *Torulopsis utilis* должна составлять 15% (по объему). Ввиду высокой устойчивости к быстрому охлаждению взрослых культур специальная методика для защиты молодых (неспорообразующих) культур *Schizosaccharomyces octosporus* не была разработана.

В дальнейшем были проведены опыты с целью выявления интервала низких температур, в котором целесообразно применять медленное охлаждение. Как показали предварительные опыты, в разбавленных культурах, сначала медленно охлажденных до —8 или —15°, а затем быстро охлажденных до температуры —79°, выживало небольшое число клеток. Невысокий процент гибели наблюдался во всех культурах дрожжей, быстро заморо-

женных при —15 или —20°, тогда как в разбавленных культурах чувствительного штамма *Saccharomyces cerevisiae* 212, быстро охлажденных до —30°, этот процент был достаточно высоким, а при быстром охлаждении до —40° погибали все клетки. Резко повышалось число погибших клеток в культурах дрожжей других штаммов, видов и родов при быстром охлаждении до любой температуры ниже —30°. Хорошие результаты удалось получить во всех опытах, когда культуры, быстро охлажденные до —15°, затем медленно, со скоростью около 2° в 1 *мин*, охлаждали до температуры —79° (табл. 13). Когда скорость охлаждения в интервале от —15 до —79° увеличивали примерно до 5° в 1 *мин*, процент выживших клеток после оттаивания был несколько ниже.

ТАБЛИЦА 13

Влияние скорости охлаждения до —79° на выживаемость дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Thorne, согретых после хранения в течение 24 *час* при —79°

Охлаждение	Число живых клеток в 1 *мм*³ 24-часовой бульонной культуры при различном разбавлении *		
	1:50	1:500	1:5000
Контрольные незамороженные . .	Не подсчитывали	217	31
Быстро замороженные при —79°	17	1	0
Медленно охлажденные до —8°, а затем быстро до —79°	20	6	2
Медленно охлажденные до —15°, а затем быстро до —79°	29	7	4
Быстро охлажденные до —15°, а затем медленно до —79° . . .	201	58	22
Медленно, по этапам охлажденные до —79°	208	78	16

* Каждое число выражает среднюю величину двух подсчетов.

Поведение дрожжевых клеток резко отличалось от поведения сперматозоидов млекопитающих. Основная предпосылка выживания сперматозоидов заключалась в

медленном охлаждении до —15°. Затем в интервале от —15 до —79° можно было без ущерба для клеток повышать скорость охлаждения (см. гл. 2). Следовательно, заключения, сделанные на основании опытов на дрожжах, вряд ли можно применять к клеткам млекопитающих.

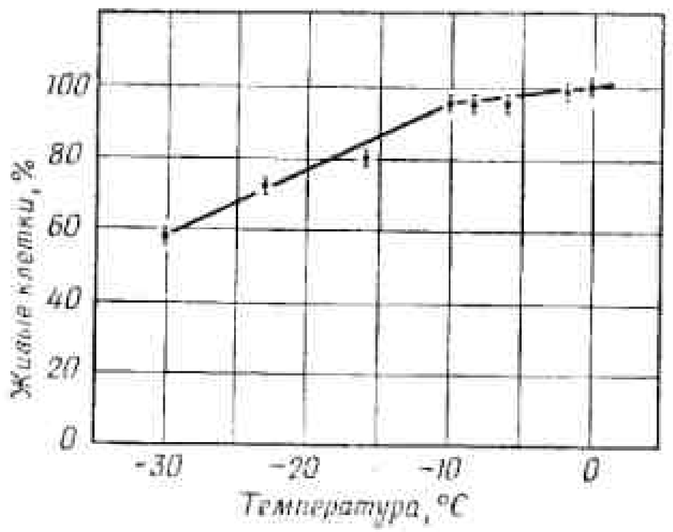
Позднее Ней и сотрудники [64] показали, что чем больше скорость охлаждения взвесей *S. cerevisiae*, тем тяжелее повреждения. При согревании со скоростью 3 или 15° в 1 *мин* разница в результатах была невелика. Эти авторы нашли, что взвеси клеток в гипертонических растворах глюкозы сильнее повреждались при замораживании и оттаивании, чем взвеси в дистиллированной воде. Критерием повреждений служили дифференциальное окрашивание живых и мертвых клеток метиленовым синим, скорость сбраживания (судя по выделению CO_2) и каталазная активность взвеси [64].

Облучение дрожжей при низких температурах

Определенный интерес представляют опыты Вуда и сотрудников [73—77] по замораживанию клеток *Saccharomyces cerevisiae* (гаплоидный штамм). Когда взвеси с фосфатным буфером охлаждали, они обычно замерзали при температуре —0,5°, но их можно было переохладить даже до —10°. Хранение этих взвесей в интервале указанных температур в течение нескольких часов не наносило клеткам никаких повреждений. В замороженной взвеси 90—100% клеток переживало хранение в течение 60 *мин* при температуре от —0,5 до —10°. Когда же температура охлаждения была ниже —10°, происходили явные повреждения клеток. Во взвесях, выдерживавшихся в течение 60 *мин* при температуре —30°, только 60% клеток сохраняли жизнеспособность [74] (фиг. 17).

Влияние рентгеновских лучей на дрожжевые клетки испытывали при различных температурах. При этом не отмечали никаких различий в чувствительности клеток при температуре от +40° до 0° или в переохлажденных смесях при любой температуре ниже —10°. Наоборот, чувствительность к облучению клеток, замороженных

при —10°, была снижена наполовину. Вместе с тем клетки, замороженные до —10° и затем согретые, обладали обычной чувствительностью к облучению при 0°. Следовательно, процесс замораживания до —10° и оттаивания



Фиг. 17. Выживание гаплоидных дрожжей, подвергавшихся в замороженном состоянии в течение 60 *мин* воздействию различных температур [74].

не вносил изменений в их структуры. Чувствительность к облучению снижалась еще на 25% при понижении температуры от —10 до —30° [73]. Однако в интервале от —30 до —72° наблюдалось поразительное повышение чувствительности к облучению. Быстро охлажденные до —72° клетки оказались не более устойчивыми к данной дозе рентгеновских лучей, чем клетки, находящиеся в жидкой фазе при 0° [77]. При этом во всех опытах была принята поправка на число клеток, погибших во время замораживания и оттаивания. Например, около 20% клеток переживало быстрое охлаждение до —50° и около 15% — охлаждение до —72° и последующее оттаивание. В пробах, подвергавшихся в течение 1, 5, 20 и 60 *мин* воздействию низкой температуры, выживал одинаковый процент клеток. Выживаемость значительно возрастала, когда пробы медленно охлаждали до —72°, выдерживая их по 5 *мин* при температурах —10, —22, —33 и —50°.

В обработанных подобным образом пробах после оттаивания был такой же высокий процент жизнеспособных клеток, как и в пробах, которые подвергали замораживанию в пределах от —22 до —33° и последующему оттаиванию. Чувствительность к рентгеновским лучам у дрожжей, медленно охлажденных до —72° и затем облученных при этой же температуре, была значительно ниже, чем у быстро охлажденных до —72° дрожжей, и примерно такого же порядка, как при охлаждении и облучении дрожжей при температурах от —20 до —30°. Данные по облучению дрожжей при различных температурах представлены в табл. 14.

ТАБЛИЦА 14

Чувствительность гаплоидных дрожжей к облучению при температурах ниже точки замерзания [77]

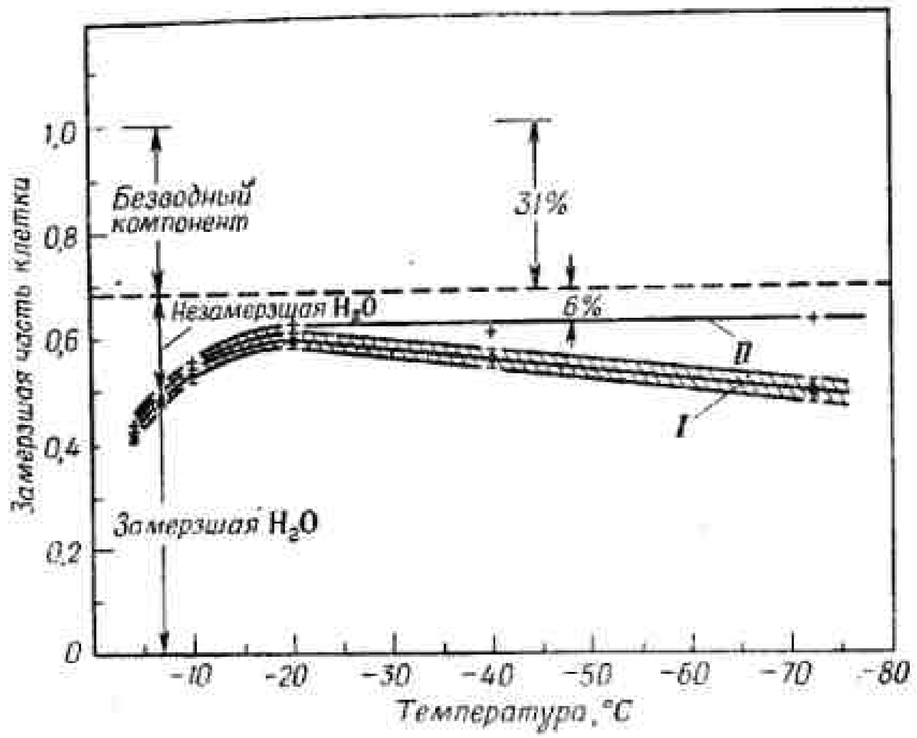
Температура облучения, °С	Условия	LD_{10}, кг	Относительная чувствительность к облучению (κ_T/κ_0)
—10	Жидкая фаза	8,4±0,2	1,00±0,03
—10	Замораживание при —10°	15,1±0,6	0,56±0,03
—22	» » —22°	16,5±0,8	0,51±0,03
—33	» » —33°	22,5±1,8	0,37±0,03
—50	» » —50°	12,8±1,2	0,66±0,07
—72	» » —72°	6,9±0,3	1,00±0,07
—10	Предварительное замораживание при —72°	16,2±1,8	0,43±0,05
—33	То же	12,1±0,6	0,57±0,04
—50	» »	7,4±0,4	0,93±0,07
—72	Ступенчатое замораживание	19,3±2,5	0,43±0,05
—10	Жидкая фаза, предварительное замораживание при —72° и оттаивание	6,9±0,4	1,22±0,07

Интересно отметить, что дрожжи, быстро охлажденные до —72°, а затем согретые и вновь охлажденные до —10°, были так же чувствительны к облучению (в жидкой и в твердой фазах), как и культуры, первоначально охлажденные до —10° и облученные при этой темпера-

туре. В то же время дрожжи, которые быстро охладили до —72°, слегка согрели и облучили при —50 или —33°, были менее устойчивы к облучению, чем клетки, которые сразу были охлаждены и облучены при этих температурах [77].

Повышенную устойчивость замороженных клеток к рентгеновским лучам объясняли тем, что токсические продукты облучения в известной степени теряют способность диффундировать в цитоплазму и инактивировать наиболее чувствительные или жизненно важные компоненты клеток. Можно было бы предполагать, что по мере уменьшения температуры будет снижаться и скорость диффузии, а одновременно с этим будет ослабевать и губительное действие рентгеновских лучей. Результаты, полученные Вудом и Тейлором [77], не подтвердили этого предположения, в связи с чем возникла необходимость исследовать влияние замораживания на дрожжевые клетки при разных скоростях охлаждения и различных конечных температурах. Было установлено количество воды, замерзшей во взвесях дрожжей при разной температуре. Количество тепла, необходимое для оттаивания проб, охлажденных до различных температур, определяли с помощью микрокалориметрических методов. Было выявлено соотношение клеточной массы к общей массе взвеси. Оказалось, что содержание воды в клетках составляло 69%. Кроме того, были найдены величины удельной теплоемкости калориметра и остатка сухого вещества клеток и выведена формула расчета замерзшей части нормальной дрожжевой клетки при различной температуре. На фиг. 18 (кривая *I*) показано, что доля клеточной воды, превращенной в лед, как и следовало ожидать, увеличивалась по мере понижения температуры, при которой замораживали дрожжи от —0,5 до —22°. При —22° кристаллизовалось до 91% воды. При температуре ниже —22° количество вымерзшей из клетки воды неожиданно уменьшалось и продолжало постепенно уменьшаться по мере понижения температуры. При —72°, по-видимому, вымерзло только 74% клеточной воды. Вуд и Розенберг [76] пришли к выводу, что часть воды в цитоплазме, скорее всего, была «связана» и не могла вымерзать. Вряд ли количество связанной воды

могло увеличиваться в процессе замораживания при температурах ниже —22°. В то же время весьма вероятно, что удельная теплоемкость изменяется по мере понижения температуры. Сделав соответствующую поправку,



Фиг. 18. Замерзшая часть нормальной дрожжевой клетки как функция температуры [76].

Точки на кривой *I* рассчитаны исходя из предположения, что удельная теплоемкость незамерзшей воды равна 1. Заштрихованный участок показывает расхождения, связанные с неясностями в отношении отдельных параметров. Точки на кривой *II* подсчитаны исходя из предположения, что фракция замерзшей воды не уменьшается, а достигает постоянной величины и удельная теплоемкость незамерзшей воды не обязательно равна 1. Пунктирная линия обозначает всю водную фракцию клетки.

Вуд и Розенберг получили вторую кривую, в которой рассчитанное количество замороженной клеточной воды оставалось всегда постоянным на уровне 94% в интервале температур от —22 до —72° (фиг. 18, кривая *II*). Несмотря на такой большой объем вымерзшей воды (94%), дрожжевые клетки переживали охлаждение до —22°. Ясно, что внутри самой клетки не всегда имело место вымерзание воды.

Меримэн и Платт [60] в опытах по замораживанию печени млекопитающих в зависимости от скорости про-

движения границы между льдом и водой определяли, вымерзала ли вода внутри цитоплазмы или же снаружи клеточной оболочки. При небольшой скорости замерзания (менее 1,5 *мм/мин*) повышение осмотического давления вне клетки в связи с замораживанием среды влекло за собой дальнейшее выделение воды через оболочку. В результате клетки обезвоживались и вода вымерзала из цитоплазмы снаружи клеточной оболочки. При быстром замораживании клеток печени (более 1,5 *мм/мин*) внутриклеточное замораживание наступало до обезвоживания клеток в результате повышения осмотического давления окружающей среды. Когда быстрому замораживанию при —72° подвергали дрожжевые клетки, скорость продвижения границы, отделяющей лед от воды, составляла приблизительно 7 *мм/мин* [77]. Следовательно, если дрожжевые клетки по своим реакциям не отличались от клеток печени, то и в них замораживание должно было бы происходить внутри клеток. При замораживании взвесей дрожжей при —33° граница, отделяющая лед от воды, перемещалась со скоростью 1,5 *мм/мин*, а при более высоких температурах — еще медленнее. Вода цитоплазмы могла выделяться через оболочки отдельных клеток и замерзать во внеклеточных пространствах. Эти теоретические выводы совпадали с опытными данными Нея [62, 63], который охлаждал под микроскопом взвеси дрожжей с различной скоростью и наблюдал процесс образования льда. При быстром замораживании при температуре от —2 до —10° происходила внеклеточная кристаллизация льда, и клетки постепенно сжимались. При быстром замораживании при —78 и —190° кристаллы льда появлялись и внутри клеток (фото 9). Разной локализацией кристаллов льда можно объяснить неодинаковую чувствительность дрожжевых клеток, охлажденных до различных температур, к рентгеновским лучам.

При действии ионизирующего излучения в замороженных клетках возникают свободные радикалы в равных количествах на каждую единицу объема воды, независимо от того, находится ли она в жидком состоянии или в замерзшем, внутри или вне клетки. Если эти свободные радикалы и их продукты образовались во льду, они, вероятно, будут фиксироваться в месте своего возникновения и смогут лишь постепенно, очень медленно диффундировать оттуда [77]. При вымерзании большого объема воды вне клеток фиксированные во внеклеточных пространствах свободные радикалы, высвобождаясь при оттаивании, будут растворяться во внешней среде и не смогут причинить вреда уязвимым и жизненно важным частям клеток. Вуд и сотрудники полагают, что уменьшение чувствительности дрожжевых клеток к облучению при температурах от 0 до —30° обусловлено тем, что по мере понижения температуры увеличивается объем воды, вымерзающей вне клеток. Подобно этому клетки, медленно охлаждаемые до —72°, обезвоживаются в процессе медленного замораживания, чем и объясняется их низкая чувствительность к облучению.

В то же время при быстром охлаждении до температур ниже —30° какая-то часть воды в цитоплазме вымерзает внутри самих клеток. Объем внутриклеточного льда зависит от температуры замораживания. При температуре —72° вся клеточная вода может быть заморожена in situ. Во время облучения свободные радикалы фиксируются внутри клеток и после оттаивания могут нанести повреждение жизненно важным и уязвимым частям клеток. Этим, по-видимому, можно объяснить тот факт, почему дрожжевые клетки, быстро охлажденные до —72° и облученные при этой температуре, были так же чувствительны к рентгеновским лучам, как и клетки, облученные в жидкой фазе или при температуре, близкой к 0°.

Поскольку такие клетки, как кишечная палочка, по своему размеру значительно меньше дрожжей и отношение их поверхности к объему больше, вода из них быстрее диффундирует через оболочку клетки во внеклеточные пространства. Клеточные оболочки бактерий, кроме того, более хрупкие и лучше пропускают воду, чем оболочки дрожжей. При быстром охлаждении кишечной палочки до температур ниже —30° ее чувствительность к облучению не повышается. Согласно Вуду и Тейлору [77], это объясняется тем, что маленькие клетки быстро обезвоживаются и, следовательно, в них не образуются кристаллы льда даже при таких скоростях охлаждения, ко-

торые обычно влекут за собой внутриклеточное вымерзание воды в дрожжевых клетках и в клетках печени кролика.

Замораживание и высушивание спор Aspergillus flavus

Принято считать, что споры бактерий, дрожжей и других грибов обладают большой устойчивостью к различным неблагоприятным физическим условиям. Большое удивление поэтому вызвало то обстоятельство, что около 95—99% спор плесневого гриба *Aspergillus flavus* погибало при лиофилизации [58, 59]. В противоположность этому 96—98% спор, которые высушили при высоких температурах (от +43 до +81°), оказались жизнеспособными [59]. Это показывает, что повреждения клеток, возможно, были связаны не с выделением воды, а с замораживанием. Проведенные исследования показали, что во взвеси спор *A. flavus* в дистиллированной воде, охлажденной до —73 и —75°, процент выживших клеток зависел в первую очередь от скорости согревания. Взвеси, которые согревали медленно (0,9° в 1 *мин*), давали только 7% прораставших спор, тогда как при согревании со скоростью 700° в 1 *мин* получалось 75% прораставших спор [58]. Подавляющее большинство спор погибало во время медленного согревания в интервале температур от —20 до —0,8° еще до начала плавления льда. К тому времени, когда температура достигала —2,3°, оставалось 3% живых спор, а при —0,8° — только 1,6%. Скорость таяния внеклеточного льда не влияла или почти не влияла на выживаемость. Вероятнее всего, повреждения были вызваны явлениями, происходившими внутри самих клеток (например, медленным плавлением кристаллов льда в клетках, которое легко могло происходить в широком интервале температур ниже нуля вследствие высокой концентрации солей в спорах [31, 58]). Большой интерес представляет и то обстоятельство, что медленное согревание одинаково губительно как для микроорганизмов и их спор, так и для изолированных тканей гомойотермных животных. Основные механизмы вызываемых повреждений, однако, не обязательно одни и те же.

Теоретическое и практическое значение исследований на дрожжах

Полученные основные данные о выживаемости дрожжей и плесневых грибов после воздействия очень низких температур, вероятно, уже нашли практическое применение. Так, удалось выделить из зараженных лимфатических узелков патогенные дрожжи *Histoplasma capsulatum*, которые хранили в течение 160 дней при температуре —40° [56]. Усовершенствование метода хранения при низких температурах может облегчить диагностику других заболеваний, вызванных дрожжами и плесневыми грибами. Некоторые выделенные редкие микроорганизмы могут быть очень полезными в промышленных и лечебных целях. Поэтому так важно было бы иметь в своем распоряжении эффективный метод хранения дрожжевых клеток с помощью низких температур или другим способом, при котором они сохраняли бы свою жизнеспособность. Проведенные до сего времени экспериментальные исследования говорят о необходимости раздельного изучения каждого нового штамма любого вида дрожжей для определения оптимальных условий его консервации. Сохранение жизнеспособности у лиофилизированных культур будет зависеть от устранения летального действия замораживания, а также от разработки наилучшего метода увлажнения клеток [54]. Разрешению этих задач может способствовать изучение физико-химического строения самих клеток. Возможно, результаты исследований и нельзя будет применить непосредственно к клеткам млекопитающих. Тем не менее дальнейшее изучение процессов замораживания и оттаивания дрожжей, а также хранения их в замороженном или высушенном состоянии поможет восполнить некоторые пробелы в наших знаниях относительно условий, необходимых для подавления в клетках жизненных процессов и последующего их восстановления без гибели клеток в процессе выделения воды или увлажнения.

ПРОСТЕЙШИЕ

Ранние исследования по замораживанию простейших

Девятого октября 1676 г. Антони ван Левенгук направил в Лондонское Королевское общество описание крошечных животных, которых он наблюдал под микроскопом в каплях дождевой, морской и колодезной воды, а также в настое перца. Некоторые из этих животных впоследствии были определены как простейшие. Весной следующего года Левенгук опять прислал сообщение о том, что во время сильного похолодания вода замерзла и все находившиеся в ней крошечные животные погибли. Это было первым высказыванием о гибели простейших при замораживании. Однако Левенгук отметил, что спустя 17—24 *час* после оттаивания в жидкостях вновь появлялись какие-то живые существа [87].

Лет сто спустя Спалланцани [123] систематически испытывал действие холода на настои, содержащие микроскопических животных (некоторые из них, по-видимому, были простейшими). Он обнаружил, что многие из этих животных переживали воздействие низких температур, пока окружающая их среда была в жидком состоянии. Например, при температуре на 6° ниже точки замерзания в среде еще имелись незамерзшие участки, в которых можно было обнаружить живых животных, тогда как в застывших, замерзших участках все они погибали при той же температуре. Спалланцани наблюдал под микроскопом, как эти животные отступали перед надвигающимся на них широким фронтом льда. Они стремились как можно дольше оставаться в жидкой среде и, как только жидкость полностью вымерзала, становились неподвижными и погибали. Спалланцани, который в своих опытах, вероятно, пользовался шкалой Реомюра, смог переохлаждать настои на 9° ниже точки замерзания. При температуре до —8° животные еще плавали в жидкости, правда с пониженной скоростью. Когда температура достигала —9°, большинство животных погибало, хотя основная масса среды оставалась жидкой. Выживало 2 типа организмов, но, к сожалению, в настоящее время невозможно установить, каких именно животных имел в виду Спалланцани.

Прошло еще почти сто лет, прежде чем Кюне [95] сообщил, что амебы не разрушаются при температуре 0°, но погибают, как только окружающая их среда замерзает. В связи с этим особый интерес представляет опыт Фола, которому удалось в 1884 г. получить культуры амеб и реснитчатых инфузорий из почвы, замороженной до —100° [106]. Молиш [116], а позднее Чемберс и Хэйл [84] замораживали амеб и наблюдали под микроскопом их разрушение в результате образования и последующего растворения внутриклеточных кристаллов льда. Уолфсон [126] обнаружил, что парамеции продолжали двигаться при температурах до —14° в переохлажденной среде, но погибали после ее замораживания и оттаивания. Многие авторы сообщали о гибели эвглен различных видов в результате замораживания [106]. В противоположность этому Беккерель [81] обнаружил живых амеб разных видов, одну эвглену и одну парамецию в почве, которую вначале полностью высушили, а затем подвергли воздействию жидкого гелия при температуре от —269 до —271°. Результаты работы Тейлора и Стрикленда [124] позволяют предполагать, что некоторые микроорганизмы, которых подвергли воздействию холода в почве, как это делали в своих опытах Фол и Беккерель, находились в состоянии цисты.

Еще в 1904 г. Лаверан и Месниль [96] показали, что патогенные трипаносомы выживали и сохраняли вирулентность после пребывания в течение 15 *мин* в жидком воздухе при температуре —191°. В одном случае *Trypanosoma lewisi*, которую выдерживали при этой температуре 75 *мин*, сохраняла свою инфекционность (при введении крысам). В других опытах, однако, трипаносомы утрачивали жизнеспособность и вирулентность при продолжительном хранении. Подобные результаты получил Гэйлорд [91] в опытах на *T. gambiense*, но де Йонг [86] нашел, что *T. equiperdum* сохраняла свою вирулентность и после трехнедельного выдерживания при температуре —191°. Приведенные противоречивые данные свидетельствовали о незнании основных факторов, обусловливающих выживание простейших при низких температурах.

Современные исследования по замораживанию простейших

Повышенный интерес к вопросу о возможности консервации простейших в замороженном состоянии при низкой температуре вызвало сообщение Когшолла [85], что малярийные плазмодии в инфицированной крови сохраняли жизнеспособность и вирулентность и после хранения их при температуре —76°. Кровь брали у обезьян макаков-резусов с подострой или хронической инфекцией *Plasmodium knowlesi* и *P. inui*. В некоторых пробах кровь перед замораживанием свертывалась, а в других ее либо подвергали дефибринированию, либо добавляли гепарин или цитрат. Несвернувшуюся кровь разливали по 1 *мл* в целлулоидные пробирки (приблизительно 12×2 *см*). Пробирки погружали в охлаждающую смесь спирта и CO_2 с температурой —79° и вращали до тех пор, пока кровь не образовывала на внутренних стенках пробирки пленку и быстро не замерзала. Затем пробы выдерживали некоторое время при —76°, после чего их быстро оттаивали, погрузив в водяную баню с температурой 37,5°. Пробы крови подвергали анализу для определения числа неповрежденных эритроцитов и плазмодиев, а затем вводили здоровым макакам-резусам. Пробы зараженной крови, хранившиеся в течение 19—70 дней при температуре —76°, вызывали у животных малярию (табл. 15). В трех случаях концентрация плазмодиев в каждой пробе до замораживания была меньше 1 на 10 000 эритроцитов. Инкубационный период болезни, вызванной введением крови, подвергавшейся замораживанию, почти не отличался от инкубационного периода у обезьян, которым вводили свежую инфицированную кровь. Следовательно, несмотря на то что во время замораживания и оттаивания лишь незначительное число эритроцитов не гемолизировалось, кровь почти полностью сохранила вирулентность. Исследования Когшолла показали применимость метода консервации в замороженном состоянии для сохранения жизнеспособности малярийных плазмодиев и других патогенных простейших in vitro. Этот метод, возможно, вытеснит те обычные методы поддержания чистоты различных штаммов

микроорганизмов, которые трудоемки, дороги, небезопасны и связаны с необходимостью пересевов или прививок животным.

Методику Когшолла с некоторыми модификациями использовали Аркетти [79] для хранения *P. gallinaceum*, а также Мэнуэлл и сотрудники [113, 114], которые выдерживали малярийных плазмодиев в инфицированной птичьей крови в замороженном состоянии при температуре от —55 до —78°. После оттаивания эти плазмодии вызывали болезнь у канареек. Обработанный таким способом *P. lophurae* после оттаивания сохранял свою инфекционность (в опытах на утках) [111, 113, 114]. Мэнуэлл [111] отметил, что если бы эффективность хранения крови определяли по степени ее способности передавать инфекцию, то метод хранения ее в замороженном состоянии можно было бы считать на 100% эффективным. Однако соотношение паразитов и выживших эритроцитов или же соотношение неповрежденных клеток и разрушенных, определенное на окрашенных мазках, показывает, что этот метод оставляет желать лучшего. Мэнуэлл и Эджет [113] установили, что повышение скорости замораживания и оттаивания путем использования более узких пробирок и механического вращения их во время охлаждения и согревания увеличивало соотношение восстановленных здоровых и зараженных эритроцитов. В результате замораживания при —10, —30 или —55° с последующим хранением при —75° погибало больше эритроцитов, чем в результате замораживания при температуре твердой углекислоты. Ни одна из проб крови, хранившихся при —10° в течение сравнительно коротких промежутков времени, после оттаивания не вызывала заболевания при введении. В противоположность этому не получено никаких данных о повышении процента гибели среди простейших, хранившихся в течение 244 дней при температуре —75°.

Уолфсон [127] изучала на утках вирулентность малярийных плазмодиев *P. lophurae, P. cathemerium* и *P. relictum*, хранившихся в замороженном состоянии при низких температурах. Она обнаружила, что соотношение эритроцитов и плазмодиев, переживших хранение, находилось в прямой зависимости от содержания инфициро-

ТАБЛИЦА 15

Результаты заражения здоровых макаков-резусов малярийными плазмодиями, хранившимися при температуре —76° [85]

№ обезьяны	Вид плазмодия	Антикоагулянт	Концентрация плазмодиев в консервированной крови*	Продолжительность хранения, дни	Количество консервированной крови, *мл*	Время обнаружения плазмодиев в крови обезьяны
1	*Plasmodium knowlesi*	Цитрат	113	70	4	7-й день
2	*P. inui*	»	<1	70	1	14-й »
3	*P. knowlesi*	Гепарин	490	19	1	5-й »
4	» »	(Дефибринирование)	490	19	1	5-й »
5	» »	Цитрат	490	19	1	6-й »
6	» »	Антикоагулянтов не применяли**	490	19	1	5-й »
7	» »	То же***	490	19	1	5-й »
8	» »	Гепарин	<1	19	1	9-й »
9	» »	Цитрат	<1	19	1	14-й »

* Число зараженных эритроцитов на 10 000 здоровых клеток.
** Кровь помещали в холодильник до свертывания.
*** Кровь помещали в холодильник после свертывания.

ванных эритроцитов в пробе крови до замораживания. Ни промежуток времени между прививкой и появлением плазмодиев в кровяном русле, ни степень тяжести инфекции не изменялись, когда утке вводили инфицированную кровь, хранившуюся от 2 дней до 1 года при температуре —75°. Саундерсу и Скотту [120] первым удалось законсервировать *P. vivax* в замороженном состоянии при —76° в человеческой крови и показать, что после оттаивания кровь сохраняла вирулентность и ее можно было использовать для пиротерапии нейросифилиса.

Больших успехов добились Уэйнмэн и Мак-Алистер [125], которые установили, что в тех случаях, когда культуры или инфицированную кровь перед хранением при —70° замораживали при —15°, процент выживших микроорганизмов после оттаивания был выше, чем в пробах того же материала, сразу замороженных при —70°. Таким образом, впервые было показано, что медленное охлаждение, возможно, действует на простейшие менее разрушительно, чем быстрое замораживание при температуре ниже нуля. Трипаносомы четырех различных видов, замороженные в два приема, переживали хранение при —70° в течение 19 месяцев. После оттаивания часть микроорганизмов сохранила подвижность; из них были получены вирулентные культуры, и животные, которым их вводили, заболели [125]. *Leishmania tropica* и *L. donovani* хранили таким образом в течение различных периодов времени (до 2 лет). Когда культуру *Trichomonas hominis* замораживали при —70° и затем оттаивали, все микроорганизмы погибали. Будучи же предварительно замороженными при —15°, они переживали последующее хранение при —70° в течение 5—407 дней. Труднее было консервировать *T. vaginalis*. Только в двух пробах из десяти, замороженных при —15° и хранившихся при температуре —70°, после оттаивании были обнаружены живые микроорганизмы. Любопытные результаты были получены в опытах с *Toxoplasma gondii*. Несмотря на то что эти микроорганизмы пережили замораживание при —70° и последующее оттаивание, все они погибли во время продолжительного хранения при указанной температуре. Аналогичные данные получили Мэнуэлл и сотрудники [112], которые впервые высказали предполож-

ние о том, что простейшие могут погибать во время хранения при низких температурах. Попытки консервировать *Entamoeba histolytica* при —70° также потерпели неудачу, хотя в одном случае в культуре, выдерживавшейся при —15°, были обнаружены жизнеспособные организмы.

Левадити [98] установил, что выживаемость *Trypanosoma congolense* или *Plasmodium berghei* в мышиной крови, хранившейся при —70°, зависела, по крайней мере частично, от содержания инфицированных, но не поврежденных эритроцитов. При медленном замораживании и оттаивании проб крови наступал выраженный гемолиз, и плазмодии плохо выживали. Пробы крови, быстро охлажденные, хранившиеся 15—100 дней при —70°, а затем быстро оттаянные, содержали достаточное количество инфицированных интактных эритроцитов, чтобы вызвать заболевание у мышей. Исследование под микроскопом показало, что около 20% трипаносом сохранили подвижность; с точки зрения морфологии многие микроорганизмы выглядели также нормальными, хотя у части малярийных плазмодиев *(P. berghei)* наблюдался лизис. В настоящее время выяснено, что уменьшение числа живых малярийных плазмодиев в медленно охлажденных инфицированных пробах крови, отмеченное Мэнуэллом и сотрудниками [112], обусловлено усилением гемолиза. Уэйнмэн и Мак-Аллистер [125] добились хороших результатов при медленном охлаждении простейших по той причине, что эти микроорганизмы не относились к паразитам, жизненный цикл которых связан с пребыванием в эритроцитах.

Применение глицерина для защиты простейших от действия низких температур

Тот факт, что сперматозоиды и эритроциты млекопитающих, находившиеся в среде, содержащей глицерин, переживали замораживание и хранение при низких температурах, открыл широкие перспективы в отношении консервации простейших.

АМЕБЫ И АМЕБОИДНЫЕ ФОРМЫ

Amoeba proteus сохраняла подвижность в течение 1 *час* в дождевой воде, содержащей 5% глицерина; если же концентрацию глицерина повышали до 10—20%, она спустя несколько минут втягивала псевдоподии и принимала форму шара. Когда амеб, активно передвигавшихся в 5-процентном растворе глицерина, охлаждали при температуре около —10°, под микроскопом можно было наблюдать образование кристаллов в окружающей среде (фото 10, *А* и *Б*). При понижении температуры до —15° амебы внезапно «затемнялись» в связи с образованием большого количества кристаллов внутри клеток (фото 10, *В*). Во время согревания сперва оттаивал лед в окружающей среде. Внутри клеток кристаллы льда медленно отступали с периферии и вновь становилась видной зернистая просвечивающая цитоплазма (фото 10, *Г*). После растворения всех кристаллов льда амебы имели обычную форму и не повреждались даже при сдавливании (фото 10, *Д*), но подвижность их не восстанавливалась. В контрольных препаратах, замороженных без глицерина, наблюдались разрывы оболочки, так что при оттаивании гранулы цитоплазмы попадали в окружающую среду и даже при легком сдавливании амебы полностью разрушались [122]. На основании полученных результатов можно сделать предположение, что глицерин защищал оболочку клеток во время замораживания и оттаивания, но или он не проникал внутрь клеток, или же повышение его концентрации во время вымерзания воды оказывало токсическое действие на *A. proteus*.

Вполне вероятно, что *Entamoeba histolytica*, привычная к условиям высокого осмотического давления в прямой кишке и в крови млекопитающих, будет переносить более высокие концентрации глицерина, чем пресноводная амеба, и полностью сохранит функциональную активность после замораживания при низких температурах в среде, содержащей глицерин [90]. Вместе с тем то обстоятельство, что эта амеба адаптировалась к жизни при температуре +38°, могло сделать ее чувствительной к охлаждению до температур выше нуля. Предварительные опыты показали, что *E. histolytica* переживает ипку-

бацию в течение 2 *час* (но не 24 *час*) при +37° в среде, содержащей 5—10% глицерина. Эти микроорганизмы выживали и в 15-процентном растворе при условии постепенного повышения концентрации глицерина. Пробы, инкубированные в 5- или 10-процентном растворе в течение 30, 60 или 120 *мин*, охлаждали до —79° и выдерживали при этой температуре различное время (от 6 до 65 дней). Живые амебы были обнаружены после оттаивания в пробирках, охлаждавшихся медленно — со скоростью 1° в 1 *мин* от 0 до —15° и со скоростью 5° в 1 *мин* от —15 до —79° в специальном холодильнике, используемом для консервации сперматозоидов быка (см. гл. 2). Впоследствии амебы нормально размножались при пересевах культур. В противоположность этому амебы, охлаждавшиеся быстро от +20 до —79° или от —15 до —79°, не выживали. Не помогало также и постепенное удаление глицерина из среды — согретые пробы, разбавленные перед посевом на твердую питательную среду, не содержали после инкубации живых амеб. Во всех опытах большое число этих организмов погибало на протяжении первой недели хранения при —79°, и в некоторых случаях живые особи наблюдались только после пересева оттаявших проб. В контрольных опытах (без добавления в суспензионную среду глицерина) не отмечалось ни одного случая выживания *E. histolytica* после замораживания при —79° и последующего оттаивания. Полученные результаты показывают, что глицерин допускает продолжительное хранение в замороженном состоянии *E. histolytica* при очень низких температурах. Надо полагать, что степень выживаемости этого организма можно повысить путем изменения среды или методики проведения опыта [90].

Использование этиленгликоля [92] в качестве защитного агента способствовало восстановлению жизнеспособности у небольшого числа клеток *Physarella oblonga*, находящихся на стадии амебы. Этот организм имеет еще стадию зооспор, обладающих жгутиками, и принадлежит к типу Mycetozoa (Myxomycetes). Клетки на покровном стеклышке подвергали воздействию 2, 3 и 4 *М* раствора этиленгликоля в течение 0,5—2 *мин*, а затем погружали в жидкий азот с температурой —195°. Спустя 1 *мин* их

быстро оттаивали. При исследовании под микроскопом в висячей капле воды на покровном стекле обнаружили, что часть организмов во время замораживания и оттаивания погибла, а у других наблюдалось восстановление подвижности, сокращение вакуолей и образование псевдоподий. Спустя 24 *час* число живых микроорганизмов увеличилось, по-видимому, в результате их размножения. Подобные результаты получил и Шарф [121], который установил, что амебная форма простейшего *Naegleria bistadialis* переживала замораживание в жидком азоте, если культуры предварительно обрабатывали этиленгликолем. В одном опыте, когда суспензионная среда содержала 1 *М* этиленгликоля, около 70% микроорганизмов пережили быстрое охлаждение в жидком азоте. В пробах, подвергавшихся 5-минутному воздействию 1 *М* раствора этиленгликоля, выдерживавшихся в течение 1 *мин* при температуре —195° и затем согреваемых, в среднем только 25% микроорганизмов сохраняло подвижность. Большое число их погибало после перенесения из среды, содержащей этиленгликоль, в водопроводную или дистиллированную воду. При этом возникает несколько вопросов, разрешение которых представляет определенный интерес. В частности, можно ли повысить выживаемость путем более медленного охлаждения или же путем изменения состава среды, в которой происходит замораживание? В одинаковой ли степени эффективны глицерин и этиленгликоль в отношении защиты клеток от действия замораживания и оттаивания? Кроме того, интересно было бы исследовать, не является ли этот организм в его жгутиковой форме более или менее устойчивым к повреждениям во время замораживания и оттаивания.

ТРИХОМОНАДЫ

Жгутиковые микроорганизмы, в том числе и трипаносомы, были в числе первых простейших, оживших после замораживания и последующего оттаивания. Однако трихомонады в обычной среде плохо переносят воздействие низких температур [125]. В 1954 г. Мак-Энтегарт [107] испытывал действие глицерина на рост культур трихомонад 4 различных видов (*Trichomonas vaginalis*,

T. foetus, T. gallinae и *T. hominis*) и их выживаемость при —79°. Согласно полученным им данным, оптимальный рост наблюдался при содержании в среде 2,5% глицерина, снижение роста — при 5 или 10% и полное отсутствие роста — в 15-процентном растворе глицерина. Попытки удалить глицерин из среды или понизить его концентрацию перед пересевом дали худшие результаты, чем непосредственный пересев взвеси с глицерином в свежую среду. Когда взвеси, содержащие 0, 5 или 10% глицерина, быстро охлаждали, погружая пробирки в замораживающую смесь с температурой —79°, результаты пересева после быстрого оттаивания были крайне неудовлетворительны. В то же время, если взвеси с 5 и 10% глицерина охлаждали медленно, со скоростью, которую применяли при охлаждении *Entamoeba histolytica* [90], то *Trichomonas vaginalis, T. gallinae* и *T. hominis* давали хороший рост после хранения проб в течение 4—6 месяцев при температуре —79° [107]. Затем максимальный период выживания этих микроорганизмов продлили до 12 месяцев, а в отношении *T. vaginalis* удалось добиться получения полноценных культур после хранения на протяжении 26 месяцев при —79° в 5-процентном растворе глицерина [109].

Вызывало удивление, что *T. foetus* в отличие от столь близко родственных ему видов трихомонад не переживал замораживания по указанному выше методу. Этот микроорганизм служит возбудителем венерического заболевания у рогатого скота и вызывает септический аборт. Поэтому крайне важно было добиться его сохранения в лабораторных условиях для получения возможности проводить сравнение физиологических и иммунологических свойств у различных штаммов, а также разработки методов химиотерапии. Поскольку данное инфекционное заболевание с трудом поддается лечению, в прошлые годы при постановке диагноза забивали быка и не допускали оплодотворения коров в течение продолжительного времени. Джойнер [93] высказал предположение, что процесс обработки глицерином и замораживания при —79°, который применяли для консервации сперматозоидов, возможно, обладает и другим важным свойством, а именно убивает патогенные трихомонады в сперме

ТАБЛИЦА 16

Выживание трихомонад в бычьей сперме, консервированной при —79° [93]

Источник трихомонад	Разбавитель	Характер замораживания при —79°	Выживание трихомонад при хранении спермы в 10-процентном растворе глицерина								
			спустя 5 *час* хранения при +5°			спустя 16 *час* хранения при +5°			спустя 24 *час* хранения при —79°		
			опыт			опыт			опыт		
			1	2	3	1	2	3	1	2	3
Промывная жидкость (из области крайней плоти)	Цитратно-желточный	Не замораживали	+	+	+	+	—	—			
		Медленное							—	—	—
		Быстрое							—	—	—
Промывная жидкость из области крайней плоти	Цитратный буфер, содержащий 10% молочного порошка	Не замораживали	+	+	+	+	—	—			
		Медленное							—	—	—
		Быстрое							—	—	—
Культура	Цитратно-желточный	Не замораживали	+	+	+	+	+	+			
		Медленное							—	—	—
		Быстрое							—	—	—
Культура	Цитратный буфер, содержащий 10% молочного порошка	Не замораживали	+	+	+	+	+	—			
		Медленное							—	—	—
		Быстрое							—	—	—

быка. Он проверил это теоретическое положение, инфицировав сперму большим числом трихомонад, взятых из культур *T. foetus* Belfast или из отцентрифугированного осадка жидкости, которой промывали область крайней плоти зараженных быков. Затем сперму разбавляли цитратно-желточным разбавителем или забуференным снятым молоком до конечной концентрации 10% глицерина и выдерживали 16 *час* при +5° (по методу Полджа). Обследование проб в конце этого периода показало полную неподвижность жгутиковых, а при пересеве культур в некоторых пробах погибали все микроорганизмы. Сперму медленно охлаждали до —79° (по методу Полджа). Спустя 24 *час* пробы отогревали, обследовали и проводили пересев культуры. Ни в одном случае не были обнаружены жизнеспособные трихомонады (табл. 16). Когда культуры или взвеси свежевзятых трихомонад выдерживали 16 *час* при температуре +5°, положительные результаты были получены в образцах с концентрацией глицерина 0 или 15% (но не 10 или 20%). Джойнер [93] подчеркивал необходимость точного соблюдения всех деталей его методики при применении ее для консервации спермы зараженных быков. Малейшие изменения физических условий могут изменить действие глицерина и способствовать выживанию трихомонад. Наилучшим средством прекращения распространения инфекции Джойнер считал забой зараженных быков. Вместе с тем он полагал, что *T. foetus* можно удалить из спермы с помощью обычного метода ее консервации при температуре —79° и что иногда складываются такие обстоятельства, когда целесообразно сохранить быка и консервировать сперму.

Данные Джойнера вызвали противоречивые отклики. С одной стороны, Бартель [80] сообщил, что ему удалось на 9% повысить число забеременевших коров в районе, где был широко распространен трихомоноз, путем одного лишь осеменения коров спермой, обработанной 10-процентным раствором глицерина в цитратно-желточном разбавителе и медленно охлажденной до —79° (по методу Полджа). С другой стороны, Лейдл и Марла [97] обнаружили, что значительное число *T. foetus* переживало медленное охлаждение до —79° и хранение при

этой температуре в течение двух дней, когда для приготовления взвеси брали лошадиную сыворотку, содержащую 10% глицерина. Левин и Маркар [102] сообщили, что добавление 5 или 10% глицерина в среду ЦППМ (состоящую из цистеина, пептина, вытяжки печени и мальтозы), в которой культивировали *T. foetus*, способствовало выживанию микроорганизмов после замораживания, хранения при температуре —76 или —20° и последующего оттаивания. Число оживших простейших зависело от скорости охлаждения и достигало 80% в тех случаях, когда взвеси охлаждали медленно, со скоростью 1° в 1 *мин*. Если же пробирки погружали непосредственно в замораживающуюся смесь с температурой —76°, все микроорганизмы погибали. Мак-Уйэд и Уильямс [110], использовавшие в опытах разбавитель спермы, содержащий 7% глицерина и забуференное молоко, также находили живых *T. foetus* в медленно охлажденных пробах, хранившихся при температуре от —73 до —79° в течение 1—125 дней. Блэкшоу и Битти [83] нашли, что *T. foetus* сохранял жизнеспособность после замораживания и оттаивания в различных средах в присутствии 5 и 7,5% глицерина. Эти авторы замораживали взвеси тотчас же после добавления глицерина, а не спустя 16 *час* пребывания при температуре +5°, как рекомендует Джойнер [93].

Эти, видимо, противоречивые данные были в дальнейшем проанализированы Левином и сотрудниками [99, 100, 103, 104], а также Джойнером и Беннетом [94], которые хорошо понимали, что замораживание при низких температурах в присутствии глицерина открывает широкие возможности как для консервации *T. foetus* и других патогенных простейших, так и для удаления их из зараженной спермы или культур. Джойнер и Беннет [94] подтвердили раннее наблюдение, что культуры *T. foetus* Belfast и этот же микроорганизм, полученный из жидкости, которой промывали область крайней плоти, не переживали замораживания при —79° и последующего оттаивания при использовании цитратно-желточного разбавителя, содержащего 10% глицерина, в условиях, применявшихся для замораживания бычьей спермы. Эти авторы установили также, что трихомонады, выделенные

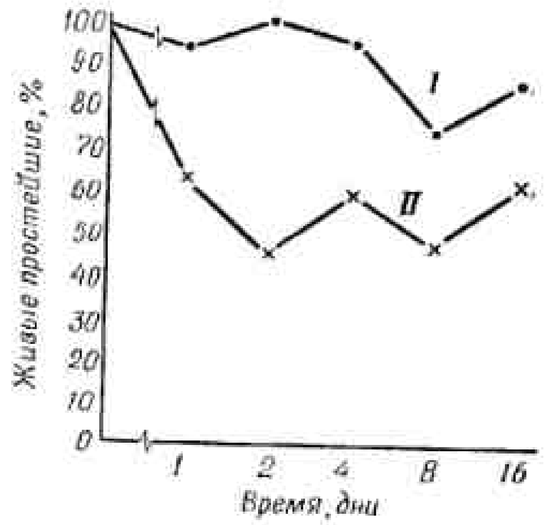
из промывной жидкости, были более чувствительны к замораживанию и оттаиванию, чем трихомонады этого штамма, полученные из культур. Было высказано предположение, что различные штаммы *T. foetus* обладают различной чувствительностью к замораживанию и оттаиванию. Степень токсичности 10-процентных растворов глицерина зависела от среды. Она увеличивалась в присутствии ионов цитрата и уменьшалась, когда разбавитель спермы содержал фосфатный буфер. Оптимальная концентрация глицерина для максимального восстановления жизнеспособности простейших после замораживания при —79° составляла 7,5%, а наилучшими разбавителями были яичный желток и фосфаты или же молоко и фосфаты.

Левин и сотрудники [99] нашли, что, хотя *T. foetus* и переносили медленное охлаждение до —20 или до —76° в среде ЦППМ в присутствии 1 *М* глицерина, дальнейшего хранения при этих температурах они не переживали. Когда в среде понижалась концентрация других компонентов (кроме глицерина), эти простейшие лучше переживали хранение при низких температурах. Полученные результаты совпадали с предположением Лавлока, согласно которому защитное действие глицерина выражается в том, что он предотвращает изменение концентрации солей во время вымерзания воды [104] (см. также гл. 3 и 12). Фицджералд и Левин [89] установили, что выживаемость была выше, когда трихомонад перед замораживанием уравновешивали с глицерином при температуре +24°, чем в опытах, в которых обработку глицерином производили при +4°. Когда среда ЦППМ была забуферена глицилглицином или триэтаноламином, микроорганизмы лучше переживали последующее замораживание в присутствии 1 *М* глицерина, чем в обычной среде ЦППМ. Вместе с тем применение фосфатного буфера Зёренсена подавляло рост трихомонад в среде ЦППМ и снижало их выживаемость после замораживания в присутствии глицерина [89]. Чувствительность *T. foetus* «О» к замораживанию зависела от фазы роста популяции, а также от состава среды. При замораживании при —21° в среде ЦППМ, содержащей вместо мальтозы глюкозу, в присутствии 1 *М* глицерина повреждения

клеток были сильнее в начальной и логарифмической фазах роста, чем при достижении максимума и в течение нескольких часов после него. Максимум наступал спустя 28 *час* после посева культуры. Эти простейшие переживали замораживание, только если возраст культуры был не менее 20,3 *час*. Оптимальный возраст культур перед замораживанием для хранения в замороженном состоянии в течение 24 *час* составлял 37,7 *час*, а для культур, хранившихся 7—15 дней,— 32,3 *час* [100].

Левин и сотрудники [104] изучали и другие факторы, которые могли влиять на защитные свойства глицерина в отношении *T. foetus* во время замораживания и хранения при низких температурах и последующем оттаивании. Повреждение клеток во время хранения при низких температурах могло быть обусловлено медленным, но все же непрекращавшимся обменом веществ. Его можно было подавить с помощью таких антиметаболитов, как малоновая кислота, фтористый натрий и иод-ацетат натрия. Однако при добавлении этих веществ в глицеринсодержащую среду лишь небольшое число простейших переживало хранение в замороженном состоянии. Следовательно, либо указанные антиметаболиты оказывали токсическое действие, когда их концентрация повышалась в результате вымораживания воды, либо продолжающийся при —21° обмен веществ не был причиной гибели микроорганизмов. Лецитин, один из важных компонентов среды, в которой замораживали сперматозоиды быка и барана, защищал *T. foetus* от повреждений во время инкубации при +37°, но не мог предотвратить постепенной гибели клеток при температуре —21° [104]. Соотношение концентраций хлористого натрия и глицерина в данной среде в большой степени предопределяло выживаемость простейших после замораживания при —21°. Когда глицерин, разбавленный дистиллированной водой, добавляли в среду ЦППМ с таким расчетом, чтобы его конечная концентрация была 1 *М*, число жизнеспособных *T. foetus*, восстановившихся при оттаивании через 24 *час*, достигало в среднем 96%. Если же глицерин разбавляли 0,85-процентным (0,15 *М*) раствором хлористого натрия, то выживало лишь 64% микроорганизмов (фиг. 19). При концентрации же хлористого нат-

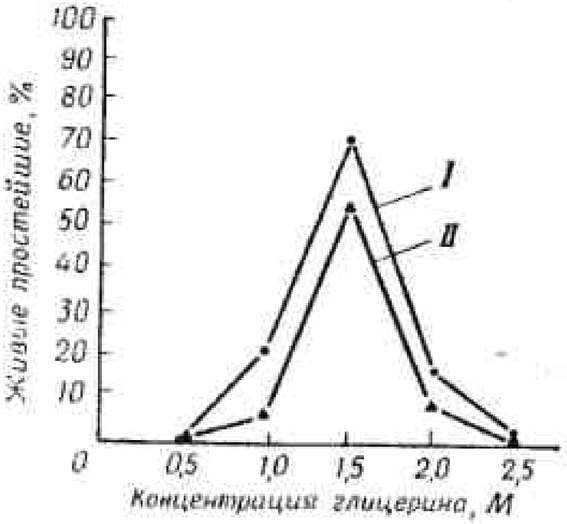
рия 0,20 *М* число жизнеспособных клеток было еще меньше. Оптимальная концентрация глицерина во всех солевых растворах составляла 1,5 *М* (фиг. 20).



Фиг. 19. Влияние концентрации хлористого натрия на выживание *Trichomonas foetus* после замораживания и хранения при температуре —21° в среде ЦППМ (цистеин, пептон, вытяжка печени, мальтоза) в присутствии 1 М глицерина [104].

I — глицерин разбавляли дистиллированной водой; *II* — глицерин разбавляли 0,85-процентным раствором NaCl.

Чувствительность *T. foetus* к повреждениям при замораживании в глицериносодержащей среде была наибольшей в начальных логарифмических фазах роста популяции. Устойчивость же была наибольшей во время



Фиг. 20. Влияние концентрации глицерина на выживание *Trichomonas foetus* после замораживания и хранения при —21° в среде ЦППМ [104].

Глицерин смешивали с хлористым натрием в удвоенной концентрации и добавляли к равному объему культуральной среды до замораживания: *I* — на 1-й день; *II* — на 16-й день.

максимального роста или после него, причем оптимальный возраст культуры для замораживания и продолжительного хранения при низких температурах составлял 32—37 *час* [101].

Влияние изменения концентрации солей на выживаемость обработанных глицерином замороженных трихомонад было сравнимо с тем, которое наблюдали в опытах на эритроцитах и сперматозоидах млекопитающих. Полученные результаты подтверждают положение, что буферное свойство глицерина, описанное Лавлоком [105], представляет собой один из важнейших факторов, действующих в биологических системах при температурах ниже точки замерзания (см. гл. 3 и 12). Различия в условиях, способствовавших выживанию замороженных клеток млекопитающих и замороженных трихомонад, возможно, отражают основные различия, существующие между отдельными типами клеток.

ТРИПАНОСОМЫ

Полдж и Солтис [118, 119] пересмотрели существующие методы хранения трипаносом в замороженном состоянии, чтобы выяснить, нельзя ли повысить их выживаемость путем либо изменения состава суспензионной смеси, либо добавления глицерина или другого нейтрального соединения к соответствующей среде, либо изменения скорости охлаждения. Предварительные опыты проводили на *Trypanosoma brucei* «О» в гепаринизированной крови, взятой у мыши на высоте инфекции. Пробы крови разбавляли 8 различными чистыми разбавителями и этими же разбавителями, но с добавлением 5, 10 или 20% глицерина. Готовили по три пробы трипаносом в каждом из 32 разбавителей (по 0,5 *мл*) и запечатывали их в обыкновенных пробирках. Первую пробу быстро замораживали путем погружения в смесь спирта и углекислоты с температурой —79°. Вторую замораживали в два приема, как рекомендуют Уэйнмэн и Мак-Аллистер [125], погружая пробирки на 2 *мин* в смесь с температурой —15° и затем перенося их в баню с температурой —79°. Третью пробу медленно охлаждали до —79° так же, как в опытах на сперматозоидах быка [117]. До температуры —20° скорость охлаждения составляла 2° в 1 *мин*, а затем (от —20 до —79°) она повышалась до 5° в 1 *мин*. После хранения пробирок в течение недели при —79° их оттаивали и исследовали содержимое под

микроскопом, чтобы выявить число погибших и живых микроорганизмов. Результаты исследования показали, что в растворе Альсевера большой процент трипаносом переживал быстрое замораживание при —79° в отсутствие глицерина, но в лошадиной сыворотке, растворе Рингера, цитрате натрия или в цитратно-желточной среде процент выживших организмов был ниже. Число микроорганизмов, у которых восстанавливалась подвижность после замораживания и оттаивания в отсутствие глицерина, уменьшалось при двухступенчатом охлаждении или при медленном охлаждении до —79°. И наоборот, в средах, содержащих глицерин, наблюдалось плохое восстановление подвижности при быстром охлаждении и значительно лучшее — при медленном. Независимо от наличия или отсутствия в среде сыворотки около 80% микроорганизмов переживало медленное охлаждение, когда в раствор Альсевера или Рингера добавляли 5—10% глицерина. Двухступенчатое охлаждение давало менее удовлетворительные результаты, а при повышении концентрации глицерина до 20% во всех средах наблюдалось дальнейшее уменьшение числа выживших клеток.

Пробы трех штаммов *T. brucei*, *T. rhodesiense* «B», *T. congolense* «V» и *T. gambiense* «H» — охлаждали до —79° в растворе Альсевера, содержащем сыворотку, и в той же самой среде с добавлением 10% глицерина. После двухмесячного хранения пробы оттаивали и вводили мышам. Вирулентность трипаносом не изменялась, судя по интервалу времени между прививкой и гибелью животных. После 8 месяцев хранения при —79° пробы *T. brucei* были так же вирулентны, как и те, которые не подвергались замораживанию. Результаты дальнейших опытов, суммированные в табл. 17, показали, что чем выше температура, тем короче период, в течение которого *T. brucei* переживали хранение в замороженном состоянии, особенно в среде, лишенной глицерина. Так, при отсутствии глицерина ни одна трипаносома не выжила после хранения в течение 3 дней при температуре —20°. Бóльшая часть микроорганизмов погибла на следующий день. Когда в смесь добавили 10% глицерина, 40% трипаносом пережило 3 дня и 10% — 7 дней при температуре —20°. Максимальная продолжительность периода, в течение которого трипаносомы переживали хранение при —40° в присутствии 5 или 10% глицерина, была 14 дней. При температуре —79° и при любой концентрации глицерина 80% микроорганизмов сохраняли подвижность после хранения в течение 250 дней. Не изменилась устойчивость различных штаммов *T. brucei* к лекарственным препаратам и антителам после 8 месяцев хранения при —79° в среде, содержащей 10% глицерина [118].

Практически проблема хранения живых трипаносом различных видов для дальнейшего экспериментирования была разрешена путем применения сред, содержащих 5 или 10% глицерина, медленного охлаждения до —79° и хранения при этой температуре. Полдж и Солтис [119] испытывали также действие других нейтральных веществ на активность трипаносом при нормальной температуре и после кратковременного охлаждения до низких температур. Ацетамид был токсичным при любой температуре, а метанол оказывал токсическое и летальное действие при температуре ниже —30°. Трипаносомы, взвешенные в 0,94-процентном растворе хлористого натрия, содержащем 10% сыворотки, теряли подвижность и погибали при добавлении 0,75% глюкозы, 10% ксилозы или 15% сахарозы (фиг. 21). Когда же их взвешивали в дистиллированной воде, содержащей 10% сыворотки и 7,5 или 10% сахаров, 90—100% микроорганизмов сохраняли высокую активность при комнатной температуре и после воздействия в течение 5 *мин* температуры —40° (фиг. 22). Процент выживших клеток резко падал, когда взвесь в растворе сахаров быстро замораживали при температуре ниже —40° (фиг. 22). В то же время 90% трипаносом, взвешенных в 10-процентном водном растворе лошадиной сыворотки, содержащем 10% глицерина, 7,5% ксилозы, 7,5% глюкозы или 10% сахарозы, переживали воздействие температуры —79°, если их предварительно замораживали на 2 *мин* при —20 или —30° (табл. 18).

Проведенные опыты особенно интересны в том отношении, что, как оказалось, трипаносомы лучше переносили сахара́ в отсутствие хлористого натрия и были более устойчивы к быстрому охлаждению, чем сперматозоиды быка. Губительное действие быстрого охлажде-

ТАБЛИЦА 17

Хранение *Trypanosoma brucei* «О» при различной температуре и разной концентрации глицерина в среде

Длительность хранения	Трипаносомы, сохранившие подвижность, %											
	−20°				−40°				−79°			
	концентрация глицерина											
	0%	5%	10%	20%	0%	5%	10%	20%	0%	5%	10%	20%
Сразу после замораживания	60	80	80	80	60	80	80	80	60	80	80	80
3 дня	0	10	40	30	20	60	80	60	—	—	—	—
7 дней	0	0	10	10	0	40	80	10	60	80	80	80
14 дней	0	0	1	0	0	10	10	1	—	—	—	—
28 дней	0	0	0	0	0	0	0	0	60	80	80	80
250 дней	0	0	0	0	0	0	0	0	60	80	80	80

ТАБЛИЦА 18

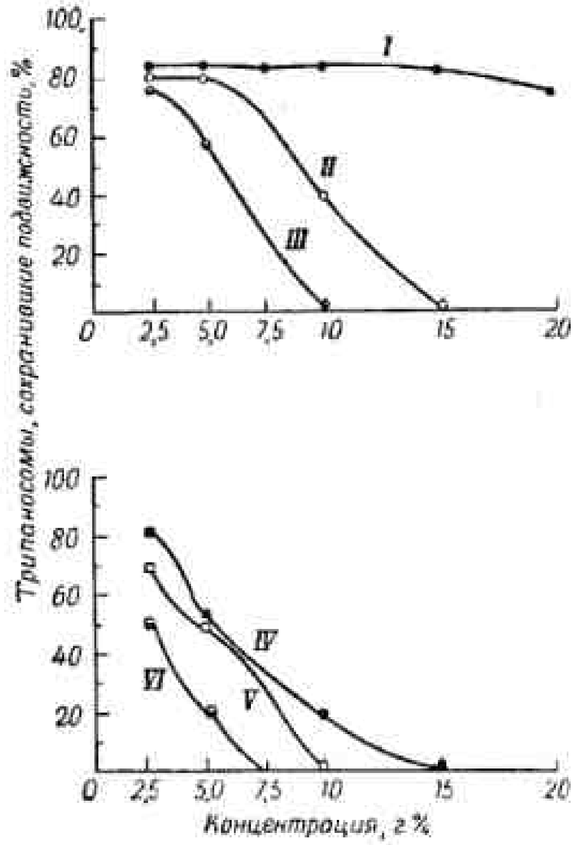
Выживаемость трипаносом при резком охлаждении до −79° после предварительного воздействия в течение 2 *мин* указанных температур [119]

Разбавитель	Живые трипаносомы, %							
	падение температуры							
	0°	−79°	−10°	−79°	−20°	−79°	−30°	−79°
Физиологический раствор-сыворотка	(100)	0	(100)	10	(80)	10	(40)	10
Метанол, 5-процентный раствор	(100)	0	(100)	0	(100)	0	(60)	0
Глицерин, 10-процентный раствор	(100)	0	(100)	10	(100)	90	(95)	90
Ксилоза, 7,5-процентный раствор	(100)	15	(100)	65	(100)	90	(95)	90
Глюкоза, 7,5-процентный раствор	(100)	10	(100)	60	(100)	90	(95)	90
Сахароза, 10-процентный раствор	(100)	5	(100)	60	(100)	90	(95)	90

ния до —79° в присутствии сахаров можно было предотвратить, проведя предварительно кратковременное охлаждение при температуре —20 или —30°. В настоящее время еще не ясен механизм защитного действия сахаров при данной методике охлаждения. В растворах не содержались электролиты, поэтому они не могли действовать в качестве буферных систем. В дальнейшем необходимо выяснить, можно ли осуществлять лиофилизацию трипаносом без потери ими жизнеспособности, приготовляя взвеси в среде, содержащей одно из тех соединений, которые предохраняют этих простейших от повреждений во время замораживания, и можно ли осуществлять высушивание при такой температуре, при которой повреждения во время возгонки льда в вакууме должны быть минимальными [119].

ДРУГИЕ ПРОСТЕЙШИЕ

Если при замораживании трипаносом можно было обойтись без глицерина, то при разработке методов хранения других патогенных простейших он несомненно принес большую пользу. Так, *Toxoplasma gondii* в отсутствие глицерина переносила хранение в замороженном состоянии только в течение нескольких минут [112], тогда как при содержании в среде 5% глицерина Эйлес и др. [88] всегда добивались положительных результатов при хранении *T. gondii* до 209 дней. Эти авторы установили, что большое влияние на выживаемость и вирулентность данного микроорганизма оказывала скорость охлаждения. Когда ампулы погружали непосредственно в баню с температурой —79° и их содержимое замерзало в течение 2 *мин*, достигая спустя 2,5 *мин* температуры —60°, простейшие полностью утрачивали вирулентность. При медленном же охлаждении в течение многих часов до —79° они сохраняли жизнеспособность, на что указывал короткий период жизни мышей после введения согретых проб. Вирулентность простейших почти не изменялась в период между 8-м и 209-м днями хранения при —70°. Число жизнеспособных организмов уменьшалось во время хранения проб при —20°, но вместе с тем они



Фиг. 21. Влияние на подвижность трипаносом различных нейтральных растворимых веществ, добавляемых в основной разбавитель —0,94-процентный раствор хлористого натрия, содержащий 10% лошадиной сыворотки [119].

I — глицерин; *II* — метанол; *III* — ацетамид; *IV* — сахароза; *V* — ксилоза; *VI* — глюкоза.

Фиг. 22. Выживание трипаносом после быстрого охлаждения на 5 *мин* непосредственно от 0° до указанной температуры [119].

I — в 0,94-процентном растворе хлористого натрия, содержащем 10% глицерина; *II* — в 0,94-процентном растворе хлористого натрия, содержащем 5% метанола; *III* — в физиологическом растворе, содержащем 10% лошадиной сыворотки, *IV* — в 10-процентном водном растворе лошадиной сыворотки, содержащем 7,5% ксилозы; *V* — в таком же растворе, содержащем 7,5% глюкозы; *VI* — в таком же растворе, содержащем 10% сахарозы.

оставались вирулентными в течение 128 дней. Примечательно, что даже 5% глицерина оказалось достаточно для выживания замороженных клеток, причем физиологический раствор был лучшей средой для глицерина, чем дистиллированная вода. Описанный метод, использованный в опытах по консервации 5 различных штаммов *T. gondii,* позволяет сохранять их в чистом виде в течение долгого времени, не требуя повторных перевивок животным, связанных с опасностью возникновения каких-либо изменений [88].

ХРАНЕНИЕ ПРОСТЕЙШИХ В ВЫСУШЕННОМ СОСТОЯНИИ

Применение глицерина и охлаждения до низких температур значительно облегчило хранение некоторых видов патогенных простейших. Нет никаких оснований полагать, что этот метод уже полностью исчерпал себя. И тем не менее, возможно, он в будущем уступит место методу консервации в высушенном состоянии. Если выживание зависит от лиофилизации путем возгонки льда в вакууме, то чрезвычайно важно выявить оптимальные среды, скорость охлаждения и наименее опасную температуру для удаления льда. Возможно, однако, что некоторые простейшие могут пережить высушивание и при комнатной температуре. Энниру [78] удалось сохранить жгутиковых *Strigomonas oncopelti,* высушивая их в вакууме при температуре выше нуля. Он готовил взвесь этих простейших в 20-процентном растворе глюкозы и переносил их на пептоновые пробки. Во время удаления воздуха материал «вспенивался», и именно в таком состоянии происходило высушивание организмов. Их сохраняли в течение 12 месяцев при +4° или при комнатной температуре. После увлажнения и посева на культуру наблюдался пышный рост жгутиковых. Изучение оптимальных условий хранения простейших в высушенном состоянии может пролить свет на проблему консервации таким же путем и клеток млекопитающих.

ЛИТЕРАТУРА

Бактерии

1. Annear D. I., Observations on drying bacteria from the frozen and from the liquid state, Aust. J. exp. Biol. med. Sci., **36**, 211—222 (1958).
2. Belehrádek J., Temperature and Living Matter, Protoplasma-Monographien, No. 8, Berlin, Borntraeger, 1935.
3. Brown H. T., Escombe F., Note on the influence of very low temperatures on the germinative power of seeds, Proc. Roy. Soc., **62**, 160—165 (1897).
4. Engley F. B., The persistence (survival) of micro-organisms. II. In the body and body materials, Tex. Rep. Biol. Med., **14**, 10—64 (1956).
5. Engley F. B., The persistence (survival) of micro-organisms. III. In culture media, Tex. Rep. Biol. Med., **14**, 114—203 (1956).
6. Engley F. B., The persistence (survival) of micro-organisms. IV. In food, Tex. Rep. Biol. Med., **14**, 313—361 (1956).
7. Fox M. S., Hotchkiss R. D., Initiation of bacterial transformation, Nature, Lond., **179**, 1322—1325 (1957).
8. Fry R. M., The preservation of bacteria. Biological Applications of Freezing and Drying, Chap. 10, ed. Harris, R. J. C., New York, Academic Press, 1954. (Р. Фрай, Консервирование бактерий. См. «Применение замораживания — высушивания в биологии», под ред. Р. Харриса, стр. 292—345. ИЛ, М., 1956.)
9. Glover R. E., The effects of (a) freeze-drying (b) low temperature on the viability of *Mycobacterium tuberculosis*, J. Path. Bact., **58**, 111—114 (1946).
10. Greaves R. I. N., Some factors which influence the stability of freeze-dried cultures. Recent Research in Freezing and Drying, ed. Parkes A. S. and Smith A. U., pp. 203—215, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1960.
11. Haines R. B., The minimum temperatures of growth of some bacteria, J. Hyg. Cambridge, **34**, 277—282 (1934).
12. Haines R. B., The effect of freezing on bacteria, Proc. Roy. Soc. B., **124**, 451—463 (1937—1938).
13. Hampil B., The influence of temperature on the life processes and death of bacteria, Quart. Rev. Biol., **7**, 172—196 (1932).
14. Harrison A. P. Jr., Survival of bacteria upon repeated freezing and thawing. J. Bact., **70**, 711—715 (1955).

15. Harrison A. P. Jr., Causes of death of bacteria in frozen supensions, Leeuwenhoek ned. Tijdschr., **22**, 407—418 (1956).
16. Harrison A. P. Jr., Cerroni R. E., Fallacy of crushing death in frozen bacterial supensions, Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., **91**, 577—579 (1956).
17. Hartsell S. E., The longevity and behaviour of pathogenic bacteria in frozen foods: the influence of plating media, Amer. J. publ. Hlth., **41**, 1072—1077 (1951).
18. Hegarty C. P., Weeks O. B., Sensitivity of *Escherichia coli* to cold-shock during the logarithmic growth phase, J. Bact., **39**, 475—484 (1940).
19. Hilliard C. M., Davis M. A., The germicidal action of freezing temperatures upon bacteria, J. Bact., **3**, 423—431 (1918).
20. Hollander D. H., Nell E. E., Improved preservation of *Treponema pallidum* and other bacteria by freezing with glycerol, Appl. Microbiol., **2**, 164—170 (1954).
21. Howard D. H., The preservation of bacteria by freezing in glycerol broth, J. Bact., **71**, 625 (1956).
22. Keith S. C. Jr., Factors influencing the survival of bacteria at temperatures in the freezing point of water, Science, **37**, 877—879 (1913).
23. Kyes P., Potter T. S., The resistance of avian *Tubercle bacilli* to low temperatures with especial reference to multiple changes in temperature, J. infect. Dis., **64**, 123—124 (1939).
24. Lovelock J. E., The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing. Biochim. biophys. Acta, **10**, 414—426 (1953).
25. Lovelock J. E., The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing, Biochim. biophys. Acta, **11**, 28—36 (1953).
26. Luyet B. J., Cehenio P. M., Life and Death at Low Temperatures, Normandy, Missouri, Biodynamica, 1940.
27. Macfadyen A., On the influence of the temperature of liquid air on bacteria, Proc. Roy. Soc., B, **66**, 180—182 (1900).
28. Macfadyen A., Rowland S., Further note on the influence of the temperature of liquid air on bacteria, Proc. Roy. Soc., B, **66**, 339—340 (1900).
29. Macfadyen A., Rowland S., Influence of the temperature of liquid hydrogen on bacteria, Proc. Roy. Soc., B, **66**, 488—489 (1900).

30. Major C. P., McDougal J. D., Harrison A. P. Jr., The effect of the initial cell concentration upon survival of bacteria at —22° C, J. Bact., **69**, 244—249 (1955).
31. Mazur P., The effects of subzero temperatures on micro-organisms, pp. 65—77 in Recent Research in Freezing and Drying, ed. Parkes A. S. and Smith A. U., Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1960.
32. Mazur P., Rhian M. A., Mahlandt B. G., Survival of *Pasteurella tularensis* in gelatin saline after cooling and warming at subzero temperatures, Arch. Biochim. Biophys., **71**, 31—51 (1957).
33. Mazur P., Rhian M. A., Mahlandt B. G., Survival of *Pasteurella tularensis* in sugar solutions after cooling and rewarming at sub-zero temperatures, J. Bact., **73**, 394—397 (1957).
34. Muggleton P. W., Freeze-drying of bacteria with special reference to B. C. G., Recent Research in Freezing and Drying. ed. Parkes A. S. and Smith A. U., pp. 229—237. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1960.
35. Pictet R., Communications without title, Arch. Sci. phys. nat., **11**, 320 (1884).
36. Pictet R., Yung E., De l'action du froid sur les microbes, C. R. Acad. Sci., Paris, **98**, 747—749 (1884).
37. Plastridge W. N., Stula E. F., Survival of *Vibrio fetus* in frozen semen, A. I. Digest, **6**, 7—9 (1958).
38. Proom H., Hemmons L. M., The drying and preservation of bacterial cultures, J. gen. Microbiol., **3**, 7—18 (1949).
39. Reeves H. C., Harrison A. P., Jr., Effect of time and temperature upon survival of *Escherichia coli* sodium chloride, Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., **95**, 278—282 (1957).
40. Rivers T. M., Effect of repeated freezing (—185° C) and thawing on *Colon bacilli*, Virus III, vaccin virus, bacteriophage complement and trypsin, J. exp. Med., **45**, 11—21 (1927).
41. Sanderson E. S., Effect of freezing and thawing on the bacteriophage, Science, **62**, 377 (1925).
42. Scott W. J., A mechanism causing death during storage of dried micro-organisms, Recent Research in Freezing and Drying. ed. Parkes A. S. and Smith A. U., pp. 188—202, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1960.
43. Sherman J. M., Cameron G. M., Lethal environmental

factors within the natural range of growth, J. Bact., 27, 341—348 (1934).
44. Smart H. F., Growth and survival of micro-organisms at sub-freezing temperatures, Science, 82, 525 (1935).
45. Smith A. U., Effects of low temperature on living cells and tissues, Biological Applications of Freezing and Drying, Chap. i. ed. Harris R. J. C., New York, Academic Press, 1954. (О. Смит, Влияние низких температур на живые клетки и ткани. См. «Применение замораживания — высушивания в биологии», под ред. Р. Харриса, стр. 9—90, ИЛ, М., 1956.)
46. Tanner F. W., Williamson B. W., The effects of freezing on yeasts, Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., 25, 377—381 (1928).
47. Turner T. B., The preservation of virulent *Treponema pallidum* and *Treponema pertenue* in the frozen state; with a note on the preservation of filtrable viruses, J. Exp. Med., 67, 61—78 (1938).
48. Turner T. B., Brayton N. L., Factors influencing the survival of Spirochetes in the frozen state, J. exp. Med., 70, 639—650 (1939).
49. Weiser R. S., Hargiss C. O., Studies on the death of bacteria at low temperatures. II. The comparative effects of crystallization, vitro-melting and devitrification on the mortality of *Escherichia coli*, J. Bact., 52, 71—79 (1946).
50. Weiser R. S., Osterud C. M., Studies on the death of bacteria at low temperatures. I. The influence of the intensity of the freezing temperature, repeated fluctuations of temperature, and the period of exposure to freezing temperatures on the mortality of *Escherichia coli*, J. Bact., 50, 413—439 (1945).
51. Wood T. H., Lethal effects of high and low temperatures on unicellular organisms, Advanc. biol. med. Phys., 4, 119—165. (1956).

Дрожжи

52. Atkin L., Moses W., Gray P. P., The preservation of yeast cultures by lyophilization, J. Bact., 57, 575—578 (1949).
53. Baum H. M., The resistance to low temperatures of a culture of *S. cerevisiae* grown from a single cell, Biodynamica, 4, 71—74 (1943).
54. Brady B. L., Some observations on the freeze-drying of yeasts, Recent Research in Freezing and Drying. ed. Parkes A. S. and Smith A. U., pp. 243—247, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1960.
55. Campbell J. D., Resistance of yeast to low temperatures, Biodynamica, 4, 65—70 (1943).
56. Emmons C. W., Rowley D. A., Isolation of *Histoplasma capsulatum* from fresh and deep frozen peri-bronchial lymph nodes of dogs by mouse inoculation, J. Lab. clin. Med. 45, 303—307 (1955).
57. Henry B. S., The viability of yeast cultures preserved under mineral oil, J. Bact., 54, 264 (1947).
58. Mazur P., Studies on the effects of sub-zero temperatures on the viability of spores of *Aspergillus flavus*. I. The effect of rate of warming, J. gen. Physiol, 39, 869—888 (1956).
59. Mazur P., Weston W. H., The effects of spray-drying on the viability of fungous spores, J. Bact., 71, 257—266 (1956).
60. Meryman H. T., Platt W. T., The distribution and growth of ice crystals in frozen mammalian tissue, Res. Rep. nav. med. Res. Inst., Maryland, 13, 1—30 (1955).
61. Mrak E. M., Phaff H. J., Yeasts, Ann. Rev. Microbiol., 2, 1—46 (1948).
62. Nei T., Freezing process of yeast cells, Part I, J. agric. chem. Soc. Japan, 28, 91—94 (1954).
63. Nei T., Effects of freezing and freeze-drying on micro-organisms, pp. 78—86, in Recent Research in Freezing and Drying, ed. Parkes A. S., Smith A. U., Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1960.
64. Nei T., Ogawa T., Kanehira A., Akimoto H., Effects of low temperature on the functions of yeast cells, I. agric. chem. Soc. Japan, 28, 94—98 (1954).
65. Pictet R., Yung E., De l'action du froid sur les microbes, C. R. Acad. Sci., Paris, 98, 747—749 (1884).
66. Polge C., Lovelock J. E., Preservation of bull semen at —79°, Vet. Rec., 64, 396—397 (1952).
67. Phodes M., Preservation of yeast and fungi by desiccation, Trans. Brit. mycol. Soc., 33, 35—39 (1950).
68. Smart H. F., Growth and survival of micro-organisms at sub-freezing temperatures, Science, 82, 525 (1935).
69. Smith A. U., Unpublished results, 1951.
70. Smith A. U., Polge C., Storage of bull spermatozoa at low temperatures, Vet. Rec., 62, 115—116 (1950).

71. Tanner F. W., Williamson B. W., The effects of freezing on yeasts, Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., 25, 377—381 (1928).
72. Wickerham L. J., Flickinger M. H., Viability of yeasts preserved two years by the lyophil process, Brew. Dig., 21, 55 (1946).
73. Wood T. H., Influence of temperature and phase state on X-ray sensitivity of yeast, Arch. Biochem., 52, 157—174 (1954).
74. Wood T. H., Lethal effects of high and low temperatures on unicellular organisms, Advances in Biological and Medical Physics, 4, 119—165, Acad. Press Inc., N. Y. (1956).
75. Wood T. H., Austin A. L., X-ray inactivation of yeast at freezing temperatures, Radiat. Res., 7, 99—106 (1957).
76. Wood T. H., Rosenberg A. M., Freezing in yeast cells. Biochim. biophys. Acta, 25, 78—87 (1957).
77. Wood T. H., Taylor A. L., X-ray inactivation of yeast at freezing temperatures Radiat. Res., 7, 99—106 (1957).

Простейшие

78. Annear D. I., Preservation of *Strigomonas oncopelti* in the dried state, Nature, Lond., 178, 413 (1956).
79. Archetti I., Conservazioni di *P. gallinaceum* a bassa temperatura, Riv. Parassit., 5, 247—249 (1941).
80. Barthel H., Kurzbericht über die Erfahrungen in der künstlichen Besamung bei Anwendung von Tiefkühlsamen, Tierärztl Umsch., 9, 403—404 (1954).
81. Becquerel P., La vie latente de quelques Algues at Animaux inférieurs aux basses températures et la conservation de la vie dans l'univers, S. R. Acad. Sci., Paris, 202, 978—981 (1936).
82. Becquerel P., La suspension de la vie au confins du zéro absolu entre 0,0075° K et 0,0047° K. Role de la synérèse reversible cytonucléoplasmique, Proc. VIIIth Intern. congr. Refug., pp. 326—329, 1951.
83. Blackshaw A. W., Beattie H. E. R., The preservation of *Trichomonas foetus* at —79° C, Aust. vet. J., 31, 214—216 (1955).
84. Chambers R., Hale H. P., The formation of ice in protoplasm, Proc. Roy. Soc., B, 110, 336—352 (1932).
85. Coggeshall L. T., Preservation of viable malaria parasites in the frozen state, Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., 42, 499—501 (1939).

86. De Jong D. A., Micro-organismes et basses températures, Arch. Néerland. Physiol., 7, 588—591 (1922).
87. Dobell C., Antony van Leeuwenhoek and His "Little Animals", London, John Bale Sons and Danielson, 1932.
88. Eyles D. E., Coleman N., Cavanaugh D. J., Preservation of *Toxoplasma gondii* by freezing, J. Parasit., 42, 408—413 (1956).
89. Fitzgerald P. R., Levine N. D., The effects of storage temperature and other factors on survival of *T. foetus* at freezing temperatures, J. Protozoo., 4, Suppl. p. 5 (1957).
90. Fulton J. D., Smith A. U., Preservation of *Entamoeba histolytica* at —79° C in the presence of glycerol, Ann. trop. Med. Parasit., 47, 240—246 (1953).
91. Gaylord H. R., The resistance of embryonic epithelium, transplantable mouse cancer, and certain organism to freezing with liquid air, J. infect. Dis., 5, 443—448 (1908).
92. Gehenio P. M., Luyet B. J., The survival of *Myxamoebae* after freezing in liquid nitrogen, Biodynamica, 7, 175—180 (1953).
93. Joyner L. P., The elimination of *Trichomonas foetus* from infected semen by storage in the presence of glycerol, Vet. Rec., 66, 727—730 (1954).
94. Joyner L. P., Bennett G. H., Observations on the viability of *Trichomonas foetus* during the process of freezing to —79° C and thawing in presence of glycerol, J. Hyg. Cambridge, 54, 335—341 (1956).
95. Kühne W., Untersuchungen über das Protoplasma und die Contractilität, Leipzig, W. Engelmann, 1864.
96. Laveran A., Mesnil F., Trypanosomes et Trypanosomiases, Paris, Masson et Cie, 1904.
97. Leidl W., Mahrla A., Das Verhalten von *Trichomonas foetus* und *Vibrio foetus* bei der Tiefkühlung, Fortpft. Zuchthyg Haustierbes., 4, 101—102 (1954).
98. Levaditi J. C., Possibilité de conserver *Tr. congolense* et *Pl. berghei* à —70° C, C. R. Soc. Biol., Paris, 146, 179—181 (1952).
99. Levine N. D., Houlahan D. A., Mizell M., Factors affecting the protective action of glycerol on *Trichomonas foetus* at freezing temperatures, J. Protozool., 2, Suppl. p. 4 (1955).
100. Levine N. D., McCaul W. E., Mizell M., The survival of *Trichomonas foetus* upon freezing in presence of glycerol at

different phases of the population growth curve, J. Protozol., **4**, Suppl. p. 5 (1957).
101. Levine N. D., McCaul W. E., Mizell M., The relation of the stage of the population growth curve to the survival of *Trichomonas foetus* upon freezing in the presence of glycerol, J. Parasit., **6**, 116—120 (1959).
102. Levine N. D., Marquardt W. C., The effect of glycerol on survival of *Trichomonas foetus* at freezing temperatures, J. Protozool., **1**, Suppl. p. 4 (1954).
103. Levine N. D., Marquardt W. C., The effect of glycerol and related compounds on survival of *Trichomonas foetus* at freezing temperatures, J. Protozool., **2**, 100—107 (1955).
104. Levine N. D., Mizell M., Houlahan D. A., Factors affecting the protective action of glyceron on *Trichomonas foetus* at freezing temperatures, Exp. Parasit., **7**, 236—248 (1958).
105. Lovelock J. E., The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing, Biochim. biophys. Acta, **11**, 28—36 (1953).
106. Luyet B. J., Gehenio P. M., Life and Death at Low Temperatures, Normandy, Missouri, Biodynamica, 1940.
107. McEntegart M. G., The maintenance of stock strain of Trichomonads by freezing, J. Hyg., Cambridge, **52**, 545—550 (1954).
108. McEntegart M. G., Serological comparison of a strain of *Trichomonas vaginalis* with the Belfast and Manley strains of *Trichomonas foetus*, J. Path. Bact., **71**, 111—115 (1956).
109. McEntegart M. G., Prolonged survival of *Trichomonas vaginalis* at —79° C, Nature, Long., **183**, 270—271 (1959).
110. McWade D. H., Williams J. A., The recovery of *T. foetus* after freezing to —79° C in prepared milk semen extender, Quart. Bull. Mich. agric. Exp. Sta., **37**, 248—251 (1954).
111. Manwell R. D., The low temperature freezing of malaria parasites, Amer, J. trop. Med., **23**, 123—131 (1943).
112. Manwell R. D., Coulston F., Binckley E. C., Jones V. P., Mammalian and avian Toxoplasma, J. infect. Dis., **76**, 1—14 (1945).
113. Manwell R. D., Edgett R., The relative importance of certain factors in the low temperature preservation of malaria parasites, Amer, J. trop. Med., **23**, 551—557 (1943).
114. Manwell R. D., Jeffery G., Preservation of avian malaria parasites by low temperature freezing, Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., **50**, 222—224 (1942).
115. Mazur P., The effects of subzero temperatures on micro-organisms, Recent Research in Freezing and Drying ed. Parkes A. S. and Smith A. U., pp. 87—100, Oxford, Blackwell Scientific Publications (1960).
116. Molisch H., Intersuchungen über das Erfrieren der Pflanzen, Jena, 1897, See Luyet B. J., and Gehenio P. M., Life and Death at Low Temperatures, Normandy, Missouri, Biodynamica, 1940.
117. Polge C., Rowson L. E. A., Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at —79° C, Nature, Lond., **169**, 626—627 (1952).
118. Polge C., Soltys M. A., Preservation of Trypanosomes jn the frozen state, Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg., **51**, 519—526 (1957).
119. Polge C., Soltys M. A., Protective action of some neutral solutes during the freezing of bull spermatozoa and Trypanosomes, Recent Research in Freezing and Drying, ed. Parkes A. S. and Smith A. U., pp. 87—100, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1960.
120. Saunders G. M., Scott V., Preservation of *Plasmodium vivax* by freezing, Science, **106**, 300—301 (1947).
121. Scharf J. E., Survival of an amoebo-flagellate after freezing, Biodynamica, **7**, 225—228 (1954).
122. Smith A. U., Polge C., Smiles J., Microscopic observation of living cells during freezing and thawing, J. R. micr. Soc., **71**, 186—195 (1951).
123. Spallanzani L., Opuscules de Physique Animale et Vegetale, Vol. I, Trans J. Senebier, Paris, Pierre Duplain, 1787.
124. Taylor C. V., Strickland A. G. R., Effects of high vacua and extreme temperatures on cysts of *Colpoda cucullus*, Physiol. Zool., **9**, 15—26 (1936).
125. Weinman D., McAllister J., Prolonged storage of human pathogenic protozoa with conservation of virulence: observations on the storage of helmints and leptospiras, Amer. J. Hyg., **45**, 102—121 (1947).
126. Wolfson C., Observations on *Paramecium* during exposure to subzero temperatures, Ecology, **16**, 630—639 (1935).
127. Wolfson F., Effect of preservation by freezing upon the virulence of *Plasmodium* for ducks, Amer. J. Hyg., **42**, 155—166 (1945).

Глава 5

ЯЙЦА, ЭМБРИОНЫ И ТКАНЕВЫЕ КУЛЬТУРЫ

Действие низких температур на яйца

РАННИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

В 1709 г. зима в Европе была исключительно суровой и погибло много животных и растений. Тем не менее с наступлением весны насекомые вылупились из яиц в положенное время, как и после мягкой теплой зимы. Это явление поразило Бургаве, зарегистрировавшего температуру 14° ниже точки замерзания. Несколько лет спустя Спалланцани, приготовив смесь льда с каменной солью, получил температуру —17° (вероятно, по Реомюру, что соответствует —21° С). После добавления 70-процентной азотной кислоты температура смеси понижалась до —24° (вероятно, —30° С). Спалланцани помещал яйца некоторых насекомых, в том числе шелковичных червей, в стеклянные сосуды и погружал последние на несколько часов в замораживающие смеси. На следующую весну из этих яиц насекомые вылупились так же быстро, как и из незамороженных, но вылупившиеся насекомые не переносили температуры 7—8° ниже нуля. Пытаясь найти причину такого различия, Спалланцани отметил, что взрослые насекомые при низких температурах промерзали насквозь, тогда как содержимое яиц оставалось в жидком состоянии. По его мнению, яйца не замерзали вследствие наличия в них маслянистого вещества и эмбрионы переживали воздействие холода именно благодаря тому, что яйца не замерзали [30].

В XIX в. и в начале XX в. появилось много сообщений о том, что яйца некоторых пойкилотермных животных,

в том числе муравьев, плодовых мух и клопов, погибают при температуре выше нуля. В некоторых опытах яйца амфибий и птиц прекрасно переносили низкие температуры, но температуру внутри яиц при этом не измеряли и эмбрионы не всегда замерзали [17].

Некоторую ясность в вопрос о выживаемости куриных яиц после воздействия низких температур внесли работы Морана [19]. Он установил, что точка замерзания желтка равна —0,65°, а белка —0,45°, но в целом яйцо можно переохладить и хранить длительное время до 7 дней в незамороженном состоянии при —11°. Температура внутри яйца снижалась медленнее, чем в окружающей среде, и достигала —2,9° лишь через 24 *час*, а —4,6° через 30 *час* при такой же температуре в помещении. Из частично замороженных яиц, внутренняя температура которых держалась на уровне —2,9° в течение 118 *час* и на уровне —4,6° в течение 47 *час*, а также из яиц, переохлажденных до —11°, получали живых эмбрионов (табл. 19).

ТАБЛИЦА 19

Хранение яиц при различной температуре [19]

Помещение, в котором хранили яйца	Средняя температура помещения, °С	Предельная продолжительность хранения	Действительная продолжительность хранения
А	—4,6	77 *час*	47 *час*
Б	—2,9	142 *час*	118 *час*
В	+0,7	237 *час*	225 *час*
Г	+10,4	34 *дня*	34 *дня*
Д	+16,2	25 *дней*	25 *дней*

Когда содержимое яйца замерзало при температуре —6°, эмбрион тотчас же погибал и липовителлин желтка денатурировался. Яйца, хранившиеся при температуре чуть выше нуля, сравнительно быстро утрачивали способность к дальнейшему развитию. Это показывает, что образование льда было лишь одним из факторов, вредно влияющих на раннее развитие эмбрионов птиц при субнормаль-

ной температуре. Оптимальная температура хранения лежала в пределах от +8 и до +10°, судя по числу яиц, из которых после инкубации вылупились цыплята [19].

СОВРЕМЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Действие холода на яйца млекопитающих стали исследовать позже из-за методических трудностей, связанных с получением самих яиц и проверкой их жизнеспособности. Хип [13] в 1890 г. впервые успешно перенес оплодотворенные яйца от одного животного к другому. Он взял из половых путей одной крольчихи яйца на стадии 4 клеток и ввел их в половые пути другой крольчихи, где они развивались до тех пор, пока в положенный срок не наступили роды. Родившиеся два нормальных крольчонка были выращены своей «приемной матерью» [18]. Прошло семь лет, прежде чем Хипу удалось повторить свой результат, а спустя еще 40 лет этот результат был подтвержден рядом авторов [11, 12, 20]. С тех пор яйца из половых путей одной самки в половые пути другой пересаживали не только у кроликов, но также у крыс, мышей, коров и овец [10, 15, 21, 34]. В некоторых опытах использовали неоплодотворенные яйца, взятые из фолликулов яичника или из фаллопиевых труб у животных, у которых вызывали овуляцию, вводя в соответствующем количестве гипофизарные вытяжки, содержащие гонадотропные гормоны. Эти яйца были оплодотворены после трансплантации в результате спаривания реципиента. В других опытах яйца еще до взятия их у донора были оплодотворены и начали делиться. Оплодотворенные яйца обычно вводят животному того же вида, что и донор. Однако проводили опыты с имплантацией яиц овцы в яйцеводы крольчихи, где они нормально дробились в течение нескольких дней [4]. Во всех этих опытах яйца имплантировали в половые пути реципиента после кратковременного охлаждения их in vitro до низких температур.

Проблема хранения неоплодотворенных яиц млекопитающих in vitro осложняется тем, что они в течение лишь короткого периода времени сохраняют способность оплодотворяться [3, 11]. У некоторых видов быстро наступает партеногенетическое развитие яиц [27]: 65% неоплодотворенных яиц кролика, взятых из фаллопиевых труб, при культивировании in vitro дробятся и внешне не отличаются от оплодотворенных [20]. Однако они развиваются партеногенетически лишь до стадии морулы и, будучи введенными в половой тракт реципиента, не вызывают беременности. Неоплодотворенные яйца кроликов, крыс и овец, взятые из фаллопиевых труб, при охлаждении особенно подвержены активации. Тибо [31—33] показал, что даже незначительное снижение температуры (на 4°) может активировать часть яиц и лишить их способности к оплодотворению, даже если единственное заметное морфологическое изменение заключается в выделении полярного тельца или перемещении ядерного веретена на ранней стадии вторичного дробления. Неоплодотворенные яйца крысы или кролика, не подвергшиеся активации, вскоре после овуляции, если их оставляют in situ, претерпевают выраженную дегенеративную фрагментацию. Когда неоплодотворенные яйца кролика, хранившиеся in vitro в течение 6—30 *час* при 0 или +10°, вводили реципиентам, которых затем спаривали, число нормально развивающихся яиц снижалось до 3—11% [9]. Все приведенные факты показывают трудности, связанные с хранением in vitro неоплодотворенных яиц млекопитающих, поскольку малейшие изменения в них отражаются на последующем оплодотворении и нормальном развитии [2, 8, 27].

Яйца некоторых видов млекопитающих после оплодотворения становятся более устойчивыми. Если их выдерживать в соответствующей среде с нормальной температурой тела, они продолжают дробиться до стадии многоклеточной морулы. При понижении температуры дробление прекращается. Оптимальная температура хранения in vitro оплодотворенных яиц кролика, находящихся на стадии 2 клеток, была 10°, судя по проценту нормально развивающихся яйцеклеток, культивированных при температуре +37° (табл. 20). К сожалению, яйца, которые, по-видимому, нормально дробились в культурах, не всегда продолжали развиваться при трансплантации их другим кроликам [5, 20]. Дальнейшие исследования показали, что свежеоплодотворенные яйца лучше развива-

ТАБЛИЦА 20

Жизнеспособность оплодотворенных яиц кролика, культивированных при +37° после хранения при более низких температурах [5]

Продолжительность хранения, *час*	Температура хранения, °С	Нормально дробящиеся яйца, %	Продолжительность хранения, *час*	Температура хранения, °С	Нормально дробящиеся яйца, %
24	0	63,4	120	0	0
	5	78,3		5	6,3
	10	82,2		10	36,5
	15	85,5		15	0
	25	37,2	144	10	23,6
72	0	48,1	168	10	0
	5	54,2			
	10	58,8			
	15	43,1			
	25	0			

лись in vivo, чем более старые, независимо от способа их трансплантации — свежими, после культивирования при +38° или после хранения в условиях низких температур [6, 7]. Например, когда яйца брали спустя 25 и 96 *час* после оплодотворения и перед трансплантацией их в половые пути самок-реципиентов хранили в течение 24 *час* при температуре +10°, в первом случае нормально развивалось 37%, а во втором — только 19%. Оптимальная температура хранения оплодотворенных яиц, которые затем имплантировали, составляла +10°. При трансплантации в фаллопиевы трубы после хранения в течение четырех дней при температуре +10° нормальное развитие наблюдалось только у 15% яиц. При хранении более 7 дней при +10° не было ни одного случая выживания или нормального развития яиц, имплантированных в матку [6, 7]. Оплодотворенные яйца не переживали быстрого или медленного замораживания при —65°, будучи взвешенными в лошадиной сыворотке или в сыворотке, содержащей 0,5—1% фруктозы [7]. Как оплодотворенные, так и неоплодотворенные яйцеклетки кролика не

дробились in vitro после охлаждения до —76° в обычной среде [26].

Положительные результаты осеменения млекопитающих и птиц сперматозоидами, хранившимися при низких температурах в средах, содержащих глицерин (см. гл. 2), вызвали дальнейшие поиски эффективных способов продолжительного хранения яиц млекопитающих в замороженном состоянии. Когда свежеоплодотворенные одноклеточные яйца кролика помещали в сыворотку, содержащую 15% глицерина, при температуре +20°, они сморщивались (фото 11, *А* и *Б*) и больше не расправлялись независимо от того, оставляли ли их в 15-процентном растворе глицерина при комнатной температуре, в холодильнике с температурой +5° или в инкубаторе с температурой +38°. Не восстанавливались они также и в тех случаях, когда их перемещали в среду, лишенную глицерина. Следовательно, можно предполагать, что глицерин не проникал в клетки и они обезвоживались благодаря гипертоничности среды [28, 29]. Когда при температуре +37° концентрацию глицерина в сыворотке постепенно повышали и оплодотворенные яйца последовательно подвергали воздействию различных концентраций глицерина (2,5, 3,75, 5, 7,5, 10 и, наконец, 15%), яйца слегка сжимались, а затем на каждом этапе вновь расширялись (фото 11, *В*). После постепенного удаления глицерина при +37° некоторые яйца разделялись в присутствии 3,75 и 2,5% глицерина, а остальные, помещенные в сыворотку, дробились и продолжали развиваться в течение дальнейших 24—48 *час*, пока не образовались морулы [28]. Следовательно, кратковременное воздействие высоких концентраций глицерина не обязательно повреждало оплодотворенные яйца. Однако они отличались от сперматозоидов млекопитающих тем, что лучше переносили добавление глицерина при температуре тела, чем при более низкой температуре.

Оплодотворенные яйца кроликов, обработанные глицерином при +37°, охлаждали и хранили при разной температуре в течение различных периодов времени. Затем их согревали до +37° и перед посевом постепенно удаляли глицерин. В некоторых пробирках, содержащих яйца, взвешенные в сыворотке с примесью 15% глице-

рина, среду переохлаждали до —15°. Через 1 *час* обнаружили 75% жизнеспособных яиц, спустя день — 67%, а через 3 дня — 69% яиц. Через 4 дня при температуре —15° все оставшиеся пробы кристаллизовались и только 10% яиц начинали дробиться после оттаивания, удаления глицерина и посева. В пробирках с непереохлажденной средой выживало 10—30% яиц после замораживания на 1 *час* при температуре —17 и —20°. Полученные результаты показали, что состояние переохлаждения было недостаточно устойчивым для продолжительного хранения яиц в условиях низких температур. Несмотря на присутствие глицерина, яйца не переживали хранения в замороженном состоянии в обычной морозильной камере. Партии обработанных глицерином яиц охлаждали также до —79, —160 или —190°, а затем быстро согревали до +40°. Во всех яйцах, перенесших быстрое охлаждение и замораживание при низких температурах, тотчас же после оттаивания были обнаружены разрывы или другие явные признаки дегенерации. Во многих случаях медленно замороженные яйца выглядели нормальными после оттаивания, но дегенерировали во время удаления глицерина. Из 600 обработанных глицерином яиц, охлажденных до —79, —160 или —190° и затем согретых, только 6 дробились при посеве после удаления глицерина (фото 11, *Г*). Одно из этих яиц показано на фото 11, *Д* на стадии 6 клеток [28, 29]. Полученные результаты показывают, что воздействие глицерина и очень низких температур не всегда исключает возможность дальнейшего развития яиц млекопитающих. Однако для того, чтобы добиться выживания возможно большего их числа после такого хранения, необходимо выработать специальную методику. В настоящее время мы еще не владеем удовлетворительной методикой хранения яиц кролика в замороженном состоянии [1].

Яйца различных видов животных по-разному реагируют на одни и те же условия опыта. Так, яйца мыши труднее поддаются культивированию in vitro и трансплантации от одного животного другому, чем яйца кролика. Раннер и Палм [21] разработали специальную методику для получения неоплодотворенных яиц у неполовозрелых мышей и введения их в половые пути генетически отличающихся мышей, которых затем спаривали. Они нашли, что вероятность выживания трансплантированных яиц достигала 14%. Несколько видоизменив эту методику, Лин и др. [16] добились 17% выживаемости трансплантированных яиц мыши. Когда же в среду добавляли 7—10% глицерина, у «приемных матерей» развивалось лишь около 3% яиц. Попытки удалить глицерин перед трансплантацией не дали повышения выживаемости яиц. Когда неоплодотворенные яйца мыши помещали в среду, содержащую 5% глицерина, при +5°, они заметно сморщивались, так же как и яйца кролика в аналогичных условиях. Яйца мышей не расправлялись в течение 1,5 *час* при температуре +5°; следовательно, они, по-видимому, обезвоживались и глицерин не проникал внутрь яйца. Тем не менее до 22,8% таких яиц переживали трансплантацию [16]. В более поздних опытах неоплодотворенные яйца мыши, взвешенные в модифицированном растворе Локка с примесью 5% глицерина, переохлаждали и выдерживали различное время при —10°. После воздействия указанной температуры в течение 30 *мин* нормально развивалось 17% трансплантированных яиц, после воздействия в течение 2 *час* — 5% яиц, а после воздействия в течение 6 *час* погибали все яйца [23, 24]. Интересно отметить, что неоплодотворенные яйца мыши, находившиеся в 5-процентном растворе глицерина при 37°, вначале сжимались, а затем расправлялись, подобно оплодотворенным яйцам кролика. По-видимому, глицерин проникал внутрь яиц. Яйца мыши, инкубированные в течение 15 *мин* в среде, содержащей 5% глицерина, при трансплантации дали в 14% нормальные плоды. Следовательно, наличие глицерина внутри неоплодотворенных яиц не препятствовало их оплодотворению и последующему нормальному развитию. Затем Шерман и Лин [25] установили, что неоплодотворенные яйца мыши переносят образование внеклеточных кристаллов льда при —10° и даже при —20° [22] при условии непродолжительного периода хранения. Бо́льшая часть яиц разрушается при образовании внутриклеточных кристаллов, но, возможно, какая-то их часть и выживает. Шерман и Лин [23, 24] высказывают удивление по поводу кратковременной продолжительно-

сти жизни неоплодотворенных яиц мыши, законсервированных при пониженных температурах. Так, из нескольких сотен яиц, хранившихся в течение 24 *час* при температуре +5°, только 2 продолжали развиваться in vivo. Они быстрее разрушались при 0 или —10°. Не было обнаружено никаких структурных изменений в неоплодотворенных яйцах мыши, обработанных 25—35-процентным раствором глицерина при 5° и быстро охлажденных до температуры жидкого азота в висячей капле на покровном стекле или же в микроскопически малом объеме среды в ампуле [22]. Данные о трансплантации яиц мыши после охлаждения до —196° пока еще не получены.

Методика трансплантации яиц млекопитающих от одного животного другому открывает огромные перспективы для исследований в области физиологии размножения, генетики и животноводства. Она не находит пока широкого применения из-за отсутствия надежного метода хранения in vitro в течение продолжительного периода времени оплодотворенных или неоплодотворенных яиц. Использование глицерина и низких температур не принесло практического решения настоящей задачи, хотя установлено, что глицерин не является летальным для свежеоплодотворенных яиц в критической фазе между сингамией и дроблением или же для неоплодотворенных яиц при воздействии на них в течение коротких периодов времени при температуре, близкой к нулю.

Эмбриональные ткани

РАННИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

В свое время было установлено, что кусочки опухолей млекопитающих, законсервированные в замороженном состоянии при очень низких температурах, после пересадки здоровым животным вызывают рост свежих опухолей. Однако оставалось неясным, вызвано ли появление новообразований каким-то вирусом или раковые клетки действительно пережили замораживание. Способность эмбриональной ткани к быстрому росту свидетельствовала о наличии у нее некоторых свойств, присущих

ткани злокачественных опухолей. Ранние исследования в области замораживания эмбриональных тканей специально проводили с целью получения убедительных доказательств за или против вирусной теории рака. Например, Гэйлорд [45] подтвердил данные Мура, Уокера и Баррэта, согласно которым клетки мышиной карциномы, замороженные в жидком воздухе, а затем согретые и пересаженные другой мыши, вызывали у нее опухоли. Свежая эмбриональная ткань мыши хорошо пролиферировала после пересадки ее взрослым животным, но не давала роста, когда ее предварительно замораживали в жидком воздухе и оттаивали, согласно методике, применявшейся для злокачественных опухолей. Постепенно накапливались данные о том, что ткани эмбрионов или плодов других гомойотермных животных также погибают при охлаждении до температур, близких к нулю. Симонэн [72] одним из первых применил культуру тканей для изучения выживаемости охлажденных и замороженных кусочков эмбриональной ткани мыши, крысы и теленка. Он нашел, что в незамороженном состоянии эти кусочки переживали воздействие температуры —5° в течение пяти дней, но замораживание при —15°, даже очень кратковременное, полностью разрушало живые клетки [72].

Фергюсон [44] нашел, что волокна гладких мышц из амниона куриного эмбриона сокращаются после замораживания при —2° в течение 10 *мин*; вместе с тем препараты, выдерживавшиеся такой же период времени при температуре —3° или еще ниже, не реагировали ни на эзерин, ни на хлористый барий и не проявляли спонтанных ритмических сокращений после оттаивания. Фергюсон подчеркивает, что в некоторых препаратах, в которых мышечные волокна полностью восстановились после пребывания в течение 10 *мин* при —2°, образовались кристаллы льда. Тем не менее считали, что именно эти кристаллы служат прямой причиной повреждения живых клеток, включая и клетки эмбрионов, хранившиеся при температурах ниже их точки замерзания.

Люйет и Гонсалес [56] полагали, что можно избежать образования кристаллов льда путем сверхбыстрого охлаждения эмбриональных тканей до очень низких тем-

ператур. Они использовали в своих опытах маленькие кусочки амниотической оболочки от 9—17-дневных куриных эмбрионов. Эти кусочки обрабатывали 30-процентным раствором этиленгликоля с целью дегидратации и сокращения объема воды, которая в дальнейшем могла бы кристаллизоваться. Излишнюю жидкость удаляли, кусочки помещали на полоски слюды и погружали в жидкий азот. Через различные периоды времени — от 1 *мин* до 1 *час* — их быстро согревали, погружая в раствор Тироде с температурой +40°. После этого ткань исследовали под микроскопом. Спустя примерно 1 *час* после согревания не наблюдалось никаких признаков активности. Затем некоторые мышечные волокна начинали самопроизвольно сокращаться, тогда как другие реагировали только на механическое раздражение. Лишь изредка происходило полное восстановление активности. Замороженные мышечные элементы амниона сокращались не более 5—10 *мин* в противоположность контрольным, которые in vitro сокращались ритмически и самопроизвольно в течение 30 *мин* и обычно на протяжении нескольких часов сохраняли способность сокращаться в ответ на раздражение. Только в одном опыте из 20 наблюдалось выживание после медленного замораживания или без предварительной обработки этиленгликолем [56].

СЕРДЦЕ КУРИНОГО ЭМБРИОНА

Гонсалес и Люйет [46] испытывали влияние быстрого охлаждения на изолированное сердце куриного эмбриона после 36—48 *час* инкубации. На этой стадии биения сердца хорошо заметны, а вся масса эмбриона еще очень мала. Эмбрионы подвергали воздействию 30-процентного раствора этиленгликоля в течение примерно 6 *мин*, а затем после удаления излишней влаги погружали в жидкий азот. Через 1 *мин*, а в некоторых опытах через 1 *час* их оттаивали в растворе Тироде с температурой +40°. Проделав около сотни неудачных опытов, авторы, наконец, добились восстановления сердечной деятельности у одного из эмбрионов, а затем и в последующих опытах получили успешные результаты: у 38 из 65 эмбрионов, обработанных этиленгликолем, восстановились биения

сердца. В некоторых случаях сокращалась только часть сердца, а в других удары были не очень интенсивными и частыми. В ряде опытов сердце билось не более получаса после согревания, а в одном после воздействия жидким азотом оно продолжало сокращаться 20 *час* [46]. Кусочки сердца эмбрионов более старшего возраста, инкубированных в течение 7—15 дней, также переживали обработку этиленгликолем и погружение в жидкий азот, как показывал бурный рост тканевых культур после согревания [57]. Хранение в течение 1 месяца в жидком азоте не влияло на интенсивность роста культивируемых кусочков сердца эмбриона [47].

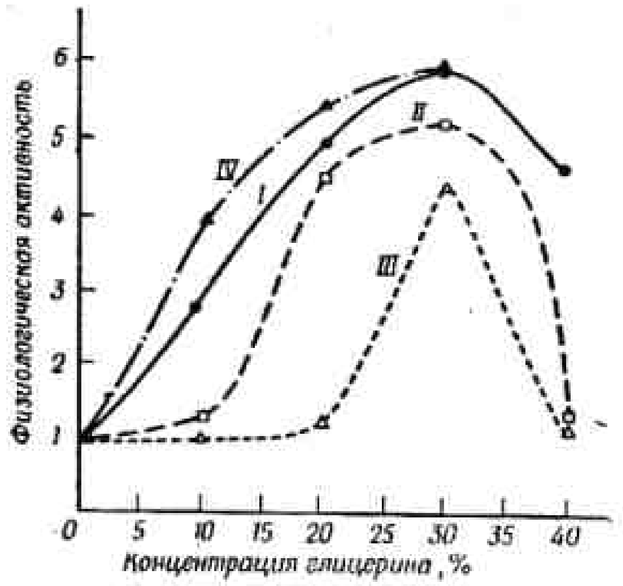
В это же время проводились опыты по продолжительному хранению сперматозоидов, эритроцитов и тканей яичника птиц и млекопитающих при температуре —79° в содержащей глицерин среде после относительно медленного охлаждения (см. гл. 2, 3 и 6). Люйет и Гонсалес [58] решили испытать действие глицерина на сердце куриного эмбриона. Они обнаружили, что кусочки сердца 10—15-дневных эмбрионов переживали обработку 30- или 60-процентным раствором глицерина и после воздействия жидким азотом при культивировании давали бурный рост, иногда даже более интенсивный, чем в контрольных, неохлаждавшихся культурах. Результаты культивирования показали, что глицерин так же эффективно защищал сердечную мышцу эмбриона от повреждений при очень низких температурах, как и этиленгликоль [58]. Обработанные глицерином кусочки сердца куриного эмбриона, помещенные в узкие стеклянные пробирки, медленно охлаждали в бане с температурой —30°. Спустя примерно 10 *сек* в тканях начинался процесс кристаллизации. На это указывало резкое изменение их внешнего вида — из прозрачных они становились мутными. Спустя 10 *мин* после замораживания пробирки согревали. При культивировании у 39 кусочков из 40 наблюдался такой же интенсивный рост, как и у незамороженных контрольных, тогда как замороженные, но не обработанные глицерином кусочки ткани совершенно не дали роста [55]. По мнению Люйета и Гехенно [55], выживание сердечных волокон, охлажденных до —30°, зависело, по крайней мере частично, от высокого содержания воды,

1399—2

не вымерзшей благодаря глицерину при данной температуре. Кусочки сердца куриного эмбриона, обработанные этиленгликолем, также переживали воздействие жидким азотом, если их охлаждали до той же температуры в течение приблизительно 30 *сек*, а не сверхбыстрым способом, который ранее считали наиболее эффективным [60]. Предварительная обработка концентрированными растворами глюкозы (1,5—4,2 *М*), которая якобы эффективно обезвоживает ткани, плохо защищала пробы от быстрого замораживания в жидком азоте. Кусочки сердца эмбриона, обработанные растворами с концентрацией хлористого натрия более 1 *М*, также не переживали погружения в жидкий азот [60]. Полученные результаты позволяют предполагать, что дегидратация посредством осмоса не является лучшим способом защиты живых клеток против последующего воздействия очень низких температур. Эти результаты показали также, что при наличии в среде глицерина или этиленгликоля образование кристаллов льда в среде не повреждало клетки.

Сравнительно недавно Рэ [68, 69] провел новые исследования выживаемости сердца куриного эмбриона после замораживания его при очень низких температурах и последующего оттаивания. Используя методику Вольфа для получения культуры органов [84], он определял физиологическую активность сердца эмбриона, извлеченного из яйца, которое было инкубировано в течение 7,5 дней. Рэ различал шесть степеней активности, от биения верхушки изолированного желудочка до координированных ударов обоих предсердий и желудочков с частотой, изменявшейся в зависимости от температуры (32—38°). Для сверхбыстрого замораживания сердце помещали на алюминиевую пластинку и погружали непосредственно в жидкий пропан, который охлаждали до температуры жидкого азота. Поскольку при погружении теплого материала в жидкий пропан с температурой —196° не образуется пузырьков газа, теплообмен происходил быстрее и спустя 0,5 *сек* температура сердца достигала —196°. Через 15 *сек* сердце переносили из жидкого пропана в жидкий азот. В других опытах сердце помещали на алюминиевую пластинку и погружали

в жидкий азот. Температура сердца снижалась до —196° через 1,5 *сек*. Медленное замораживание осуществляли двумя способами. В одних опытах предметное стекло с сердцем помещали в пробирку из пирексового стекла и последнюю погружали в жидкий азот. Снижение температуры до —196° происходило в течение 1 *мин*. В других опытах сердце сначала замораживали в течение 40 *сек* при —30°, а затем погружали в жидкий азот. До замораживания сердце пропитывали в течение 30 *мин*

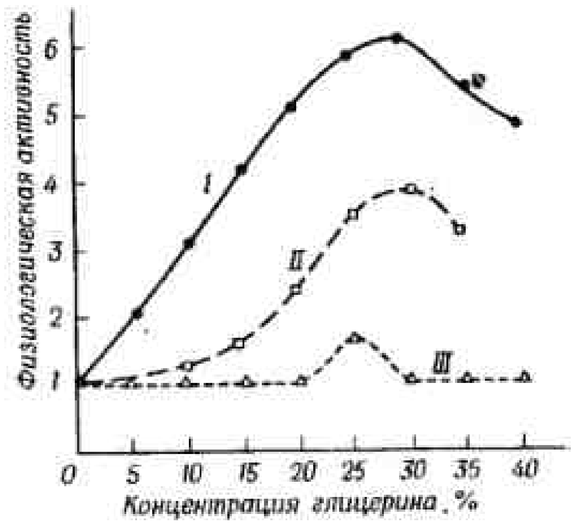


Фиг. 23. Влияние скорости охлаждения на физиологическую активность сердца куриного эмбриона [68].

I — замораживание в пробирке в жидком азоте (65 *сек*); *II* — замораживание непосредственно в жидком пропане (0,5 *сек*); *III* — замораживание непосредственно в жидком азоте при —196° (1,5 *сек*); *IV* — замораживание в пробирке при —30° (40 *сек*), а затем при —196° (20 *сек*). Физиологическую активность подразделяли на шесть уровней: *1* — полное отсутствие физиологической активности; *2* — сокращения отдельных участков желудочка; *3* — сокращения только одного желудочка; *4* — сокращения обоих желудочков; *5* — сокращения желудочков и предсердий; *6* — координированные сокращения желудочков и предсердий.

уравновешенным солевым раствором Эрла, содержащим глицерин в различной концентрации. В первой серии опытов производили быстрое оттаивание, погружая сердце в физиологический раствор с температурой +20°. При отсутствии в среде глицерина все препараты погибали. Оптимальная концентрация глицерина при любой скорости охлаждения составляла 30% (фиг. 23). Обработанное глицерином сердце, охлажденное до —196° в два приема или же в течение 65 *сек*, после оттаивания проявляло бóльшую физиологическую активность, чем сердце, замороженное очень быстро в жидком пропане или непосредственно в жидком азоте. Скорость оттанва-

ния после замораживания при —196° оказывала значительно большее влияние на последующую сердечную деятельность, чем скорость охлаждения (фиг. 24). Препараты предварительно обрабатывали глицерином и охлаждали с оптимальной скоростью. Почти не восстанавливались (или восстанавливались в очень небольшой степени) препараты, оттаивание которых при температуре воздуха +20° осуществляли медленно в течение



Фиг. 24. Влияние скорости оттаивания на физиологическую активность куриного эмбриона [68]. *I* — быстрое оттаивание при +20° (1 *сек*); *II* — медленное оттаивание в пробирке (45 *сек*); *III* — очень медленное оттаивание на воздухе (6 *мин*). Физиологическую активность подразделяли так же, как и на фиг. 23.

6 *мин*. При оттаивании за 45 *сек* не наблюдалось полного восстановления, тогда как препараты, обработанные 30-процентным раствором глицерина, замороженные при —196° и оттаянные за 1 *сек*, обладали максимальной активностью. Некоторые сердца хранили в течение нескольких недель при температуре твердой углекислоты (—79°). После быстрого оттаивания наблюдалось восстановление почти нормальной сердечной деятельности [68]. Рэ [68] полагал, что частичная защита сердечной мышцы более слабыми растворами глицерина, в результате чего физиологическая активность сердца после оттаивания снижалась, была связана с гибелью части мышечных волокон. Некоторые волокна могли быть менее устойчивыми или же процесс замораживания в них протекал более резко.

ЗАМОРАЖИВАНИЕ ДРУГИХ ТКАНЕЙ КУРИНОГО ЭМБРИОНА

Различные ткани куриного эмбриона (помимо сердца и мышечных элементов амниона) обладают в известной степени устойчивостью к замораживанию в нормальной среде. Помера и Льюис [64] обнаружили, что кусочки мышцы ноги 11—13-дневного куриного эмбриона переживали быстрое охлаждение до —11° и последующее оттаивание, а при посеве росли, ничем не отличаясь от незамороженных контрольных препаратов. Критическая точка температуры лежала где-то в пределах от —18 до —21°. Ниже этой температуры мышечные волокна немедленно погибали. Правда, веретенообразные клетки переживали замораживание мышечной ткани даже при —39°. При быстром охлаждении кусочков кожи 12—13-дневного эмбриона до —8° и последующем оттаивании рост эпителиальных клеток в культуре снижался. Когда же кожу замораживали при —18 или —26°, эпителиальные клетки обычно разрушались. Лишь в одном опыте эпителиальные клетки, охлажденные до —29,8° в течение 43 *сек*, при посеве дали пышный рост. Веретенообразные клетки росли в культурах кожи, замороженной при —39,2° [64, 65]. При любой температуре ниже нуля степень повреждения клеток была тем больше, чем продолжительнее было хранение. Однако окончательный распад эпидермальных клеток наступал лишь после хранения их в течение 1,5—3 *час* при температуре от —14,5 до —16,0°. Веретенообразные же клетки переживали хранение в холодильнике при такой температуре в течение 9—12 *час* [67]. Кусочки скелетной мышцы эмбриона давали рост, если только их хранили при —14,5° не более 6,75—9 *час*. Веретенообразные клетки прорастали из эксплантатов мышцы, выдерживавшейся различное время (до 20, но не 24 *час*) при температуре от —14,5 до —16,5° [67]. Обработанные 5- или 10-процентным раствором глицерина, эпителиальные клетки и мышечные волокна куриного эмбриона переживали быстрое замораживание при —50° независимо от того, были ли они согреты тотчас же после охлаждения или же их хранили при данной температуре в течение различных периодов времени до 10 дней [66].

В последние годы были разработаны тонкие методы, позволяющие изучать развитие скелетных структур в культурах тканей [43]. Например, рудиментарные большеберцовые хрящи 6—7-дневного куриного эмбриона хорошо растут и дифференцируются in vitro при посеве на соответствующую среду. Кости куриного эмбриона и их хрящевые эпифизы не переживали замораживания при —79° в обычном физиологическом растворе, но, когда их обрабатывали 15-процентным раствором глицерина и медленно охлаждали до —79°, они сохраняли жизнеспособность и после оттаивания и посева хорошо развивались [36]. Хрящевые клетки эпифиза при гистологическом исследовании имели нормальный внешний вид, и в некоторых из них можно было наблюдать митоз. Никаких явлений некроза в эпифизе не отмечалось, а в диафизе лишь некоторые клетки выглядели дегенерировавшими и основное вещество кости, проявлявшее незначительные нарушения структуры, окрашивалось, как обычно, метахроматически метиленовым синим. Когда таким же способом обработали глицерином и охладили до —79° большую берцовую кость 7-дневного куриного эмбриона, она развивалась в культуре хуже, чем незамороженная контрольная, хотя эпифизы увеличивались нормально. Гистологическое исследование показало полную сохранность большинства клеток эпифиза и очень маленькие участки некроза (фото 12). В диафизе, однако, было обнаружено большое число разрушенных или поврежденных клеток (фото 13), хотя надкостница и зона периостального формирования кости, по-видимому, не пострадали. Интересно, что с возрастом эмбриона (даже при однодневной разнице) клетки диафиза становились более чувствительными к замораживанию, несмотря на наличие в среде глицерина. Некоторые изменения в основном веществе кости, а также изменения проницаемости оболочки более старых клеток, возможно, не позволяли глицерину проникать внутрь клеток [36]. Это было подтверждено в дальнейшем в опытах на хряще млекопитающих, который можно хранить при низкой температуре в присутствии глицерина при условии, что клетки перед обработкой их глицерином отделяют от основного вещества кости посредством

разрушения последнего с помощью соответствующего фермента [54].

Еще в 1907 г. Гаррисон [52], использовав эмбрионов лягушки, культивировал нервные клетки и нервные волокна эмбриональной нервной ткани, а в 1911 г. Бэрроуз повторил его опыты на куриных эмбрионах [37]. Следует, однако, отметить, что ни в опытах указанных авторов, ни в опытах более поздних исследователей эти ткани не пролиферировали так активно, как другие эмбриональные ткани. Тем не менее Люйет и Гонсалес [59] обнаружили, что головной мозг куриного эмбриона, обработанный 60-процентным раствором этиленгликоля, быстро охлажденный до температуры жидкого азота и затем согретый, давал рост типичных нервных волокон, идентифицированных при помощи импрегнации серебром. Наблюдалась также миграция клеток, имеющих сферическое тело и удлиненные униполярные и биполярные отростки. Вне всякого сомнения, нервные клетки переживали воздействие очень низких температур.

Куриные эмбрионы, начиная со стадии первичной полоски (8 *час* инкубации) и кончая стадией образования головной складки (20 *час* инкубации), отделяли от желтка и рассекали в поперечном направлении позади гензеновского узелка. Передние участки обрабатывали 60-процентным раствором этиленгликоля и погружали на 1 *мин* в жидкий азот. Затем их быстро согревали в растворе Рингера и культивировали в среде, состоящей из экстракта альбумина и разведенного в физиологическом растворе агара [48]. У большинства замороженных эмбрионов наблюдались некоторые признаки регенерации клеток, например закрытие нервной складки или образование сомитов у обрезанного конца. Сердечная деятельность восстановилась, а в 5 опытах из 30 образовались головной мозг, глазные пузыри и нервная трубка. Эмбрионы в своем развитии лишь слегка отставали от незамороженных контрольных [48]. Полученные результаты показывают, что замороженные и согретые куриные эмбрионы сохраняли, по крайней мере частично, способность к морфологической и физиологической дифференциации, а также к восстановлению или возмещению удаленных частей, включая такие сложные органы,

как зачатки глаза и головного мозга. До настоящего времени не удалось добиться полного развития в инкубаторе изолированных, но интактных эмбрионов, как охлажденных, так и не подвергавшихся замораживанию.

ТКАНИ ЭМБРИОНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Относительно небольшое число исследований было посвящено вопросу о выживании эмбрионов млекопитающих и их тканей после замораживания и оттаивания. Чанг [38] обрабатывал глицерином 10-дневных эмбрионов кролика, взвешивая их при температуре 32° в течение 10—20 *мин* последовательно в разбавленной сыворотке, содержащей 5, 10 и 15% глицерина. Затем он охлаждал эмбрионы с различной скоростью до —79° и выдерживал их при этой температуре в течение различных периодов времени (до 80 *мин*). Эмбрионы оттаивали за 1 *мин* и затем культивировали. После оттаивания они обычно сморщивались и при посеве уже не расправлялись. Во всех опытах ткань хориона давала энергичный рост, а у 11 из 40 эмбрионов, согретых после охлаждения до —79°, восстановились сокращения волокон сердечной мышцы. Обычно эти ритмические сокращения ограничивались областью луковицы аорты, но у одного эмбриона, охлажденного медленно (со скоростью, которую обычно применяли при замораживании сперматозоидов быка), наблюдались сокращения и луковицы аорты и предсердия. Другие структуры, в том числе сомиты, мозговые пузыри и глазные бокалы, начали дегенерировать после инкубации в течение 12—24 *час*. Изменения в концентрации глицерина, использование в некоторых случаях в качестве защитного агента этиленгликоля, более быстрое или, наоборот, более медленное охлаждение не улучшили результатов опытов [38]. У 10-дневных эмбрионов сердечная деятельность восстанавливалась после остановки сердца в течение 7 дней во время хранения при 0°. Таким образом, продолжительная остановка сердца совместима с восстановлением его функциональной активности [38]. Можно предполагать, что 10-дневные эмбрионы кролика более устойчивы к замораживанию и оттаиванию в присутствии глицерина, чем эмбрионы в возрасте 11—13 дней.

Эндокринная ткань млекопитающих

Свежеоплодотворенные и неоплодотворенные яйца кролика, извлеченные из фаллопиевой трубы вскоре после овуляции, окружены слизистым веществом, которое содержит много зернистых фолликулярных клеток и образует яйценосный бугорок. Каждое яйцо окружено также лучистым венцом, состоящим из нескольких слоев фолликулярных клеток, плотно прилегающих к прозрачной оболочке (zona pellucida). При культивировании in vitro яйца начинают дробиться и фолликулярные клетки яйценосного бугорка и лучистого венца дают бурный рост [74]. Яйца, быстро охлажденные в пробирках с сывороткой до —79°, не дробились при культивировании, однако некоторые клетки лучистого венца и яйценосного бугорка выжили и стали развиваться. Быстрое замораживание в жидком воздухе убивало все клетки. При медленном замораживании в сыворотке до —79° и последующем культивировании яйца дегенерировали, но большое число окружающих их фолликулярных клеток сохранило жизнеспособность и развивалось.

Кусочки яйценосного бугорка отделяли от яиц и замораживали отдельно в различных средах и с разной скоростью, после чего культивировали на предметных стеклах с тем, чтобы иметь возможность подсчитать процент живых и мертвых клеток. Полученные результаты показали, что 25—50% клеток переживали медленное охлаждение до —79° либо в сыворотке, либо в 0,85-процентном растворе хлористого натрия, содержащем 15% глицерина. Выживаемость была выше, когда яйценосные бугорки взвешивали в сыворотке с добавлением 15% глицерина. После инкубации в течение 4 *час* можно было наблюдать рост примерно 75% клеток, а затем и их дробление. Через 24 *час* культуры яйценосных бугорков, медленно охлажденных либо в чистой сыворотке, либо в сыворотке, содержавшей глицерин, почти не отличались от незамораживавшихся контрольных (фото

14, *В* и *Г*). При быстром охлаждении до —79° в культуре иногда попадались живые клетки (фото 14, *Б*), но при быстром охлаждении в жидком воздухе все клетки погибали (фото 14, *А*). Подобные же результаты были получены и на клетках, соскобленных или выдавленных из неразорвавшихся фолликулов, при охлаждении до —79° в присутствии глицерина или без него. Все эти данные позволяют говорить о возможности хранения при очень низких температурах целых яичников; они побудили нас провести исследование по пересадке замороженной овариальной ткани [63].

Клетки передней доли гипофиза взрослых кроликов и крыс хорошо росли во вращающихся пробирках, а на специальной среде давали интенсивный рост специфических эпителиальных клеток. Кусочки передней доли гипофиза переживали постепенное добавление, а затем удаление глицерина, причем слои эпителиальных клеток в таких условиях пролиферировали так же, как и в незамороженных контрольных препаратах [76]. Обработанную глицерином, медленно охлажденную до —79° ткань гипофиза оттаивали через несколько часов или дней, удаляли из нее глицерин и культивировали. Приблизительно через два дня начиналась миграция живых клеток из эксплантатов, клетки хорошо размножались и культуры по виду ничем не отличались от контрольных. В настоящее время вряд ли имеются большие перспективы в отношении успешной имплантации гипофизарной ткани в какое-либо иное место, помимо ямки турецкого седла [49]. Поэтому лучшим способом проверки жизнеспособности замороженной ткани гипофиза является ее культивирование. Однако маловероятно, чтобы при посеве эндокринные ткани продолжали выделять свои специфические гормоны. Способность замороженной ткани гипофиза продолжать секрецию еще не исследовалась.

Кожа, роговица и другие ткани млекопитающих

Тейлор и Герстнер [81] применяли культуру тканей для изучения выживаемости клеток кожи, замороженной различными способами. Они сравнивали действие

замораживания на кожу плода, новорожденных, а также неполовозрелых и взрослых мышей и крыс. Кожа незамороженного плода или новорожденного животного росла in vitro лучше, чем кожа взрослых крыс и мышей. За исключением этого отличия, возраст, по-видимому, не оказывал существенного влияния на выживаемость тканей после замораживания и оттаивания в различных условиях. Необработанная кожа, замороженная путем охлаждения до температуры жидкого азота в течение 30 *сек* и оттаянная приблизительно за 1 *сек*, не давала роста в 99% случаев. Лишь изредка наблюдалось размножение небольшого числа клеток. Все пробы, обработанные до быстрого замораживания и оттаивания 20—30-процентным раствором этиленгликоля, при пересеве давали рост; в 13% случаев культуры ничем не отличались от контрольных, а в 80% результаты были вдвое хуже, чем в незамороженных пробах. Обработка 20—30-процентным раствором глицерина снижала рост клеток в кусочках незамороженной кожи на 25%, а обработка 50-процентным раствором снижала рост почти наполовину. Когда кожу замораживали в растворе, содержащем более 50% глицерина, наблюдался такой же рост клеток, как и в кусочках незамороженной, но обработанной глицерином кожи. Все повреждения кожи можно было отнести за счет вредного действия глицерина, а не замораживания. Важно отметить, что перед культивированием кусочки кожи промывали в четырех порциях раствора Тироде, не содержащего глицерина. По-видимому, указанные повреждения наступали во время отмывания. Исследования под микроскопом показали наличие тяжелых повреждений клеток в необработанной коже после замораживания и оттаивания. Вместе с тем в коже, замороженной и оттаянной в присутствии этиленгликоля или глицерина, не наблюдалось видимых повреждений клеток. Они наступали при перенесении ткани в нормальную среду [81].

Помера и Мурхэд [66] засняли на кинопленке действие глицерина на культуры эпидермальных клеток взрослого человека. В необработанных культурах в краевых клетках наблюдался выраженный пиноцитоз. Он прекращался при добавлении в среду 2% глицерина,

но через несколько минут опять возобновлялся, так что культуры вскоре принимали нормальный вид. Когда концентрацию глицерина последовательно повышали до 4, 6, 8 и 10%, в краевых клетках повторялось прекращение и возобновление пиноцитоза. Клетки, инкубированные в течение 24 *час* в среде, содержащей 10% глицерина, а затем подвергшиеся воздействию 20-процентного его раствора, восстанавливались по мере постепенного удаления глицерина и через несколько часов культуры выглядели нормально, а большинство клеток проявляли полную активность, включая пиноцитоз.

Иногда кусочки кожи, не развивавшиеся in vitro, хорошо приживали при подсадке взрослым или неполовозрелым крысам и мышам, у которых они были взяты [81]. Полученные результаты позволяют предполагать, что в некоторых случаях условия культуры ткани, возможно, оказываются слишком жесткими для проверки выживаемости кожи грызунов после замораживания.

Впоследствии Тейлор [80] охлаждал полоски кожи плода, погружая их в жидкий пентан, охлажденный до —190°. Температура снижалась со скоростью 100° менее чем за 10 *сек*. Тейлор проводил также медленное охлаждение со скоростью 100° за 7—60 *мин* и определял жизнеспособность препаратов в культурах тканей. Он нашел, что быстрое охлаждение имело существенное значение, но при наличии глицерина не наблюдалось большого различия в росте эксплантатов, замороженных и охлажденных с разными скоростями. Однако он не проверил действие медленного охлаждения со скоростью 1° в 1 *мин* от 0 до —15 или —20° с последующим более быстрым охлаждением до —79 или —190°. Между тем такая методика давала хорошие результаты в опытах на обработанных глицерином клетках и тканях многих типов, в том числе сперматозоидов, овариальной ткани, а также кожи и роговицы других млекопитающих.

Роговицу обрабатывали 15-процентным раствором глицерина, медленно охлаждали до —79°, хранили при этой температуре, а затем оттаивали и успешно подсаживали животным и человеку без проверки ее жизнеспособности с помощью культуры тканей (см. гл. 7). Позднее Эрл и сотрудники показали, что роговица кролика, пропитанная раствором, содержащим 15% глицерина, и медленно охлажденная до —79°, всегда даст энергичный рост эпителиальных и веретенообразных клеток. Какое-то незначительное замедление процесса наблюдалось перед началом миграции клеток, но вскоре культуры обработанной глицерином и замороженной роговицы нельзя было отличить от свежей ткани. В 28% случаев роговица, охлажденная без глицерина, не давала роста, а в остальных случаях наблюдались тяжелые повреждения и задержка роста клеток [42, 61].

Можно было предполагать, что эпителиальные клетки внутренних органов более чувствительны к повреждениям во время замораживания, чем клетки многослойного плоского эпителия кожи и роговицы. Тем не менее Клинке в 1939 г. обнаружил живые клетки в кусочках почечной ткани 6-недельного кролика после замораживания их в жидком азоте. Ему иногда удавалось добиться роста типичного почечного эпителия после оттаивания и посева. Позднее появилось сообщение, что кусочки почек теленка хорошо переживали обработку глицерином, медленное охлаждение и хранение при —79° [82]. При посеве клетки пролиферировали так же, как в контрольных незамороженных кусочках. Взвеси почечных клеток обезьяны, обработанных трипсином, консервировали путем медленного охлаждения в среде, содержащей 15% сыворотки и 5% глицерина. При этом 70% согретых и культивированных клеток оказались жизнеспособными и были использованы для культивирования вирусов [77].

Один из недостатков метода хранения живых клеток в культурах тканей заключается в их дедифференциации, а также в изменении внешнего вида и присущих им свойств. Особенно это наблюдается при длительном культивировании, когда в течение ряда лет требуется неоднократно осуществлять пересевы. Использование глицерина и медленного охлаждения сделало возможным замораживание культивированных клеток чистых штаммов, включая фибробласты мыши, кролика и человека, и сохранение их жизнеспособности в течение многих месяцев и лет в условиях консервации при низких температурах. Таким путем удалось сохранить раз-

личные клетки злокачественных опухолей, в том числе клетки HeLa и клетки мышиной лимфосаркомы [41, 70, 71, 78, 79]. Гаушка и сотрудники организовали банк замороженных тканей, в котором на протяжении 1—2 лет хранили 82 типа тканей (опухолевых и здоровых) в среде, содержащей 10—15% глицерина, при температуре —78°. Некоторые типы клеток и тканей были чувствительны к быстрому замораживанию, но зато переживали медленное охлаждение со скоростью 1° в 1 *мин* в пределах от 0 до —25°. В законсервированных таким путем клетках не наблюдалось никаких изменений; тем самым авторам удалось избежать дополнительных затрат времени и средств на сохранение клеток с помощью пересева культур [53].

ЛИТЕРАТУРА

Яйца

1. Adams C. E., Polge C., Personal communication, 1958.
2. Austin C. R., Fertilization of the rat egg., Nature, Lond., **166**, 407 (1950).
3. Austin C. R., Walton A., Fertilization, Ch. 10 in Marshall's Physiology of Reproduction, 3rd edn. ed. Parkes A. S., London, Longmans, Green, 1960.
4. Averill R. L. W., Adams C. E., Rowson L. E. A., Transfer of mammalian ova between species, Nature, Lond., **176**, 167—168 (1955).
5. Chang M. C., Normal development of fertilized rabbit ova stored at low temperature for several days, Nature, Lond., **159**, 602—603 (1947).
6. Chang M. C., The effects of low temperature on fertilized rabbit ova in vitro, and the normal debelopment of ova kept at low temperature for several days, J. gen. Physiol **31**, 385—410 (1948).
7. Chang M. C., Probability of normal development after transplantation of fertilized rabbit ova stored at different temperatures, Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., **68**, 680—683 (1948).
8. Chang M. C., Fertilizability of rabbit ova and the effects of temperature in vitro on their subsequent fertilization and activation in vivo, J. exp. Zool., **121**, 351—382 (1952).

9. Chang M. C., Storage of unfertilized rabbit ova: subsequent fertilization and the probability of normal development, Nature, Lond., **172**, 353—354 (1953).
10. Dickman Z., Noyes R. W., The fate of ova transferred into the uterus of the rat, J. Reprod. Fertil., **1**, 197—212 (1960).
11. Hammond J., The fertilisation of rabbit ova in relation to time, J. exp. Biol., **11**, 140—161 (1934).
12. Hammond J., Jr., Recovery and culture of tubal mouse ova, Nature, Lond., **163**, 28—29 (1949).
13. Heape W., A note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother, Proc. Roy. Soc., **48**, 457—458 (1890).
14. Heape W., Further note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother, Proc. Roy. Soc., **62**, 178—183 (1897).
15. Hunter G. L., Adams C. E., Rowson L. E. A., Successful interbreed transfer of ova in sheep, Nature, Lond., **174**, 890 (1954).
16. Lin T. P., Sherman J. K., Willett E. L., Survival of unfertilized mouse eggs in media containing glycerol and glycine, J. exp. Zool., **134**, 275—292 (1957).
17. Luyet B. J., Gehenio P. M., Life and Death at Low Temperatures, Normandy, Missouri, Biodynamica, 1940.
18. Marshall F. H. A., The Physiology of Reproduction, 2nd Edn. London, Longmans, Green, 1922.
19. Moran T., The effect of low temperatures on hen's eggs, Proc. Roy. Soc., B, **98**, 436—456 (1925).
20. Pincus G., Observations on the living eggs of the rabbit, Proc. Roy. Soc., B, **107**, 132—167 (1930).
21. Runner M. N., Palm J., Transplantation and survival of unfertilized ova of the mouse in relation to postovulatory age, J. exp. Zool., **124**, 303—316 (1953).
22. Sherman J. K., Personal communication (1958).
23. Sherman J. K., Lin T. P., Effect of glycerol and low temperature on survival of unfertilized mouse eggs, Nature, Lond., **181**, 785—786 (1958).
24. Sherman J. K., Lin T. P., Survival of unfertilized mouse eggs during freezing and thawing, Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., **98**, 902—905 (1958).

25. Sherman J. K., Lin T. P., Temperature shock and cold-storage of unfertilized mouse eggs, Fertility and Sterility, **10**, 384—396 (1959).
26. Smith A. U., Cultivation of rabbit eggs and cumuli for phase-contrast microscopy, Nature, Lond., **164**, 1136—1137 (1949).
27. Smith A. U., Fertilization in vitro of the mammalian egg. The Biochemistry of Fertilization and the Gametes, Biochem. Soc. Symposia, No. 7, pp. 3—10, ed. Williams R. T., Cambridge, University Press, 1951.
28. Smith A. U., Behaviour of fertilized rabbit eggs exposed to glycerol and to low temperatures, Nature, Lond., **170**, 374—375 (1952).
29. Smith A. U., In vitro experiments with rabbit eggs. Mammalian Germ Cells, Ciba Foundation Symposium, pp. 217—222, ed. Wolstenholme G. E. W., London, Churchill, 1953.
30. Spallanzani L., Opuscules de Physique Animale et Vegetale. Vol. I, Trans. J. Senebier, Paris, Pierre Duplain, 1787.
31. Thibault C., La parthénogenèse expérimentale chez le lapin, C. R. Acad. Sci., Paris, **224**, 297—299 (1947).
32. Thibault C., L'activation et la régulation de l'ovocyte parthénogénétique de lapine, C. R. Soc. Biol., Paris, **142**, 495—497 (1948).
33. Thibault C., L'oeufs des mammifères, Ann. des Sc. Nat. Zool., **11**, 133—219 (1949).
34. Willett E. L., Egg transfer and superovulation in farm animals, Iowa St. Coll. J. Sci., **28**, 83—100 (1953).
35. Willett E. L., Black W. G., Casida L. E., Stone W. H., Buckner P. J., Successful transplantation of a fertilized bovine ovum, Science, **113**, 247 (1951).

Культуры тканей

36. Biggers J. D., The growth of cartilaginous embryonic chick bones after freezing, Experimentia, **13**, 483—484 (1957).
37. Burrows M. T., The growth of tissues of the chick embryo outside the animal body, with special reference to the nervous system, J. exp. Zool., **10**, 61—83 (1911).
38. Chang M. C., Resumption of heart in the rabbit embryo after exposure to low temperatures, Science, **118**, 550—552 (1953).

39. Chang M. C., Resumption of heartbeat in the rabbit embryo after being kept at 10° or 0° C for several days, Fed. Proc., **13**, 25 (1954).
40. Craigie J., Survival and preservation of tumors in the frozen state, Advanc. Cancer Res., **2**, 197—228 (1954).
41. Craven C., The survival of stocks of HeLa cells maintained at —70° C, Exp. Cell Res., **19**, 164—174 (1960).
42. Draheim J., McPherson S. D. Jr., Evans V. J., Earle W. R., Further studies on the viability of frozen corneas as determined in tissue cultures, Amer. J. Ophthal., **44**, 182—188 (1957).
43. Fell H. B., Skeletal development in tissue culture, The Biochemistry and Physiology of Bone, Chap. 14. ed. Bourne G. H., New York, Academic Press, 1956.
44. Ferguson J., Low temperature and survival of embryonic tissue, Science, **110**, 47—48 (1949).
45. Gaylord H. R., The resistance of embryonic epithelium, transplantable mouse cancer and certain organisms to freezing with liquid air, J. infect. Dis., **5**, 443—448 (1908).
46. Gonzales F., Luyet B., Resumption of heart-beat in chick embryo frozen in liquid nitrogen, Biodynamica, **7**, 1—5 (1950).
47. Gonzales F., Luyet B., Survie de cellules du coeur d'embryon de poulet après un séjour de quatre semaines dans l'azote liquide, C. R. Acad. Sci., Paris, **234**, 2651—2652 (1952).
48. Gonzales F., Luyet B., Resumption of development in chick embryos after freezing, Biodynamica, **7**, 181—192 (1954).
49. Harris G. W., Neural Control of the Pituitary Gland. Monographs of the Physiological Society, No. 3. ed. Bayliss L. E., Feldberg W., and Hodgkin A. L., London, Edwaed Arnold. 1955.
50. Harris G. W., Jacobson D., Proliferative capacity of the hypophysial portal vessels, Nature, Lond., **165**, 854 (1950).
51. Harris G. W., Jacobson D., Functional grafts of the anterior pituitary gland, Proc. Roy. Soc., B, **139**, 263—276 (1952).
52. Harrison R. G., Observations on the living developing nerve fiber, Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., 3, 140 (1907).
53. Hauschka T. S., Mitchell J. T., Niederpruem D. J., A reliable frozen tissue bank: viability and stability of 82 neoplastic normal cell types after prolonged storage at —70° C, Cancer Res., **19**, 643—653 (1959).

54. Heyner S., The survival of embryonic cartilage after freezing to —79° C. J. Exper. Zool., **144**, 165—177 (1960).

55. Luyet B. J., Gehenio P. M., Effect of glycerol in limiting ice formation in tissues subjected to low temperatures, Biodynamica, **7**, 107—118 (1952).

56. Luyet B., Gonzales F., Reprise des contractions rhythmiques du muscle amniotique après congélation dans l'azote liquide, C. R. Acad. Sci., Paris, **230**, 2331—2333 (1950).

57. Luyet B., Gonzales F., Survival of cells in embryonic heart of chick after freezing, Biodynamica, **7**, 61—66 (1951).

58. Luyet B., Gonzales F., Protective action of glycerol against freezing injury in embryonic tissues of chick, Biodynamica, **7**, 101—106 (1952).

59. Luyet B., Gonzales F., Growth of nerve tissue after freezing in liquid nitrogen, Biodynamica, **7**, 171—174 (1953).

60. Luyet B., Keane J. F., Comparative efficiency of ethylene glycol, glucose and sodium chloride in protecting tissues against freezing injury, Biodynamica, **7**, 119—132 (1952).

61. McPherson S. D., Jr., Draheim J. W., Evans V. J., Earle W. R., The viability of fresh and frozen corneas as determined in tissue culture, Amer. J. Ophthal., **41**, 513—519 (1956).

62. Medawar P. B., Billingham R. E., The viability of mammalian skin after freezing, thawing and freeze-drying. Freezing and Drying, ed. Harris R. J. C., pp. 55—62, London, Institute of Biology, 1951.

63. Parkes A. S., Smith A. U., Regeneration of rat ovarian tissue grafted after exosure to low temperature, Proc. Roy. Soc., B, **140**, 455—470 (1953).

64. Pomerat C. M., Lewis R. B., Thermal streess and tissue culture. I. The effect of rapid freezing and thawing on chick embryonic epidermis, skeletal muscle and spindle cells, Tex. Rep. Biol. Med., **11**, 306—333 (1953).

65. Pomerat C. M., Lewis R. B., Thermal stress and tissue culture. II. The effect of rapid freezing and thawing on human newborn and adult skin, Tex. Rep. Biol. Med., **11**, 333—346 (1953).

66. Pomerat C. M., Moorhead P. S., Thermal stress and tissue culture. VII. The effect of glycerol on cells with special reference to protection against freezing, Tex. Rep. Biol. Med., **14**, 237—253 (1956).

67. Pomerat C. M., Nakai J., Gilliland P. F., Thermal stress and tissue culture. IV. The intensity-time factor, Tex. Rep. Biol. Med., **12**, 345—353 (1954).

68. Rey L. R., Physiologie du coeur de l'embryon de poulet in vitro après congélation à très basse température, J. Embryol. exp. Morphol., **6**, 171—177 (1958).

69. Rey L. R., Conservation de la Vie par le Froid, Actualités sci. industr. No. 1279. Paris, Herman, 1959. (Луи Рэ, Консервация жизни холодом, Госмедиздат, М., 1962.)

70. Scherer W. F., Effects of freezing speed and glycerol diluent on 4—5 year survival of HeLa and L cells, Exp. Cell Res., **19**, 175—198 (1960).

71. Scherer W. E., Hoogasian A. C., Preservation at subzero temperatures of mouse fibroblasts (strain L) and human epithelial cells (strain HeLa), Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., **87**, 480—487 (1954).

72. Simonin C., Recherches sur la survie des tissues exposés aux basses températures, C. R. Soc. Biol., Paris, **107**, 1029—1032 (1931).

73. Smith A. U., Cultivation of rabbit eggs and cumuli for phase-contrast microscopy, Nature, Lond., **164**, 1136—1137 (1949).

74. Smith A. U., Cultivation of ovarian granulosa cells after cooling to very low temperatures, Exp. Cell Res., **3**, 574—583 (1952).

75. Smith A. U., Parkes A. S., Preservation of ovarian tissue at low temperatures, Lancet, **ii**, 570—572 (1951).

76. Smith S. E., The growth and physiology of cultures of endocrine tissues, Thesis, University of London, 1955.

77. Stulberg C. S., Rightsel W. A., Page R. H., Berman L., Virologic use of monkey cells preserved by freezing, Proc. Soc. exp., Biol. N. Y., **101**, 415—418 (1959).

78. Stulberg C. S., Soule D. H., Berman L., Preservation of human epithelial-like and fibroblast-like cell strain at low temperatures, Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., **98**, 428—430 (1958).

79. Swim H. E., Haff R. F., Parker R. F., Some practical aspects of storing mammalian cells in the dry-ice chest, Cancer Res., **18**, 711—717 (1958).
80. Taylor A. C., The effect of rate of cooling on survival of frozen tissues, Proc. Roy. Soc., B, **147**, 423—553 (1957).
81. Taylor A. C., Gerstner R., Tissue survival after exposure to low temperature and the effectiveness of protective pretreatments. I. Evaluation by growth in tissue cultures, J. cell. comp. Physiol., **46**, 477—502, 1955.
82. Vieuchange J., Survie du tissu rénal de mammifère conservé in vitro par congélation à —70° C, C. R. Acad. Sci., Paris, **246**, 2409—2412 (1958).
83. Webster J. P., Refrigerated skin grafts, Ann. Surg., **120**, 431—448 (1944).
84. Wolff E., Haffen K., Sur une technique permettant la culture in vitro des gonades embryonnaires des oiseaux, C. R. Acad. Sci., Paris, **234**, 1396—1398 (1952).

Глава 6

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЗАМОРОЖЕННОЙ ТКАНИ ЯИЧНИКА

Анатомию яичника млекопитающих описал еще в 1672 г. Грааф, который доказал, что яичник является местом созревания яйцеклеток. Постепенно стало очевидным глубокое влияние, оказываемое яичником на внешний вид и поведение самок птиц и млекопитающих.

Броун-Секар был твердо убежден в том, что яичники, так же как и яички, представляют собой органы внутренней секреции. Однако лечение самок животных и женщин после овариэктомии различными экстрактами яичников не дало определенных положительных результатов. В 1896 г. Кнауэр показал, что яичники кролика продолжали функционировать после трансплантации их из обычного топографического места в другой участок тела [14, 16]. При удалении яичников и последующей успешной пересадке их в необычное место дегенерация матки предотвращалась, по-видимому, вследствие внутренней секреции трансплантатов [15]. Если же трансплантаты не приживали, наступала атрофия матки. Это обычно и наблюдалось при попытках осуществить гомотрансплантацию. В некоторых опытах, для которых в качестве доноров и реципиентов брали животных одного помета, гомотрансплантаты приживали и в матке не возникало никаких повреждений. Пересаженная ткань яичника даже через много месяцев выглядела

вполне нормальной и здоровой. Штейнах установил, что у кастрированных в раннем возрасте самцов морских свинок и крыс после трансплантации им яичников развивались вторичные женские половые признаки. Таким образом, исчезли всякие сомнения в том, что яичники являются органами внутренней секреции [14].

Способность яичников, пересаженных кастрированным самцам морских свинок, вызывать возникновение у них вторичных женских половых признаков Липшюц [10] использовал для проверки жизнеспособности яичников после хранения in vitro. Эта проверка была связана с большими трудностями ввиду иммунологической несовместимости при несовпадении пола донора и реципиента и необходимости добиться радикальных изменений в морфологии и функциональной активности органов и тканей самца для получения положительных результатов. Тем не менее опыты по имплантации яичников, хранившихся 11 дней при комнатной температуре или 16 дней при 1—3°, дали положительные результаты [10, 12]. В 8 опытах яичники, потерявшие во время высушивания 56% своего веса, приживали и вызывали характерные изменения у самцов, которым они были пересажены [11]. Яичники же, хранившиеся при температуре ниже нуля, никогда не приживали при имплантации их самцам морских свинок [12].

Лонг и Иванс [13] описали цитологические изменения во влагалищных мазках, взятых у грызунов на различных стадиях эстрального цикла. Эти циклические изменения прекращаются после кастрации, но восстанавливаются при успешной трансплантации жизнеспособной ткани яичника [7, 34].

Влагалищные мазки использовали также для проверки функциональной активности ткани яичника, культивированной in vitro при температуре +37° или хранившейся в течение 2—5 дней при +10° и затем пересаженной в переднюю камеру глаза кастрированных крыс [33]. Спустя 8—24 дня после пересадки в мазке появлялись характерные для течки ороговевшие клетки. Когда для имплантации брали кусочки яичников, быстро замороженные в жидком воздухе, во влагалищных мазках при ежедневном исследовании в течение 50 дней не наблюдали ни цитологических изменений, связанных с эстральным циклом, ни ороговевших клеток. Это показывает, что эндокринная ткань не переживала воздействия очень низкой температуры.

В период между 1942 и 1949 гг. проводили опыты по трансплантации свежих яичников в другие участки тела, в том числе в брыжейку, почки, селезенку, ухо и в различные места под кожу [9]. Было получено много ценных сведений о поведении ауто- и гомотрансплантатов и их эндокринной активности при пересадке в различные места и при разных обстоятельствах. Однако за этот же период, по-видимому, не предпринимали попыток трансплантировать ткань яичника, хранившуюся in vitro. К таким опытам вернулись лишь в 1950 г., когда возник вопрос о возможности хранения в замороженном состоянии яиц некоторых млекопитающих (см. гл. 5). Яйца после оттаивания обычно дегенерировали, но некоторые фолликулярные клетки лучистой короны и яйценосного бугорка переживали медленное охлаждение до —79 или —196° и при культивировании давали интенсивный рост. Оставалось не выясненным, способны ли сами выжившие клетки и их потомство секретировать гормоны и восстанавливается ли их обычная функциональная активность в теле животного после трансплантации.

Все указанные выше рассуждения побудили нас провести опыты по трансплантации живым животным ткани яичника, хранившейся in vitro при температуре ниже нуля. В первую очередь надо было обеспечить сохранение жизнеспособности эндокринной ткани. Исследования на изолированном яйце показали, как трудно сохранить зрелые развивающиеся яйца в ткани яичника. Кроме того, если цель опыта состояла в восстановлении оплодотворяющей способности, то яичник нужно было пересаживать в обычное место его анатомического расположения в теле, а это требовало специальной предоперационной подготовки и определенного навыка. Другая проблема заключалась в преодолении иммунологической несовместимости с тем, чтобы гомотрансплантаты свежей или замороженной ткани приживали у других особей данного вида.

Эндокринная активность трансплантатов яичника

Степень выживаемости замороженной ткани определяли на основе данных, полученных в опытах по пересадке свежей ткани, подготовленной к трансплантации различными способами.

АУТОТРАНСПЛАНТАТЫ СВЕЖЕЙ ТКАНИ КРЫСЫ

В предварительных опытах взрослым овариэктомированным крысам имплантировали под кожу часть яичника (от $^1/_3$ до $^1/_2$). Эндокринная активность у всех 24 крыс восстанавливалась в течение 2 недель [24]. Интервал времени до восстановления эстрального цикла зависел от объема имплантированной ткани (табл. 21). Ороговение клеток влагалища задерживалось лишь на 1 день в группе крыс, которым вновь имплантировали оба яичника, разрезанные на 4 части.

ТАБЛИЦА 21

Восстановление эстрального цикла у овариэктомированных крыс после трансплантации ткани яичника [40]

Количество пересаженной ткани, часть одного яичника	Число животных	Число животных с приживши ми трансплантатами	Средний интервал времени до восстановления эстрального цикла, дни
1/4	10	7	12,0
2/4	10	10	8,8
4/4	10	10	7,1
8/4 (2 яичника, каждый разрезан на 4 части)	10	10	6,2

Порции ткани в одну треть или половину яичника, которые в течение 2,5 *час* пропитывали 0,85-процентным раствором NaCl, содержащим 15% глицерина, после аутотрансплантации быстро становились активными. Измельченная ткань, взвешенная в 0,85-процентном растворе NaCl или в физиологическом растворе с примесью глицерина и хранившаяся в течение 1—4 *час* при +20° или 48 *час* при +2°, также хорошо приживала у овариэктомированных крыс. Когда измельченную ткань обрабатывали в течение 1 *час* физиологическим раствором, содержащим 15% глицерина, средний интервал времени между имплантацией и появлением во влагалищном мазке ороговевших клеток составлял 6,7 дней. Следовательно, у большой части фолликулярных клеток по возвращении в организм, из которого они были взяты, восстанавливалась функциональная активность [24]. Кроме того, испытывали влияние аутотрансплантации одного яичника на крысах, у которых другой яичник был оставлен in situ. Полученные результаты подтвердили данные предшествующих исследователей, что трансплантаты яичника плохо приживают, если они вынуждены «конкурировать» с имеющимися яичниками ради гонадотропных гормонов гипофиза.

ГОМОТРАНСПЛАНТАТЫ НЕЗАМОРОЖЕННОЙ ТКАНИ КРЫСЫ

Консервация ткани яичника при низких температурах приобретет еще большее значение, если благодаря ей удастся успешно трансплантировать ткань после длительного хранения. Однако иммунологические реакции могут вызвать гибель клеток, переживших замораживание. В связи с этим большое внимание пришлось уделить изучению гомотрансплантации незамороженной ткани яичника. Предварительные опыты показали, что у капюшонных крыс гомотрансплантаты в пределах одной или разных линий приживали лучше, чем у белых [24]. В последующих опытах такое различие было подтверждено, хотя оно выступало и не так ярко [40]. Полученные результаты приведены в табл. 22.

Средний латентный период до появления эндокринной активности в этих опытах составлял 11,5 дня. В более поздних опытах [19] он в различных группах уменьшился до 6,8—8,3 дня. У 5 капюшонных крыс из 10 яичники, трансплантированные от белых крыс, сохраняли активность в течение 12—15 месяцев. Среди белых же крыс только у 2 животных из 10 спустя 3 месяца

после трансплантации наблюдалось нормальное функционирование яичников, взятых от капюшонных крыс. Таким образом, подтвердилось первое впечатление, что

ТАБЛИЦА 22

Гомотрансплантация ткани яичника крысам разных линий

Реципиенты	Доноры	Число животных	Животные с прижившими трансплантатами	
			число	процент
Капюшонные . .	Капюшонные	10	9	90
Капюшонные . .	Белые	19	16	84
Белые	Капюшонные	18	11	61
Белые	Белые	10	6	60

капюшонные крысы лучше переносят трансплантацию ткани яичника от белых крыс, чем белые от капюшонных [19].

Интересно, что у белых крыс процент приживших и активных через 22 дня гомотрансплантатов ткани яичника от животных одной линии был выше, чем процент приживших гомотрансплантатов кожи. Процент воспринятых организмом и приживших трансплантатов ткани яичника от животных разных линий был ниже у животных, которым раньше подсаживали кожу от тех же доноров (независимо от того, воспринимал ее организм или нет) [1]. Таким образом, ткань яичника, по-видимому, отличается меньшей «тканевой совместимостью» антигенов, чем кожа, но обе ткани имеют некоторые общие антигены.

Характерной анатомической чертой длительное время живущих трансплантатов и особенно гомотрансплантатов было наличие кист. С функциональной точки зрения у крыс-реципиентов наблюдалась некоторая тенденция к замене эстрального цикла состоянием постоянного ороговения. Такие ненормальные явления, которые нельзя связать с антигенными различиями доноров и реципиентов, вероятно, обусловлены плохой васкуляризацией

трансплантатов. Это приводит к неадекватной секреции или ограниченному выделению экстрогенов в кровоток. Передняя доля гипофиза, получая гормоны в пониженной концентрации, выделяет излишнее количество фолликулостимулирующего гормона. Одновременно снижается или вовсе прекращается секреция гипофизом лютеинизирующего гормона. В результате вместо овуляции и развития желтого тела происходит разрастание фолликулов в кисты [19].

На основании изучения гомотрансплантации свежей ткани яичника у крыс можно сделать следующий вывод. Трудности иммунологического порядка, возникающие при трансплантации внутри одной линии, не столь серьезны. Вместе с тем при трансплантации у разных линий антигенная реакция со стороны реципиента бывает настолько бурной, что трансплантаты редко живут более одной-двух недель. Все это, казалось бы, исключало возможность изучения оплодотворяющей способности на свежих или замороженных ортотопических гомотрансплантатах яичников, взятых от животных другой линии с отличительными генетическими признаками. Паркс [20], однако, установил, что реакцию реципиента можно смягчить с помощью интраперитонеальной инъекции взвеси гомогенизированной ткани яичника, взятой от крысы той линии, которую используют в качестве донора. Такую методику еще не применяли при гомотрансплантации замороженной ткани.

АУТОТРАНСПЛАНТАТЫ ЗАМОРОЖЕННОЙ ТКАНИ КРЫСЫ

Предварительные опыты. Порции в одну треть или половину яичника крысы, быстро или медленно замороженные при —79 или —196° (в высушенном состоянии или в 15-процентном растворе глицерина), в большинстве случаев не приживали у животных, которым была проведена аутотрансплантация. В связи с этим в методику опыта внесли некоторые изменения. Яичники перед погружением в физиологический раствор, содержащий 15% глицерина, крошили на мелкие кусочки, чтобы облегчить проникновение глицерина в клетки. Спустя 1—2 *час* пробы замораживали при —79°, затем оттаивали

и трансплантировали. Медленно охлажденная ткань сохраняла эндокринную активность у обеих крыс, которым ее имплантировали, тогда как с быстро замороженной тканью получали отрицательные результаты.

Было проведено несколько серий опытов, в которых тщательно измельченную в различных средах ткань яичника медленно охлаждали до —79 или —196°. Результаты этих опытов (табл. 23) показали, что взвеси ткани

ТАБЛИЦА 23

Результаты трансплантации ткани яичника, хранившейся в замороженном состоянии в течение 9 дней в различных средах [39]

Обработка	Доля животных, имевших трансплантат в течение 28 дней	Средний интервал времени до проявления активности трансплантата, дни
Незамороженную ткань выдерживали в физиологическом растворе, содержащем 15% глицерина, при комнатной температуре в течение 1 *час*	14/14	6,9
Ткань замораживали в физиологическом растворе, содержащем 15% глицерина, при —196°	5/5	14,4
Ткань замораживали в сыворотке, содержащей 15% глицерина, при —196°	5/5	16,4
Ткань замораживали в физиологическом растворе, содержащем 25% глицерина, при —196°	3/5	23,3
Ткань замораживали в сыворотке при —79°	4/4	24,0

яичника, медленно охлажденные до —196° в среде, содержащей 15% глицерина, неизменно давали активные трансплантаты, но латентный период до появления эндокринной активности был почти в два раза больше, чем при аутотрансплантации незамороженной ткани. Взвеси ткани яичника в сыворотке без глицерина переживали охлаждение до —79, но не до —196°.

Разрушение ткани после оттаивания. Интересно отметить, что ткань яичника разрушалась при хранении ее при комнатной температуре после оттаивания. Когда между оттаиванием после замораживания в жидком воздухе и имплантацией проходило 2 *час*, из 10 аутотрансплантатов только 4 сохраняли эндокринную активность. При этом интервал времени между имплантацией и наступлением ороговения клеток во влагалищном мазке увеличивался до 29 дней [24]. В описываемых опытах ткань яичника взвешивали в 0,85-процентном растворе NaCl, содержащем 15% глицерина. Позднее Паркс [22] показал (табл. 24), что выдерживание в течение 3 *час*

ТАБЛИЦА 24

Влияние 3-часовой задержки между оттаиванием и имплантацией [22]

Среда	Доля животных с прижившими трансплантатами	Средний латентный период, дни
Физиологический раствор, содержащий 15% глицерина	0/9	—
Крысиная сыворотка, содержащая 15% глицерина	5/10	19,8
Лошадиная сыворотка, содержащая 15% глицерина	7/9	17,9

при температуре +20° после оттаивания и перед имплантацией полностью разрушает ткань яичника, замороженную в физиологическом растворе, содержащем глицерин, но лишь незначительно снижает выживаемость этой ткани при замораживании ее в сыворотке, содержащей 15% глицерина. Еще более сильное разрушение ткани после оттаивания наблюдалось, когда материал, замороженный в физиологическом растворе с глицерином, переносили в среду, содержащую лошадиную сыворотку, или материал, замороженный в сыворотке с примесью глицерина, переносили в физиологический раствор с глицерином (табл. 25).

ТАБЛИЦА 25

Влияние изменения среды после оттаивания [22]

Среда, в которой ткань замораживали и оттаивали	Среда, в которой ткань находилась в течение 3 *час* перед имплантацией	Доля животных с прижившими трансплантатами	Средний латентный период, дни
Физиологический раствор, содержащий глицерин	Физиологический раствор, содержащий глицерин	1/10	28,0
Физиологический раствор, содержащий глицерин	Обычный физиологический раствор	0/10	—
Физиологический раствор, содержащий глицерин	Лошадиная сыворотка, содержащая глицерин	7/10	23,7
Физиологический раствор, содержащий глицерин	Обычная лошадиная сыворотка	5/10	20,2
Лошадиная сыворотка, содержащая глицерин	Лошадиная сыворотка с постепенным полным удалением глицерина	3/9	23,0
Лошадиная сыворотка, содержащая глицерин	Физиологический раствор, содержащий глицерин	1/10	26,0

Разрушение при температуре —79°. Другое неожиданное, но чрезвычайно важное открытие заключалось в том, что ткань яичника разрушалась в первые 10 дней хранения при —79° (табл. 26). Ткань, взвешенная в 0,85-процентном физиологическом растворе, содержащем 25% глицерина, и согретая после хранения в течение 1 *час* при температуре —79°, давала активный аутотрансплантат в среднем через 16,5 дня у всех 4 крыс, которым она была имплантирована. В то же время ткани, обработанные таким же путем, но хранившиеся при температуре —79° в течение 9 дней, не дали ни одного активного трансплантата через 28 дней. При хранении в среде, содержащей сыворотку, ткани разрушались в

меньшей степени, хотя разрушение и имело место (табл. 26).

При увеличении продолжительности хранения с 9 до 83 дней в условиях температуры —79° в физиологическом растворе, содержащем 15% глицерина, ткани не утрачивали своей потенциальной жизнеспособности [24, 39].

Поразительно, что обработанная глицерином ткань яичника, охлажденная до —190° и хранившаяся при этой температуре, мало подвергалась разрушению (табл. 26). Продолжительность хранения при температуре жидкого воздуха (1 *час* или 9 дней) не играла особой роли: различия в соотношении животных, у которых трансплантаты сохранили активность, а также разница в интервале времени между моментом имплантации и появлением эндокринной активности ткани были весьма незначительными. Полученные результаты показывают, что в ткани, хранившейся при —79°, наступали изменения, которые при —190° полностью прекращались или сильно замедлялись. Вряд ли эти изменения были связаны с химическими реакциями, протекающими очень медленно при температуре —79°. Скорее здесь имели место физические повреждения.

Особый интерес вызывает тот факт, что ткань яичника, переносившая в отсутствие глицерина температуру —79°, разрушалась при —190° (табл. 26). Этого и следовало ожидать, учитывая результаты культивирования яйценосного бугорка. Окончательно было подтверждено, что в интервале температур от —79 до —190° в тканях происходят определенные физические изменения, которые вызывают повреждения клеток и которые можно предотвратить глицерином.

Увеличение концентрации глицерина от 15 до 25% не повышало функциональной жизнеспособности ткани яичника, подвергавшейся в течение 1 *час* или 9 дней воздействию температуры —79 или —190° (табл. 26). В то же время было получено некоторое указание, впоследствии подтвержденное, что при температуре хранения яичников —79° сыворотка представляет собой лучшую среду, чем 0,85-процентный раствор хлористого натрия, независимо от наличия или отсутствия глицерина.

ТАБЛИЦА 26

Результаты трансплантации ткани яичника крысы после хранения в течение 1 *час* или 9 дней при температуре —79 или —190°

Среда	Температура хранения, °С	Продолжительность хранения	Доли животных, имевших активные трансплантаты в течение 28 дней	Средний латентный период, дни
NaCl (0,85%)	—79	9 дней	1/5	27,0
	—190	1 *час*	0/5	—
		9 дней	0/5	—
NaCl (0,85%) + 15% глицерина	—79	9 дней	0/5	—
	—190	1 *час*	5/5	15,4
		9 дней	5/5	14,4
NaCl (0,85%) + 25% глицерина	—79	1 *час*	4/4	16,5
		9 дней	0/5	—
	—190	1 *час*	2/5	24,0
		9 дней	2/5	20,0
Крысиная сыворотка . . .	—79	1 *час*	5/5	23,6
		9 дней	4/4	24,0
	—190	1 *час*	0/5	—
		9 дней	0/5	—
Крысиная сыворотка, содержащая 15% глицерина	—79	1 *час*	5/5	13,6
		9 дней	2/5	18,5
	—190	1 *час*	4/4	15,8
		9 дней	5/5	16,4
Крысиная сыворотка, содержащая 25% глицерина	—79	1 *час*	4/5	17,0
		9 дней	3/5	20,7
	—190	1 *час*	3/5	22,5
		9 дней	2/5	23,0

Продолжительное хранение в жидком воздухе. Следующая задача заключалась в исследовании влияния продолжительного хранения на замороженную ткань

яичника. В качестве объектов для аутотрансплантации яичников брали неполовозрелых крыс весом 60 *г*. Этим уменьшалась возможность смерти крыс от старости во время проведения опыта. Яичники мелко крошили в физиологическом растворе, содержащем 15% глицерина, медленно охлаждали до —79°, хранили при температуре —190° в течение различного периода времени до 1 года и затем имплантировали под кожу. Полученные результаты показывают, что увеличение продолжительности хранения от 1 *час* до 1 года почти не усиливало повреждения ткани яичника, вызываемого замораживанием и оттаиванием (табл. 27).

ТАБЛИЦА 27

Сохранение жизнеспособности ткани яичника, хранившейся продолжительное время при температуре —190° [40]

Продолжительность замораживания ткани, дни	Число имплантаций	Число активных трансплантатов	Средний интервал между моментом имплантации и возобновлением встрального цикла, дни
1/24	5	5	15,4
9	5	5	14,4
83	5	5	18,8
117	8	8	15,1
235	9	9	16,0
367	12	12	16,3

Упрощение методики. Применение автоматического прибора для медленного охлаждения [35] давало почти такие же результаты, как и ступенчатое охлаждение ампул с тканью яичника в холодных банях [25]. Поэтому для повседневной работы было принято это упрощение.

Оставались неразрешенными две более сложные проблемы: как избежать трудоемкого процесса измельчения ткани яичника в стерильных условиях и как сократить расход жидкого воздуха, запас которого необходимо было ежедневно пополнять? На второй год хранения

ткани при —190° произошли неполадки и некоторые ампулы, как выяснилось, были случайно согреты, так что их пришлось выбросить, а материал других при аутотрансплантации давал неудовлетворительные результаты [17]. Результаты исследований, приведенные в табл. 28, показывают, что ткань яичника, разрезанного

ТАБЛИЦА 28

Влияние среды, подготовки ткани и температуры хранения в течение 7 дней на результат аутотрансплантации [25]

Среда	Измельченные яичники				Яичники, разрезанные на 4 части			
	—79°		—190°		—79°		—190°	
	доля животных с прижившими трансплантатами	средний латентный период, дни	доля животных с прижившими трансплантатами	средний латентный период, дни	доля животных с прижившими трансплантатами	средний латентный период, дни	доля животных с прижившими трансплантатами	средний латентный период, дни
Крысиная сыворотка	4/9	23,7	3/10	35,3	4/8	32,0	4/10	30,0
Физиологический раствор, содержащий 15% глицерина . . .	7/10	24,0	10/10	17,0	8/10	22,0	9/10	17,7
Сыворотка, содержащая 15% глицерина . . .	9/10	18,2	8/8	14,7	9/10	20,8	9/10	13,3

на 4 части, переживает замораживание при —79 и —190°. Число животных, у которых трансплантаты прижили, немногим отличалось от числа животных в опытах, в которых в аналогичной среде замораживали мелко изрубленную ткань. Не сильно удлинялся и латентный период

между имплантацией ткани и появлением признаков активности. Эти результаты показывают также превосходство сыворотки (как разбавителя глицерина) над физиологическим раствором независимо от температуры замораживания ткани (—79 или —190°). Доля животных с прижившими трансплантатами слегка уменьшалась, а латентный период удлинялся, когда подсадочный материал хранили в течение 1 недели не при —190, а при —79°.

Учитывая все сказанное, в последующих опытах яичник разрезали на 4 части, взвешивали в сыворотке, содержащей 15% глицерина, охлаждали до —79° и хранили при этой температуре различное время от 1 до

ТАБЛИЦА 29

Влияние продолжительного хранения ткани при —79° в сыворотке, содержащей 15% глицерина [25]

Продолжительность хранения, недели	Доля животных с прижившими трансплантатами	Средний латентный период, дни
1	10/10	23,3
4	8/9	19,0
12	10/10	19,1
26	10/10	20,0
48	9/9	26,6

48 недель. Полученные результаты (табл. 29) показывают, что хранение в течение 1—26 недель не повлияло на долю крыс с прижившими аутотрансплантатами и не удлинило латентный период времени между имплантацией ткани и восстановлением активности. После 48-недельного хранения при —79° этот период был уже значительно больше [25]. Однако ткань яичника, хранившаяся 70 недель при —79° в сыворотке с глицерином, давала функционально активные и нормальные в гистологическом отношении трансплантаты [22].

Как известно, важным компонентом одной из обычных сред, применяемых для консервации обработанных глицерином сперматозоидов быка при температуре —79°, является яичный желток. Однако, когда разрезанные на 4 части яичники взвешивали в 15-процентном растворе глицерина в яичном желтке, охлаждали до —79° и хранили при этой температуре в течение различного времени от 1 недели до 1 месяца, доля крыс, у которых за 28 дней восстановилась функциональная активность аутотрансплантатов, снизилась. В некоторых случаях эндокринная активность восстановилась лишь спустя 3—8 месяцев после имплантации [5].

Гораздо проще было бы хранить ткань яичника при температурах, создаваемых обычными холодильниками, применяемыми в быту, а не при температуре твердой углекислоты. Однако хранение при температуре —20° в сыворотке с глицерином не давало удовлетворительных результатов, и ткань, имплантированная через 8 дней хранения при этой температуре, была нежизнеспособной.

Влияние изменения концентрации и длительности обработки глицерином. Оптимальная концентрация глицерина для защиты сперматозоидов быка от повреждающего действия замораживания при —79°, хранения при этой температуре и оттаивания составляет приблизительно 6—10% в зависимости от концентрации других компонентов среды и точного соблюдения методики охлаждения (см. гл. 2). Действие более низких концентраций глицерина испытывали на яичниках крысы, разрезанных на 4 части, охлажденных до —79° и хранившихся при этой температуре в течение 24 *час* до аутотрансплантации (табл. 30).

В проведенных опытах ни один из трансплантатов, замороженных в отсутствие глицерина, не приживал. Значительно лучшие результаты были получены при содержании в среде 5% глицерина, еще лучшие — при 10% и самые лучшие — при 15%, судя по доле животных с физиологически активными трансплантатами и по продолжительности латентного периода. Степень повреждений, связанных с понижением концентрации глицерина, не увеличивалась при удлинении срока хранения с 24 *час* до 1 месяца.

ТАБЛИЦА 30

Влияние изменения концентрации глицерина на жизнеспособность ткани яичника [22]

Концентрация глицерина в крысиной сыворотке, %	Доля животных с прижившими трансплантатами	Средний латентный период, дни
15	10/10	16,6
10	8/10	20,1
5	7/10	21,6
0	0/10	—
Без среды	0/10	—

Когда кусочки яичника перед замораживанием подвергали воздействию глицерина в течение 18 *час* в условиях комнатной температуры, ни один из трансплантатов не прижил после оттаивания. Если обработку глицерином проводили при 2°, а не при комнатной температуре, то результаты трансплантации также были неудовлетворительными. Сокращение продолжительности обработки глицерином при комнатной температуре до 3—17 *мин* улучшило результаты, судя по среднему латентному периоду до проявления активности трансплантатов. Непродолжительная обработка глицерином допускала применение более высоких концентраций без повреждения тканей (табл. 31) [22].

Скорость охлаждения. В противоположность сперматозоидам быка ткань яичника крысы, взвешенная в сыворотке с 15% глицерина, не повреждалась при резком охлаждении в пределах температур выше нуля [22], но полностью или почти полностью утрачивала жизнеспособность в результате быстрого охлаждения от 0 до —79° [22, 24]. Поэтому ткань яичника, предназначенную для трансплантации, пропитывали сывороткой, содержащей 15% глицерина, в течение 15 *мин* или 1 *час*, а затем подвергали быстрому двухступенчатому охлаждению [22].

ТАБЛИЦА 31

Влияние уменьшения продолжительности пропитывания глицерином перед замораживанием на жизнеспособность ткани яичника [22]

Концентрация глицерина в крысиной сыворотке, %	Продолжительность пропитывания, *мин*	Доля животных с прижившими трансплантатами	Средний латентный период, дни
15	60	18/20	18,7
15	13—17	9/10	13,7
15	3—17	20/20	14,3
20	5—15	8/10	15,4
25	5—15	10/10	14,0

Результаты, приведенные в табл. 32, показывают, что быстрое двухступенчатое охлаждение меньше вредит тканям, которые перед замораживанием в течение 1 *час* обрабатывали глицерином, чем охлаждение до —79° в один прием. Однако доля животных с прижившими, функционально активными трансплантатами была значительно меньше, а латентный период дольше, чем в предыдущих опытах, в которых проводили постепенное охлаждение от 0 до —79°.

Защитное действие других нейтральных растворимых веществ. Помимо глицерина, многие другие нейтральные растворимые вещества оказывают некоторое защитное действие на сперматозоиды быка и эритроциты человека в процессе замораживания при очень низких температурах и последующего оттаивания. Однако до настоящего времени не удалось открыть соединение, которое лучше бы защищало эти клетки или было бы менее токсичным при эффективной концентрации, чем глицерин (см. гл. 2 и 3).

Подобные же результаты были получены и в опытах на ткани яичника крысы. Многоатомные спирты — пропилен-, этилен- и диэтиленгликоль — хорошо защищали ткань при охлаждении до —79° и хранении при этой температуре в течение 24 *час* (табл. 33), но ни одно из этих соединений не было столь эффективным, как глицерин.

Кусочки же яичника, обработанные метанолом, моноэтиловым эфиром диэтиленгликоля или карбоваксом и замороженные при —79°, при имплантации животным совер-

ТАБЛИЦА 32

Действие двухступенчатого быстрого охлаждения до —79° на жизнеспособность обработанной глицерином ткани яичника [22]

Продолжительность пропитывания глицерином	Перерыв в охлаждении		Доля животных с прижившими трансплантатами	Средний латентный период, дни
	температура, °С	продолжительность, *мин*		
1 *час*	— 20	5	11/19	19,5
1 *час*	— 30	5	7/10	19,4
1 *час*	— 20	30	6/10	18,3
15 *мин*	— 20	5	1/9	26,0

шенно не давали активных аутотрансплантатов. Кусочки яичника, взвешенные в 10-процентном растворе метанола, переживали воздействие температуры —20° в течение

ТАБЛИЦА 33

Защитное действие различных многоатомных спиртов на ткань яичника при замораживании [22]

Компонент, добавлявшийся к крысиной сыворотке	Доля животных с прижившими трансплантатами	Средний латентный период, дни
Глицерин, 15%	10/10	16,6
Пропиленгликоль, 12,5% . . .	7/10	18,1
Этиленгликоль, 10%	9/10	22,5
Диэтиленгликоль, 17,5% . . .	8/10	19,0

3 *час* независимо от скорости охлаждения. Однако после 18 *час* хранения при этой же температуре они ни у одной из крыс, которым их имплантировали, не образовали активного трансплантата [22, 23]. Защитное действие мета-

нола было испытано также в условиях промежуточных температур в целях консервации тканей методом лиофилизации. Только в тех случаях, когда процесс высушивания длился несколько дней, из кусочков яичника, замороженных при —79°, удавалось удалить молекулы льда путем возгонки в вакууме. В то же время в диапазоне температур от —10 до —40° возгонка льда совершалась в течение нескольких часов. Метанол представляет собой относительно летучее соединение и полностью удаляется приблизительно за такой же период времени. Остается не ясным, сохранит ли ткань яичника крысы жизнеспособность после ее последующего увлажнения [23]. Воздействие неразбавленным глицерином в условиях комнатной температуры на обработанную глицерином лиофилизированную ткань почти несомненно вызовет необратимые повреждения фолликулярных клеток.

pH среды. Большое влияние на выживаемость эндотелия роговицы и других обработанных глицерином замороженных и согретых тканей оказывает pH защитной среды [36]. В крысиной сыворотке, содержащей 15% глицерина, pH составлял 7,8. Путем добавления в эту среду бикарбоната натрия или уксусной кислоты и ацетата натрия исследовали влияние pH на жизнеспособность ткани яичника. Полученные результаты (табл. 34) показывают,

ТАБЛИЦА 34

Влияние pH суспензионной среды на жизнеспособность обработанной глицерином замороженной ткани яичника [22]

pH среды	Доля животных с прижившими трансплантатами	Средний латентный период, дни
8,8	8/19	18,6
7,8	8/10	22,0
6,8	10/10	18,2
5,8	1/8	21,0
4,8	0/10	—

что выживаемость замороженной ткани яичника несколько повышалась при доведении pH до 6,8. Увеличение щелочности до pH 8,8, оптимального для эндотелия роговицы, уменьшало долю животных с прижившими трансплантатами. Увеличение кислотности до pH 5,8 или 4,8 оказывало еще более вредное влияние.

Облучение замороженной ткани яичника. Разрезанные на 4 части яичники крысы, взвешенные в физиологическом растворе с добавлением 15% глицерина, облучали при комнатной температуре. Ткань, получившая дозу 1000 г, хорошо приживала после имплантации, тогда как получившая дозу 6600 г не дала ни одного трансплантата. При воздействии дозой 3300 г наблюдался промежуточный результат, и у небольшого числа животных были получены активные трансплантаты, но после несколько более продолжительного латентного периода.

В других опытах яичники крысы, разрезанные на 4 части и взвешенные в такой же среде, охлаждали до —79°, затем при этой же температуре облучали при дозе 3300 г, а после оттаивания проводили аутотрансплантацию. Полученные результаты (табл. 35) убедительно показывают, что при —79° облучение меньше по-

ТАБЛИЦА 35

Влияние температуры на вредное действие облучения в опытах на ткани яичника крысы [18]

Ткань	Обработка in vitro ткани до трансплантации	Доля животных с прижившими трансплантатами	Средний латентный период, дни	Доля животных, имевших активные трансплантаты через 7 недель
Необлученная	При комнатной температуре	10/10	7,8	10/10
	При —79°	10/10	12,3	10/10
Облученная, 3300 г	При комнатной температуре	2/10	21,0	0/10
	При —79°	9/10	20,5	5/10

вреждало эндокринную ткань яичника, чем в условиях комнатной температуры. Однако сравнение с контрольным материалом, замороженным, но необлученным, выявляет, что и здесь вредное действие облучения полностью не было исключено.

АУТОТРАНСПЛАНТАТЫ ЗАМОРОЖЕННОЙ ТКАНИ МЫШИ

Нередко приходится сталкиваться с неожиданными различиями в устойчивости к физическим и химическим агентам однотипных клеток и тканей у животных разных видов. В связи с этим исследования, аналогичные вышеизложенным, были проведены на мышах. Методика подготовки и замораживания яичников, а также испытания их выживаемости не отличалась от той, которую использовали в опытах на крысах. Ввиду трудности получения достаточного количества мышиной сыворотки для оценки выживаемости свежей и замороженной ткани яичника использовали 0,85-процентный раствор хлористого натрия и лошадиную сыворотку, содержащие 15% глицерина. Незамороженная ткань, обработанная любой смесью, очень легко давала активные трансплантаты. Ткань же, охлажденная до —79° в физиологическом растворе с добавлением 15% глицерина, согретая и тотчас же имплантированная, давала очень небольшое число трансплантатов, которые к тому же сохраняли активность лишь в течение сравнительно коротких отрезков времени. Ткань, охлажденная в физиологическом растворе с глицерином и хранившаяся при —79° в течение 1 дня, совсем не приживала. В противоположность этому яичники мыши, замороженные в лошадиной сыворотке с добавлением 15% глицерина и хранившиеся при температуре —79°, хорошо приживали и функционировали продолжительное время независимо от продолжительности хранения — 1 *мин*, 1—2 *час* или 1 день.

ГОМОТРАНСПЛАНТАТЫ ЗАМОРОЖЕННОЙ ТКАНИ КРЫСЫ

В контрольных опытах (см. стр. 209) показано, что в противоположность коже свежая ткань яичника в большинстве случаев дает функционально активные и

долгоживущие трансплантаты у капюшонных крыс [1, 19, 20, 24].

В более ранних опытах было установлено также, что трансплантаты обработанной глицерином замороженной ткани приживают. Длительное хранение при температуре —79° в менее адекватной среде или задержка имплантации после оттаивания сокращали долю прижившихся трансплантатов и увеличивали интервал между имплантацией и появлением функциональной активности. Не получено никаких данных о том, что замораживание снижает интенсивность реакции на гомотрансплантаты. Наоборот, дополнительные осложнения, связанные с замораживанием ткани, уменьшали долю животных, у которых прижили гомотрансплантаты ткани яичника (табл. 36). Часть фолликулярных клеток, вероятно, погибала в процессе замораживания и оттаивания, а другая часть—после имплантации. Клетки, по-видимому, разрушались после имплантации и вызывали бурную реакцию на гомотрансплантаты. Интересно отметить, что иммунологическая реакция на гомотрансплантаты замороженной кожи была слабее, когда температура хранения составляла —65, а не —79 или —190° [41]. Сомнительно, однако, чтобы ткань яичника переживала хранение при

ТАБЛИЦА 36

Влияние замораживания и оттаивания ткани яичника крысы на реакцию на гомотрансплантаты [21]

Обработка ткани	Доля животных с приживши трансплантатами	Средний латентный период, дни	Доля животных, имевших активные трансплантаты через 28 дней
Не обрабатывали: свежая ткань	5/10	13,2	2/10
Ткань замораживали при —79° за 2 *час* в физиологическом растворе, содержащем 15% глицерина	2/9	20,0	1/9

такой высокой температуре. На основании результатов предварительных опытов можно было предполагать, что трансплантаты яичников неполовозрелых или новорожденных крыс приживали лучше, чем трансплантаты взрослых животных [24]. Правильность этого предположения подверглась подробному изучению с точки зрения гистологии (см. ниже).

Гистологическое развитие трансплантатов яичников и дальнейшая судьба яиц

ТКАНЬ ЯИЧНИКА ВЗРОСЛОЙ КРЫСЫ

В незамороженных обработанных глицерином кусочках мелко измельченного яичника взрослого животного, использовавшихся в ранних опытах, содержалось много нормальных овоцитов и фолликулов с развивающимися яйцами. Соединительная ткань также выглядела нормально с точки зрения гистологии. После замораживания и оттаивания все яйца в более крупных и в примордиальных фолликулах выглядели разрушенными и дегенерировавшими. Однако большинство фолликулярных клеток, а также клетки соединительной ткани и зародышевого эпителия имели обычный внешний вид и нормальные тинкториальные свойства (фото 15).

В течение первых 2 дней после аутотрансплантации незамороженные обработанные глицерином кусочки подвергались дегенерации и инфильтрации полиморфноядерными лейкоцитами. В это же время отчетливо были видны нормальные яйца в хорошо окрашенных примордиальных фолликулах. Спустя 4—6 дней после трансплантации обнаруживались крупные и мелкие граафовы пузырьки, а на 8-й день появлялось желтое тело. В период между 3-й и 12-й неделями после имплантации трансплантаты обработанной глицерином незамороженной ткани яичника содержали множество фолликулов на различных стадиях развития, а также желтое тело и некоторое количество беспорядочно расположенных клеток соединительной ткани и лютеиновых клеток [24].

В обработанных глицерином замороженных и оттаянных кусочках спустя 24 *час* после имплантации также наблюдалась сильная дегенерация клеток и инфильтрация полиморфными лейкоцитами (фото 16, *А*). Действительно, ни яиц, ни примордиальных фолликулов в аутотрансплантатах двух подопытных крыс в этот период не было обнаружено. Спустя 2—3 дня после имплантации среди общей массы дегенерировавшего материала и полиморфных лейкоцитов появлялись небольшие скопления клеток, сходных по своей структуре и тинкториальным свойствам с клетками соединительной ткани и фолликулярными клетками (фото 16, *Б*). На 4-й день можно было видеть отдельные примордиальные фолликулы, а также разбросанные группы клеток соединительной ткани (фото 16, *В*). В участки дегенерации прорастали веретенообразные клетки, а также вновь образованные капилляры [24]. На 6-й день молодые граафовы пузырьки и примордиальные фолликулы обнаруживались практически во всех участках (фото 16, *Г*). На 8-й день наблюдались небольшие скопления эпителиальных клеток, образующих ацинусы и канальцы, а также беспорядочные образования лютеиновых клеток. Между 11-м и 19-м днями количество лютеиновых клеток увеличивалось и появлялось несколько желтых тел. На этой стадии некоторые фолликулы были окружены слоями лютеиновых клеток. В последующие дни число нормальных фолликулов, содержащих яйца, сильно сократилось. На 22-й день в одном аутотрансплантате был обнаружен лишь один фолликул, окруженный толстым слоем лютеиновых клеток (фото 16, *Д*). Через 98 дней в трансплантате не было ни одного яйца (фото 16, *Е*). В данных опытах яичники замораживали в физиологическом растворе, содержащем 15% глицерина. При замораживании же в сыворотке с добавлением 15% глицерина даже спустя 145 дней после имплантации можно было обнаружить крупные и мелкие фолликулы (фото 17).

Эти результаты ранних исследований позволяли предполагать, что яйца на всех стадиях развития крайне уязвимы и что в процессе замораживания и оттаивания большое число овоцитов в обработанных глицерином кусочках яичника разрушалось. Процесс разрушения

клеток продолжался и далее в течение 24 *час* после аутотрансплантации. Как только восстанавливалось кровоснабжение, начинался процесс регенерации и развития оставшихся в живых различных фолликулярных клеток. Возможно, овоциты образовывались из пережившего зародышевого эпителия между 2-м и 6-м днями после имплантации [24]. Последнее предположение, однако, не подтвердилось в проведенных позднее опытах, в которых взрослым крысам инбредной линии, принадлежащим к одному помету, проводили аутотрансплантацию замороженной или незамороженной ткани яичника, обработанной глицерином [8]. Яичники не измельчали, а разрезали на 12 кусочков каждый и 6 кусочков из 24 замороженной или незамороженной ткани яичника от каждого животного сохраняли для последующего гистологического обследования и подсчета овоцитов. Спустя 2 дня после аутотрансплантации 7 крыс, которым имплантировали незамороженную ткань, и 8 с трансплантатами замороженной ткани забивали; остальные группы животных забивали через 4, 6, 8, 10, 20 и 30 дней после аутотрансплантации замороженной или незамороженной ткани. Готовили серийные срезы трансплантатов и подсчитывали общее число овоцитов в этих срезах, а также и в

ТАБЛИЦА 37

Влияние замораживания и оттаивания на ткань яичника [8]

Интервал после имплантации, дни	Незамороженная ткань		Замороженная ткань	
	среднее число овоцитов в 6 контрольных кусочках	среднее число овоцитов в трансплантатах	среднее число овоцитов в 6 контрольных кусочках	среднее число овоцитов в трансплантатах
2	540	410	600	32
4	670	260	570	29
6	660	450	710	46
8	800	610	720	13
10	690	330	890	24
20	1120	420	830	15
30	320	550	820	32

трансплантированных контрольных кусочках. Средние результаты по каждой группе приведены в табл. 37. Во всех трансплантатах замороженной ткани, взятых спустя 2 дня после имплантации, было обнаружено, по-видимому, нормальное число овоцитов. Овоциты находили также и во всех последующих группах. Статистический анализ показал, что общее число овоцитов в ткани яичника изменялось независимо от продолжительности существования трансплантата. В трансплантатах незамороженной ткани овоцитов было значительно меньше, чем в образце неимплантированного материала, и всегда много больше, чем в трансплантатах замороженной ткани. На основании полученных результатов было сделано заключение, что замораживание и оттаивание не обязательно разрушает все овоциты в ткани яичника взрослой крысы. Овоциты, обнаруживаемые в аутотрансплантатах, не имели повреждений [8].

ТКАНЬ ЯИЧНИКА НЕПОЛОВОЗРЕЛОЙ КРЫСЫ

В предварительных опытах, проведенных на яичниках неполовозрелых крыс, ткань, измельченную в физиологическом растворе с примесью 15% глицерина, охлаждали до —79° [24]. После оттаивания в ней не было обнаружено ни одного нормального яйца, а спустя день после ауто- и гомотрансплантации яйца и фолликулы на всех стадиях развития, по-видимому, дегенерировали. Однако на 4-й день после трансплантации уже имелось много примордиальных фолликулов. В последующие 30 дней трансплантаты из замороженной ткани неполовозрелых крыс содержали больше граафовых пузырьков, чем трансплантаты из замороженной ткани взрослых животных. Ауто- и гомотрансплантаты яичников неполовозрелых крыс, исследованные в период между 38 днями и 16 неделями после имплантации, не отличались от трансплантатов взрослых животных. Они имели хорошо разветвленную сеть сосудов, распространенные участки неравномерно образованных скоплений лютеиновых клеток и небольшие ацинусы, выстланные эпителиальными клетками. В то же время они не содержали ни яиц, ни фолликулов, хотя эстральный цикл у некоторых живот-

ных, судя по влагалищным мазкам, протекал нормально [24]. Когда в качестве среды использовали сыворотку с добавлением 15% глицерина, спустя 10—20 недель после трансплантации замороженных яичников обнаруживали фолликулы, содержащие яйца [22].

Гистологическое исследование трансплантатов ткани яичников неполовозрелых крыс упрощалось, когда яичники перед обработкой глицерином, замораживанием, оттаиванием и имплантацией разрезали только на две части [2]. После пропитывания ткани в физиологическом растворе, содержащем 15% глицерина, бо́льшая часть яиц и окружающих их фолликулярных клеток имела тяжелые повреждения. Правда, некоторые зернистые клетки в крупных и средних фолликулах, а также часть яиц в примордиальных фолликулах имели нормальный вид. Половинки яичников, охлажденные до —79°, а затем согретые, после обработки имели более тяжелые повреждения, но и здесь в примордиальных фолликулах оставалось как-то число, по-видимому, нормальных яиц. Спустя 1 день после гомотрансплантации незамороженных яичников неполовозрелых животных взрослым крысам все трансплантаты были хорошо васкуляризованы и содержали нормальные яйца. На этой стадии гомотрансплантаты замороженной ткани имели самую различную васкуляризацию и внешний вид. Хорошо васкуляризованная замороженная ткань трансплантата через 1 день после пересадки уже была инфильтрирована фибробластами и содержала много примордиальных фолликулов и яиц, окруженных одним-двумя слоями зернистых клеток. Трансплантаты с плохой васкуляризацией были инфильтрированы полиморфноядерными лейкоцитами и не содержали нормальных яиц [2].

Доля нормально развивающихся яиц в замороженных яичниках крысят спустя 24 *час* после гомотрансплантации составляла 1—5% первоначального числа их в имплантируемой ткани [2]. Яйца, взятые на этой стадии, не всегда развивались. В нормальном яичнике в обычных условиях какая-то часть фолликулов дегенерирует на протяжении всей жизни животного, тогда как другая часть достигает зрелости. В период между 2-м и 8-м днями после имплантации дегенерировавшая ткань умень-

шалась в объеме, а фолликулы были крупнее, чем в трансплантатах, исследованных спустя 24 *час*. Через 6—8 дней некоторые фолликулы достигали 150—120 μ в диаметре. Наблюдались также фолликулы, не содержащие яиц и состоящие из зернистых клеток. Некоторые из них, возможно, раньше содержали яйца, тогда как другие могли развиться из выживших зернистых клеток. На 10-й день утолщение внутренней оболочки более крупных фолликулов указывало на наступление процесса лютеинизации. Спустя 28 дней многие фолликулы были окружены лютеиновыми клетками. Были обнаружены также желтые тела, причем некоторые из них содержали остатки дегенерировавших яиц.

Гомотрансплантаты ткани яичников были обычно хуже васкуляризованы, чем аутотрансплантаты яичников неполовозрелых крыс того же возраста. Кроме того, они отличались присутствием лимфоцитов: в некоторых трансплантатах их было немного, в других огромное количество, а в третьих лимфоциты образовывали плотную зону (фото 18). В аутотрансплантатах овуляция происходила чаще, чем в гомотрансплантатах (фото 18, *Б*). Многие фолликулы подвергались лютеинизации без разрыва, так что в них сохранились яйца. Возможно, структура гомотрансплантатов нарушалась в результате уменьшившегося кровоснабжения, что, в свою очередь, снижало доставку гонадотропных гормонов или нарушало их баланс. Попытки изменить эндокринную среду гомотрансплантатов путем введения реципиенту сыворотки жеребой кобылы, чтобы обеспечить гонадотропный стимул, практически не увенчались успехом [3].

Обнадеживал тот факт, что иногда овуляция происходила даже в ткани яичника, имплантированного другой особи в необычное место — под кожу. Было испробовано много различных методик с целью увеличения числа развивающихся яиц, переживших воздействие глицерином и низкой температурой. Так, например, пробовали постепенно повышать концентрацию глицерина, которым обрабатывали яичники неполовозрелых крыс при комнатной температуре или при +38°. В некоторых опытах перед гомотрансплантацией из ткани постепенно удаляли глицерин. В других яичники охлаждали до —79°, оттаи-

вали и трансплантировали либо с глицерином, либо после предварительного постепенного его удаления. Животных забивали спустя 10 дней после гомотрансплантации, поскольку в последующие дни обычно происходила овуляция или лютеинизация фолликулов и число яиц уменьшалось. На серийных срезах определяли число нормальных яиц на всех стадиях развития. Результаты подсчета показали, что яичники неполовозрелых животных, обработанные и замороженные в крысиной сыворотке с примесью глицерина, содержали лишь ненамного больше яиц, чем яичники, обработанные физиологическим раствором с глицерином, но зато при использовании сыворотки яйца не сморщивались. Ни постепенное добавление глицерина в тепле, ни любое другое усовершенствование методики не дали значительного повышения степени выживаемости яиц в гомотрансплантатах яичников неполовозрелых крыс [4]. Наблюдали и значительные различия в числе переживших яиц в яичниках, обработанных аналогичным способом, но имплантированных под кожу различным животным. Число развивающихся яиц в замороженных трансплантатах, по-видимому, обусловлено не столько методикой охлаждения и оттаивания, сколько скоростью восстановления хорошей васкуляризации и другими условиями в месте имплантации.

Вполне вероятно, что хорошее кровоснабжение устанавливается быстрее при ортотопической имплантации замороженной ткани яичника в брюшинную полость. В таких условиях можно было проверить после овуляции оплодотворяемость яиц, переживших замораживание.

Оплодотворяемость замороженной ткани яичника

У крыс, мышей и других грызунов яичники находятся в особой капсуле. Полное хирургическое удаление яичников затруднительно ввиду опасности повреждения бахромчатого конца фаллопиевой трубы. Во время операции можно случайно оставить у животного кусочки ткани яичника, которые впоследствии могут продуцировать оплодотворяющиеся яйца и будут таким образом

затруднять проверку способности к оплодотворению у ортотопических трансплантатов. Тем не менее некоторым исследователям [37, 38] удалось успешно трансплантировать яичники в капсулу яичника кастрированной мыши. Последующий генетический контроль подтвердил, что часть мышей происходила от яиц, развившихся в гомотрансплантате.

Паррот и Паркс внесли дальнейшие усовершенствования в методику опыта. Они стерилизовали самок мышей путем облучения, а затем трансплантировали в капсулу яичников свежую или замороженную ткань яичника. В первых опытах мыши получали одну летальную дозу (900 г). Тотчас же после облучения им вводили внутривенно гомологический костный мозг. Спустя 28 дней 32 мыши из 40 были живы. Из них 18 использовали для контроля и спаривали с самцами. Из 12 спаренных ни одна не забеременела, и спустя 60 дней после облучения у них прекращался эстральный цикл. Через 35—42 дня после облучения остальным 14 животным трансплантировали яичники мышей одной с ними линии. Спустя примерно 10 дней их спаривали с самцами, и из 13 спаренных 8 мышей забеременели и имели потомство. После этого их снова спаривали два раза и получили еще 17 мышат [31]. Затем методику опыта упростили. Мышей облучали в два приема (по 450 г), что устраняло необходимость введения костного мозга. Десять мышей, облученных таким способом, не забеременели, несмотря на частые спаривания их в последующие 17 недель. Пять других стерилизованных таким же путем мышей получили ортотопические гомотрансплантаты. Четыре из них неоднократно беременели и каждый раз приносили нормальное потомство [26, 27]. Гистологическое исследование срезов всей капсулы показало полное отсутствие яиц в облученных атрофированных яичниках. Пересаженные же яичники были хорошо развиты и содержали много яиц в фолликулах различного размера. Ортотопические трансплантаты обработанной глицерином и замороженной ткани яичника хорошо прижили у ряда стерилизованных мышей, которые впоследствии дали потомство (фото 19). Доля животных с прижившими трансплантатами была меньше в тех случаях, когда ткань

яичника предварительно подвергали замораживанию. Тем не менее нет никакого сомнения в том, что пережившие замораживание развивающиеся яйца могут созреть и быть оплодотворены, так что впоследствии будет наблюдаться весь цикл развития плода вплоть до рождения нормальных детенышей [30, 32].

Ортотопическая трансплантация у мышей различных линий часто терпит неудачу в связи с тяжелыми иммунологическими реакциями. Вместе с тем яичники белых хомячков успешно трансплантировали в капсулу яичников облученных золотистых хомячков. Самки последних в некоторых случаях после спаривания с самцами белых хомячков беременели и рождали белых детенышей. Последние явно происходили из яиц, продуцированных имплантированной тканью яичника белого хомячка, поскольку в обычных условиях при спаривании белых и золотистых хомячков всегда получаются гибриды золотистого цвета [26, 27, 29]. В настоящее время у хомячков различных линий после ортотопической гомотрансплантации замороженных яичников получено лишь несколько детенышей. Неудачи при трансплантации, возможно, объясняются очень небольшим числом овоцитов в имплантируемой ткани.

В будущих исследованиях по консервации ткани яичника при низких температурах усилия следует направить на повышение выживаемости овоцитов. Когда последнее будет достигнуто, разностороннее применение метода хранения в условиях низких температур будет зависеть уже от того, насколько мы сумели устранить тяжелые антигенные реакции организма на гомотрансплантаты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Billingham R. E., Parkes A. S., Studies on the survival of homografts of skin and ovarian tissue in rats, Proc. Roy. Soc. B, **143**, 550—560 (1955).
2. Deanesly R., Immature rat ovaries grafted after freezing and thawing, J. Endocrin, **11**, 197—200 (1954).
3. Deanesly R., Cyclic function in ovarin grafts, J. Endocrin., **13**, 211—220 (1956).

4. Deanesly R., Egg survival in immature rat ovaries grafted after freezing and thawing, Proc. Roy. Soc., B, **147**, 412—421 (1957).
5. Deanesly R., Parkes A. S., Delayed development of grafts from frozen ovarian tissue, J. endocrin., **14**, XXXV—XXXVI (1957).
6. Garrison F. H., An Introduction to the History of Medicine, 3rd Edn., Philadelphia, Saunders, 1921.
7. Goodman L., Observations on transplanted immature ovaries in eyes of adult male and female rats, Anat. Rec., **59**, 223—251 (1934).
8. Green S. H., Smith A. U. Zuckerman S., The numbers of oöcytes in ovarian autografts after freezing and thawing, J. Endocrin., **13**, 330—334 (1956).
9. Harris M., Eakin R. M., Survival of transplanted ovaries in rats, J. exp. Zool., **112**, 131—156 (1949).
10. Lipschütz A., Histologie des ovaires isolés et transplantés, C. R. Soc. Biol., Paris, **99**, 533—534 (1928).
11. Lipschütz A., Transplantation d'ovaires après dessiccation, C. R. Biol., Paris, **100**, 95—97 (1929).
12. Lipschütz A., Survival of the isolated mammalian ovary, Proc. 2nd Internat, Congr. Sex Res., p. 94 (1930).
13. Long J. A., Evans H. M., The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena, Mem. Univ. Calif., No. 6 (1922).
14. Marshall F. H. A., The Physiology of Reproduction, 2nd Edn. London, Longmans, Green, 1922.
15. Marshall F. H. A., Jolly W. A., Results of removal and transplantation of ovaries, Trans. roy. Soc. Edinb., **45**, 589—599 (1907).
16. Parkes A. S., The Internal Secretions of the Ovary, London, Longmans, Green, 1929.
17. Parkes A. S., Preservation of tissue in vitro for the study of ageing, Ciba Edn. Colloq. Ageing, **1**, 162—169, 1955.
18. Parkes A. S., Radiation sensivity of ovarian tissue at —79° C, Nature, Lond., **176**, 1216—1217, 1955.
19. Parkes A. S., Survival time of ovarian homografts in two strains of rats, J. Endocrin., **13**, 201—210 (1956).
20. Parkes A. S., Attenuation of host reaction to ovarian homografts, Nature, Lond., **178**, 1228 (1956).
21. Parkes A. S., Viability of ovarian tissue after freezing, Proc. Roy. Soc., B, **147**, 520—528 (1957).

22. Parkes A. S., Factors affecting the viability of frozen ovarian tissue, J. Endocrin., 47, 337—343 (1958).
23. Parkes A. S., Freeze-drying of viable grafts: problems and possibilities, Recent Research in Freezing and Drying, ed. Parkes A. S. and Smith A. U., pp. 304—311, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1960.
24. Parkes A. S., Smith A. U., Regeneration of rat ovarian tissue grafted axter exposure to low temperatures, Proc, Roy. Soc., B, 140, 455—470 (1953).
25. Parkes A. S., Smith A. U., Preservation of ovarian tissue at —79° C for transplantation, Acta endocr., Copenhagen, 17, 313—320 (1954).
26. Parrott D. M. V., Orthotopic ovarian grafts in mice, rats and hamsters, J. Endocrin., 16, XI—XII (1958).
27. Parrott D. M. V., Fertility of orthotopic ovarian grafts, Stud. Fertility, 9, 137—145 (1958).
28. Parrott D. M. V., Ovarian grafting as a method for research into ageing, Gerontologia, 3, 91—96 (1959).
29. Parrott D. M. V., Orthotopic ovarian grafts in the golden hamster, J. Endocrinol., 19, 126—138 (1959).
30. Parrott D. M. V., The fertility of mice with orthotopic ovarian graft derived from frosen tissue, J. Reprod Fertil., 1, 230—241 (1960).
31. Parrott D. M. V., Parkes A. S., Orthotopic ovarian grafting after sterilisation by X-rays, Brit. vet. J., 112, 550—554 (1956).
32. Parrott D. M. V., Parkes A. S., Dynamics of the orthotopic ovarian graft. Sex Differentiation and Development, Mem. Soc. Endocrin., No. 7, pp. 71—80. ed. Austin, C. R. Cambridge, University Press, 1960.
33. Payne M. A., Meyer R. K., Endocrine function of ovarian tissue after growth or storage in vitro, Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., 51, 188—189 (1942).
34. Pfeiffer C. A., Functional capacities of ovaries of new-born after transplantation into adult ovariectomized rats, Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., 31, 479—481 (1934).
35. Polge C., Lovelock J. E., Preservation of bull semen at —79° C, Vet. Rec., 64, 386—398 (1952).
36. Ridge J. W., Freezing of the cornea, Proc. Roy. Soc., B, 147, 531 (1957).
37. Robertson G. G., Ovarian transplantations in the house mouse, Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., 44, 302—304 (1940).

38. Runner M. N., Palm J., Comparison of transplantability of skin, ovary and tumor in mice, Anat. Rec., 108, 537—538 (1950).
39. Smith A. U., Parkes A. S., Preservation of ovarian tissue at low temperatures, Lancet, ii, 570—572 (1951).
40. Smith A. U., Parkes A. S., Storage and homografting of endocrine tissues, Preservation and Transplantation of Normal Tissues, Ciba Foundation Symposium, pp. 76—85 ed. Wolstenholme G. E. W. and Cameron M. P., London, Churchill, 1954.
41. Theilleux, Raby, Vigne, Landon, Mérieux, Weinmann, Rey L. R., Destobbeleire Y., Trautmann O., Preservation of skin by cold after glycerol treatment, Bull. int. Inst. Refrig., 39, 996—998 (1959).

Глава 7

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЗАМОРОЖЕННЫХ ТКАНЕЙ РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНОВ И СИСТЕМ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Женские половые пути

В ранних опытах по замораживанию ткани яичника маленькие кусочки фаллопиевой трубы иногда измельчали в 15-процентном растворе глицерина вместе с яичниками, охлаждали до —79°, выдерживали при этой температуре, оттаивали и затем имплантировали. При гистологическом исследовании трансплантатов обнаруживались хорошо сформировавшиеся канальцы, выстланные мерцательным эпителием, как в фаллопиевых трубах или в ткани яичника. Отдельные кусочки фаллопиевой трубы обрабатывали физиологическим раствором, содержащим 15% глицерина, охлаждали до —79° и хранили при этой температуре. Затем их оттаивали и имплантировали под кожу либо тем же животным, у которых их брали, либо другим. Последующие гистологические исследования показали, что клетки цилиндрического мерцательного эпителия выживали и перерождались в подкожной ткани в тубулярные структуры (фото 20). Бридис и Фэрт в 1938 г. охлаждали мерцательный эпителий трахеи цыпленка до —79° и отмечали после оттаивания движения мерцательных волосков. Позднее было высказано предположение, что эти движения вызывались током жидкости или воздуха. В настоящее время не может быть никаких сомнений в том, что цилиндрический мерцательный эпителий в надлежащих условиях переживает длительное воздействие очень низких температур. Трансплантаты матки или влагалища, замороженные

при —79°, при гистологическом исследовании спустя несколько дней или недель после имплантации не содержали типичного эпителия.

Семенники

Поскольку выяснилось, что сперматозоиды, с одной стороны, и ткань яичника — с другой, переживают обработку глицерином и охлаждение до температуры —79°, возникла мысль о возможности хранения таким же путем и ткани семенника. Были проведены следующие опыты. У 7—9-дневных самцов крыс извлекали семенники, надрезали белочную оболочку, пропитывали семенные канальцы при комнатной температуре физиологическим раствором с глицерином или без него и производили гомотрансплантацию кастрированным взрослым крысам. В течение последующих 3—4 месяцев наблюдали за половым поведением животных. Спустя 12—16 недель после операции их забивали, а семенные пузырьки взвешивали и фиксировали. Трансплантаты также фиксировали для гистологического исследования. Макроскопическое и микроскопическое исследование семенных пузырьков, которые хорошо развились в каждой группе у 5 животных из 8, показало, что они находились под влиянием андрогенных гормонов. В трансплантатах наблюдались большие участки соединительной ткани, окружающей семенные канальцы, выстланные сперматогониями и сперматоцитами первого порядка. В трансплантатах незамороженной ткани не были обнаружены ни сперматиды, ни полностью развившиеся сперматозоиды [65].

При имплантации кастрированным крысам ткани семенника взрослого животного, пропитанной физиологическим раствором, охлажденной до —79° и оттаянной спустя 1 *час*, в трансплантатах не восстановилось эндокринологической активности. Через 12 недель после имплантации животных забили. У 4 животных из 6 были обнаружены очень маленькие трансплантаты, в которых при гистологическом исследовании можно было различить рудиментарную ткань семенника. Семенные пузырьки полностью атрофировались, а в выстилающем эпителиальном слое не было обнаружено никаких при-

знаков воздействия андрогенных гормонов. В противоположность этому в 7 гомотрансплантатах (из 8) обработанной глицерином ткани семенника неполовозрелых животных, охлажденной и хранившейся при —79° в течение 1 *час*, быстро развилась андрогенная активность; об этом можно было судить по результатам спаривания кастрированных крыс, которым эту ткань имплантировали. У забитых животных через 12 недель обнаружили хорошо развитые семенные пузырьки. Трансплантаты имели большую величину и гистологически не отличались от трансплантатов незамороженной ткани [65]. У 6 животных из 8 гомотрансплантаты ткани, хранившейся 1 неделю при температуре —79°, проявили эндокринологическую активность. Число активных трансплантатов уменьшалось по мере увеличения продолжительности хранения при —79°. Ткань, хранившаяся при этой температуре в течение 22 недель, проявляла андрогенную активность только у 4 из 9 кастрированных животных на протяжении 12—16 недель после имплантации. Несколько лучшие результаты были получены при консервации в жидком воздухе (табл. 38). Трансплантаты ткани семенника у этих 4 животных не отличались от гомотрансплантатов свежей ткани семенника неполовозрелых животных. Они содержали соединительную ткань и семенные канальцы, выстланные сперматогониями и сперматоцитами первого порядка.

Семенные канальцы в подкожных трансплантатах ткани семенника не имели выводных протоков, через которые окончательно созревшие сперматозоиды могли бы проникнуть в половые пути. Одно время считали, что именно вследствие этого обстоятельства в трансплантированных семенных канальцах не образовывались сперматиды и сперматозоиды [61, 97]. Однако при гомотрансплантации свежей ткани семенника в переднюю камеру глаза или в мошонку кастрированных самцов крыс, морских свинок и кроликов в этой ткани, несмотря на отсутствие выводных протоков, наблюдались все стадии сперматогенеза, включая окончательное созревание сперматозоидов. Завершение сперматогенеза в таких трансплантатах объясняли наличием более низкой температуры в водянистой влаге и в мошонке [26 61, 97, 100].

ТАБЛИЦА 38

Результаты гомотрансплантации ткани семенника неполовозрелых крыс [65] *

Среда	Температура хранения, °С	Продолжительность хранения	Число животных-реципиентов	Число животных, у которых трансплантаты проявляли андрогенную активность
Физиологический раствор	Не замораживали		8	5
Физиологический раствор, содержащий 15% глицерина	Не замораживали		8	5
Физиологический раствор	—79	1 *час*	6	0
Физиологический раствор, содержащий 15% глицерина	—79	1 *час*	8	7
		1 неделя	8	6
		8 недель	5	2
		22 недели	9	4
Физиологический раствор, содержащий 15% глицерина	—190	1 *час*	16	14
		1 неделя	10	8
		7 недель	6	3
		22 недели	9	7

* Животных забили спустя 12—16 недель после трансплантации.

Более высокая температура в области поясницы и боковой части живота, куда обычно имплантировали крысам семенники после их оттаивания, могла подавлять образование сперматозоидов. Динсли [26] установила, что семенники неполовозрелых крыс, замороженные при —79 или —190°, подвергались полной дифференциации после оттаивания и имплантации в мошонку взрослых кастрированных самцов крыс (фото 21). В замороженн-

ных семенных канальцах в течение многих месяцев вырабатывались нормальные подвижные сперматозоиды, несмотря на полное отсутствие выводных протоков, хотя эти гомотрансплантаты вызывали иммунологическую реакцию со стороны реципиента [26].

Когда препараты ткани семенных канальцев замораживали в растворе Рингера, в них при исследовании непосредственно под микроскопом наблюдалась внутриклеточная кристаллизация льда. На это указывало резкое «затемнение» клеток — результат рассеяния света многочисленными крошечными кристалликами, образовавшимися в клетках. При последующем оттаивании клетки полностью разрушались [89]. Когда ткань помещали на агар, содержащий 15% глицерина, и окружали небольшим количеством раствора Рингера с добавлением 15% глицерина, в среде, окружающей клетки, происходила кристаллизация, но сами сперматоциты и сперматиды не подвергались никаким изменениям, пока температура не достигала уровня от —45 до —50°. В этом интервале температур несколько крупных клеток иногда «затемнялось», что указывало на образование кристаллов льда в цитоплазме. Большинство клеток (а в некоторых случаях и все) оставалось прозрачным и, по-видимому, не замораживалось в течение последующих 15—20 *мин* пребывания при этой температуре. После оттаивания препаратов, пропитанных глицерином, клетки, включая и те, которые содержали кристаллы льда, были интактными и имели нормальный внешний вид [89]. К сожалению, не было никакой возможности определить на стадии замораживания, сохраняли ли они жизнеспособность, а также выяснить, замерзали ли изнутри те клетки, которые впоследствии в имплантатах хорошо размножались и дифференцировались.

Эпидидимис и добавочные железы мужских половых путей

В некоторых трансплантатах замороженных семенников обнаруживались канальцы, выстланные мерцательным эпителием и похожие на канальцы эпидидимиса. В связи с этим был проведен следующий опыт.

Отдельные кусочки эпидидимиса, пропитанные физиологическим раствором с добавлением 15% глицерина, подвергли длительному воздействию температуры —79°, а затем имплантировали под кожу. Месяц спустя животных забили. Под кожей у них были обнаружены узелки, которые, как выяснилось при гистологическом исследовании, состояли из канальцев, выстланных мерцательным эпителием, сильно напоминающим эпителий эпидидимиса (фото 22).

Кусочки предстательной железы и семенных пузырьков, взвешенные в физиологическом растворе с добавлением 15% глицерина, судя по образованию характерных тканевых узелков в подкожных трансплантатах, также переживали охлаждение до —79°, хранение при этой температуре и последующее оттаивание.

Кора надпочечника

К сожалению, никогда не удавалось добиться размножения клеток в культуре ткани коры надпочечника, обработанной глицерином и охлажденной до —79°. Возможно, это обусловлено особыми трудностями, возникающими при культивировании незамороженной ткани надпочечника in vitro [90]. Поэтому было проведено несколько опытов по выявлению жизнеспособности и функциональной активности замороженной ткани коры надпочечника при трансплантации. Методика опыта была несколько усложнена ввиду того, что трансплантаты коры надпочечника не приживают у крысы при сохранении у нее собственных надпочечников. По-видимому, это связано с тем, что количество поступающего в кровоток адренокортикотропного гормона недостаточно для обеспечения роста трансплантата и поддержания функций эндогенных желез [101, 102]. При полном же двустороннем удалении надпочечников большинство крыс погибает в течение нескольких дней [23, 76]. При добавлении к диете хлористого натрия продолжительность жизни оперированных крыс увеличивается [80]. Наличие мозгового слоя препятствует успешной трансплантации надпочечника. Поэтому надпочечники извлекали целиком, разрезали их пополам и отделяли мозговое вещество. Затем

кору надпочечника имплантировали или под кожу или в капсулу почки адреналэктомированных крыс. В течение последующих двух недель животные получали пищу с высоким содержанием солей. За эти две недели имплантированная свежая ткань коры надпочечника давала активные трансплантаты, которые позволяли животным жить на обычной диете. Еще через две недели у многих крыс ткань коры надпочечника восстанавливала в достаточной степени свою функцию и крысам можно было давать пищу с низким содержанием хлористого натрия [63]. При имплантации под кожу активность в трансплантатах восстанавливалась медленнее, чем при имплантации в капсулу почки. Число животных, проживших шесть недель после операции, включая две недели на диете с низким содержанием солей, увеличивалось, когда имплантировали бóльшие количества ткани коры надпочечника. Наилучшие результаты были получены при аутотрансплантации под кожу четырех половинок свежих надпочечников, из которых было удалено мозговое вещество. Из 28 крыс 26 жили шесть недель после адреналэктомии. Когда для такого же опыта взяли ткань коры надпочечника, выдержанную в течение 1 *час* в физиологическом растворе с добавлением 15% глицерина, из 30 крыс с удаленными надпочечниками 26 жили шесть недель, включая две недели на диете с низким содержанием солей. У этих животных трансплантаты хорошо прижили и развивались. В других опытах кору надпочечника, обработанную физиологическим раствором с добавлением 15% глицерина, охлаждали до —79°, через 1 *час* согревали, а затем, как и в предыдущих опытах, проводили аутотрансплантацию под кожу. В этой группе до конца испытательного периода из 28 животных выжило только 7. В другой группе число выживших животных было больше, так как для трансплантации брали железы, предварительно подвергавшиеся замораживанию в забуференной среде с низкой концентрацией солей, содержащей 20% глицерина. Впоследствии из 10 адреналэктомированных крыс 9 прожили 6 недель после опытов, в которых осуществлялась аутотрансплантация коры надпочечника, охлажденной до —79° в забуференной гипотонической среде с примесью 20% глицерина.

В третьей группе из 10 крыс, получивших трансплантаты, замороженные в среде, содержавшей 15% глицерина, также выжило 9 животных [63]. Таким образом, нет никаких сомнений, что клетки коры надпочечника крысы в присутствии глицерина переживают воздействие температуры — 79°, хотя оптимальная среда для хранения этих желез при данной температуре еще не выяснена.

Щитовидная железа и паращитовидные железы

Щитовидная железа является первой железой, для которой было показано, что ее структурные единицы, судя по гистологическому исследованию аутотрансплантатов, устойчивы к воздействию очень низких температур [18]. У морских свинок вырезали щитовидные железы и либо погружали их непосредственно в жидкий азот на 10 *мин*, либо помещали в запечатанных ампулах емкостью 20 *мл* на 24 *час* в сосуды с твердой углекислотой. После оттаивания их имплантировали тем же животным в подкожный карман на передней стенке живота. Спустя 13 дней после аутотрансплантации щитовидных желез, выдержанных 24 *час* при температуре —79°, 9 животных забили. У одной морской свинки хорошо сохранившаяся ткань паращитовидной железы окружала центральный участок рыхлой соединительной ткани, содержащей коричневый пигмент и фагоциты. У другого животного был обнаружен участок ткани щитовидной железы, состоящей из маленьких фолликулов, выстланных кубическим эпителием. В одной из клеток наблюдался митоз, что и рассматривалось как показатель жизнеспособности ткани. У 7 морских свинок при обследовании на 13-й день в трансплантатах была обнаружена некротизированная ткань. Гистологическое исследование проводили через 11, 13 или 15 дней после имплантации. В контрольных опытах при имплантации незамороженной ткани в большей части центрального участка щитовидных желез в течение первых 24 *час* наступал некроз. В области некротизированной ткани отмечалась инвазия фибробластов, и к 13-му дню ткань была полностью замещена. Только на 20-й день наблю-

далась значительная регенерация фолликулов щитовидной железы [18]. Полученные результаты показывают, что гистологическое исследование трансплантатов замороженной ткани не имеет смысла проводить ранее, чем через 20 дней после имплантации.

Семи морским свинкам в течение 3—4 дней давали тиротропин. У каждого животного брали дольку щитовидной железы и замораживали ее при —190° в течение 10 *мин*. Затем дольку железы оттаивали и имплантировали той же морской свинке, у которой ее вырезали. Из 7 животных 4 погибли через три дня. В извлеченных после смерти, хорошо сохранившихся трансплантатах не было обнаружено никаких признаков некроза. Две другие морские свинки погибли на 5-й день. В центральной части их аутотрансплантатов наблюдался некроз, но периферические фолликулы хорошо сохранились. Последняя морская свинка выжила, но через 11 дней трансплантат был полностью замещен соединительной тканью. Блюменталь и Уолш [18] пришли к заключению, что быстрое охлаждение до —190°, во время которого, по-видимому, происходит витрификация внутри- и внеклеточной воды, вызывает меньшее повреждение щитовидной железы, чем медленное охлаждение до —79°, сопровождающееся процессом замораживания. Однако нецелесообразно сравнивать трансплантаты, взятые у животных, погибших через 3—5 дней после имплантации, с трансплантатами, взятыми на 13-й день у живых животных. Когда в жидкий азот погружают такой большой кусочек ткани, как щитовидная железа морской свинки, вряд ли он будет охлаждаться настолько быстро, что произойдет витрификация вне- и внутриклеточной воды. Процесс охлаждения здесь несколько замедлен, так как пузырьки газа, обволакивающие ткань, изолируют ее от воздействия холодной среды. Как бы то ни было, скорость охлаждения может играть меньшую роль, чем длительность воздействия очень низкой температуры. Как правило, не следует сравнивать жизнеспособность тканей, быстро замороженных при одной температуре, и тканей, медленно замороженных при другой температуре. Интересно, что в опытах Блюменталя и Уолша из четырех щитовидных желез, погруженных на 10 *мин* в жидкий азот и хранившихся в течение 24 *час* при температуре —79°, две прекрасно сохранились, как показало гистологическое исследование, проведенное спустя 11 дней после аутотрансплантации. Фолликулы были выстланы кубическим и цилиндрическим эпителием, а, кроме того, некоторые клетки находились на стадии митоза.

Стюарт и др. [91] впервые применили глицерин для защиты ткани щитовидной железы при хранении в условиях низких температур. Они установили, что можно получить активные трансплантаты, имплантируя щитовидные железы, предварительно обработанные 15- или 20-процентным раствором глицерина и подвергшиеся воздействию температуры —79° в течение 1 дня. Жизнеспособность ткани уменьшалась при понижении концентрации глицерина и увеличении продолжительности хранения до 1 месяца. Гистологическое исследование для определения жизнеспособности ткани эти авторы проводили спустя 28 дней после имплантации.

Паркс [64] при исследовании функционального состояния замороженной и незамороженной ткани щитовидной железы следил не только за ростом тироидэктомированных животных, которым имплантировали щитовидную железу, но и за поглощением радиоактивного иода (I^{131}) прижившими трансплантатами. Крысы, которым имплантировали ткань щитовидной железы, замороженную при —79° в сыворотке без глицерина, отставали в своем росте, а поглощение радиоактивного иода в трансплантатах было незначительным. Крысы же, которым имплантировали ткань, охлажденную до —79° в сыворотке с добавлением 15% глицерина, росли нормально. Кроме того, в таких трансплантатах наблюдалось хорошее поглощение радиоактивного иода.

Опубликованная в 1950 г. работа Блюменталя и Уолша [18] вызвала особый интерес. Она зародила сомнение в правильности теории, согласно которой передача злокачественных опухолей от одной особи другой при имплантации раковых, саркоматозных и лейкемических клеток всецело зависит от наличия вируса. Эта теория была впервые выдвинута в 1908 г. Салвин-Муром и Баррэтом [85] и нашла подтверждение в сделанном

впоследствии открытии, что куриная саркома Рауса, биттнеровская карцинома молочной железы у мышей и некоторые опухоли у кроликов передаются ультрафильтратами бесклеточных экстрактов. Указанную теорию поддерживали также Ги, Манн и некоторые их сотрудники. Они полагали, что опухолевые клетки погибают при замораживании и оттаивании. Тот факт, что опухоли удавалось переносить от одного животного к другому с помощью ткани, подвергавшейся замораживанию при —79° или лиофилизации, служил, по их мнению, убедительным доказательством связи любого новообразования с присутствием вирусов, которые, как известно, переживают такую обработку [34, 53, 54]. Опыты по трансплантации замороженной ткани щитовидной железы показали выживание и размножение здоровых клеток после хранения при очень низких температурах. Таким образом, нет никакой надобности привлекать вирус для объяснения развития рака после имплантации свежих или замороженных злокачественных клеток. Исключение составляют такие особые случаи, как упомянутые выше куриная саркома Рауса и карцинома молочной железы у мышей. Работы Пасси и его сотрудников [67—69] подтверждают правильность взгляда, что передача различных опухолей путем имплантации замороженного или лиофилизированного материала связана с выживанием некоторого количества злокачественных клеток. Доля выживших клеток зависит от природы опухоли, состава окружающей среды и методики лиофилизации. Вопрос о жизнеспособности замороженных опухолей рассмотрели Биллингэм [11] и Креги [24].

Селезенка и костный мозг

Перед исследователями открылись новые перспективы, когда было установлено, что мыши, облученные летальными дозами рентгеновских лучей, выжили после имплантации им в брюшную полость здоровой ткани селезенки [38, 39]. Облученные мыши и морские свинки выздоравливали также после внутривенного введения взвеси гомологичного костного мозга [51]. Особый интерес вызвал тот факт, что мыши после облучения летальной дозой выживали при введении им костного мозга морской свинки или крысы [22, 50]. На первых порах казалось невероятным, чтобы гомотрансплантаты, а тем более гетеротрансплантаты костного мозга приживали. Возникло предположение, что защитным агентом служило какое-то гормональное или гуморальное вещество, содержащееся в селезенке и костном мозге [37].

Другие данные заставляли предполагать, что живые клетки донора выживают в организме облученного реципиента и обусловливают выздоровление последнего [5—7]. Активный агент в селезенке и костном мозге утрачивает свою активность при хранении в течение нескольких часов при комнатной температуре или в течение 48 час при температуре +4 или —15°. Неорганические частицы и различные биохимические соединения в таких условиях могут сохранять свою специфическую активность, тогда как бóльшая часть живых клеток погибает. В то же время клетки выживают, если ткань селезенки предварительно охладить до —79° и выдерживать при этой температуре в среде, содержащей глицерин. Барнс и Лутит [8] измельчали селезенку мышей линии СВА в сыворотке, содержащей 15% (по объему) глицерина, и разливали полученную взвесь в ампулы, которые затем медленно охлаждали, применяя ту же методику, что и при охлаждении сперматозоидов быка и ткани яичников. Спустя 2—17 дней ампулы отогревали, а их содержимое гомогенизировали и вводили мышам, которых не более чем за 1 *час* до инъекции облучали летальной дозой 950 г. Результаты опытов приведены в табл. 39. Многие животные оставались живы спустя 30 дней после облучения и введения охлажденной и хранившейся при температуре —70° взвеси, эквивалентной по количеству ткани целой селезенки. Когда количество вводившейся ткани сократили до $^1/_5$ объема селезенки, число выживших мышей (как контрольных, получавших свежую ткань, так и подопытных, которым вводили замороженную ткань) уменьшилось. В других опытах материал хранили при температуре —70° в течение 83 дней до инъекции его мышам, облученным летальной дозой 950 г. Спустя 28 дней 4 мыши из 5, получивших количество ткани,

эквивалентное 1 селезенке, и 3 мыши из 5, получивших 1/5 селезенки, были еще живы [8].

Результаты других опытов также подтвердили участие живых клеток в процессе защиты животных от облучения. Так, предварительная инъекция (до облучения) клеток селезенки от мыши другой линии, вызывающая иммунологическую реакцию, полностью уничтожала терапевтический эффект второй инъекции (после облучения) клеток селезенки мыши той же линии [6, 7]. Когда проводили одну инъекцию гомологичных клеток после облучения, собственные и искусственно вызванные антитела донора не исчезали и содержание антител в крови реципиента, по-видимому, увеличивалось (см. [32]).

Была найдена такая линия мышей (Т6), у которых во время метафазы делящихся клеток костного мозга выделялась особая пара хромосом. В результате этой аномалии, обусловленной неадекватной реципрокной транслокацией двух самых маленьких членов нормального набора хромосом, животные были гетерозиготами. Взвешенные клетки селезенки от мышей линии Т6 вводили мышам линии СВА, облученным летальной дозой. Спустя 5—49 дней после инъекции облученных животных забивали и их костный мозг подвергали цитологическому исследованию. В каждом случае в клетках костного мозга во время митоза была обнаружена характерная хромосома мышей линии Т6 [32]. Полученные результаты показывают, что клетки донора заменили большую часть клеток костного мозга реципиента. Таким образом, не осталось никаких сомнений в том, что клетки селезенки, обработанные глицерином и хранившиеся при —70°, выжили и «заселили» костный мозг и другие ткани облученных животных, которым эти клетки были введены. Нормальная иммунологическая реакция со стороны реципиента на введение гомологичной ткани была, по-видимому, подавлена в результате вызванного ионизацией повреждения тканей и клеток, обычно вырабатывающих антитела.

Хромосомы крысы отличаются от хромосом мыши как по форме, так и по величине. Эти различия хорошо видны на фото 23, на котором показаны при сильном увеличении хромосомы крысы и мыши в клетках костного

ТАБЛИЦА 39

Выживание мышей линии СВА в течение 30 дней после облучения при дозе 950 г [8]

Группа		Внутривенное введение	Количество введенной ткани, доля селезенки мышонка	Доля выживших мышей по группам	Всего
Опыт 1	I (контроль)	Стерильный физиологический раствор	—	0/5 0/5 — 0/10 0/10 0/10	0/40
	II	Измельченная ткань селезенки свежая	1	4/4 4/5 5/5 5/5 0/5 5/5	23/29
		свежая	1/5	3/5 5/5 — 5/5 0/5 1/5	14/25
	III	Измельченная ткань селезенки, хранившаяся при —70°			
		2 дня	1	4/5 1/5 0/5 — 5/5 —	10/20
		9 дней	1	— — — — — 5/5	5/5
		17 дней	1	— — — 4/5 — —	4/5
		2 дня	1/5	0/2 0/5 1/5 — 0/5 —	1/17
		9 дней	1/5	— — — — — 3/4	3/4
		17 дней	1/5	— — — 4/5 — —	4/5
Опыт 2		83 дня	1	— — — — — —	4/5
		83 дня	1/5	— — — — — —	3/4

мозга во время митоза. Когда мышам, получившим летальные дозы рентгеновских лучей, вводили взвеси только что взятых у крыс клеток костного мозга, через 5, 11 и 19 дней в их костном мозге можно было обнаружить делящиеся клетки, причем хромосомы имели конфигурацию, типичную для хромосом крысы. Из 1400 клеток, исследованных во время митоза, ни в одной не было найдено хромосом с конфигурацией, типичной для мыши [32]. В этом случае иммунологическая реакция на гетерологичные клетки была устранена облучением у реципиента клеток, которые в обычных условиях вырабатывают антитела. Позднее Барнс [3] вводил мышам, облученным летальной дозой, костный мозг крысы, который он предварительно обрабатывал глицерином, охлаждал до —79° и хранил при этой температуре в течение 2—83 дней. Выживших мышей забивали спустя 40 и 360 дней после облучения. У 4 животных из 6 при обследовании костного мозга и других тканей были отчетливо видны крысиные клетки. На фото 24, на котором костный мозг одного из подопытных животных показан при незначительном увеличении, его нельзя отличить от нормального костного мозга.

Феррби и его сотрудники показали, что доза обработанного глицерином замороженного костного мозга, необходимая для сохранения жизни мышам, облученным летальной дозой и обреченным на гибель в течение 30 дней после облучения, сравнима с дозой свежего незамороженного костного мозга, применяемой в подобных же случаях. Эти авторы подсчитывали общее число ядерных клеток в материале, предназначенном для инъекции, однако такой подсчет не всегда служил адекватным критерием «ценности» костного мозга донора [30]. Феррби и сотрудники испытывали также различные методы замораживания и оттаивания костного мозга мыши и проверяли жизнеспособность клеток по эффективности их защитного действия на мышей, облученных летальной дозой рентгеновских лучей. Оказалось, что быстрое замораживание снижало жизнеспособность как предварительно обработанных, так и не обработанных глицерином клеток донора. Зато при медленном охлаждении по методу Полджа и Лавлока [71] материал, предназначенный

для инъекции, прекрасно сохранялся независимо от содержания в среде 5—15% глицерина или полного отсутствия его. В клетках костного мозга, обработанных глицерином, при перемещении их в лишенную глицерина среду in vitro наступал лизис. Тем не менее при введении таких клеток облученным животным они все же предотвращали их гибель. В то же время осмотический лизис можно было предупредить, понижая концентрацию глицерина по методу Словитера [87]. Результаты, суммированные в табл. 40, показывают, что костный мозг прекрасно сохранялся в продолжение не менее 6 недель при температуре —80°, судя по его защитному действию при введении облученным животным.

Функциональную активность замороженных клеток костного мозга мыши и человека проверяли также по их способности после оттаивания синтезировать in vitro дезоксирибонуклеиновую кислоту [30]. Применяли методику Томаса и Локта [93]. Поскольку синтез ДНК неразрывно связан с процессом размножения клеток, результаты исследования, вероятно, служили хорошим показателем числа жизнеспособных клеток. Как видно из результатов, суммированных в табл. 41, клетки костного мозга мыши в меньшей степени, чем клетки человека, повреждаются при обработке 15-процентным раствором глицерина и замораживании. Эти результаты позволяют предполагать также, что при любом методе замораживания костного мозга погибает довольно много клеток. Наиболее благоприятной средой для выживания клеток, охлажденных до —80°, судя по их способности синтезировать ДНК после оттаивания, служила смесь, содержащая 15% глицерина и сыворотку или альбумин. Когда перед опытом после оттаивания постепенно удаляли глицерин, результаты были еще лучше.

Костный мозг человека собирали от мертворожденных плодов и трупов взрослых, а также извлекали из резецированных ребер. Клетки костного мозга обрабатывали глицерином и вводили больным без каких-либо неблагоприятных последствий. Обработанный глицерином костный мозг трупов охлаждали до —80° и хранили при этой температуре несколько недель. Затем его оттаивали и вводили больным, которых в целях лечения лей-

ТАБЛИЦА 40

Действие внутривенного введения костного мозга, хранившегося 6 недель при температуре — 80°, на выжимаемость мышей, получивших летальную дозу рентгеновских лучей (900 г) [30]

Обработка	Доля животных, прожив-ших 30 дней
Контроль	
1. Только воздействие рентгеновскими лучами	0/10
2. Введение свежего костного мозга — $1 \cdot 10^8$ клеток в основной жидкой среде (Tc 199 *, 10% мышиной сыворотки и гепарин — 20 *мкг/мл*)	10/10
3. Введение свежего костного мозга — $1 \cdot 10^8$ клеток в основной среде с добавлением 15% глицерина . . .	9/10
Введение консервированного костного мозга (в каждом случае $1 \cdot 10^8$ клеток)	
4. В Tc 199 с добавлением 5% человеческого альбумина	7/7
5. В Tc 199 с добавлением 5% альбумина и 15% глицерина	4/5
6. В Tc 199 с добавлением 5% альбумина и 15% глицерина, но с понижением концентрации глицерина по методу Словитера перед введением	6/6
7. В основной среде с добавлением 5% глицерина . .	10/12
8. В основной среде с добавлением 5% глицерина, но с понижением его концентрации по методу Словитера	8/12
9. В основной среде с добавлением 15% глицерина . .	14/18
10. В основной среде с добавлением 15% глицерина, но с понижением его концентрации по методу Словитера	6/6

* Имеющаяся в готовом виде в продаже жидкость, применяемая в качестве культурной среды.

коза подвергли облучению большими дозами рентгеновских лучей, в результате чего они заболели апластической анемией. В одном случае последующее улучшение состояния больного позволило предполагать, что клетки костного мозга пережили замораживание и стали размножаться в организме реципиента [96].

Ранние исследования по трансплантации свежего и замороженного костного мозга облученным животным и человеку стимулировали дальнейшую разработку методик получения материала, а также введения и хранения тканей, взятых у плодов, неполовозрелых и взрослых животных и людей [29, 31, 70]. Другие способы проверки выживаемости свежего или замороженного костного мозга включают культивирование ткани in vitro, изучение подвижности клеток и микроскопическое исследование препаратов после их окрашивания с целью дифференцировки живых и мертвых клеток [27, 49, 72]. На основании полученных данных можно полагать, что повреждение клеток всегда происходит во время хранения костного мозга при низких температурах и что это связано, по крайней мере частично, с добавлением или удалением глицерина. Миелоидные клетки, по-видимому, повреждаются сильнее, чем молодые клетки эритроцитарного ряда. Тем не менее костный мозг, обработанный глицерином, медленно охлаждавшийся до —79° и хранившийся при этой температуре, также способствует выздоровлению после облучения [49].

Непосредственный и отдаленный эффекты имплантации, а также дальнейшую судьбу ауто-, гомо- и гетеротрансплантатов свежего и замороженного костного мозга интенсивно изучали не только на мышах и людях, но и на крысах, кроликах, собаках и других животных, получивших разные дозы рентгеновских лучей как в здоровом состоянии, так и при различных заболеваниях. Посвященная этому вопросу обширная литература в основном рассмотрена в обзорных статьях [4, 21, 25, 47, 73, 74]. Одна из основных трудностей заключается в том, что животные, получившие смертельную дозу облучения, а затем как будто бы излеченные с помощью трансплантации свежего или замороженного гомологичного костного мозга, через 3—4 месяца погибают от «вторичной

ТАБЛИЦА 41

Сравнение синтеза ДНК в клетках костного мозга человека и мыши, подвергшихся замораживанию с помощью различных методик [30]

Методика замораживания	Суспензионная среда	Радиоактивность 1 *микромоль* тимина, выделенного из ДНК, *имп/мин*			
		человек		мышь	
			среднее		среднее
Выдерживали при 4°	Основная (с гомологической сывороткой)	19 000 18 200	18 600	3340 3950	3645
По Барнсу и др. [6]; замораживали при —80° и оттаивали при 37°	Основная (с гомологической сывороткой)	222 164	193	135 90	112
Выдерживали при 4°, затем удаляли глицерин по методу Словитера	Основная с добавлением 15% глицерина	10 130 11 500	10 815	567 111	339
По Барису и др. [6]; замораживали при —80°, оттаивали при 37°, затем удаляли глицерин по методу Словитера	Основная с добавлением 15% глицерина	8 000 7 650	7 825	486 —	486
Выдерживали при 4°	Основная с добавлением 5% человеческого альбумина	23 600	23 600	3780 3920	3850
По Барнзу и др. [6]; замораживали при —80° и оттаивали при 37°	Основная с добавлением 5% человеческого альбумина	184	184	180 82	131

болезни». На основании имеющихся данных можно полагать, что их гибель обусловлена иммунологической реакцией хорошо приживших клеток трансплантата против клеток и тканей реципиента. Эта вторичная болезнь может протекать в легкой форме в тех случаях, когда тканевая несовместимость между трансплантатом и реципиентом слабо выражена или когда используют незрелую миелоидную ткань [9]. Так, введение костного мозга от одного близнеца другому оказалось очень эффективным при лечении тяжелого лейкоза, вызванного большими дозами облучения [94, 95]. В то же время введение гомологичного костного мозга (не от близнеца) больным, случайно подвергшимся облучению слишком большими дозами рентгеновских лучей, давало весьма сомнительный эффект (см. [4]).

В заключение можно сказать, что мы уже владеем методами сохранения жизнеспособности молодых клеток костного мозга всех трех типов путем обработки их глицерином, охлаждения и консервации при низких температурах. Однако эти методы требуют дальнейшего усовершенствования для увеличения числа жизнеспособных клеток после оттаивания и имплантации. Правда, ценность трансплантации костного мозга облученным животным и людям несколько снижается наличием иммунологических реакций, в частности антигенной реакции приживших клеток против тканей реципиента. Задача заключается в преодолении таких нежелательных реакций (без влияния в то же время на выработку организмом антител к различным бактериям, их токсинам и другим чужеродным белкам), причем решение этой задачи, вероятно, в еще большей степени не терпит отлагательства, чем задачи хранения костного мозга.

Кожа

Более 150 лет прошло с тех пор, как Баронио вырезал у овцы кусочки кожи во всю ее толщину и спустя определенные промежутки времени (до 1 *час*) успешно имплантировал их той же овце. В конце XIX столетия Реверден, Оллье, Тирш и Волф сообщили о своих кли-

нических случаях успешной аутотрансплантации кусочков кожи. Применявшиеся ими методы пересадки носят их имена. Мартин в 1873 г. одним из первых стал хранить кожу при температуре чуть выше нуля для последующей трансплантации. Он пришел к выводу, что охлаждение способствует сохранению жизнеспособности кожи in vitro, тогда как тепло дает отрицательный эффект. В 1903 г. Венчер выдерживал в стерильных условиях кусочки кожи при температуре +4° в течение 2 недель и при последующей аутотрансплантации обнаружил хорошее приживление большей части трансплантатов. Каррел показал, что наилучшей средой для хранения кожи при +4° служит вазелин [33]. Уэбстер, широко применявший трансплантацию консервированной кожи, сообщил о 23 больных, которым 36 раз были имплантированы охлажденные кусочки их собственной кожи. Все трансплантаты, хранившиеся при +4° менее 21 дня, прижили. Хотелось бы, однако, добиться более продолжительного хранения замороженной кожи при очень низких температурах или после ее лиофилизации [98].

Между тем, изучая трансплантацию раковых и саркоматозных опухолей, Майдер и Мортон [60] обнаружили, что клетки многослойного плоского эпителия в контрольных кусочках кожи переживали замораживание при —50 и —74° и последующее оттаивание. Во всех опытах нормальную или малигнизированную ткань имплантировали под кожу. Через 10 дней имплантаты извлекали, фиксировали, делали срезы и окрашивали их. В замороженной коже крысы образовывались видимые подкожные узелки, подобные образующимся при гомотрансплантации свежей кожи. Исследование под микроскопом показало, что выжившие клетки многослойного плоского эпителия образовали под кожей кисты, в которых обнаруживались волосы. Наличие митотических фигур свидетельствовало о размножении этих клеток. При медленном охлаждении клетки повреждались в меньшей степени и в трансплантатах наблюдалась более выраженная регенерация. К сожалению, в описываемых опытах не удалось выяснить, как будет функционировать замороженная кожа при трансплантации ее в обычное местоположение на поверхности тела.

Уэбстер [98] удалял у больного участки кожи со следами татуировки и трансплантировал его собственную же кожу, быстро замороженную при —79°. Некоторые трансплантаты прижили, но бóльшая часть их отторглась. Лучших результатов удалось добиться при аутотрансплантации лиофилизированной кожи.

Примерно в это же время Бриггс и Джанд [19] разработали надежную методику аутотрансплантации кожи у экспериментальных животных, которая заключалась в следующем. На спине и на животе мыши вырезали одинаковые круглые кусочки кожи диаметром 9,5—10 *мм*. Кожу со спины пришивали на животе и наоборот. Перед закреплением трансплантата его поворачивали под углом 45—180°, а затем покрывали кусочком целлофана и накладывали вокруг туловища животного полоску лейкопластыря. Через 5 дней обследовали трансплантаты и снимали швы. Трансплантаты всегда приживали, хорошо васкуляризировались и в последующие несколько недель прорастали шерстью. По длине и направлению роста волос их можно было отличить от окружающей кожи. Опыты повторили, используя кожу, замороженную приблизительно при —79°. В первых опытах кусочки кожи с живота мыши помещали на увлажненной рингеровским раствором полоске фильтровальной бумаги во внутреннюю трубку двойной пробирки. Затем последнюю опускали в сосуд Дьюара, заполненный измельченной в порошок твердой углекислотой. В течение 1,75—2,2 *мин* температура кожи снижалась от 0 до —15°, а затем в течение незарегистрированного периода времени — от —15 до —78,5°. Спустя 1—12 *час* внутренние пробирки перемещали в водяную баню с температурой +30°, в которой образцы оттаивали приблизительно за 1 *мин*. Затем 18 мышам трансплантировали на спину кусочки их собственной кожи, причем 6 трансплантатов из 18 прижили.

Во втором опыте применяли ту же методику охлаждения, но круглые кусочки кожи с живота складывали таким образом, чтобы внутренняя поверхность кожи не соприкасалась с внешней средой. В результате кожа не контактировала с раствором Рингера и охлаждалась медленнее, так что температура снижалась от 0 до —15°

за 2,5—3 *мин*. После пребывания в течение 1—6 *час* при температуре —78,5° кусочки оттаивали и трансплантировали на спину; 62% трансплантатов прижили. В третьем опыте кусочки кожи с живота охлаждали на льду и замораживали, как во втором опыте. Затем их быстро оттаивали, непосредственно поливая раствором Рингера с температурой 25°. Кусочки прикладывали, не пришивая, к области дефекта на спине животного; 78% трансплантатов прижили, и у них полностью восстановилась функциональная активность. Полученные данные окончательно показали возможность восстановления нормального функционального состояния кожи, замороженной при —79°, после трансплантации ее на поверхность тела живого животного [19]. Они позволяют предполагать, что медленное охлаждение и быстрое согревание дают наилучшие результаты и что при внесении в эту методику небольших изменений можно будет получить еще более высокий процент приживления трансплантатов.

Еще в 1873 г. Конгейм показал, что охлаждение кожи у интактного животного вызывает ее повреждение. Так, ушные раковины кролика, замороженные при —7 или —8°, распухали, при —10 или —16° воспалялись, а при —18 или —20° наступал некроз. Согласно Лейку [46], кожа человека как in situ, так и в виде лабораторных препаратов переносит без ущерба замораживание при —6°, но не при более низкой температуре. Следует отметить, что приведенные данные находятся в резком противоречии с результатами, полученными другими исследователями [19, 60, 98]. Крейбергу и сотрудникам удалось показать, что при замораживании и оттаивании кожи на поверхности тела в подкожных кровеносных сосудах наступает стаз, приводящий к отеку, полному прекращению местного кровообращения и в конечном счете — некрозу [43, 45]. Гибель замороженной непосредственно на теле кожи не обусловлена гибелью отдельных клеток [44]. При замораживании у интактных мышей ушных раковин при —79 или при —190° во всех случаях наступал некроз кожи и стаз в подкожных сосудах (фото 25). В противоположность этому лоскуты замороженной кожи, вырезанные вскоре после оттаивания и трансплантированные

в подкожный карман на боку у того же животного, приживали, причем формировался многослойный эпителий (фото 26). Выживаемость эпителия понижалась по мере увеличения промежутка времени между оттаиванием ушной раковины, с одной стороны, и вырезанием и трансплантацией кожи — с другой [44]. Некоторые результаты опытов суммированы в табл. 42.

ТАБЛИЦА 42

Трансплантация замороженной кожи [44]

	Общее число случаев трансплантации	Число случаев некроза
Контрольный опыт I		
Ушную раковину замораживали с помощью твердой CO_2 на 5 *сек* и обследовали через 7 дней	48	48
Контрольный опыт II		
Лоскут свежей кожи с ушной раковины трансплантировали в подкожный карман	30	22 (2/3)
Основной опыт		
а) Ушную раковину замораживали на 5 *сек* и трансплантировали сразу же после оттаивания	22	14 (2/3)
б) Ушную раковину трансплантировали спустя $3—3\frac{3}{4}$ *час* после оттаивания	12	3 (1/4)
в) Ушную раковину трансплантировали спустя $5\frac{1}{3}—6$ *час* после оттаивания	20	5 (1/4)

Кожный покров млекопитающих представляет собой исключительно сложную систему тканей, которая состоит из дермы с сальными и потовыми железами, окруженными сложными сплетениями коллагеновых и эластических волокон многослойного плоского эпителия, а также придатков — волос и ногтей (когтей). Толщина много-

слойного плоского эпителия, степень кератинизации и пигментации, так же как и рисунок кожи, зависят от расположения сосочков в нижележащей дерме и характерны для кожи в любом участке тела [16, 58]. Функциональное выживание кожных трансплантатов можно определять не только по росту многослойного плоского эпителия, но и по его цвету, по рисунку кожи и толщине кутикулы на его поверхности. Рост, структура, цвет и направление волос, наличие сальных и потовых желез также служат показателем восстановления функциональной активности трансплантата. Кроме того, на хорошее состояние трансплантатов во всю толщу кожи может указывать и анатомическое расположение коллагеновых и эластических волокон в дерме, васкуляризация кожи, а также число и типы различных клеток [14].

Биллингэм и Медавар [14] подробно изложили основные положения, касающиеся трансплантации свежей ткани у животных, описали различные методики и внешний вид приживших и неприживших трансплантатов через различные сроки после трансплантации. В своих опытах они применяли эти методики и пользовались разными показателями для определения выживаемости различных компонентов кожи, замороженной при низких температурах. Для замораживания и трансплантации использовали пигментированную кожу ушной раковины взрослого кролика. Каждый трансплантат представлял собой плоский кружок кожи диаметром 9 *мм* и толщиной 0,25—0,5 *мм*, так что в нем сохранялась бо́льшая часть волосяных фолликулов. Кусочки кожи замораживали и оттаивали с помощью различных методик и трансплантировали в область дефекта на боковой поверхности груди животного, у которого брали кожу. Одновременно с замороженной тканью всегда трансплантировали кусочек свежей кожи, не подвергшейся никакой обработке.

Перед замораживанием кусочки кожи пропитывали в течение 1 *час* при комнатной температуре раствором Рингера или же раствором Рингера с добавлением 15% (вес/объем) глицерина. Затем их помещали на смазанную вазелином полоску медной фольги внутренней поверхностью наружу. Некоторые кусочки замораживали

быстро, погружая медную полоску в баню с изопентаном, охлажденным в жидком воздухе до температуры ниже —150°. Другие замораживали медленно, помещая медную пластинку во внутреннюю трубку двойной пробирки, причем расстояние между внутренним и внешним сосудами равнялось 3 *мм*. Эту двойную пробирку охлаждали в течение 15 *мин* в замораживающей смеси из спирта и углекислоты до —79°, после чего помещали на 15 *мин* в баню с жидким воздухом при температуре —190°. В заключение медную полоску с кусочками кожи извлекали из пробирки и погружали в изопентан. Несколько кусочков кожи быстро согревали, погружая медную полоску в мензурку с раствором Рингера, нагретым до +37°. Остальные кусочки согревали медленно, для чего медную полоску переносили в пустой сосуд, обложенный битым льдом. В этом случае на оттаивание кожи требовалось не менее 5 *мин*. После этого кусочки кожи трансплантировали тем же животным, у которых они были иссечены [14, 15]. Для того чтобы выявить выживаемость различных компонентов кожи, опытные и контрольные трансплантаты обследовали и сравнивали сначала на 8-й день после трансплантации, а затем каждые 4 дня. Выживание клеток мальпигиевого слоя подтверждалось развитием нормального эпителия, а меланобластов — пигментацией поверхностного эпидермиса и возобновлением роста пигментированных волос. На сохранность нормальной фиброзной структуры дермы указывала отчетливая граница между окружающей тканью и трансплантатом, который сохранял характерный для кожи ушной раковины вид, а также плотность покрывающего его волосяного покрова и направление роста волос. При нарушении фиброзной структуры дермы центральная часть трансплантата выглядела мертвой, белой и постепенно уменьшалась в объеме, а волосяной покров сильно редел. Полученные результаты показывают, что эпителиальные клетки интактной кожи, обработанной раствором Рингера, переживали как быстрое, так и медленное замораживание при условии быстрого оттаивания. В присутствии 15% глицерина эпителий интактной кожи переживал и быстрое и медленное оттаивание (табл. 43). В то же время меланобласты кожи ушной

раковины кролика не переживали быстрого замораживания в растворе Рингера независимо от скорости оттаивания. Они погибали также при медленном оттаивании

ТАБЛИЦА 43

Выживание (+) или гибель (0) эпителия кожи ушной раковины кролика в различных условиях [59]

Замораживание	Оттаивание	Предварительная обработка	
		раствор Рингера	раствор Рингера, содержащий 15% глицерина
Быстрое	Быстрое	+	+
Быстрое	Медленное	0	+
Медленное	Быстрое	+	+

в присутствии 15% глицерина (табл. 44). В трансплантатах кожи, обработанных 15-процентным раствором глицерина и медленно охлажденных, не обнаруживалось никаких повреждений после хранения их в течение 4 ме-

ТАБЛИЦА 44

Выживание (+) или гибель (0) меланобластов кожи ушной раковины кролика в различных условиях [59]

Замораживание	Оттаивание	Предварительная обработка	
		раствор Рингера	раствор Рингера, содержащий 15% глицерина
Быстрое	Быстрое	0	+
Быстрое	Медленное	0	0
Медленное	Быстрое	+	+

сяцев при температуре —79° при условии быстрого оттаивания. По внешнему виду они не отличались от кусочков свежей кожи, трансплантированных в одно с ними время. Качество трансплантатов, обработанных раствором Рингера, всегда было ниже. Кожа сморщивалась и утрачивала вид, характерный для кожи ушной

раковины. Например, волосяной покров становился очень редким и частично или полностью исчезали пигментация [15]. В последующих опытах Биллингэм [10] обнаружил, что трансплантаты кожи, предварительно обработанной глицерином, медленно охлажденной до —79° и хранившейся при этой температуре более одного года, не отличались от пересаженных в одно время с ними трансплантатов свежей кожи. С тех пор кожу хранили в течение 4 лет при —79° без какого-либо ущерба для ее физиологических свойств. Были подготовлены также взвеси эпидермальных клеток, содержащие как клетки мальпигиева слоя, так и меланобласты. Эти взвеси замораживали, быстро сливая их по капле в тонкостенную пробирку и вращая последнюю под определенным углом в жидком воздухе. Другие пробы клеточной взвеси медленно охлаждали в двойной пробирке, погруженной в жидкий воздух, после чего внутреннюю пробирку погружали в жидкий воздух. Затем пробы быстро согревали, перенося пробирки в водяную баню с температурой +37°. Клеточную взвесь центрифугировали, компактную массу эпителиальных клеток отбирали пипеткой и трансплантировали в область дефекта. О выживании клеток мальпигиевого слоя судили по регенерации эпителиального слоя, а о наличии живых меланобластов — по пигментации этого слоя. Из данных, приведенных в табл. 45, видно, что эпителиальные клетки, взвешенные порознь в растворе Рингера, не переживали ни быстрого, ни медленного замораживания, тогда как

ТАБЛИЦА 45

Выживание (+) или гибель (0) изолированных эпителиальных клеток кожи ушной раковины в различных условиях [15]

Замораживание	Оттаивание	Предварительная обработка	
		раствор Рингера	раствор Рингера, содержащий 15% глицерина
Быстрое	Быстрое	0	+
Медленное	Быстрое	0	+

клетки мальпигиевого слоя и меланобласты переживали как быстрое, так и медленное замораживание при условии присутствия в среде 15% глицерина и быстрого оттаивания.

Хемфилл и Браун [35] испытывали влияние 15-процентного раствора глицерина на выживаемость толстых (во всю толщу кожи) и тонких трансплантатов кожи мыши. Они подтвердили данные Биллингэма и Медавара, согласно которым выживаемость трансплантатов повышается при обработке глицерином, медленном охлаждении и быстром согревании. В то же время Кили и др. [42], трансплантируя кожу собаки после охлаждения до —196° и оттаивания, получили лучшие результаты при сверхбыстром охлаждении, чем при замораживании кусочков кожи, помещенных в сосуд Дьюара на расстоянии 2—3 *см* от поверхности жидкого азота. Результаты, судя по доле прижившихся трансплантатов, были еще лучшими, когда кожу перед сверхбыстрым охлаждением от 20 *сек* до 3 *мин* обрабатывали этиленгликолем. При такой обработке и хранении в течение 46—66 дней при температуре —70° в 86% случаев отмечалось хорошее, стойкое приживление трансплантатов. Кили и др. (в соответствии с общепризнанной в то время теорией Люйета) предполагали, что этиленгликоль обезвоживал кожу, которая затем в процессе сверхбыстрого замораживания переходила в стекловидное состояние. Тейлор [92] добился хороших результатов при быстром охлаждении кожи крысы, особенно в тех случаях, когда он предварительно обрабатывал ее этиленгликолем или глицерином. Возможно, разница в полученных результатах обусловлена видовыми различиями кожи собаки и крысы, с одной стороны, и мыши и кролика — с другой. В настоящее время общее мнение склоняется в пользу медленного охлаждения [40] и предварительной обработки кожи глицерином или этиленгликолем [75].

За последние годы некоторые исследователи при изучении влияния глицерина и других многоатомных спиртов, а также процессов замораживания и оттаивания на клетки многослойного плоского эпителия кожи человека и животных применяли методику культуры тканей. Полученные ими результаты (см. гл. 5) подтверждают устойчивость клеток к замораживанию при условии быстрого их оттаивания, а также благоприятное действие предварительной обработки глицерином или родственными ему веществами. И сейчас уже нет никаких сомнений в том, что с помощью указанных защитных агентов кожу животных и человека можно хранить продолжительное время при очень низких температурах в состоянии «приостановленной» жизни. После быстрого оттаивания многие клетки оживут, в них восстановится способность к росту и делению in vitro или in vivo. Более того, ткань в целом представляет собой живой трансплантат, способный полностью выполнять нормальную функцию кожи при ортотопической трансплантации той же особи, у которой она была взята несколько месяцев или даже год назад. Это может иметь большое значение с терапевтической точки зрения. Так, во время операции можно получить без вреда для больного кусочки кожи и сохранять их для дальнейшего использования, например при лечении тяжелых ожогов или ампутации конечностей, или же на всякий «непредвиденный» случай. С биологической точки зрения кожу можно использовать после хранения в течение различных периодов времени в условиях очень низких температур для получения «возрастных химер» (согласно терминологии Медавара), способствующих выяснению некоторых явлений, связанных со старением. Замороженную кожу, разумеется, можно применять для гомотрансплантации. Как и свежий гомотрансплантат, она фиксируется в первые дни после трансплантации и даже, возможно, будет расти в течение первых двух недель. Вместе с тем окончательному приживлению кожи будет препятствовать иммунологическая реакция реципиента на чужеродную ткань. Если эту реакцию не подавить или не изменить, то скорее всего последует отторжение трансплантата. Доказано, что хранение кожи при несколько неблагоприятной температуре (—60°) изменяет ее антигенные свойства, не влияя на выживаемость [75].

В течение всего периода времени до отторжения гомотрансплантаты кожи могут служить хорошим защитным покровом при ожогах или других травмах. Они предотвращают потерю жидкостей и преграждают путь

инфекции, пока больной не оправится от первоначального шока [20]. Еще большее значение приобрели бы банки для хранения кожи при низкой температуре, если бы такие средства, как 6-меркаптопурин либо какое-нибудь другое вещество или антиметаболит, подавляющие реакцию взрослого животного на растворимые антигены [86], снимали иммунологическую реакцию на кожные трансплантаты.

Роговица

Еще в 1771 г. Квенгси высказал предположение о возможности замены рубцовоизмененной помутневшей роговицы хрустальной линзой соответствующей формы. С тех пор неоднократно предпринимались попытки заменить роговицу искусственными линзами, и в последние годы для этой цели использовали различные пластмассы. Однако недостаток таких линз, который не удалось устранить до настоящего времени, заключается в том, что они выпадают или плохо действуют на зрение в результате образования позади них фиброзной ткани. Прошло 120 лет с той поры, как Киссам осуществил первую трансплантацию роговицы у человека. Для замены рубцовоизмененной роговицы он использовал роговицу поросенка. Непосредственно после операции зрение больного улучшилось, но позднее трансплантат помутнел и в конце концов превратился в рубцовую ткань. С тех пор в литературе время от времени появлялись сообщения об успешной гетеротрансплантации роговицы у человека и животных [83]. В большинстве случаев, однако, гетеротрансплантация роговицы не удавалась. Вместе с тем накопился обширный клинический и экспериментальный материал, показывающий, что при ортотопической имплантации в переднюю камеру глаза гомологичная роговица дает удовлетворительные, никогда не мутнеющие трансплантаты. В конце XIX и в начале XX вв., когда фон Хиппель и Цирм проводили первые работы в этой области, нередко приходилось хирургическим путем удалять глаза с еще прозрачной роговицей. Таким образом, в распоряжении врачей всегда было необходимое количество роговицы для трансплантации. С годами,

однако, положение изменилось в связи с применением консервативных методов лечения некоторых заболеваний. Кроме того, потребности в трансплантатах возросли благодаря увеличению числа хирургов, овладевших этим методом. В 1922 г. Филатов сообщил, что удовлетворительные результаты при гомотрансплантации давала роговица трупов, которую он предварительно хранил в холодильнике. Впоследствии было установлено, что роговицу можно брать у трупа на протяжении 15 *час* после смерти и с успехом имплантировать после хранения в течение 2—3 недель in vitro в стерильном жидком парафине при температуре +4°. Во время хранения жизнеспособность клеток, вероятно, постепенно снижается [83].

Успех ортотопической гомотрансплантации роговицы находился в явном противоречии с неудачами, на которые были обречены попытки ортотопической гомотрансплантации кожи человека и животных [56, 57]. Единственно возможное объяснение заключалось в том, что имплантированная роговица как бы создает почву для прорастания клеток реципиента и, следовательно, не обязательно должна быть живой. Вряд ли можно сомневаться в том, что эпителий, покрывающий переднюю поверхность трансплантата, постепенно замещается гомологичными клетками реципиента. Известны случаи удовлетворительного приживления роговицы, лишенной эпителиального слоя [17, 81, 82]. В то же время существуют предположения, что для удовлетворительного приживления трансплантатов клетки собственно ткани роговицы должны быть живыми [17]. Так, почти все исследователи находят, что роговица, предварительно фиксированная в формалине, спирте или других химических соединениях, убивающих клетки, а также роговица, облученная летальными дозами рентгеновских лучей, вскоре подвергается фиброзному перерождению и утрачивает прозрачность, даже если она как будто бы прижила и в нее проросли клетки реципиента. Смельсер и Озэйникс [88] обнаружили также, что роговица, замороженная при температуре жидкого азота, приживала после гомотрансплантации, но сохраняла прозрачность в течение не более 4 дней. Затем она становилась как бы подернутой дымкой и отечной, и в нее постепенно прорастали кровенос-

ные сосуды из склеры реципиента. К концу второй недели после имплантации роговица была совершенно мутной и к концу 4-й или 5-й недели оставалась мутной и плохо снабжалась кровью. Спустя различные периоды времени после операции — от 6 недель и до 2 месяцев — приживленные трансплантаты или становились совершенно мутными, или еще просвечивали, но никогда не были прозрачными.

Смельсер и Озэйникс [88] замораживали весь глаз кролика. В 8 опытах глаза́ вначале погружали в изопентан, охлажденный жидким азотом, а затем переносили в жидкий азот, из которого извлекали спустя различные сроки — от 2 *час* до 3—4 дней. После этого глаза оставляли для оттаивания при комнатной температуре и, когда роговица уже достаточно оттаяла, а водянистая влага и остальная часть глаза были еще в замороженном состоянии, иссекали трансплантат. В настоящее время известно, что такое медленное оттаивание гибельно для многих клеток, в том числе и для клеток кожи, которые могут пережить замораживание и быстрое оттаивание [14, 17]. Не доказано, что роговица, замороженная, хранившаяся при очень низкой температуре и затем согретая без участия каких-либо защитных агентов, даст устойчивые прозрачные трансплантаты. Вейсс и Тейлор [99] сообщили об удовлетворительных результатах гомотрансплантации лиофилизированной роговицы. Роговицу крысы замораживали в изопентане при —150°, затем в течение нескольких дней из нее при —40° удаляли влагу и после этого ее хранили в запаянных пробирках. После оводнения роговица приобретала нормальную консистенцию и имела обычный вид. При гомотрансплантации такая роговица давала удовлетворительные трансплантаты. В трансплантат роговицы прорастали клетки реципиента, но она оставалась прозрачной. Позднее многие авторы [1, 41] изучали судьбу трансплантатов лиофилизированной роговицы у кроликов, морских свинок и других животных и обнаружили, что, несмотря на успешное приживление, все трансплантаты впоследствии стали мутными.

Недавно, однако, Энаф сообщил о целом ряде замечательных опытов, в которых гомо- и гетеротрансплантация лиофилизированной роговицы дала прекрасные функциональные результаты [36]. Энаф в сотрудничестве с Рэ [36, 75] усовершенствовал методику лиофилизации. Большое значение в ней играла скорость замораживания ткани до возгонки льда в высоком вакууме. Наилучшие результаты получали при быстром замораживании ткани в жидком пропане при —196° (табл. 46). Лиофилизацию осуществляли в специальном аппарате, который допускал

ТАБЛИЦА 46

Функциональный результат трансплантации лиофилизированной роговицы [36]

Замораживание	Охлаждающая баня	Конечная температура, °С	Продолжительность замораживания	Продолжительность пребывания в охлаждающей бане, *мин*	Результат после лиофилизации
Медленное	Порошкообразная, твердая CO_2	—79	10—15 *мин*	30	—
Быстрое	Жидкий азот	—196	8—9 *сек*	5	+
Быстрое	Замораживающая смесь спирт—CO_2	—79	3—5 *сек*	5	++
Быстрое	Жидкий пропан при —196° (5 *сек*), а затем жидкий азот	—196	1,5 *сек*	5	+++

возгонку льда при температуре около —50°. Весь процесс лиофилизации занимал 12 *час* при использовании диффузионного насоса, создающего вакуум 10^{-3} *мм* рт. ст. Затем ткань увлажняли, добавляя физиологический раствор при комнатной температуре. Гистологическое строение роговицы полностью сохранялось. В то же время входящие в ее состав белки изменялись ввиду хорошего приживления как гетеро-, так и гомотрансплантатов. Роговица кролика, например, приживала в глазах собак, и наоборот. Имели место также случаи удачной гетеро-

трансплантации лиофилизированной роговицы у людей (фото 27).

Насколько нам известно, результаты Энафа еще никем не повторены. Вероятно, это объясняется тем, что консервация роговицы с помощью лиофилизации требует сложной дорогостоящей аппаратуры и квалифицированного обслуживающего персонала. Метод охлаждения до низких температур в присутствии глицерина значительно проще. Первыми стали хранить обработанную глицерином роговицу при очень низких температурах Роб и Исткот [79]. Они воздействовали на роговицу животных и человека физиологическим раствором, содержащим 15% глицерина, и охлаждали ее до —79° по методике, применявшейся для ткани яичника. Роговицу хранили при этой температуре до самой трансплантации, когда ее быстро согревали при +40°. Предварительные результаты были обнадеживающими; трансплантаты в виде тонких пластинок, обработанные таким путем, приживали и оставались прозрачными в течение 6 недель. Другие результаты гомотрансплантации замороженной роговицы человека опубликовали Исткот и др. [28]. Материал для трансплантации брали у трупов как можно скорее после смерти, максимум через 12 *час*. В некоторых случаях консервировали роговицу во всю толщу ткани, а в других снимали пластинки различной толщины, с тем чтобы иметь в своем распоряжении трансплантаты требуемой толщины. Трансплантаты того и другого вида помещали в стерильные бутыли с завинчивающимися пробками и заливали раствором Рингера, содержащим 15% глицерина при pH 6. После выдерживания их в течение 1 *час* в комнатной температуре бутыли погружали в охлаждающую смесь, состоящую из спирта и углекислоты с температурой —79°, а затем хранили в твердой углекислоте различное время от 3 дней до 9 месяцев. За это время pH среды, по-видимому, значительно снижался в связи с растворением CO_2. Роговицу оттаивали как можно быстрее, погружая бутыли в водяную баню с температурой +40°. Замороженные трансплантаты имплантировали таким же способом, как и свежий материал. Результаты первых 12 наблюдений приведены в табл. 47. Все трансплантаты в виде тонких

пластинок прижили и вели себя во всех отношениях как свежая ткань. В течение всего периода клинического наблюдения, который в ряде случаев длился 10 месяцев, они оставались прозрачными. В двух случаях трансплантации (во всю толщу) замороженной роговицы также были получены успешные во всех отношениях результаты [28]. В трех случаях такая трансплантация имела лишь частичный успех — трансплантаты сохранили прозрачность только в центральной части. Остальные два трансплантата полностью помутнели, и пришлось заново осуществить трансплантацию на этот раз свежей роговицы.

Успешные результаты, полученные при имплантации трансплантатов в виде тонких пластинок, позволяют предполагать, что клетки эпителия роговицы, а также собственно ткани роговицы переживали охлаждение до —79°. Биллингэм проверял жизнеспособность эпителиальных клеток, пересаживая обработанные глицерином замороженные тонкие трансплантаты роговицы кролика в специально подготовленный на груди участок, с которого была удалена кожа [13]. На границах, отделяющих окружающую кожу от гетеротрансплантатов замороженной роговицы, хранившейся 1 месяц при —79°, появились пояски типичного для роговицы прозрачного эпителия. После этого уже не оставалось никаких сомнений в том, что большое число эпителиальных клеток переживало замораживание при —79°, хранение при этой температуре и последующее оттаивание [17]. Показано [2], что клетки собственно ткани роговицы также переживают замораживание при —79°. Роговицу морских свинок обрабатывали раствором Рингера, содержащим 15% глицерина, охлаждали до —79° и хранили при этой температуре в течение 30 дней. После оттаивания ее имплантировали под кожу морским свинкам. Приблизительно через 20 дней реципиентам ввели радиоактивный сульфат ($-S^{35}O_4$), а еще через 16 *час* трансплантаты извлекли и подвергли гистологическому исследованию. Радиоавтограммы показали одинаковое поглощение S^{35} собственно тканью роговицы как в свежих, так и в замороженных трансплантатах. Следовательно, клетки,

ТАБЛИЦА 47

Трансплантация роговицы [28]

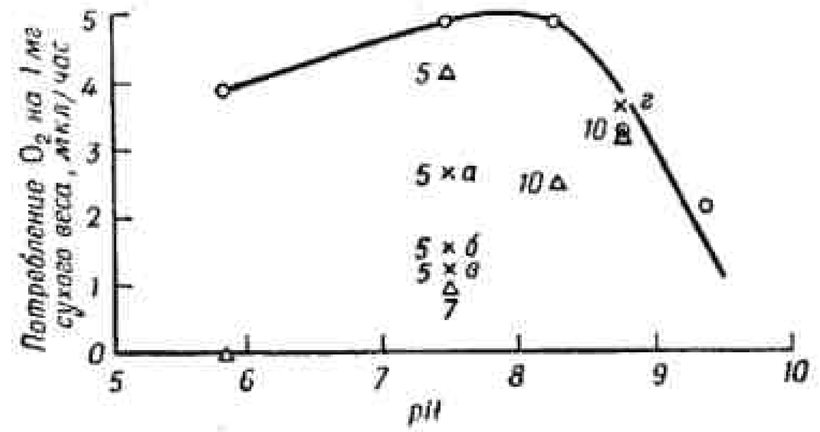
№ наблюдения	Тип трансплантата	Показания	Продолжительность замораживания	pH среды после оттаивания	Результаты
1	В виде тонких пластинок	Рубцовое изменение роговицы. Подготовка к трансплантации во всю толщу	3 дня	5,8	Успех
2	Во всю толщу	Рубцовое изменение роговицы как следствие интерстициального кератита	5 дней	5,0	Частичный успех. Зрение 6/24. Улучшение
3	» » »	Рубцовое изменение роговицы как следствие интерстициального кератита	7 дней	5,9	Неудача
4	» » »	Рубцовое изменение как следствие язвы	9 дней	5,0	Неудача. Трансплантат оставался прозрачным, но на задней поверхности образовалась пленка
5	» » »	Помутнение центральной части роговицы как следствие интерстициального кератита	16 дней	5,8	Получен прозрачный трансплантат
6	» » »	Помутнение центральной части роговицы	16 дней	5,8	Успех. Зрение 6/6
7	В виде тонких пластинок	Рубцовое изменение роговицы как следствие трахомы. Подготовка к трансплантации во всю толщу	21 день	6,2	Успех
8	В виде тонких пластинок	Помутнение роговицы как следствие язвы. Предыдущая трансплантация свежей роговицы не удалась. Замороженный трансплантат в виде тонких пластинок приживал	28 дней	—	Успех
9	В виде тонких пластинок	Помутнение центральной части роговицы как следствие язвы	37 дней	5,5	Успех
10	Во всю толщу	Кератит с проникающей язвой вследствие acné rosacea. Область зрачка не затронута. Трансплантация по неотложным показателям	3 месяца	5,0	Частичный успех. Трансплантаты прижили, центральная часть оставалась прозрачной, но по краям образовывались рубцы. Улучшение. Зрение не нарушено.
11	» » »	Кератит с проникающей язвой вследствие acné rosacea	7 месяцев	4,5	Частичный успех. Центральная часть оставалась прозрачной, но по краям образовывались рубцы. Улучшение. Зрение не нарушено.
12	В виде тонких пластинок	Кератит вследствие acné rosacea	9 месяцев	4,0	Успех

по-видимому, переживали замораживание и в них происходили нормальные метаболические процессы.

Полные и частичные неудачи при трансплантации во всю толщу роговицы свидетельствовали о возможном повреждении во время замораживания и оттаивания хрупких клеток эндотелия на задней поверхности роговицы [28]. После трансплантации поврежденный эндотелий замещался фиброзной тканью, что в некоторых случаях приводило к помутнению трансплантатов во всю толщу свежей роговицы [48]. В то же время повреждение эндотелия на задней поверхности роговицы должно вызвать нарушение нормального обмена между водянистой влагой и роговицей. Ридж [77] показал, что потребление кислорода клетками эндотелия в роговице кролика снижалось, если физиологический раствор с pH 5,85 содержал хотя бы 1% глицерина. При pH 8,8 эндотелий был резистентным к подавляющему влиянию глицерина в концентрациях, достигающих 10%. При pH 8,8 обработанный глицерином эндотелий оказывался почти полностью защищенным от губительного действия замораживания при —79° и последующего оттаивания. Об этом можно было судить по его потреблению O_2, которое составляло 75% потребления кислорода свежей тканью (фиг. 25). Таким образом, степень выживаемости замороженных трансплантатов во всю толщу роговицы человека и кролика, по-видимому, можно повысить, приведя pH в должное соответствие со средой и понизив концентрацию глицерина примерно до 10%.

Биллингэм и Райкрофт [17] разработали свою методику замораживания и хранения роговицы. Для того чтобы пропитать роговицу глицерином, они при комнатной температуре погружают весь глаз на 1 *час* в раствор Рингера, содержащий 15% глицерина. Затем они удаляют жидкость и помещают глаз роговицей вверх в стеклянный сосуд с широким горлышком и с завинчивающейся крышкой или с притертой пробкой, смазанной силиконом. Для охлаждения сосуд окружают твердой CO_2 с температурой —79°. Для последующего оттаивания глаз быстро отогревают, обильно поливая его теплым физиологическим раствором с температурой 38°. Замороженная роговица приобретает серый оттенок; она как бы

испещрена пятнами и тверда на ощупь (фото 28, *А* и *Б*). В процессе оттаивания она быстро становится прозрачной, и в передней камере глаза появляются пузырьки воздуха (фото 28, *В—Д*). Когда температура роговицы достигает уровня нормальной температуры тела, маленькие пузырьки воздуха часто появляются и в ее строме [12]. Прозрачность роговицы обусловлена особым расположением коллагеновых волокон, окруженных в строме



Фиг. 25. Влияние pH, глицерина и замораживания на потребление O_2 эндотелием роговицы [77].

○ необработанная роговица; △ обработанная глицерином роговица; × обработанная глицерином и замороженная роговица.
Цифры показывают концентрацию глицерина (в %), а буквы — способ оттаивания: *а* — согревание путем погружения в водяную баню с температурой +37° на 60 *мин* до взятия эндотелия; *б* — согревание и выдерживание при комнатной температуре в течение 40 *мин* до взятия эндотелия; *в* — согревание путем погружения в водяную баню с температурой +37° на 3 *мин*, а затем в течение 20 *мин* выдерживание при комнатной температуре; *г* — согревание путем погружения в водяную баню с температурой +37° на 20 *мин*.

основным веществом, содержащим муконд [55]. Возможно, оптические свойства роговицы претерпевают изменения в результате образования пузырьков или поглощения жидкости [12]. Ридж полагает, что некоторые из этих пузырьков возникают вследствие метаболической активности ресничного тела в интактном глазе после смерти [78] и что перед замораживанием, может быть, следует заменять водянистую влагу забуференной жидкостью. Однако, несмотря на возникновение этих пузырьков, Райкрофт [84] использовал трансплантаты во всю толщу роговицы глаз, обработанных глицерином и хранившихся при —79° в течение многих месяцев. При этом

он в ряде случаев получил хорошо функционирующие и немутнеющие трансплантаты (фото 29). В других случаях консервированные трансплантаты имели оптические дефекты, обусловленные образованием складок и сокращением десцеметовой оболочки или отслойкой роговичных пластинок. Остается выяснить, что же служит причиной повреждения зрения — гибель части клеток или нарушение расположения коллагеновых волокон.

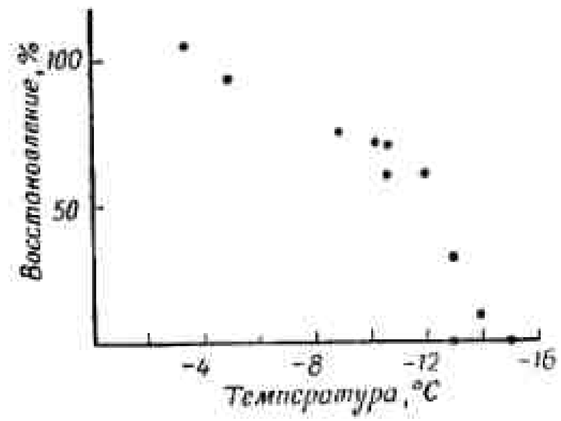
Одна из главных, еще не разрешенных проблем, связанных с хранением ткани при низких температурах, заключается в получении роговицы или глаза человека вскоре после смерти, до наступления посмертных изменений. Следует, однако, отметить, что задача продолжительного хранения роговицы частично уже разрешена [28, 62, 81, 83].

Нервные волокна и ганглии

Поскольку установлено, что у взрослых млекопитающих в клетках кожи и роговицы, имеющих эктодермальное происхождение, после обработки их глицерином и хранения при низких температурах восстанавливается нормальная физиологическая активность, возникло предположение о возможности хранения таким же образом нервных клеток и волокон. Люйет и Гонсалес [52] обнаружили, что нервная ткань мозга куриного эмбриона, обработанная 60-процентным раствором этиленгликоля, переживала замораживание в жидком азоте, на что указывал рост нервных волокон в культурах тканей, приготовленных после оттаивания (см. гл. 5).

Возможность восстановления нормальной функции нервных клеток, волокон и синапсов млекопитающих после замораживания и оттаивания очень подробно изучал Паско [66]. Он использовал препараты верхнего шейного ганглия крысы вместе с его пре- и постганглионарными нервами. Препарат монтировали вместе с электродами, чтобы регистрировать потенциалы действия от ганглиев и волокон до и после замораживания. Охлаждение и оттаивание производили тремя способами. Первый заключается в том, что препарат погружали в пробирку (12×0,8 *см*), содержащую 2 *мл* раствора Кребса

или раствора Кребса с глицерином, пробирку запаивали и охлаждали до нужной температуры, после чего отогревали в воде с температурой +40°. Согласно второму способу, препарат прикрепляли к маленькой стеклянной гирьке и опускали в пустую пробирку; пробирку запаивали и погружали в сосуд с замораживающей смесью. В течение 2 *мин* температура препарата понижалась до —40°, а затем примерно за 4 *мин* до —79°. Препарат оттаивали, вскрыв пробирку и перенеся гирьку в раствор Кребса или в раствор Кребса с глицерином при температуре 38°. Процесс оттаивания длился 3 *сек*. По третьему способу препарат, зажав между двух листков алюминиевой фольги, погружали в изопентан с температурой —76°, а затем согревали в воде при +40°. Охлаждение и оттаивание осуществляли очень быстро, но не настолько, чтобы вызвать витрификацию воды вместо ее кристаллизации.



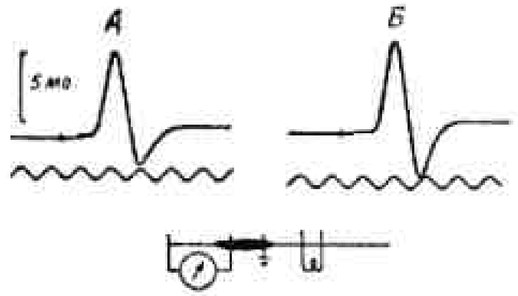
Фиг. 26. Восстановление потенциал действия, передающегося через верхний шейный ганглий, после выдерживания препарата в течение 5 *мин* при низкой температуре [66].

Верхние шейные узлы крысы, охлажденные в растворе Кребса и выдерживавшиеся в течение 5 *мин* при различных температурах ниже 0° в отсутствие глицерина, согревали, а затем проверяли их физиологическую активность. Оказалось, что потенциал постганглионарных волокон, вызванный раздражением преганглионарных волокон, после охлаждения препарата ганглия до —10° и оттаивания мало отличался от потенциала, зарегистрированного перед охлаждением. В препаратах, охлажденных до температур от —10 до —15°, реакция была уменьшена (фиг. 26). После охлаждения до —15° реакция на раздражение преганглионарного нервного волокна отсутствовала, хотя в одном опыте при непосредственном раздражении постганглионарного нервного

волокна был вызван небольшой потенциал действия [66]. Препараты, не обработанные предварительно глицерином, не реагировали на электрическое раздражение после охлаждения до —79°, независимо от применявшегося метода замораживания и оттаивания. У них изменялся внешний вид; они казались прозрачными, и можно было не сомневаться в наличии необратимых повреждений.

Первые попытки обрабатывать ганглий и его пре- и постганглионарные волокна путем погружения их в глицерин привели к полной потере возбудимости и сморщиванию препарата, как если бы его подвергли высушиванию. Эти явления, однако, были обратимы. После отмывания в растворе Кребса препарат приобретал прежний нормальный вид и возбудимость восстанавливалась. Пропитанные глицерином ганглии не переживали охлаждения до —79° (любым методом). На основании полученных данных можно было предположить, что оболочки нервов и капсулы ганглиев непроницаемы для глицерина. Когда эти оболочки удаляли, а концентрацию глицерина постепенно повышали, перенося препарат с интервалом в 5 *мин* в растворы, содержащие 5—10% и 10—15% глицерина, проведение возбуждения и передача его через синапсы замедлялись, а потенциал действия падал, но никогда не исчезал полностью. Величина потенциала действия и скорость распространения нервных импульсов приходили в норму через 20—30 *мин* после окончания постепенного удаления глицерина и возвращения препарата в раствор Кребса. Ганглии, выдержанные в течение 30 *мин* (для уравновешивания) в растворе Кребса с добавлением 5, 10 или 15% глицерина, охлаждали до —79° тремя способами. После их оттаивания глицерин медленно удаляли. Затем препараты опять помещали в раствор Кребса и через различные промежутки времени вновь исследовали их свойства, сравнивая электрические реакции с реакциями, зарегистрированными до обработки. Оказалось, что 5—10-процентный раствор глицерина мало защищал нервные ткани. Быстрое охлаждение на алюминиевой фольге неизменно вызывало повреждения, а в некоторых случаях были отчетливо видны такие признаки механической травмы, как раздавливание или разрыв нервов. В противоположность этому

в ганглиях и нервах, обработанных после удаления капсулы и оболочек раствором Кребса с добавлением 15% глицерина и затем медленно охлажденных до —79°, после оттаивания физиологические функции восстанавливались. Не наблюдалось большой разницы между потенциалами действия препаратов, которые во время замораживания были погружены в среду, содержащую глицерин, и препаратов, предварительно обработанных



Фиг. 27. Потенциалы действия, зарегистрированные от верхнего шейного ганглия крысы после раздражения преганглионарного нерва [66].

А. До замораживания. *Б*. После замораживания при —79° и оттаивания. Видно полное восстановление реакции. Потенциалы дифазные, поскольку нецелесообразно было вводить кокаин в постганглионарный нерв до замораживания, так как он мог распространиться по всему препарату во время обработки глицерином. Внизу показано расположение электродов. Отметка времени 50 *гц*.

глицерином и подвергшихся замораживанию в пустой пробирке. Первыми восстановились потенциалы действия в пре- и постганглионарных волокнах. Проведение возбуждения через ганглий, проверявшееся по высоте потенциала действия в постганглионарном нерве, вызванного раздражением преганглионарного нерва, восстановилось позднее. Реакции постепенно увеличивались в течение 45 *мин* — 1 *час* после удаления глицерина и возвращения препарата в раствор Кребса, в котором он и находился до тех пор, пока потенциалы действия, зарегистрированные от ганглия или его нервов, не становились идентичными тем, которые наблюдались до замораживания (фиг. 27).

Хранение при температуре —76° в течение 24 *час* не оказывало заметного вредного действия на ганглии, медленно охлажденные любым из двух способов в присутствии 15% глицерина. Потенциалы действия, зарегистрированные от пре- и постганглионарных нервов, а также

потенциалы действия, проходящие через ганглий, не изменялись ни по амплитуде, ни по продолжительности. Не ухудшалась также способность передачи через синапсы ганглия быстрой серии импульсов. Однако препараты, хранившиеся более 1 дня при температуре —76°, полностью не восстанавливались, о чем можно было судить по ослаблению реакций на электрические раздражения. Меньше была амплитуда и потенциалов действия в препарате, который хранили 21 день при —76° [66].

Полученные данные представляют интерес во многих отношениях. Наиболее важно, что препарат ганглия оказался необычайно устойчивым к замораживанию без обработки его глицерином. В то время как эритроциты гемолизировались при замораживании в течение 5 *мин* при температуре от —3 до —5°, верхний шейный ганглий крысы, будучи замороженным при —4 или —5°, не получал тяжелых повреждений. Температура, при которой быстро наступали изменения ткани, точно не установлена. Тяжесть повреждений увеличивалась по мере снижения температуры от —10 до —15° (при продолжительности воздействия также 5 *мин*). Даже после хранения в течение 12 *час* при —15° в одном препарате в постганглионарном нерве был вызван небольшой потенциал действия. Следовательно, механизм повреждения нервных волокон и ганглия во время замораживания и оттаивания, по-видимому, не вполне соответствует тому, который имеет место при замораживании эритроцитов. Нервные ткани, вероятно, исключительно устойчивы к действию концентрированных солевых растворов. Препараты ганглия переносили более быстрое охлаждение, чем сперматозоиды быка. Очень быстрого охлаждения они не переживали, возможно вследствие механической травмы. Отсюда возник вопрос, не наступает ли в нервной ткани тот вид физико-химической неустойчивости, который наблюдается у сперматозоидов быка и который можно вызвать в эритроцитах очень быстрым охлаждением. Паско [66] полагает, что нервные волокна и ганглии при очень быстром охлаждении повреждаются главным образом в результате механического стресса. Интересно отметить, что капсула ганглия и оболочки нервов препятствовали проявлению защитного действия глицерина. Следовательно, можно предположить, что они непроницаемы для глицерина. Осмотическая дегидратация не повышала устойчивости нервных волокон и синапсов к замораживанию. Все полученные данные показывают, что для того, чтобы оказать защитное действие при очень низких температурах, глицерин должен достигать клеток и волокон, а возможно, и проникать в них. Паско производил перфузию интактных крыс растворами глицерина с постепенно возрастающей концентрацией и готовил препараты верхних шейных ганглиев, не удаляя капсулы ганглия и оболочек нервов. После охлаждения препаратов до —76° и последующего оттаивания, а также после удаления глицерина проведение возбуждения в постганглионарном нерве и передача его через ганглий не нарушались. В преганглионарном же нерве, в препаратах, обработанных глицерином посредством перфузии интактного животного, никогда не наблюдалось проведения возбуждения. По-видимому, преганглионарный нерв повреждался при удалении глицерина in vitro. Отсюда возникло предположение, что оболочка нерва препятствовала диффузии молекул глицерина из нервных волокон, допуская в то же время проникновение в них молекул воды. Наступающий в результате этого отек наносил волокнам механическую травму [66].

На основании опытов с перфузией, а также результатов замораживания изолированных ганглиев, обработанных глицерином in vitro, можно прийти к выводу, что такого рода повреждение нервной ткани, возможно, не должно быть лимитирующим фактором при попытке оживить интактное животное, перфузированное глицерином, охлажденное до очень низкой температуры и затем согретое (см. гл. 10).

ЛИТЕРАТУРА

1. Bacsich P., Wyburn G. M., Cornea. Transplant. Bull., **1**, 199—200, 1954.
2. Bacsich P., Wyburn G. M., Experimental corneal homografts, J. Anat, Lond., **91**, 339—344 (1957).
3. Barnes D. W. H., Personal communication, 1957.
4. Barnes D. W. H., Treatment of lethally irradiated mice: The

.radiation chimaera, XXIst Internat. Congr. Physiol., Buenos Aires, Symposia and Special Lectures, pp. 114—118 (1959).
5. Barnes D. W. H., Loutit J. F., Protective effects of implants of splenic tissue, Proc. R. Soc. Med., **46**, 251—252 (1953).
6. Barnes D. W. H., Loutit J. F., What is the recovery factor in spleen? Nucleonics, **12**, 68—71, 1954.
7. Barnes D. W. H., Loutit J. F., Spleen protection: The cellular hypothesis, In Radiobiology symposium Proc. Symp., Liege, 1954, ed. Bacq Z. M. and Alexander P., pp. 134—135, London, Butterworth Scientific Oublication, 1954. (Д. Барнс и Дж. Лутит, Защитное действие селезенки; клеточная гипотеза. См. «Вопросы радиобиологии», стр. 216—219, ИЛ, М., 1956.)
8. Barnes D. W. H., Loutit J. F., The radiation recovery factor: preservation by the Polge — Smith — Parkes technique, J. nat. Cancer Inst., **15**, 901—905 (1955).
9. Barnes D. W. H., Loutit J. F., Immunological status and longevity of radiation-chimaeras, Proc. Roy. Soc., B, **150**, 131—146 (1959).
10. Billingham R. E., The storage of skin. Preservation and Transplantation of Normal Tissues, ed. Wolstenholme G. E. W. and Cameron M. P., pp. 160—170, Ciba Foundation Symposium, London, Churchill, 1954.
11. Billingham R. E., The preservation of tissue. Biological Applications of Freezing and Drying, Chap. 11, ed. Harris R. J. C., New York, Academic Press, 1954. (Р. Биллингем, Консервирование тканей. См. «Применение замораживания — высушивания в биологии», под ред. Р. Харриса, стр. 346—386, ИЛ, М., 1956.)
12. Billingham R. E., Rubbles in thawed cornea, Proc. Roy. Soc., B, **147**, 530—531 (1957).
13. Billingham R. E., Boswell T., Studies on the problem of corneal homografts, Proc. Roy. Soc., B, **141**, 392—406 (1953).
14. Billingham R. E., Medawar P. B., The technique of free skin grafting in mammals, J. exp. Biol., **28**, 385—402 (1951).
15. Billingham R. E., Medawar P. B., The freezing, drying and storage of mammalian skin, J. exp. Biol., **29**, 454 (1952).
16. Billingham R. E., Medawar P. B., A study of the branched cells of the mammalian epidermis with special reference to the fate of their division products, Phil. Trans. Roy. Soc., B, **237**, 151—171 (1953).

17. Billingham R. E., Rycroft B. W., The Preservation of the Donor Graft, Corneal Grafts, ed. Rycroft B. W., pp. 195—207, London, Butterworth, 1955.
18. Blumenthal H. T., Walsh L. B., Survival of guinea-pig thyroid and parathyroid autotransplants previously subjected to extremely low temperatures, Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., **73**, 62—67 (1950).
19. Briggs R., Jund L., Successful grafting of frozen and thawed mouse skin, Anat. Rec., **89**, 75—86 (1944).
20. Brown J. E., Eryer M. P., Randall P., Lu M., Rostmorten homografts as "biological dressings" for extensive burns and denuded areas, Ann. Surg., **138**, 618—629 (1953).
21. Congdon C. C., Immunological problems in Tissue Transplantation for recovery from radiation injury, XXIst Internat. Congr. Physiol., Buenos Aires, Symposia and Special Lectures, pp. 119—123 (1959).
22. Congdon C. C., Lorenz E., Modification of lethal irradiation injury in mice by injection of homologous or heterologous bone, J. nat. Cancer Inst., **14**, 955—961 (1954).
23. Cowie A. T., The influence of age and sex on the life span of adrenalectomized rats, J. Endocrin., **6**, 94—98 (1949).
24. Craigie J., Survival and preservation of tumors in the frozen state, Advanc. Cancer Res., **11**, 197—228 (1954).
25. Dameshek W., Bone marrow transplantation — a present day challenge, Blood, **12**, 321—323 (1957).
26. Deanesly R., Spermatogenesis and endocrine activity in grafts of frozen and thawed rat testis, J. Endocrin., **11**, 201—206 (1954).
27. Donohue D. M., Gabrio B. W., Finch C. A., Quantitative measurement of haematopoetic cells of the marrow, J. clin. Invest., **37**, 1564—1570 (1958).
28. Eastcott H. H. G., Cross A. G., Leign A. G., North D. P., Preservation of corneal grafts by freezing, Lancet, **i**, 237—341 (1954).
29. Ferrebee J. W., Atkins L., Lochte H. L., Jr., McFarland R. B., Richardson Jones A., Dammin G. J., Thomas E. D., The collection, storage and preparation of viable cadaver marrow for intravenous use, Blood, **14**, 140—147 (1959).
30. Ferrebee J. W., Billen D., Urso I. M., Lu W. C., Thomas E. D., Congdon C. C., Preservation of radiation

1399-1

recovery factor in frozen marrow, Blood, **12**, 1096—1100 (1957).
31. Ferrebee J. W., Lochte H. L., Swanberg H., Thomas E. D., The collection and storage of viable human foetus hematopoetic tissue for intravenous use, Blood, **14**, 1173—1179 (1959).
32. Ford C. E., Hamerton J. L., Barnes D. W. H., Loutit J. F., Cytological identification of radiation-chimaeras, Nature, Lond., **177**, 452—454 (1956).
33. Garrison F. H., An Introduction to the History of Medicine, 3rd Edn. London, Saunders, 1921.
34. Gye W. E., Begg A. M., Mann I., Craigie J., The survival of activity of mouse sarcoma tissue after freezing and drying, Brit. J. Cancer, **3**, 259—267 (1949).
35. Hemphill J. E., Brown J. B., Skin storage in tissue banking. A summary emphasizing low temperature methods of storage; and preliminary report of the use of anti-freeze agents, Plast. reconstr. Surg., **14**, 118—125 (1954).
36. Henaff F., Preparation of grafts of freeze-dried cornea, Recent Research in Freezing and Drying, ed. Parkes A. S. and Smith A. U., pp. 295—302, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1960.
37. Jacobson L. O., Evidence for a humoral factor or factors in recovery from radiation injury, A review, Cancer Res., **12**, 315—325 (1952).
38. Jacobson L. O., Simmons E. L., Marks E. K., Gastone E. O., Robson M. J., Eldredge J. H., Further studies on recovery from radiation injury, J. Lab. clin. Med., **37**, 683—697 (1951).
39. Jacobson L. O., Simmons E. L., Marks E. K., Gastone E. O., Robson M. J., Eldredge J. H., Further studies on recovery from radiation injury (Correction of previous paper.), J. Lab. clin. Med., **38**, 330 (1951).
40. Jessop N. M., An analysis factors influencing the survival after prolonged deep freezing of intrasplenic and subcutaneous rat skin autografts, Amer. J. Anat., **102**, 273—300 (1958).
41. Katzin H. M., Preservation of corneal tissue by freezing and dehydration, Amer. J. Ophthal., **30**, 1128—1134 (1947).
42. Keeley R. L. A., Gomez A. C., Brown I. W., An experimental study of the effects of freezing, partial dehydration and ultrarapid cooling on the survival of dog skin grafts, Plast. reconstr. Surg., **9**, 330—344 (1952).
43. Kreyberg L., Development of acute tissue damage due to cold., Physiol. Rev., **29**, 156—167 (1949).
44. Kreyberg L., Hanssen O. E., Necrosis of whole mouse skin in situ and survival of transplanted epithelium after freezing to —78° C and —190° C, Scand. J. clin. Lab. Invest., **2**, 168—170 (1950).
45. Kreyberg L., Rotnes P. L., La state expérimentale. Méthode pour la mettre en évidence au moyen de préparations spéciales, C. R. Soc. Biol., Paris, **106**, 895—897 (1931).
46. Lake N. C., An investigation into the effects of cold upon the body, Lancet, **ii**, 557—562 (1917).
47. Leading Article. Bone marrow transplantation in blood diseases, Lancet, **ii**, 132—133 (1958).
48. Leigh A. G., Opacification in perforating corneal grafts, Brit. J. Ophthal, **38**, 10—18 (1954).
49. Lochte H. L. Jr., Ferrebee J. W., Thomas E. D., In vitro studies on the preservation of marrow cells in glycerol at low temperatures, J. Lab. clin. Med., **53**, 117—126 (1959).
50. Lorenz E., Congdon C. C., Uphoff D., Modification of acute irradiation injury in mice and guinea-pigs by bone marrow injections, Radiology, **58**, 863—877 (1952).
51. Lorenz E., Uphoff D., Reid T. R., Shelton E., Modification of irradiation injury in mice and guinea — pigs by bone marrow injections, J. Nat. Cancer Inst., **12**, 197—201 (1951).
52. Luyet B., Gonzales F., Growth of nerve tissue after freezing in liquid nitrogen, Biodynamica, **7**, 157—170 (1953).
53. Mann I., Effect of low temperature on the Bittner virus of mouse carcinoma, Brit. Med. J., **ii**, 251—253 (1949).
54. Mann I., Effect of repeated freezing and thawing on mouse carcinoma tissue, Brit. med. J., **ii**, 253—255 (1946).
55. Maurice D. M., The structure and transparency of the cornea, J. Physiol., **136**, 263—286 (1957).
56. Medawar P. B., The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits, J. Anat., Lond., **78**, 176—199 (1944).
57. Medawar P. B., Immunity to homologus grafted skin. III. The fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue and to the anterior chamber of the eye, Brit. J. exp. Path., **29**, 58—69 (1948).

58. Medawar P. B., The micro-anatomy of the mammalian epidermis, Quart. J. micr. Sci., **94**, 481—506 (1953).
59. Medawar P. B., Billingham R. E., The viability of mammalian skin after freezing, thawing and freeze-drying, Freezing and Drying, ed. Harris R. J. C., pp. 55—62, London, Institute of Biology, 1951.
60. Mider G. B., Morton J. J., The effect of freezing in vitro on some transpantable mammalian tumors and on normal rabbit skin, Amer. J. Cancer., **35**, 502—509 (1939).
61. Moore C. R., Biology of the testis, Sex and Internal Secretions, 2nd Edn., ed. Allen E., pp. 353—451, London, Baillière, Tindall and Cox, 1939.
62. Ormsby H. L., Basu P. K., The eye bank and corneal grafting program, Canad. med. Ass. J., **76**, 919—921 (1957).
63. Parkes A. S., Viability of adrenocortical tissur transplanted after freezing and thawing, Proc. Roy. Soc., B, **144**, 314—328 (1955).
64. Parkes A. S., Functional grafts of fresh or stored thyroid tissue, Endocrinology, **18**, XXXV — XXXVi (1959).
65. Parkes A. S., Smith A. U., Storage of testicular tissue at very low temperatures, Brit. med. J., **i**, 315—316 (1954).
66. Pascoe J. E., Survival of the rat's superior cervical ganglion after cooling to —76° C, Proc. Roy. Soc., B, **147**, 510—519 (1957).
67. Passey R. D., Dmochowski L., Freezing and desiccation of mouse tumours, Brit. med. J., **ii**, 1129—1134 (1950).
68. Passey R. D., Dmochowski L., Freezing and Drying, ed. Harris R. J. C., pp. 63—75, London, Institute of Biology, 1951.
69. Passey R. D., Dmochowski L., Lasnitzki L., Cultivation in vitro of frozen and desiccated mouse tumours, Brit. med. J., **ii**, 1134—1136 (1950).
70. Pegg D. E., Trotman R. E., The preservation of human bone marrow at —79° C, J. clin. Path., **12**, 477—482 (1959).
71. Polge C., Lovelock J. E., Preservation of bull semen stored at —79° C, Vet. Rec., **64**, 396—397 (1952).
72. Pulvertaft R. J., Humble J. C., Culture de Moelle Osseuse sur lames Tournantes, Revue d'Hematologie, **11**, 349—377 (1956).
73. Report, Bone Marrow Transplantation Conference, Atlantic City, N. J., 1959 (Review of the Yugoslavian reactor accident), Blood, **14**, 1254—1256 (1959).

74. Report, Transplantation of bone marrow (Special Section), Blood, **13**, 266—301 (1958).
75. Rey L. R., Conservation de la Vie par le Froid, Actuilités sci. industr., No. 1279, Paris, Hermann, 1959. (Луи Рэ, Консервация жизни холодом, Госмедиздат, М., 1962.)
76. Richter C. P., Increased salt appetite in adrenalectomized rats, Amer. J. Physiol., **115**, 155—161 (1936).
77. Ridge J. W., Preservation of corneal endothelium by freezing, Nature, Lond., **178**, 1404—1405 (1956).
78. Ridge J. W., Freezing of the cornea, Proc. Roy. Soc., B, **147**, 531 (1957).
79. Rob C., Eastcott H. H. G., The preservation of arteries and other tissues for clinical use, Preservation and Transplantation of Normal Tissues, ed. Wolstenholme G. E. W. and Cameron M. P., pp. 190—195, Ciba Foundation Symposium, London, Churchill (1954).
80. Rubin M. I., Krick E. T., Effect of adrenalectomy on salt metabolism in rats, Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., **31**, 228—229 (1933).
81. Rycroft B. W., The surgey of corneal grafts, British Surgical Progress, pp. 242—255, London, Burterworth, 1953.
82. Rycroft B. W., The present state of corneal grafts, Preservation and Transplantation of Normal Tissues, ed. Wolstenholme G. F. W. and Cameron M. P., pp. 210—218, Ciba Foundation Symposium, London, Churchill, 1954.
83. Rycroft B. W., Corneal Grafts, London, Butterworth, 1955.
84. Rycroft B. W., Three unusual corneal grafts, Brit. J. Ophthal., **41**, 759—766 (1957).
85. Salvin-Moore J. E., Barratt J. O. W., Note upon the effect of liquid air upon the graftable cancer of mice, Lancet, **1**, 227 (1908).
86. Schwartz R., Dameshek W., Drug-induced immunological tolerance, Nature, Lond., **183**, 1682—1683 (1959).
87. Sloviter H. A., Tietze R. M., A Method for preraring thawed erythrocyte-glycerol mixtures for transfusion, Amer. J. Med. Sci., **231**, 437—440 (1956).
88. Smelser G. K., Ozanics V., Effect of quick freezing at very low temperatures of donor tissue in corneal transplants. Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., **62**, 274—277 (1946).

89. Smith A. U., Smiles J., Microscopic studies of mammalian tissues during cooling to and rewarming from —79° C, J. R. micr. Soc., 73, 134—139 (1953).
90. Smith S. E., The growth and physiology of endocrine tissues, Ph. D. Thesis, University of London, 1955.
91. Stewart J. H., Stewart R. D. H., Woodruff M. F. A., The storage of Rat Thyroid Tissue at subzero temperature, Proc. Univ. Otago Med. Sch., 33, 26—27 (1955).
92. Taylor A. C., The effect of rate of cooling on survival of frozen tissues, Proc. Roy. Soc., B, 147, 466—476 (1957).
93. Thomas E. D., Lochte H. L., Desoxyribonucleic acid synthesis by bone marrow cells in vitro, Blood, 12, 1086—1095 (1957).
94. Thomas E. D., Lochte H. L. Jr., Cannon J. H., Sahler O. D., Ferrebee J. W., Supra-lethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man, J. clin. Invest., 38, 1079—1716 (1959).
95. Thomas E. D., Lochte H. L. Jr., Ferrebee J. W., Irradiation of the entire body and marrow transplantation: some observations and comments, Blood, 14, 1—23 (1959).
96. Thomas E. D., Lochte H. L. Jr., Lu W. G., Ferrebee J. W., Intravenous infusion of bone marrow in patients receving radiation and chemotherapy, New Engl. J. Med., 257, 491—496 (1957).
97. Turner C. D., Intra-ocular homotransplantation of prepuberal testes in the rat, Amer. J. Anat., 63, 101—159 (1938).
98. Webster J. P., Refrigerated skin grafts, Ann. Surg., 120, 431—439 (1944).
99. Weiss P., Taylor A. C., Transplantation of frozen-dried cornea in the rat, Anat. Rec., 88, 465 (1944).
100. Williams R. G., Studies of living interstitial cells and pieces of seminiferous tubules in autogenous grafts of testis, Amer. J. Anat., 86, 343—369 (1950).
101. Wyman L. C., Tum Suden C., Studies on suprarenal insufficiency. XI. The growth of transplanted cortical tissue in the rat, Amer. J. Physiol., 101, 662—667 (1932).
102. Wyman L. C., Tum Suden C., Factors determining and limiting the growth of transplanted suprarenal cortical tissue, Endocrinology, 21, 523—528 (1937).

Глава 8

ДЕЙСТВИЕ ГЛИЦЕРИНА И ЗАМОРАЖИВАНИЯ НА ОРГАНЫ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Исторические этапы в исследовании изолированных органов

За последние 70 лет ценные сведения относительно функции отдельных органов были получены путем изучения их в изолированном состоянии. Разработаны методики, с помощью которых удавалось в течение нескольких часов in vitro поддерживать почти в норме функциональную активность отдельных органов. В числе пионеров в этой области исследований следует назвать Лангендорфа [31], который в 1895 г. описал несложный метод перфузии коронарных артерий изолированного сердца млекопитающего теплой и насыщенной кислородом искусственной перфузионной жидкостью. Старлинг и сотрудники создали препарат сердца и легких, в котором циркулировала кровь [30]. Им удалось установить некоторые закономерности в нагнетательной деятельности сердца. Ловетт Ивэнс в 1912 г. [22] применял подобный препарат для изучения газообмена сердца, а в последние годы Бери и сотрудники использовали его при исследовании действия ацетилхолина, адреналина и норадреналина на частоту сердцебиений [8—10]. Не всегда обязательно применять перфузию кровью и включать в систему кровообращения легкие. Например, для перфузии коронарных артерий сердца крысы использовали искусственные перфузионные жидкости в аппаратах с замкнутым кругом циркуляции и таким образом изучали действие инсулина на потребление сердечной мышцей глюкозы и других сахаров [4, 23].

Первые попытки перфузировать изолированные почки млекопитающих искусственной перфузионной жидкостью in vitro не имели особого успеха. Однако почки, подключенные к препарату сердце — легкие, выделяли мочу, и в этих опытах удалось выяснить различные характерные особенности их деятельности [1, 3, 37, 44]. Позднее Хемингуэй [26] обнаружил, что почки функционировали так же хорошо, когда вместо сердца использовали механический насос. Легкие имели значение для «детоксикации» крови, но изолированные почки функционировали и в отсутствие легких [26, 45].

Изолированная печень, подключенная к препарату сердце— легкие, в течение непродолжительного времени вырабатывает желчь. Разработаны различные методы перфузии изолированной печени кровью. При использовании этих методов печень секретировала желчь в течение 24 *час* подряд [6] и поглощала из крови коллоидное фосфатное соединение, меченное радиоактивным фосфором (P^{32}), так же полно и быстро, как и у интактного животного in situ [5]. Результаты опытов с перфузией показали, что именно печень синтезирует бóльшую часть присутствующих в плазме альбумина, глобулина и фибриногена [33] и что она способна осуществлять катаболизм молекул альбумина, меченных радиоактивным изотопом иода (I^{131}) [11, 25].

Более простые методы изучения органов in vitro также дали важные результаты. Например, изолированная матка девственной морской свинки будет ритмически сокращаться и реагировать на различные фармакологические препараты при погружении в насыщенный кислородом уравновешенный солевой раствор. Ее сокращения можно регистрировать, закрепив нижний конец рога матки в указанной выше среде и присоединив верхний конец к рычагу с писчиком [12]. Этот же препарат использовали для изучения фармакологического действия гистамина [14] и стандартизации экстрактов задней доли гипофиза [15]. Кроме того, на изолированной матке выявили действие таких веществ, как эргометрин и различные алкалоиды спорыньи [7]. В опытах на изолированой матке было установлено также одно принципиально важное положение, что в отдельных тканях

может развиться иммунитет или повышенная чувствительность и проявятся анафилактические реакции. Морских свинок, у которых брали органы для проведения опытов, иммунизировали против чужеродной сыворотки или белков. При добавлении в раствор очень маленьких доз антигена изолированные матки энергично сокращались [13].

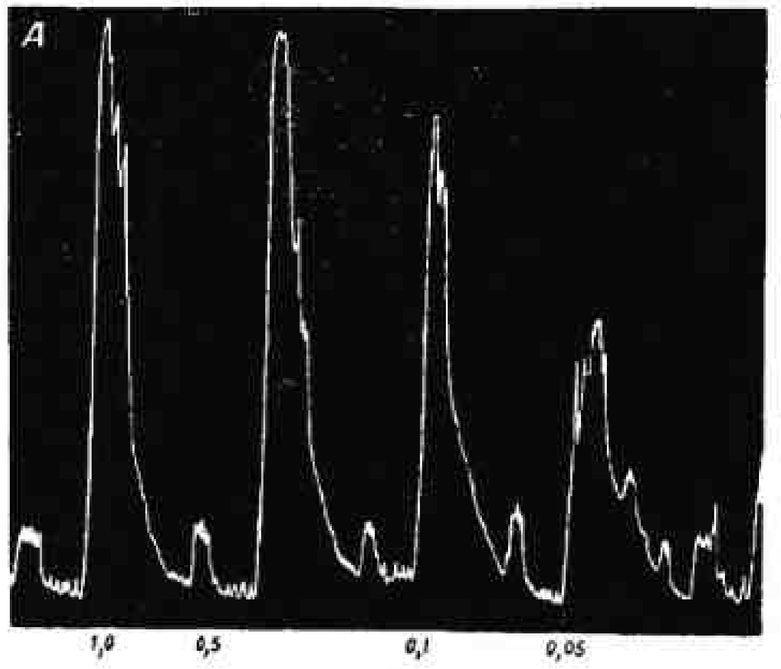
В последние годы исследованиями на различных органах млекопитающих in vitro заинтересовались хирурги в связи с актуальностью проблемы трансплантации органов [16—19]. Почка собаки, аутотрансплантированная в области шеи или в пах, обычно нормально функционировала в течение продолжительного времени [20, 34]. Между тем гомотрансплантаты почки существовали у собак лишь ограниченный период времени. Кроме того, чужеродная почка начинала вырабатывать антитела еще до момента ее гибели в результате иммунологической реакции со стороны реципиента [18, 19, 41]. У человека почку успешно трансплантировали у идентичных близнецов [32]. В некоторых случаях трансплантаты выделяли мочу в течение 37—180 дней даже при отсутствии кровного родства между донором и реципиентом [29]. В настоящее время основным препятствием к трансплантации целых органов от одной особи к другой, генетически ей не тождественной, по-видимому, служит иммунологическая несовместимость тканей. Образование антител и их реакцию на антигены в тканях, возможно, удастся подавить путем облучения интактного животного рентгеновскими лучами или же с помощью таких химических агентов, как меркаптопурин. Между тем уже разработаны хирургические методы трансплантации различных органов, в том числе сердца и легких (вместе или отдельно) от одного животного другому [2, 28, 35]. Пока еще продолжительность жизни собак после замены сердца ограничивается несколькими часами. В медицинскую практику широко вошли различные другие операции, казавшиеся в прошлом фантастическими, и не исключена возможность, что в будущем возникнет необходимость в создании банков здоровых органов для замены ими больных органов.

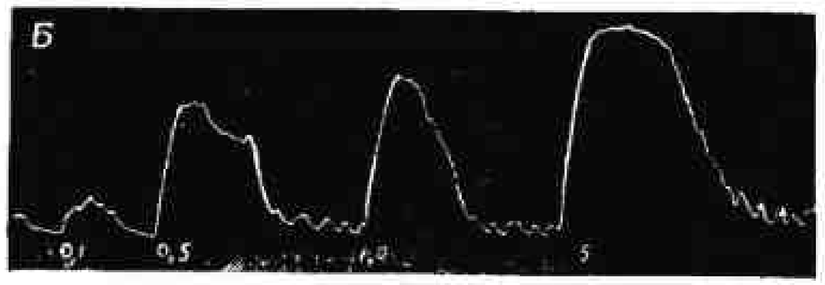
Вот на таком фоне и возникло решение заняться проблемой жизнеспособности целых органов после обработки глицерином и охлаждения до низких температур. Нам казалось, что дальнейшие исследования в этой области заполнят существующий разрыв между замораживанием изолированных клеток и тканей млекопитающих, с одной стороны, и интактных млекопитающих — с другой.

Матка

Для своих первых исследований мы выбрали матку девственной морской свинки, так как ее гладкая мышца переживает охлаждение в течение многих часов при температуре выше 0° без особых мер предосторожности, а ее активность можно легко выявить с помощью несложной методики Дэйла. Матку извлекали у неполовозрелой морской свинки весом 240—260 *г*. Оба рога разделяли, помещали в не содержащий магния раствор Тироде и регистрировали на закопченной ленте их спонтанную активность и реакцию на небольшие дозы гистамина. Записи, полученные от разных маток, показывают, что у них значительно варьировала как интенсивность и частота спонтанных сокращений, так и чувствительность к гистамину (фиг. 28). Два рога от одной матки вели себя почти одинаково, поэтому на них можно было сравнить влияние различных методов обработки. После хранения в течение 24 *час* при +5° спонтанная активность и чувствительность к гистамину препаратов уменьшались, а через 72 *час* (при той же температуре) наблюдались только редкие сокращения.

Когда в среду добавляли раствор Тироде или Рингера с примесью 20% глицерина, отмечалось расслабление рогов матки и спонтанные сокращения прекращались. После отмывания среды, содержащей глицерин, и замены ее нормальной средой матка резко сокращалась и расслабление наступало лишь по истечении большого промежутка времени. Затем возникали слабые спонтанные сокращения. По окончании периода расслабления частота и интенсивность сокращений возвращались к прежней величине (фиг. 29). К этому времени восстанавливалась и нормальная чувствительность к гистамину. Рога матки, выдерживавшиеся в течение 24 *час* при +5° в растворе Рингера с примесью 20% глицерина,



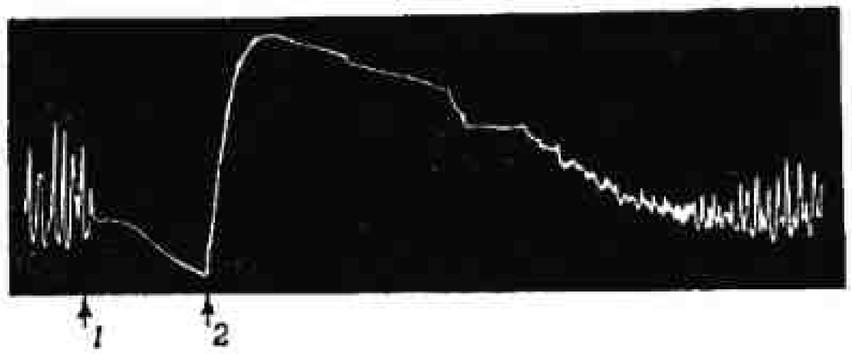


Фиг. 28. Спонтанные сокращения и реакции свежих рогов матки девственной морской свинки на различные дозы гистамина.

А. Очень активная и чувствительная матка. *Б*. Умеренно активная и чувствительная матка. Цифры показывают количество гистамина (в микрограммах), добавленного к 100 *мл* раствора Рингера.

после отмывания также спонтанно сокращались и реагировали на небольшие дозы гистамина. Восстановление было более быстрым и полным в тех случаях, когда препараты выдерживали в течение 24 *час* при +5° в растворе, не содержащем кальция, но с при-

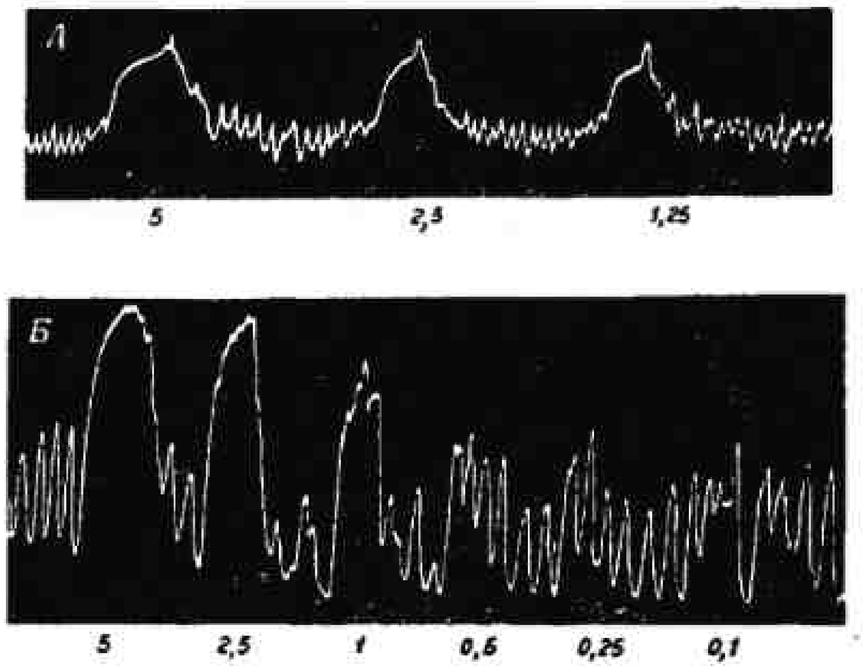
месью 20% глицерина, причем остальные соли присутствовали в половинной концентрации, характерной для обычного раствора Рингера. По спонтанной активности и чувствительности к гистамину эти препараты мало отличались от контрольных рогов, хранившихся в обычной среде при температуре +4°. При хранении в среде, содержащей 25—30% глицерина, их сократительная способность слегка снижалась.



Фиг. 29. Реакция рога матки до, во время и после воздействия раствора Рингера, содержащего 20% глицерина.
1 — воздействие глицерином; *2* — отмывание.

В рогах матки, медленно или быстро замороженных в растворе Рингера или Тироде, при любой температуре от —5 до —196° после оттаивания не наблюдалось ни спонтанных сокращений, ни реакции на гистамин. Тогда попробовали выдерживать матки в течение 1 *час* в растворах, содержащих глицерин. Один рог быстро охлаждали до —79 или —196°, а другой медленно охлаждали до —79° в приборе, использовавшемся для охлаждения бычьей спермы (см. гл. 2). Рога матки при быстром замораживании в растворе Рингера с 20% глицерина после оттаивания не проявляли никаких признаков жизнеспособности, тогда как рога, быстро замороженные в не содержащем кальция растворе Рингера с 20% глицерина, после оттаивания слабо сокращались. В отсутствие кальция и при снижении наполовину концентрации всех других солей умеренные дозы гистамина вызывали слабую реакцию. Рога матки, медленно охлажденные до —79°, а затем оттаянные и

отмытые от глицерина, всегда давали спонтанные, не очень сильные, но вполне отчетливые сокращения и реагировали на небольшие дозы гистамина (фиг. 30). Наилучшие результаты были получены при медленном охлаждении до температуры —79° в не содержащем



Фиг. 30. Спонтанные сокращения и реакция на гистамин у рогов матки, обработанных 20-процентным раствором глицерина, медленно охлажденных до —79°, согретых, отмытых от глицерина и погруженных в раствор Рингера.
А. Замораживание производили в растворе Рингера с добавлением 20% глицерина. *Б*. Замораживание производили в не содержащем кальция растворе Рингера с уменьшенной вдвое концентрацией остальных солей и с добавлением 20% глицерина. Цифры показывают дозу гистамина в микрограммах.

кальция растворе Рингера с уменьшенной вдвое концентрацией остальных солей и добавлением 20% глицерина (фиг. 30, *Б*). Спонтанные сокращения, а также сокращения, вызванные гистамином, были меньше выражены, когда рога матки медленно охлаждали до —79° в растворе Рингера, содержащем 10—20% глицерина и хлористый кальций и лишь половину обычной концентрации хлористого натрия [43].

Когда концентрацию глицерина понижали до 5%, медленно охлажденные рога матки проявляли мало

активности. В то же время уменьшение продолжительности инкубирования в не содержащем кальция растворе Рингера с уменьшенной вдвое концентрацией остальных солей и добавлением 20% глицерина перед охлаждением с 1 *час* до 10 *мин* приводило к заметному усилению как спонтанных, так и вызванных сокращений после оттаивания. Рога матки, обработанные не содержащим кальция раствором Рингера с добавлением 20% глицерина и погруженные после оттаивания в сыворотку морской свинки, были более активными, чем рога, замороженные в той же среде, но помещенные после оттаивания в обычный физиологический раствор.

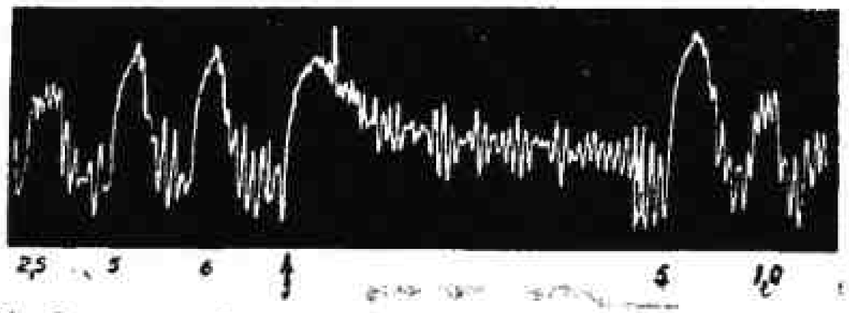
Сравнение спонтанной активности рогов матки и их чувствительности к гистамину до и после замораживания показало, что даже при самых благоприятных условиях замораживание в какой-то степени повреждало ткани. Матки после оттаивания находились в состоянии частичного сокращения и никогда полностью не расслаблялись. Наиболее заметными были сокращения в рогах, замороженных в присутствии ионов кальция. При понижении концентрации глицерина до 15% результаты не улучшались. И много хуже они были, когда замораживание осуществляли в среде, содержащей 20% глицерина и забуференной фосфатами при pH 7,0, 7,4 или 7,8. Об этом свидетельствовало уменьшение спонтанных сокращений и исчезновение реакции на гистамин. Крайне интересно, что матки, замороженные в присутствии фосфатов, после оттаивания были дряблыми и полностью расслабленными, независимо от наличия или отсутствия в среде ионов кальция. Возможно, в процессе вымерзания воды в рогах матки нарушалось ионное равновесие, причем это нарушение зависело от состава среды, в которой матки охлаждали до —79°. Эвтектическая точка раствора хлористого натрия лежит при —21°. Хлористый же кальций остается в растворе, и его концентрация постепенно повышается, пока температура не достигнет его эвтектической точки, т. е. примерно —50°. Поэтому матки, охлаждаемые в средах, содержащих соли натрия и кальция, в процессе медленного охлаждения испытывали в течение нескольких минут влияние ионов кальция, нарушающих

ионное равновесие, что, возможно, приводило к необратимому сокращению. Матки, охлажденные в средах, в состав которых кальций не входит, иногда содержали его в интерстициальных жидкостях, так что во время медленного охлаждения при температурах от —21 до —50° могло произойти частичное сокращение. Фосфат кальция относительно нерастворим. В присутствии добавочных фосфатов из буферной системы все имеющиеся ионы кальция во время замораживания могли выпасть в осадок, чем и объясняется расслабление рогов матки после оттаивания, но без возобновления сокращений [43].

Сукцинат кальция по своей растворимости занимает промежуточное место между хлористым кальцием и фосфатом кальция.

Лавлок предложил использовать для буферной системы вместо фосфатов сукцинаты. Он полагал, что матки, помещенные в среду, содержащую глицерин и сукцинаты, будут одинаково устойчивы к замораживанию при низких температурах как при наличии, так и в отсутствие хлористого кальция. Рога матки охлаждали до —79° в обычном (с солями кальция и магния) растворе Рингера, забуференном при pH 7,0 сукцинатом натрия и янтарной кислотой и содержащем 20% (по объему) глицерина. После оттаивания и удаления глицерина в препаратах наблюдались более активные спонтанные сокращения и бóльшая чувствительность к гистамину, чем в контрольных рогах, взятых от тех же самых маток и замороженных в любой другой среде. Матки морских свинок, предварительно иммунизированных лошадиной сывороткой, при замораживании в среде сукцинат — глицерин — раствор Рингера бурно реагировали на добавление в среду лошадиной сыворотки. Они были лишь немного менее активны, чем незамороженные матки, подвергавшиеся в течение 1 *час* воздействию этой же среды при комнатной температуре (фиг. 31). Однако у них отмечалась более слабая реакция на гистамин и лошадиную сыворотку, чем у незамороженных маток иммунизированных животных [43].

Полученные результаты подтвердили теорию, согласно которой сократительная способность мышцы матки после оттаивания частично зависит от наличия глицерина, а частично от ионного равновесия, в особенности от концентрации ионов кальция в среде во время



Фиг. 31. Спонтанные сокращения и реакции матки иммунизированной морской свинки на гистамин и лошадиную сыворотку.

Матку охлаждали до — 79° в растворе Рингера, содержащем 20% глицерина и соли Ca и Mg. Среда была забуферена при pH 7,0 сукцинатом натрия и янтарной кислотой. Матку согревали, отмывали и погружали в раствор Рингера. Цифры показывают дозу гистамина в микрограммах, а стрелка — добавление 0,5 *мл* лошадиной сыворотки.

замораживания. В эту теорию, однако, нужно внести некоторые поправки в свете наблюдений Рэ, который отметил, что при охлаждении содержащих глицерин сред до низких температур эвтектические точки отдельных солей уже не столь четко выражены [36]. Хуже растворимые соли, однако, начинают выпадать из раствора при более высоких температурах, чем лучше растворимые, и не исключена возможность нарушения ионного равновесия, несмотря на присутствие глицерина и предотвращение полного выпадения солей в осадок в определенной эвтектической точке (см. гл. 11).

Сердце

Методы

В опытах на изолированном сердце золотистого хомячка, взятом у животного при нормальной температуре тела и перфузируемом по методу Лангедорфа, наилучшего поддержания сердечной деятельности и наибольшей длительности жизни сердца удавалось добиться в тех случаях, когда применяли перфузионную жидкость с комнатной температурой. По предложению Робба [38], в раствор Тироде добавляли небольшие количества папаверина и не содержащего солей дрожжевого экстракта, богатого витаминами группы В, а кроме того, поливидонпирролидин («плазмосан»). Перфузионную жидкость каждый раз приготовляли заново и фильтровали через мелкопористый стеклянный фильтр непосредственно перед употреблением. В одном сосуде раствор насыщали кислородом при комнатной температуре, а в другом держали этот же раствор с добавлением 15—20% (по объему) глицерина.

Сердце охлажденного хомячка сохраняло жизнеспособность более продолжительный срок, чем сердце животного, не подвергшегося охлаждению, что подтверждает наблюдения Джайя и Радуловича [24] о жизнеспособности сердца крысы. Поскольку осуществление гипотермии по методу Джайя в закрытых сосудах требовало не менее 2 *час*, в методику были внесены некоторые изменения. Хомячка наркотизировали пентоталом и помещали на измельченный лед. Затем ему вскрывали грудную клетку, одновременно вдувая в легкие воздух через ноздри. В грудную полость для уменьшения частоты сердцебиений заливали охлажденный гепаринизированный раствор Тироде с температурой около +5°. Корни легких и крупные сосуды перерезали, и сердце переносили в насыщенный кислородом и гепаринизированный раствор Тироде, охлажденный примерно до +5°, для отмывания крови из камер и из коронарной системы. Через 30 *сек*, в течение которых сердце энергично сокращалось, в восходящую аорту вставляли канюлю и через нее медленно проводили капельную перфузию. Кончик канюли помещали непосредственно над аортальными клапанами. Коронарные артерии перфузировали насыщенной кислородом жидкостью с комнатной температурой под давлением около 120 *мм* рт. ст. В верхушку сердца вдевали крючок, который присоединяли к рычажку с писчиком, регистрировавшему механические движения сердца на закопченной ленте. На придаток ушка сердца накладывали

микроэлектроды, подключенные через усилитель к записывающему устройству.

Перфузионную жидкость насыщали кислородом в сосуде, подвешенном на высоте около 1,8 *м* над столом. Она вытекала по капле в меньший сосуд, находившийся на расстоянии 60 *см* над аортальной канюлей, а затем ее пропускали через змеевик, окруженный водяной рубашкой.

Температуру жидкости, проходящей через коронарные артерии, можно было снизить до —0,5°, пропуская через змеевик концентрированный физиологический раствор с температурой около —5°, и повысить до +40°, пропуская через змеевик горячую воду. В последнем случае жидкость в верхнем резервуаре также согревали до +40°, чтобы предотвратить избыточное растворение кислорода в резервуаре при более высоких температурах в змеевике. Если таких мер предосторожности не принимали, пузырьки кислорода нередко закупоривали коронарные сосуды. Обычно, однако, перфузионные жидкости не согревали, а охлаждали, и тогда опасность газовой эмболии была невелика.

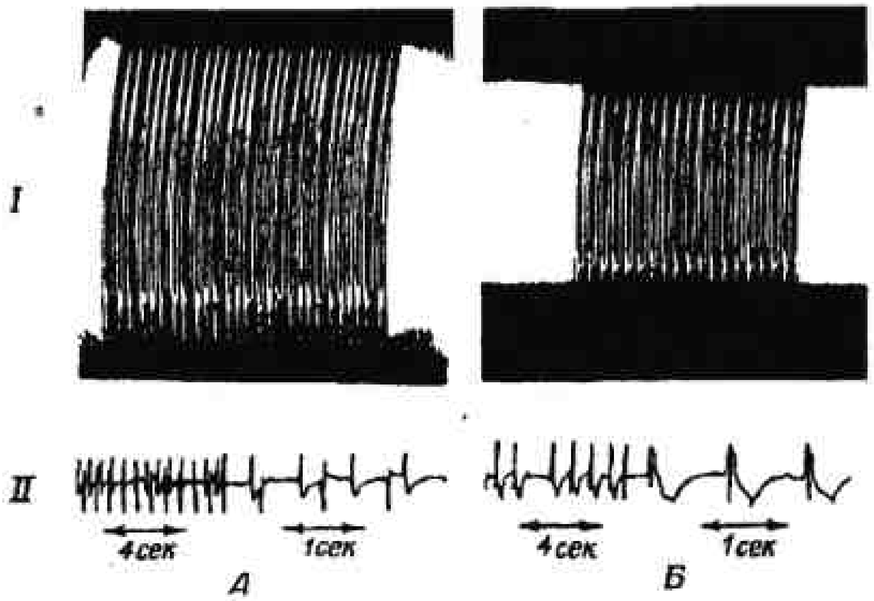
Сердца, которые в дальнейшем должны были замораживать в среде, не содержащей глицерина, охлаждали до 0° с помощью перфузионного аппарата. После прекращения сердцебиений их переносили в маленькие сосуды с политеновыми крышками, снабженные термопарой и содержащие 50 *мкл* охлажденной на льду среды. После этого их охлаждали и замораживали при желаемой температуре — или быстро в замораживающей смеси спирт — CO_2, или медленно в приборе Лавлока для медленного охлаждения (см. гл. 2). Сердца, подлежащие обработке глицерином, сначала охлаждали до температуры 12—15°. Концентрацию глицерина в среде, окружающей сердце, постепенно повышали, регулируя скорость вытекания капель из главных сосудов, содержащих перфузирующую жидкость с глицерином или без него. Когда в жидкости, перфузирующей коронарные сосуды, достигалась желаемая концентрация глицерина, сердца в приборе охлаждали до 0°. Затем их переносили в политеновые сосуды, в которых охлаждали до температуры ниже 0°. В первых опытах, для того

чтобы согреть замороженные сердца, сосуд держали под краном с горячей водой. Позднее для согревания сердец, замороженных при —79°, использовали сверхвысокочастотный магнетронный генератор, с помощью которого температуру повышали от —79 до 0° примерно в течение 1 *мин*.

ЗАМОРАЖИВАНИЕ СЕРДЦА БЕЗ ГЛИЦЕРИНА

Сердца́ хомячков, перфузируемые несколько измененным раствором Тироде с комнатной температурой, продолжали сокращаться на протяжении 8 *час* лишь с небольшим уменьшением силы сокращения или незначительным изменением электрокардиограммы, но без каких-либо признаков отека. Сердцебиения прекращались при температуре от +5 до 0°, а при согревании сердца до температуры чуть выше этого уровня опять возобновлялись. В изолированных сердцах, замороженных при температуре от —0,6 до —1° на 5—30 *мин*, сокращения обычно восстанавливались и продолжались несколько часов после согревания сердец при условии подключения их к перфузионному аппарату. Здесь обычно наблюдалось заметное снижение силы сокращений, а иногда и некоторые изменения электрокардиограммы. После замораживания при —1 или —2° и оттаивания сокращения сердца при перфузии восстанавливались и электрокардиограмма вначале имела нормальный вид. Однако сила ударов снижалась быстрее, чем в незамороженных контрольных сердцах, и продолжительность жизни in vitro уменьшалась. Примерно через 1 *час* на электрокардиограмме сердец, замороженных при температуре от —1,5 до —2,0°, появлялись отклонения от нормы. Наиболее низкая температура, после которой активность сердца полностью восстанавливалась, была —1,5° [42]. После замораживания при температуре от —2 до —3° сокращения сердца, восстановившиеся после оттаивания, носили беспорядочный характер. В течение 30 *сек* сила сокращения постепенно уменьшалась, а затем сердце останавливалось на различные периоды времени от 10 до 15 *сек*, после чего сердечная активность опять восстанавлива-

лась на 30 *сек*. Такая цикличность повторялась продолжительное время. В некоторых случаях сердце реагировало только на механический раздражитель (сжимание) и в скором времени останавливалось. После замораживания при температуре от —3 до —4,5° обычно восстанавливались сокращения предсердий, но не желудочков. В сердцах, замороженных при температуре

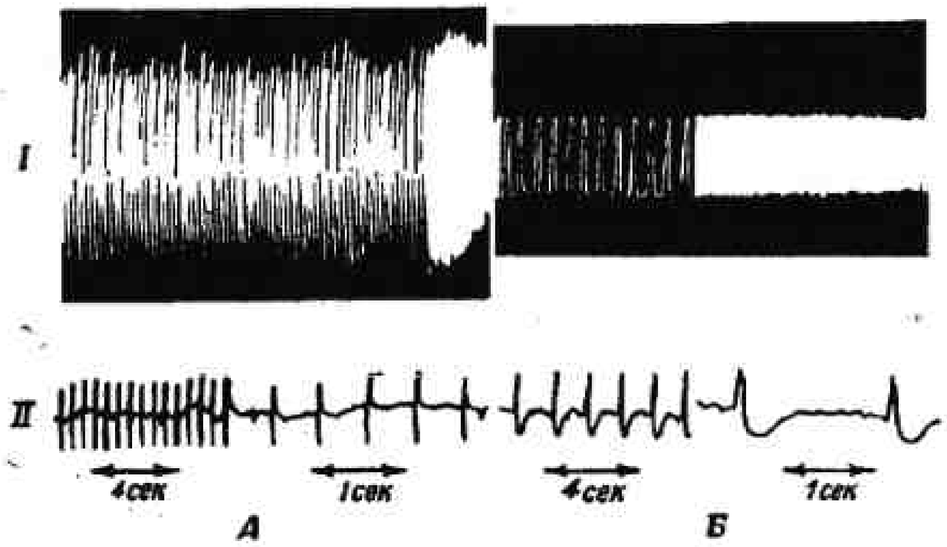


Фиг. 32. Кимограмма *(I)* и электрокардиограмма[1] *(II)* сердца хомячка, которого постепенно в течение 30 *мин* охлаждали до тех пор, пока температура внутри тела не достигла —0,7° [42].
А — непосредственно после согревания; *Б* — спустя 4 *час*. Скорость вращения барабана 8 и 128 *мм/мин*.

ниже —5°, после оттаивания никогда не наблюдалось никаких признаков активности. Перфузат был окрашен в бледно-розовый цвет, и спектроскопический анализ показывал присутствие в нем миоглобина. Миокард становился бесцветным, как бы «резиновым» на ощупь и явно нежизнеспособным.

В последующих опытах интактных хомячков охлаждали до тех пор, пока у них не прекращалось дыхание и сердцебиение, а затем их замораживали в жидкой среде при —5° (см. гл. 10). У частично замороженных животных вырезали сердца, согревали их в растворе

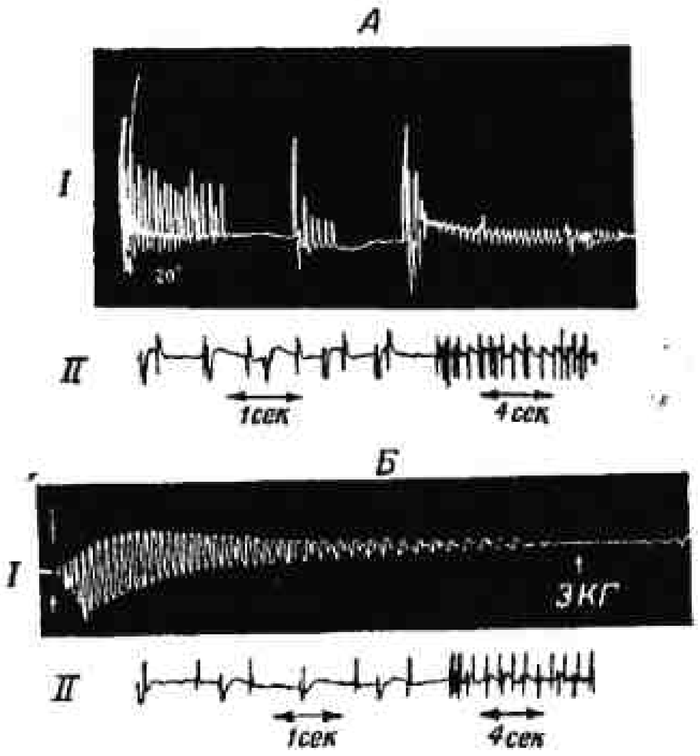
Тироде и перфузировали при комнатной температуре. У животных, замороженных на 30 *мин*, температура в грудной полости была от —0,6 до —0,8°. Сердца после оттаивания при перфузии восстанавливали свою нормальную деятельность (фиг. 32). Этого, впрочем, и следовало ожидать, так как интактные хомячки, замороженные на такой срок при указанной температуре,



Фиг. 33. Кимограмма *(I)* и электрокардиограмма *(II)* сердца хомячка, которого постепенно в течение 3 *час* охлаждали до тех пор, пока температура в грудной полости не достигла —1,5° [42].
А — непосредственно после оттаивания; *Б* — спустя 1 *час*. Скорость вращения барабана 8 и 128 *мм/мин*.

обычно полностью оживали. Не удалось, правда, оживить хомячков, которые находились в замороженном состоянии более 1 *час* или же были охлаждены до температуры ниже —1°. Тем не менее при постепенном замораживании хомячков на 3 *час* при температуре в грудной полости от —1 до —2° их сердца после оттаивания нормально сокращались при перфузии in vitro. Обычно период сохранения нормальных сердцебиений уменьшался и механическая сила сокращений снижалась на протяжении 1-го часа перфузии (фиг. 33). Сердца хомячков, замороженных на 3 *час*, когда температура внутри тела достигала от —2 до —3°, после оттаивания давали во время перфузии in vitro нерегулярные сокращения, разделенные интервалами, во время

которых сердечная деятельность отсутствовала. Иногда сердца начинали спорадически сокращаться лишь после искусственного сжатия желудочков (фиг. 34). Когда температура в грудной полости замороженных хомячков достигала —3 или —5°, предсердия изолированного



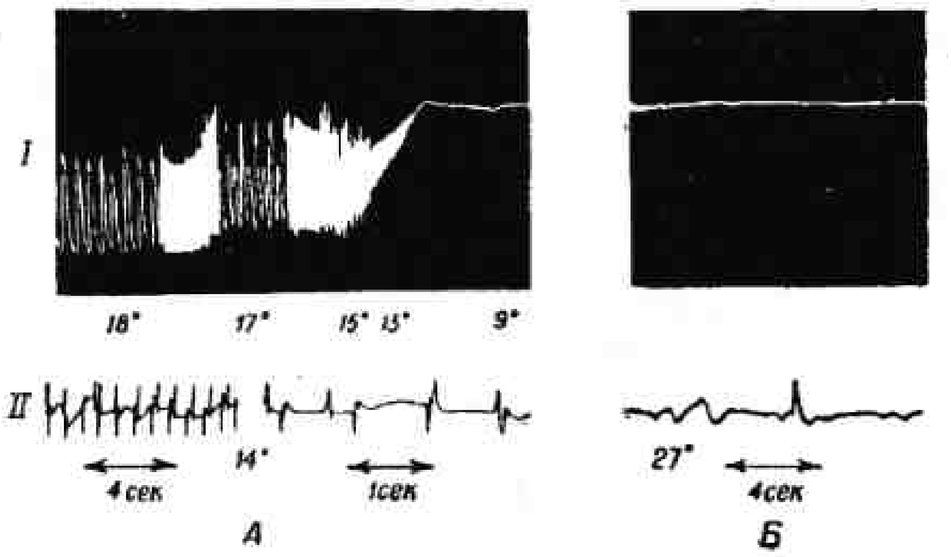
Фиг. 34. Кимограмма *(I)* и электрокардиограмма *(II)* сердца хомячка, которого постепенно в течение 3 *час* охлаждали до тех пор, пока температура в грудной полости не достигла —2,2° [42].

А — непосредственно после оттаивания; *Б* — спустя 1 *час*; первая стрелка показывает момент нанесения щипка. Скорость вращения барабана 128 *мм/мин*.

сердца, но не желудочки возобновляли после оттаивания ритмические сокращения. При температуре в грудной полости ниже —5° в изолированных сердцах in vitro не отмечалось никакой активности [42]. Приведенные опыты показали, что между результатами замораживания изолированного сердца хомячка и интактного животного нет особых различий.

Изолированные сердца крыс прекращали сокращаться, когда перфузионную жидкость охлаждали до

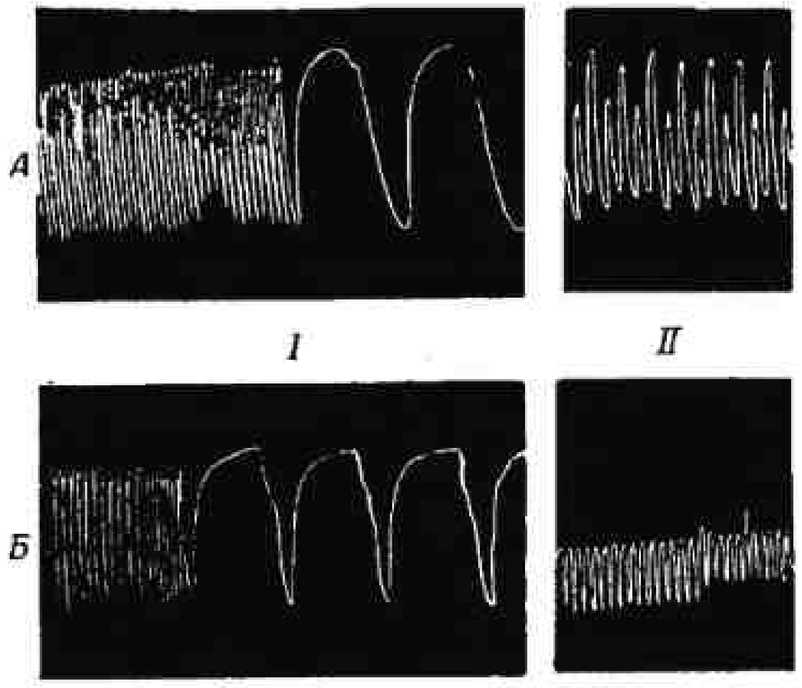
10—15°. Тем не менее они переживали замораживание в течение 1 *час* при температуре от —0,6 до —2° и после оттаивания возобновляли нормальные сокращения при перфузии коронарных артерий. Активность этих сердец частично восстанавливалась также после замораживания при температуре от —2 до —4,8°, но не при температуре ниже —5° (фиг. 35). Интересно, что, несмотря на



Фиг. 35. Кимограмма *(I)* и электрокардиограмма *(II)* сердца крысы, извлеченного из теплого животного и охлажденного in vitro [42].

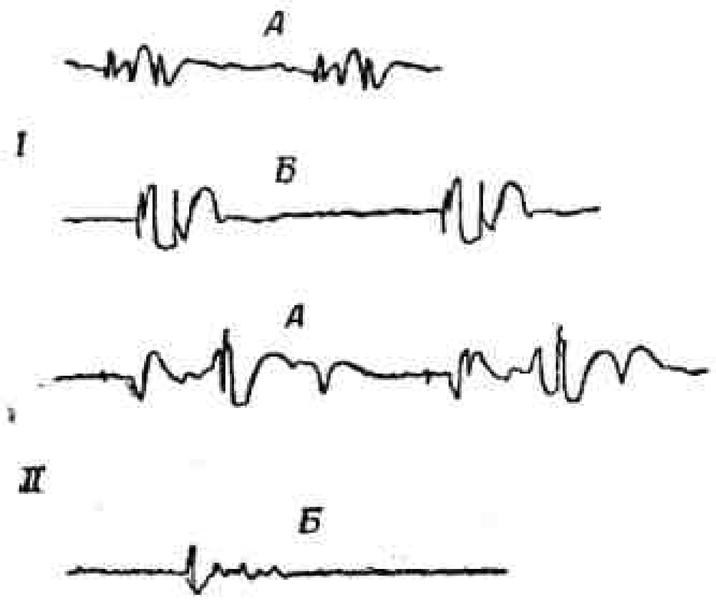
А — во время охлаждения до температуры — 4,8°; *Б* — после согревания. Скорость вращения барабана 8 и 128 *мм/мин*.

различную реакцию на охлаждение до температуры выше нуля, сердца крысы и хомячка почти не отличались по своей устойчивости к замораживанию. Значительно более устойчивым оказалось сердце черепахи. Его сокращения восстанавливались после продолжительного замораживания в течение 24 *час* при —2° или после замораживания в течение 1 *час* при температуре —10° (фиг. 36 и 37). Недавно Саймон в Австралии воздействовал на земноводных *Hyla* и *Crinia* низкими температурами. Обычно эти животные обитают в среде с температурой 15—20° и никогда не подвергаются воздействию холода. Тем не менее когда их охлаждали, вскрыв полость тела и орошая ее холодным раствором



Фиг. 33. Кимограммы, зарегистрированные от сердец двух черепах [42].

А — до замораживания; *Б* — после замораживания; *I* — на 24 *час* при —2°; *II* — на 1 *час* при —10°. Скорость вращения барабана 8 и 128 *мм/мин* [42].



Фиг. 37. Электрокардиограммы, соответствующие кимограммам, приведенным на фиг. 36 [42].

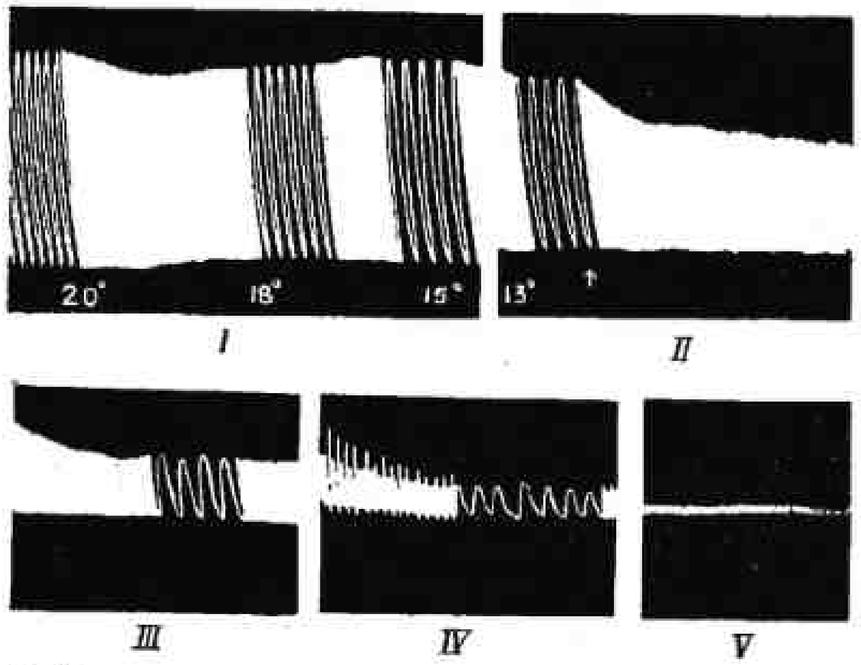
Рингера, сердечная деятельность не прекращалась до тех пор, пока температура не понижалась до —0,5°. Одна квакша (*Hyla phyllochroa*) полностью восстановила свою деятельность после понижения температуры до —2,5°. Орошающая жидкость и ткани при этой температуре оказались переохлажденными [40]. Эти исследования показали, что сердца млекопитающих и земноводных обладают исключительной устойчивостью к охлаждению в обычной физиологической среде до температур, близких к нулю.

ДЕЙСТВИЕ ГЛИЦЕРИНА НА СЕРДЦЕ И НА ЕГО УСТОЙЧИВОСТЬ К ЗАМОРАЖИВАНИЮ

Изолированное сердце золотистого хомячка прекращало сокращаться, когда в коронарные сосуды внезапно вводили 5—15-процентный раствор глицерина, и уже не восстанавливало своей деятельности, когда для последующей перфузии использовали раствор Тироде, не содержащий глицерина. Вместе с тем при постепенном повышении концентрации глицерина не наступало остановки сердца, особенно если перфузирующую жидкость охлаждали до температуры 11—17°. В тех случаях, когда, не прекращая перфузии, концентрацию глицерина на протяжении 1,5—2 *час* постепенно повышали, сила сердечных сокращений уменьшалась и они становились нерегулярными (фиг. 38), но полностью не исчезали, даже если через коронарные сосуды в течение 30 *мин* пропускали 20-процентный раствор глицерина. Затем по мере понижения концентрации глицерина сила сокращений сердца увеличивалась до тех пор, пока через коронарные сосуды не начинала протекать перфузионная жидкость, не содержащая глицерина. Спустя примерно 2 *час* записанные на закопченной ленте сокращения почти не отличались по своей амплитуде от исходных.

Сердца хомячков после воздействия глицерином с постепенным повышением концентрации до 15% [42] охлаждали до 0° на перфузионном аппарате, а затем помещали в маленькие политеновые сосуды, наполненные 15-процентным раствором глицерина с температу-

рой 0°. После этого сердца медленно охлаждали со скоростью 1° в 1 *мин* до тех пор, пока температура окружающего льда не достигла —20°. Для согревания сердец сосуды держали под струей горячей водопроводной воды. После этого сердца присоединяли к перфузионному аппарату и перфузировали 15-процентным раство-

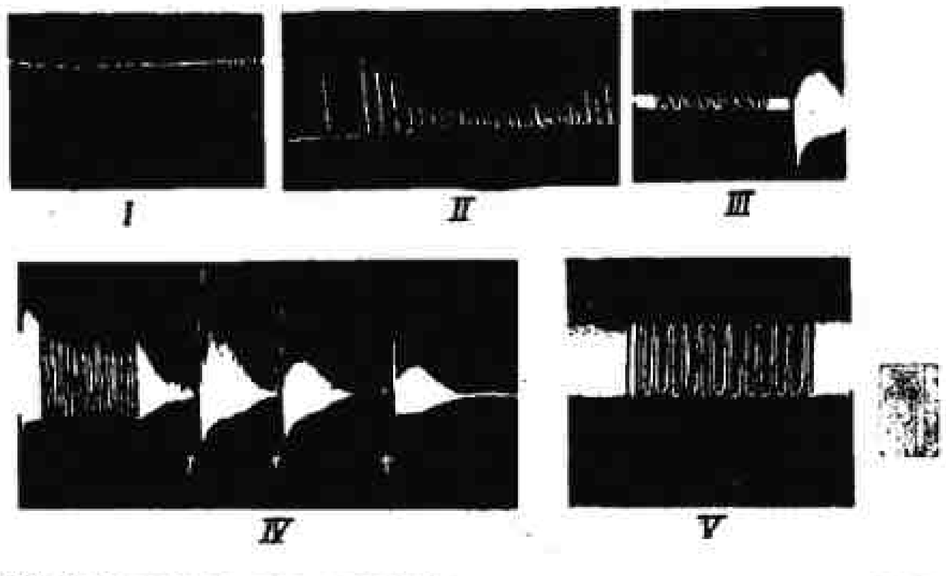


Фиг. 38. Кимограмма сердца хомячка, зарегистрированная во время охлаждения до +13° и во время добавления глицерина в перфузионную жидкость при указанной температуре [42].

I — во время охлаждения от +20 до +15° до добавления глицерина; *II* — в самом начале добавления глицерина при +13° (показано стрелкой); *III* — при содержании в перфузионной жидкости 7,5% глицерина; *IV* — при содержании в перфузионной жидкости 10% глицерина; *V* — при содержании в перфузионной жидкости 15% глицерина. Скорость вращения барабана 8 и 128 *мм/мин*.

ром глицерина. Некоторые сердца, обработанные таким образом, стали слабо сокращаться. После понижения концентрации глицерина сила и частота ударов увеличились, хотя в отдельных опытах сокращения сердца были нерегулярными и периодически вовсе прекращались. В некоторых случаях наблюдалось спонтанное восстановление сокращений, в других для этого требовалось механическое раздражение. В конце концов восстанавливался регулярный сердечный ритм с ударами умеренной силы (фиг. 39). Сердца хомячков, пропитан-

ные 15-процентным раствором глицерина, охлаждали также до —79°. В предварительных опытах, в которых политеновые сосуды согревали в горячей водопроводной воде, процесс оттаивания после охлаждения до температуры —79° занимал 5—10 *мин*. Во время постепенного понижения концентрации глицерина в перфузионной жидкости не наблюдалось никаких признаков

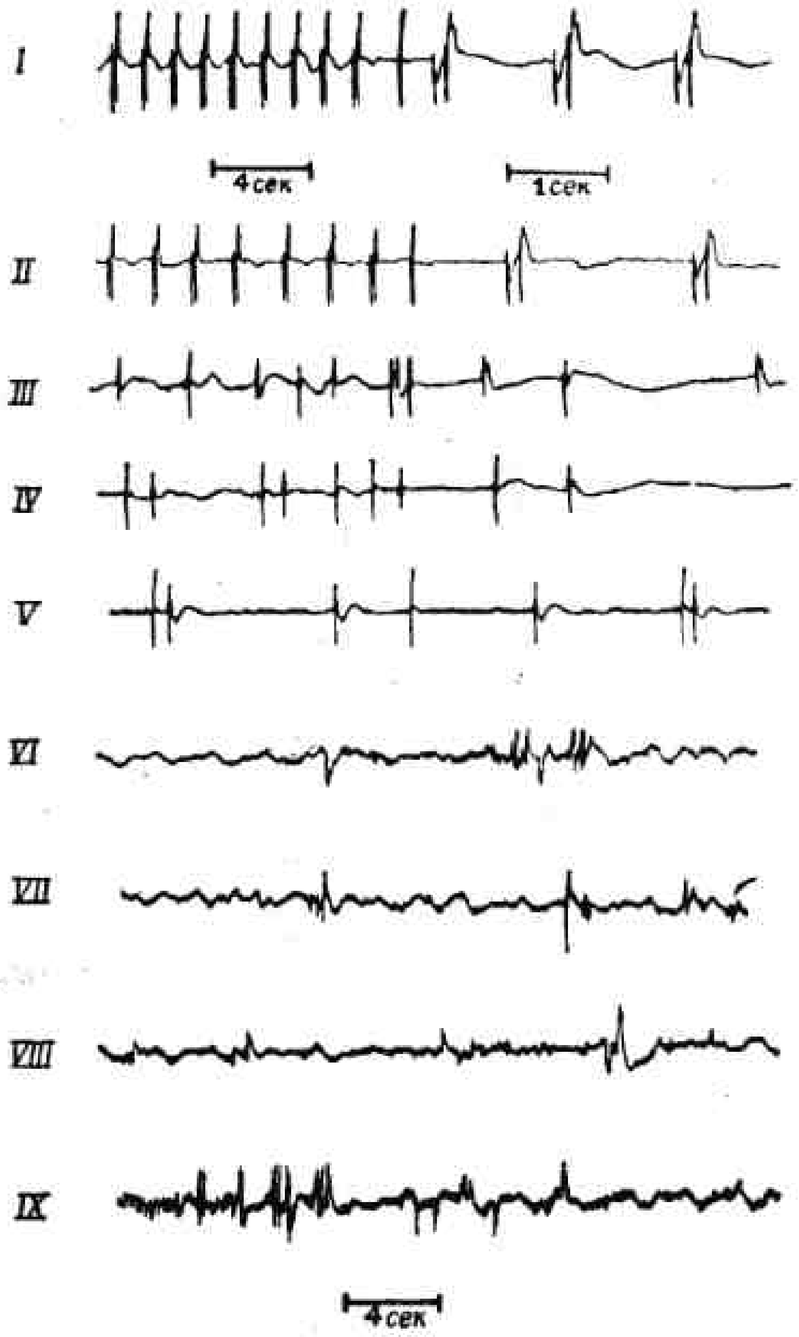


Фиг. 39. Кимограмма сердца хомячка, зарегистрированная во время перфузии 15-процентным раствором глицерина (см. фиг. 38) после охлаждения до —20° и согревания [42].

Глицерин постепенно удаляли из перфузионной жидкости при +20°. *I* — непосредственно после согревания; *II* — при понижении концентрации глицерина до 7,5%; *III* — при отсутствии в перфузионной жидкости глицерина; *IV* — то же при нанесении щипков (показано стрелками); *V* — спустя 4 *час* после согревания. Скорость вращения барабана 8 и 128 *мм/мин*.

сердечной деятельности. Перфузионная жидкость окрашивалась в розовый цвет, и в ней появлялся миоглобин, тогда как миокард быстро бледнел.

В последующих опытах сердца хомячков, обработанные 15-процентным раствором глицерина и охлажденные до —79°, согревали с помощью сверхвысокочастотного генератора, благодаря чему температура в течение 1 *мин* повышалась от —79 до +10°. При перфузии этих сердец 15-процентным раствором глицерина на электрокардиограмме наблюдались нерегулярные зубцы. Их частота увеличивалась по мере постепенного удаления глицерина (фиг. 40). Наилучшие результаты были по-



Фиг. 40. Электрокардиограмма сердца хомячка после охлаждения до—79° и при перфузии глицерином.

I — перфузия раствором Тироде при температуре +19°; *II* — перфузия 3-процентным раствором глицерина при +17°; *III* — перфузия 10-процентным раствором глицерина при +17°; *IV* — перфузия 15-процентным раствором глицерина при +15°; *V* — перфузия 15-процентным раствором глицерина при +5°; *VI* — сразу же после оттаивания (после охлаждения до —79°) в 15-процентном растворе глицерина; *VII* — спустя 45 *мин* после оттаивания в 7,5-процентном растворе глицерина при +20°; *VIII* — спустя 2 *час* после оттаивания без глицерина при +20°; *IX* — спустя 3 *час* после оттаивания в растворе Тироде при +20°.

лучены на сердцах, перфузированных сывороткой хомячка с добавлением 15% глицерина и замороженных в этой же среде. Однако даже в таких условиях после согревания сердец электрокардиограмма не приходила в норму и механические сокращения не регистрировались. Тем не менее на основании полученных результатов можно предположить, что небольшая часть миокарда сохраняла жизнеспособность после замораживания при —79° [43]. Если это предположение соответствует действительности, то в будущем, внеся требуемые изменения в состав перфузионной жидкости и в методику замораживания и оттаивания, удастся восстановить нормальную активность всего сердца после хранения его в замороженном состоянии при низких температурах.

Другие органы

В почках собаки, перфузированных раствором Тироде сначала с постепенно повышающейся, а затем с постепенно понижающейся концентрацией глицерина, после аутотрансплантации их в область шеи наблюдался массивный отек и некроз коры [28]. В целях изучения причины отека и его предотвращения были проведены соответствующие опыты in vitro. Срезы коры почек кролика весом 50—100 *мг* и толщиной 0,5 *мм* при погружении их в насыщенную кислородом кроличью кровь, лошадиную сыворотку или в раствор Тироде не изменяли своего веса. При перенесении же срезов в раствор Тироде, содержащий до 5 или 15% глицерина, вес их быстро уменьшался в течение 20 *мин*. После 50—80 *мин* пребывания в глицеринизированной среде вес увеличивался и наконец стабилизировался на величине, превышающей исходную. Другие срезы во время достижения минимального веса переносили из раствора Тироде, содержащего 15% глицерина, в гепаринизированную кроличью кровь. В результате их вес увеличивался в течение 20 *мин* до 115—119% контрольного, после чего он на протяжении 3,5 *час* понижался и наконец приходил в норму. Отек и повышение веса можно было приостановить, перенеся срезы в раствор Тироде с 20%

сахарозы после пребывания в течение 10 *мин* в не содержащей глицерина крови кролика. Еще через 10 *мин* их вновь переносили в кровь, и тогда имел место уже лишь незначительный и преходящий отек и увеличение веса. Необходимо разработать такой метод удаления глицерина, чтобы предотвратить отек паренхиматозной оболочки во время перфузии целых почек. Возможно, удастся восстановить хорошее снабжение кровью нефронов почек, которые были обработаны подобным образом и затем трансплантированы [28]. Большое число обработанных глицерином почек собаки охлаждали до —79°, но метод быстрого согревания такой большой массы замороженного материала до настоящего времени не разработан. По всем признакам повреждения наступают во время продолжительного оттаивания.

Легкие собаки также перфузировали растворами с постепенно повышающейся и понижающейся концентрацией глицерина. Имеются указания, что во избежание массивного отека легких до или после трансплантации их живому животному необходимо применять особую перфузионную жидкость и специальную методику для удаления глицерина. Пока еще мы не имеем в своем распоряжении методики быстрого оттаивания легких, охлажденных до температуры —79°, тогда как методика трансплантации долей легкого собаки уже разработана [27].

ЛИТЕРАТУРА

1. Bainbridge F. A., Evans C. L., The heart, Lung, kidney preparation, J. Physiol., **48**, 278—286 (1914).
2. Berman E. F., Goldberg M., Akman L., Experimental replacement of the heart in the dog, Transplant. Bull., **5**, 10—11 (1958).
3. Bickford R. G., Winton F. R., The influence of temperature on the isolated kidney of the dog, J. Physiol., **89**, 198—219 (1937).
4. Bleehen N. M., Fisher R. B., The action of insulin on the isolated rat heart, J. Physiol., **123**, 260—276 (1954).

5. Brauer R. W., Leong G. F., McElroy R. F., Holloway R. J., Circulatory pathways in the rat liver as revealed by P^{32} chromic phosphate colloid uptake in the isolated perfused liver preparation, Amer. J. Physiol., **184**, 539—598 (1956).
6. Brauer R. W., Pessotti R. L., Pizzolato P., Isolated rat liver preparation. Bile production and other basic properties, Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., **78**, 174—181 (1951).
7. Brown G. L., Dale H., The pharmacology of ergometrine, Proc. Roy. Soc., B, **118**, 446—447 (1935).
8. Burn J. H., Gunning A. J., Walker J. M., Effects of noradrenaline and adrenaline on the arterial rhythm in the heart-lung preparation, J. Physiol., **137**, 141—153 (1957).
9. Burn J. H., Williams E. M. V., Walker J. M., The effects of acetylcholine in the heart-lung preparation including the production of auricular fibrillation, J. Physiol., **128**, 277—293 (1955).
10. Burn J. H., Williams E. M., Walker U. M., The production of block and auricular fibrillation in the heart-lung preparation by inhibitors of cholinesterase, Brit. Heart J., **17**, 431—447 (1955).
11. Cohen A., Gordon A. H., Catabolism of plasma albumin by the perfused rat liver, Biochem. J., **70**, 544—551 (1958).
12. Dale H. H., The action of extracts of the pituitary body, Biochem. J., **4**, 427—447 (1909).
13. Dale H. H., The anaphylactic reaction of plain muscle in the guinea-pig, J. Pharmacol., **4**, 167—223 (1913).
14. Dale H. H., Laidlaw P. P., The physiological action of β-Iminazolylethylamine, J. Physiol., **41**, 318—344 (1910).
15. Dale H. H., Laidlaw P. P., A method of standardising pituitary (infundibular) extracts, J. Pharmacol., **4**, 75—95 (1912).
16. Dempster W. J., Kidney homotransplantation, Brit. J. Surg., **40**, 447—465 (1953).
17. Dempster W. J., Problems of renal transplantation. Modern Trends in Urology, ed. Riches E. W., pp. 154—167, London, Butterworth (1953).
18. Dempster W. J., Bibliography of kidney transplantation, Transplant. Bull., **i**, 55—58 (1954).
19. Dempster W. J., Bibliography of kidney transplantation. Addendum 1, Transplant. Bull., **2**, 14—15 (1955).

20. Dempster W. J., Joekes A. M., Functional study of the kidney auto-transplanted to the neck of dogs, Acta med. scand., **147**, 99—118 (1954).
21. Dempster W. J., Joekes A. M., Emotional antidiuresis in the auto-transplanted kidney, J. Physiol., **128**, 122—130 (1955).
22. Evans C. L., The gaseous metabolism of the heart and lungs, J. Physiol., **45**, 213—234 (1912).
23. Fisher R. B., Lindsay D. B., The action of insulin on the penetration of sugars into the perfused heart, J. Physiol., **131**, 526—541 (1956).
24. Giaja J., Radulovic J., Survival of the heart following deep hypothermia, Nature, Lond., **178**, 1286 (1956).
25. Gordon A. H., The use of the isolated perfused liver to detect alteration to plasma proteins, Biochem. J., **66**, 255—264 (1957).
26. Hemingway A., Some observations on the perfusion of the isolated kidney by a pump, J. Physiol., **71**, 201—213 (1931).
27. Huggins C. E., Reimplantation of lobes of the lung. An experimental technique, Lancet, **ii**, 1059—1062 (1959).
28. Huggins C. E., The effect of vatying concentrations of glycerol on the weight of isolated rabbit kidney slices, J. Physiol., **145**, 54P (1959).
29. Hume D. M., Merrill J. P., Miller B. F., Thorn G. W., Experiences with renal homotransplantation in the human: report of nine cases, J. clin. Invest., **34**, 327—382 (1955).
30. Knowlton F. P., Starling E. H., The influence of variations in temperature and blood-pressure on the performance of the isolated mammalian heart, J. Physiol., **44**, 206—219 (1912).
31. Langendorff O., Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen, Pflüg. Arch. ges. Physiol., **61**, 291—332 (1895).
32. Merrill J. P., Murray J. E., Harrison J. H., Girld W. R., Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins, J. Amer. med. Ass., **160**, 277—282 (1956).
33. Miller L. L., Bly C. G., Watson M. L., Bale W. F., The dominant role of the liver in plasma protein synthesis. A direct study of the isolated perfused rat liver with the aid of lysine-ε-C^{14}, J. exp. Med., **94**, 431—453 (1951).
34. Murray J. E., Lang S., Miller B. E., Dammin G. L., Prolonged functional survival of renal autotransplants in the dog, Surg. Gynec. Obstet., **103**, 15—22 (1956).

35. Neptune W. B., Cookson B. A., Bailey C. P., Appler R., Rajkowski F. W., Complete homologous heart transplantation, Arch. Surg., Chicago, **66**, 174—178 (1953).
36. Rey L. R., Study of the freezing and dryingof tissues at very low temperatures. Recent Research in Freezing and Drying, ed. Parkes A. S. and Smith A. U., pp. 40—62, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1960.
37. Richards A. N., Plant O. H., Urine formation in the perfused kidney. The influence of alterations in renal blood pressure on the amount and composition of urine, Amer. J. Physiol., **59**, 144—183 (1922).
38. Robb J. S., Maintenance of perfused mammalian hearts, Circulation Res., **1**, 185 (1953).
39. Ross D. N., Hypothermia as an aid to surgery, Amm. R. Coll. Surg. Engl., **24**, 43—53 (1959).
40. Simon J. R., Personal communication, 1958.
41. Simonsen M., Buemann J., Gammeltoft A., Jensen F., Jørgensen K., Biological incompatibility in kidney transplantation in dogs. 1. Experimental and morphological investigations, Acta path. microbiol. scand., **32**, 1—35 (1953).
42. Smith A. U., Problems in the resuscitation of mammals from body temperatures below 0° C, Proc. Roy. Soc., **B**, **147**, 533—544 (1957).
43. Smith A. U., Factors in the reanimation of frozen mammals. Symposium on Hypothermia, ed. Andjus R. K., pp. 480—492. XVth int. Congr. Milit. Med. Pharm, Belgrade, 1959.
44. Verney E. B., Starling E. H., On secretion by the isolated kidney, J. Physiol., **56**, 353—358 (1922).
45. Winton F. R., Physical factors involved in the activities of the mammalian kidney, Physiol. Rev., **17**, 408—435 (1937).

Глава 9

ДЕЙСТВИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА ПОЙКИЛОТЕРМНЫХ ЖИВОТНЫХ

Ранние работы

Около 300 лет назад Генри Пауэр взял сосуд с уксусом, в котором кишели крошечные угрицы, и заморозил его в смеси из льда и соли до такой степени, что эти маленькие животные, по его выражению, «закристаллизовались». Когда он спустя 2—3 *час* растопил лед, эти животные вновь появились и «плясáли и резвились как ни в чем не бывало». Они пережили и следующее замораживание, когда сосуд с уксусом выставили на целую ночь на сильный мороз. Это одно из первых описаний опытов по замораживанию целых животных. Пауэр пришел к выводу, что охлаждение в противоположность нагреванию не обладает способностью убивать [31].

Вскоре после этого Роберт Бойль опубликовал результаты своих наблюдений и опытов по физическому, химическому и биологическому действию холода [7]. На Бойля произвело большое впечатление то, что охлаждение предотвращает гниение. Например, в Гренландии погребенные трупы сохранялись без каких-либо признаков разложения в течение более 30 лет. После оттаивания же структура плоти претерпевала изменения и вскоре наступал распад. Бойль обнаружил, что умеренное охлаждение сохраняет яблоки, яйца, мясо, глаза млекопитающих и различные скоропортящиеся продукты растительного и животного происхождения, но что после их оттаивания из замороженного состояния структура

тканей обычно изменяется. Когда он замораживал живых лягушек в широкогорлом сосуде с водой, они как бы врастали в лед, но часто вокруг них был виден тончайший слой незамерзшей жидкости. Одна лягушка, хотя и была покрыта льдом, явно оставалась живой. Другие, хотя и выглядели внешне окоченевшими и неподвижными, стали двигаться спустя несколько минут после того, как сломали лед и их перенесли в холодную воду. Таз с водой, в которой плавали маленькие пескари, выставили на всю ночь на жестокий мороз. Утром обнаружили, что некоторые рыбки плавали в незамерзшей воде под ледяной коркой. Другие же вросли в лед, были твердыми на ощупь, изогнулись и казались мертвыми. Однако, как только лед сломали и рыб опустили в свежую воду, они тотчас ожили. Вместе с тем при пребывании в такой ледяной оболочке в течение 3 дней рыбы неизменно замерзали и погибали. Бойль пришел к выводу, что охлаждение не в меньшей степени, чем нагревание, может действовать разрушающе на живые организмы и неодушевленные предметы. Примерно лет сто спустя Джон Хантер не смог оживить замороженного карпа (см. [27]).

Реомюр [32] одним из первых описал свои наблюдения и опыты по замораживанию насекомых (фиг. 41). Он имел одно преимущество перед Бойлем в том отношении, что в его распоряжении был точный термометр для измерения температуры. Реомюр обнаружил, что гусеницы распространенных, но не названных им видов переживали замораживание при —17° R (—20° C) в стеклянной пробирке, помещенной в смесь льда и соли. Гусеницы других видов погибали при этой температуре, но оживали после охлаждения до —9° R (—11° C). Реомюр показал, что гусеницы, хотя и были окоченелыми и твердыми на ощупь, при самой низкой температуре, которую они переживали, сохраняли какое-то количество незамерзшей жидкости. Можно полагать, что именно Реомюр был первым энтомологом, наблюдавшим насекомых в состоянии переохлаждения. В своих опытах он наглядно показал, что животные были заморожены лишь частично. Когда менее устойчивых к холоду гусениц охлаждали до —15° R (—17,5° C) и затем разрезали пополам, ока-



MÉMOIRES

POUR SERVIR

A L'HISTOIRE

DES INSECTES.

PREMIER MÉMOIRE.

DE LA DURÉE DE LA VIE

DES CRISALIDES;

Des moyens de la prolonger, & des moyens de l'abréger; Et comment on peut prolonger & abréger la durée qui ſemble preſcrite à la vie complette de quantité d'Inſectes de différents genres.

Фиг. 41. Заглавие раздела, посвященного замораживанию гусениц, из 2-го тома классического труда Реомюра, опубликованного в Париже в 1736 г.

зывалось, что их внутренние органы совершенно промерзали. Попытки оживить гусениц, замороженных при этой температуре и затем оттаянных, окончились неудачей. Реомюр пришел к выводу, что не было таких гусениц, которые ожили бы после того, как они полностью замерзли. Если бы он видел таких гусениц, он счел бы, что присутствует при воскрешении животного, ибо при полном замораживании останавливается кровообращение, а организм, у которого прекратилось кровообращение, можно считать мертвым. Реомюр установил, что у гусениц различных видов кровь замерзает при разной температуре. Он сравнивал кровь с водкой различной крепости — слабая водка замерзает при такой температуре, при какой более крепкая еще остается в жидком состоянии. Так впервые возникло предположение о том, что различия в устойчивости к холоду обусловлены различиями в физических и химических свойствах крови у животных разных видов. Реомюр указывал, что кровь птиц и млекопитающих замерзает при более высокой температуре, чем кровь насекомых, но этих животных от холода защищает их «природное тепло».

Спалланцани [46] нашел, что многие крошечные животные, в том числе и некоторые роды коловраток, переживали замораживание при температуре —24°. Он подтвердил также более ранние наблюдения Левенгука и Нидхэма об оживлении высушенных организмов, таких, как мелкие пресноводные животные и пшеничные угрицы. По мнению Спалланцани, это было истинное воскрешение организма. На протяжении всего XIX в. исследователи спорили относительно возможности выживания организма после полного прекращения жизненных процессов в результате высушивания (см. [16]).

Между тем из северных стран возвращались путешественники с поражающими воображение рассказами о виденных ими насекомых, моллюсках, пресмыкающихся и рыбах, которые неоднократно или на долгие периоды времени замерзают при низкой температуре окружающего воздуха, а затем полностью оживают после оттаивания. Например, в 1835 г. исследователь Арктики Росс обнаружил, что из гусениц *Laria rossi,* четыре раза подвергшихся замораживанию при температуре от —11,45

до —47°, вывелись бабочки. Франклин во время своей экспедиции к Северному Ледовитому океану в период между 1819 и 1822 гг. наблюдал, как карп, будучи замороженным в течение 36 *час*, трепыхался после отогревания (см. [30]). В 1886 г. Тернер описал, как однажды в экспедиции на Аляске он накормил собак замороженной мелкой рыбой *(Dallia pectoralis)*, вырубленной из куска льда, в котором она хранилась несколько недель. Вскоре собак вырвало рыбой, которая, попав в желудке собаки в теплую среду, оттаяла и ожила (см. [44]). Такие рассказы очевидцев укрепляли веру в то, что когда-нибудь в будущем, возможно, удастся сохранять в замороженном состоянии и затем оживлять животных любых видов.

Некоторые опыты, проведенные исследователями в конце XIX в., казалось, подтвердили это предположение. Например, Пиктэ сообщил, что виноградная улитка *(Helix pomatia)* пережила пребывание в течение 30 *час* в холодильнике при температуре —130°, а лягушки ожили после замораживания при —28°. Пиктэ демонстрировал также оживление золотых рыбок и линей после охлаждения их до —15°, т. е. до такой температуры, при которой все тело рыбы промерзало и становилось ломким (см. [19]).

Успехи, достигнутые в начале XX века

Результаты, полученные последующими исследователями, находились в полном противоречии с высказываниями Пиктэ и опровергали точку зрения, согласно которой пойкилотермные животные переживают полное замораживание. Например, Фишер [12] утверждал, что виноградная улитка *(Helix pomatia)* не переживает воздействие температур ниже —5 или —6°. Камерон и Браунли [8] установили, что лягушки *Rana piptens* переживали понижение температуры внутри тела до —1°, но погибали, когда она падала до —1,8°. Эти авторы обнаружили, что в тех случаях, когда животные подвергались воздействию низких температур, у них температура внутри тела снижалась крайне медленно. Они охлаждались так же, как охлаждается соответствующий объем физиологического, изотонического с кровью раствора. Процесс замораживания не заканчивался еще после многочасового пребывания при температуре ниже точки замерзания крови или физиологического раствора. Так, тело лягушек, находившихся в течение 1 *час* при температуре —25°, было совершенно твердым и казалось насквозь промерзшим. Скелетные мышцы содержали лед, но внутренние органы не промерзли и сердце продолжало сокращаться. Температура внутри тела не достигла летального уровня —1,8°, и интактные животные ожили. Интересно, что сердце после замораживания при —2,5° вновь начало сокращаться и что скелетная мышца и периферические нервы также функционировали, хотя они были заморожены при температурах, обычно летальных для интактных животных. Было сделано заключение, что маловероятно, чтобы лягушки переживали замораживание при низкой температуре воздуха в таких холодных областях, как Северная Канада, и что они переживают зимний период, по-видимому, зарывшись в тину или ил, где температура сохраняется на уровне выше —1°. В СССР Калабухов и Мацко с сотрудниками также установили, что лягушки и жабы переживают частичное замораживание поверхностных тканей, но погибают при полном замораживании, когда температура внутри тела падает ниже —1° (см. [13]). Геологи, находившие в глыбах льда лягушек, которые оживали после освобождения их из ледяной оболочки, редко регистрировали температуру среды, окружавшей животных. Она могла равняться 0°, а если и была ниже 0°, то все равно внутренние органы могли оставаться незамерзшими и при температуре около —1°.

До недавнего времени многие физиологи находились под впечатлением того факта, что профессору Люйету удалось оживить золотых рыбок, которые были погружены в жидкий воздух и тела которых стали ломкими в связи с полным вымерзанием всей жидкости в организме. Между тем факты, сообщенные Люйетом, говорят, что золотая рыбка переживает погружение в жидкий воздух на различные сроки, но не более 15 *сек*. Тела

рыбок, которые впоследствии ожили, не промерзли целиком и не стали ломкими. При воздействии жидкого воздуха в течение 35 *сек* и более тела становились ломкими и рыбки не оживали [18]. Люйет показал, как искусный фокусник может убедить аудиторию в том, что рыбка, ожившая после пребывания в жидком воздухе, находилась в нем такое же время, как и те, которые были разломаны пополам. Возможно, сам того не желая, он ввел в заблуждение даже некоторых сотрудничавших с ним исследователей. В начале XX в. многие ученые изучали действие замораживания на рыб различных видов, регистрируя у них температуру внутри тела. Они пришли к единодушному мнению о том, что животные в состоянии пережить образование льда в коже и других поверхностных тканях, в результате чего их тело становится твердым и буквально окостеневшим. Однако они погибали, если период замораживания продолжался достаточно долго, а температура была настолько низкой, что происходило полное промерзание внутренних органов. Следовательно, наблюдения Пиктэ были, по-видимому, ошибочными. Теория Бахметьева, согласно которой насекомые и другие пойкилотермные животные могут переживать продолжительное замораживание в состоянии анабиоза, подверглась критике, несмотря на его оговорку, что при падении температуры ниже критического уровня наступает смерть [13, 33, 47].

В противоположность золотым рыбкам уксусные угрицы *(Anguillula aceti)* оживали после погружения в жидкий воздух на сроки, достаточные для замораживания их при этой температуре (приблизительно —190°). Успех оживления зависел от очень быстрого согревания и увеличивался при предварительной обработке угриц 30-процентным раствором этиленгликоля, который, как полагают, вызывал дегидратацию [20, 21]. Была выдвинута теория, согласно которой успех выживания в этих случаях зависел от витрификации протоплазмы во время быстрого охлаждения и перехода ее из стеклообразного состояния в жидкое в процессе быстрого оттаивания, благодаря чему в ней не успевали образовываться кристаллы льда. При медленном согревании, особенно при

температурах выше —43°, организмы погибали, по-видимому, вследствие наступления кристаллизации. Казалось бы, нет никакой возможности охлаждать и согревать более крупных, чем уксусные угрицы, животных настолько быстро, чтобы обеспечить витрификацию жидкостей внутри организма и предотвратить их кристаллизацию.

Образования кристаллов льда при низких температурах можно избежать при помощи полного высушивания организма до его охлаждения. Беккерель в многочисленных опытах, проведенных им за период между 1905 и 1951 гг., нашел, что такие мелкие животные, как коловратки и тихоходки, выживающие после обезвоживания при температурах выше нуля, могут в высушенном состоянии пережить воздействие температуры любого жидкого атмосферного газа [4]. Он охлаждал также высушенные организмы до долей градуса Кельвина (—273°) при помощи метода адиабатического размагничивания железных квасцов в жидком гелии. После согревания и увлажнения эти организмы оживали, хотя условия, в которых они находились, полностью исключали проявление каких-либо химических процессов, присущих жизни [5, 6]. Приведенные замечательные результаты послужили дальнейшим подтверждением теории, согласно которой выживание организмов при очень низких температурах возможно только в том случае, если удастся избежать кристаллизации льда. К сожалению, нет никакой надежды, что удастся применить эту методику в опытах на большей части видов беспозвоночных, а также на каких-либо позвоночных животных. Потеря ими определенной доли общего объема жидкости (величина этой доли зависела от вида, но все же была сравнительно небольшой) вызывала летальный исход при любой температуре.

Интенсивное изучение механизма, благодаря которому насекомые переживают воздействие низких температур, натолкнуло на мысль о том, что в некоторых случаях холодовое затвердение обусловлено уменьшением содержания воды [28, 29, 47]. Частичное обезвоживание вызывает понижение температуры замерзания крови и тканевых жидкостей. Более концентрированные жидко-

сти можно также переохлаждать до более низкой температуры [37]. Способность этих жидкостей оставаться в переохлажденном состоянии, не замерзая, при понижении температуры до —20°, а иногда и до —40° имеет существенное значение. Она помогает многим насекомым, обитающим в Канаде и других северных странах, переносить самые жестокие морозы [34, 35]. Однако иногда переохлажденные насекомые замерзают, и это влечет за собой летальный исход. Процесс начинается с образования одного центра кристаллизации льда. Вероятность появления таких центров повышается по мере увеличения длительности переохлаждения. Чем ниже температура, тем больше шансов на образование и дальнейший рост кристаллов льда в переохлажденной жидкости или в ткани насекомых [35, 39]. Таким образом, попытки добиться выживания отдельных особей в состоянии переохлаждения связаны с определенным риском. Вместе с тем с экологической точки зрения, несомненно, возможность выживания в таких условиях играет очень важную роль для ряда видов, место географического распространения которых в противном случае резко ограничивается. Точные измерения температуры выявили еще один замечательный фактор защиты и изоляции от холода у перезимовывающих организмов — кокон, почва, остатки листвы и растений, снег. Многие насекомые переживают суровые зимние холода в сравнительно мягких микроклиматических условиях при температуре выше точки замерзания жидкостей организма, допускающей длительное пребывание их в переохлажденном состоянии [35].

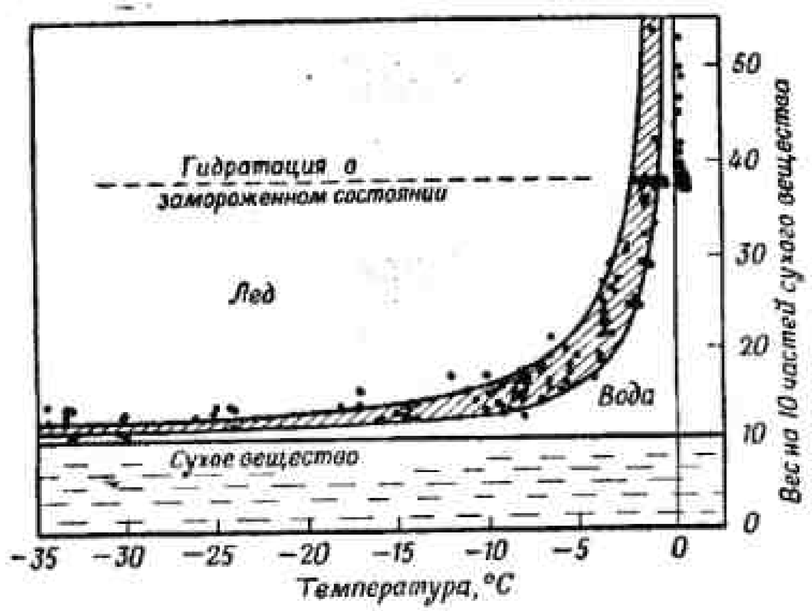
Регистрация температуры внутри тела показала, что другие пойкилотермные животные, в том числе лягушки, жабы, ящерицы, черепахи и змеи, переживают переохлаждение до температуры от —5 до —10°. Можно было даже определить количество потребляемого кислорода у ящериц, переохлажденных до температуры от —4,5 до —7,8° [13]. Следовательно, некоторые пойкилотермные позвоночные, зимующие в различных укрытых местах, во время своей естественной спячки пребывают в состоянии переохлаждения.

Последние открытия в области оживления пойкилотермных животных, охлажденных до низких температур

Многочисленные наблюдения и опыты, проведенные с целью выявления действия субнулевых температур на пойкилотермных животных, опровергли некоторые ранее разработанные общепринятые теории, и в последние годы вся проблема в целом подверглась пересмотру.

НАСЕКОМЫЕ

Многие исследователи получили данные, что насекомые различных сильно отличающихся друг от друга

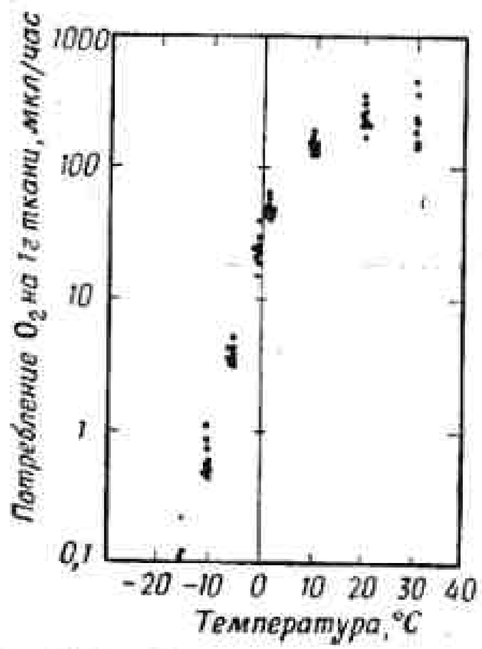


Фиг. 42. Отношение содержания незамерзшей воды и льда к сухому веществу личинки *Chironomus* при различных температурах охлаждения [44].

Заштрихованный участок ограничен двумя гиперболическими кривыми, показывающими, что содержание свободной воды обратно пропорционально температуре ниже точки замерзания.

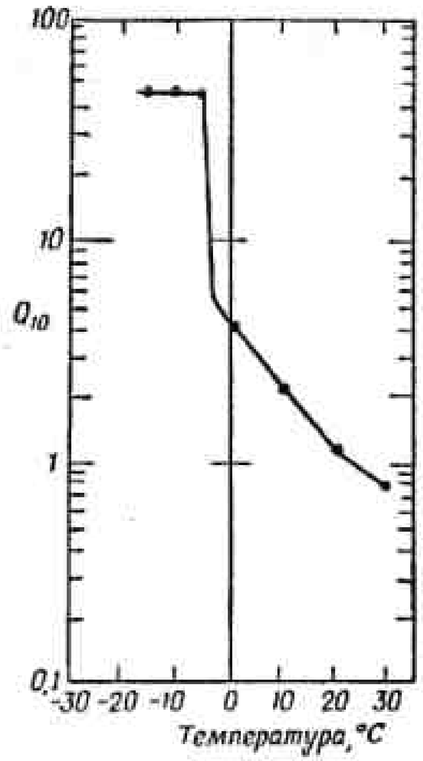
видов переживают замораживание при низких температурах. Например, Сколендер и сотрудники [44] показали, что личинки комара-звонца *(Chironomus)*, которых обнаруживали на Аляске замерзшими во льду или в иле на дне арктических водоемов при температуре —20°, всегда оживали после оттаивания, даже после замораживания

при —40°. Они переживали также неоднократное охлаждение до —16°. Определяли количество льда и воды в этих замороженных, но живых личинках при различных температурах. Отношение содержания воды к сухому весу резко уменьшалось по мере падения температуры (фиг. 42). При —15° вымерзало до 90% воды. При —35°, т. е. наиболее низкой температуре, применявшейся в данных исследованиях, в личинке оставалось еще какое-то небольшое количество свободной воды. Иногда личинку переохлаждали, но это не влияло на переживание ею низких температур. С помощью микрометода определяли потребление кислорода частично замороженной личинки при различных температурах. В интервале температур от 0 до —15° у отдельных личинок наблюдалось резкое уменьшение потребления O_2 (фиг. 43). Поразительные изменения коэффициента Q_{10} для потребления O_2 обнаружены в личинках, охлажденных до температур, лежащих выше точки замерзания, а также между точкой замерзания и —5° (фиг. 44). Некоторое количество кислорода они потребляли и при —15°, но когда температура падала до —40°, потребность в кислороде сводилась к нулю [43]. В опытах определяли интенсивность диффузии кислорода и CO_2 через лед, и она оказывалась достаточной для поддержания дыхания личинок, находившихся в мелких замерзших водоемах при температуре, преобладающей в естественных условиях [44].



Фиг. 43. Потребление кислорода отдельными личинками *Chironomus* при температуре от +30 до —15° [44].

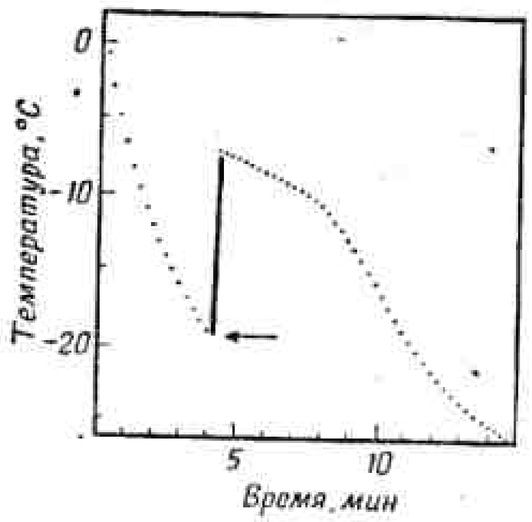
Очень интересное изучение выживаемости замороженных насекомых провел японский ученый Асахина с сотрудниками. Они сообщили [3], что предкуколки бабочки *Monema flavescens* (более известной как *Cnidocampa flavescens* Walk.) переживали замораживание при —30°, будучи переохлажденными примерно до —20°. Типичная кривая (фиг. 45) показывает постепенное понижение температуры насекомого во время охлаждения до —20°. Затем следует резкое и быстрое повышение температуры, совпадающее с наступлением процесса замораживания и обусловленное выделением скрытой теплоты кристаллизации. После этого температура постепенно понижается и достигает уровня температуры окружающего воздуха, тогда как жидкости организма постепенно вымерзают. Когда зимующих предкуколок освобождали от коконов, они переживали замораживание при таких низких температурах, как —30°, что подтвердилось восстановлением у них сокращений сердца после оттаивания. Они переживали также неоднократное замораживание и оттаивание с интервалами в 1 день. Будучи на той же стадии развития, но в интактных коконах, предкуколки переживали и нормально развивались после замораживания и пребывания в течение 100 дней при температуре —15°. В противоположность этому гусеницы, вылупившиеся в летние месяцы, не переживали даже кратковременного замораживания при —10° [3].



Фиг. 44. Изменение интенсивности дыхания у личинок *Chironomus* при температуре от +30 до —15°, выраженное как изменение коэффициента Q_{10} для потребления O_2 [44].

Процесс замораживания зимующих предкуколок *Cnidocampa flavescens* изучали под микроскопом. Куколкам вскрывали брюшную полость и охлаждали их на столике микроскопа до —10 или —20°. Вымерзание

начиналось в нескольких местах с поверхности крови. Постепенно кристаллы разрастались в радиальном направлении (фото 30, *А*), пока не заполняли все пространство, занятое кровью. Когда сердца зимующих предкуколок изолировали и охлаждали в крови непосредственно под микроскопом, кристаллы льда образовывались вне клеток сердечной мышцы (фото 30, *Б* и *Г*). Отдельные клетки и целые органы сморщивались, но после оттаивания они вновь приобретали нормальный вид, а сердечная деятельность восстанавливалась. При таком же замораживании сердец летних гусениц в крови, а также при замораживании сердец зимующих гусениц в 0,15 *М* растворе хлористого натрия отдельные клетки замораживались изнутри при температуре около —15°. Внутри клеток были видны кристаллы льда, а все сердце в целом темнело (фото 30, *В* и *Д*). Сердца, в которых происходила внутриклеточная кристаллизация льда, после оттаивания не возобновляли ритмических сокращений [3]. Вполне возможно, что у насекомых, замерзших в естественных зимних условиях, кристаллы льда образовались вне клеток, которые обезвоживались и сморщивались.



Фиг. 45. Охлаждение зимующих предкуколок *Cnidocampa flaves cens* Walk. [3].

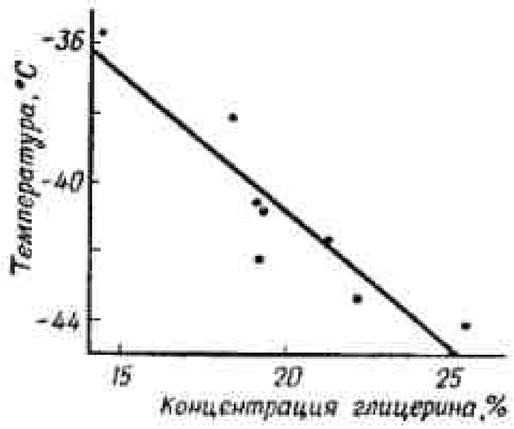
Стрелка показывает самую низкую температуру переохлаждения.

В следующих опытах Асахина и Аоки [2] охлаждали зимующих предкуколок *Cnidocampa flavescens* до —90° в специальной холодильной камере, где температура за 1,5 *час* снижалась от —5 до —90°. Спустя 45 *мин* предкуколок согревали при комнатной температуре, причем из 60 ожило 20. Предкуколок, извлеченных из коконов, погружали в жидкий кислород с температурой —180°. Предварительно их замораживали при —30° и выдерживали при этой температуре в течение одного дня. После оттаивания при комнатной температуре у них восстанавливались сокращения сердца и некоторые предкуколки продолжали развиваться, но не завершали полностью метаморфоза до стадии имаго. Предкуколки, которых до погружения в жидкий кислород выдерживали в течение 1 дня при температуре —10 или —20°, не выживали после оттаивания. Зимующие гусеницы бабочки боярышницы *Aporia crataegi adherbal* Fruhstorfer также переживали погружение в жидкий кислород при условии предварительного замораживания при —30°. После оттаивания у них восстанавливалась нормальная подвижность и они продолжали расти. Можно полагать, что выживание при температуре —180° зависело в каждом отдельном случае от внеклеточного вымерзания воды при —30° [1, 2].

Еще не выяснены основные факторы, способствующие выживанию этих и других видов насекомых при низких температурах на определенной стадии цикла развития, а также отличие их от насекомых, которые неизбежно погибают при действии замораживания. Новую струю внесли исследования Уайетта и сотрудников, которые установили, что глицерин является основным растворимым компонентом в плазме куколки бабочки *Hyalophora cecropia* [51, 52] и родственного ей вида сатурнии *Telea polyphemus* [53, 54]; глицерин обнаружен также в яйцах тутового шелкопряда *(Bombyx mori)* [9] и в личинках лугового мотылька *(Loxostege sticticalis)* и золотарниковой мухи-пестрокрылки *(Eurosta solidaginis)* [38]. В каждом случае стадия развития насекомого, во время которой в организме находили глицерин, представляла собой зимнюю стадию. Отсюда можно было сделать вывод, что своей устойчивостью к холоду некоторые насекомые обязаны именно накоплению глицерина. Более ранние исследования показывали, что присутствие глицерина в гемолимфе и тканевых жидкостях не всегда связано с устойчивостью к холоду. Солт [38], например, обнаружил, что личинки лугового мотылька *(Loxostege sticticalis)*, не переживающие замораживания, имеют почти такую же концентрацию глицерина (2—4%), как и личинки золотарниковой мухи-пестрокрылки *(Eurosta*

solidaginis), которые переживают хранение в течение 18 дней при температуре —55°.

Позднее в 1958 г. Солт сообщил, что он нашел до 25% глицерина в зимующих личинках паразитической осы *Bracon cepht* (Gahan). Некоторые из этих насекомых, паразитирующие на хлебном американском пилильщике *(Cephus cinctus)*, переохлаждались при —47°. Связь между концентрацией глицерина и достигнутой температурой переохлаждения у отдельных личинок показана на фиг. 46. Точка замерзания гемолимфы у этих насекомых лежит в интервале от —7 до —17°. Для большей точности результатов были определены также и точки таяния [40].



Фиг. 46. Связь между концентрацией глицерина в личинках *Bracon cephi* (Gahon) и достигнутой ими температуры переохлаждения 40].
Линия регрессии рассчитана.

Интересно отметить, что концентрация глицерина в личинках *Bracon cephi* увеличивалась осенью при хранении их как в естественных условиях, так и при температуре —5°. Одновременно с этим понижалась температура переохлаждения и таяния (табл. 48). В этот же период у насекомых наблюдалась способность переживать воздействие температур от —40 до —47° в переохлажденном состоянии, а также переживать замораживание. Весной и ранним летом происходил обратный процесс — концентрация глицерина в крови понижалась и исчезала устойчивость к холоду. В гемолимфе и других тканевых жидкостях зимующих личинок *B. cepht,* помимо глицерина, присутствовали также какие-то другие, еще не идентифицированные растворенные вещества. Когда концентрация глицерина достигала 5 *M,* она не соответствовала наблюдавшемуся в это время понижению температуры таяния примерно на одну моляльную единицу [41]. Не может быть никаких сомнений в том, что исключительная устойчивость личинок *B. cephi* к холоду в осенне время связана главным образом с их способностью обеспечивать высокую концентрацию глицерина. Концентрация глицерина в личинках в середине зимы достигала 20—27%, и этого было достаточно для обеспечения переохлаждения до такой низкой температуры, что насекомые не замерзали в своих естественных местах обитания. Концентрация глицерина была также достаточной для защиты отдельных клеток и тканей от повреждения, если личинки *B. cephi* все-таки замерзали [41]. В чувствительных же к холоду личинках *Loxostege sticticalis* его концентрация была, видимо, недостаточно высокой для оказания защитного действия. Как бы то ни было, исследования на *Bracon cephi* показали, что благодаря изменению метаболических процессов с наступлением холодов у ряда насекомых развивалась повышенная устойчивость к холоду. Примечательно, что раньше сам Солт сомневался в существовании такого основного фактора, повышающего устойчивость к холоду [36, 40—42].

ТАБЛИЦА 48

Изменение температуры переохлаждения и таяния, а также концентрации глицерина у личинок *Bracon cephi* (от 20 до 100 особей) в зависимости от времени года и температуры [42]

Дата сбора личинок	Обработка (продолжительность выдерживания при указанной температуре)	Температура переохлаждения, °С	Температура таяния, °С	Концентрация глицерина, *M*
15 августа 1958 г.	Без обработки	—29,0	—1,5	0,02
28 сентября 1955 г.	Без обработки	—29,6	—	—
28 сентября 1955 г.	+5°; 12 недель	—37,6	—	—
28 сентября 1955 г.	12 недель; на открытом воздухе	—40,5	—	—
22 ноября 1957 г.	—5°; 3 недели	—41,2	—8,8	2,74
22 ноября 1957 г.	—5°; 3—4 месяца	—40,1	—6,8	2,80
22 ноября 1957 г.	—5°; 8 месяцев	—36,0	—	2,13
1 апреля 1958 г.	—5°; 1 неделя	—37,6	—6,7	2,04
2 мая 1958 г.	Без обработки	—	—1,4	0,25
2 мая 1958 г.	20°; 1 неделя	—26,0	—	0,03

Впоследствии глицерин обнаружили в зимующих личинках жуков-древоточцев *Melandra striata* и кукурузного мотылька *(Pyrausta nubilalis)* [10]. Впадающие в спячку пенсильванские муравьи-древоточцы *(Camponotus pennsilvanicus)* и их яйца содержали зимой 10% глицерина. Когда муравьев, постепенно согревая до комнатной температуры, выводили из состояния спячки, они вновь становились подвижными и приблизительно через 3 дня в их организме уже нельзя было обнаружить глицерина. Как только у насекомых посредством охлаждения вызывали состояние спячки, глицерин вновь появлялся и снова каждый раз исчезал, когда муравьев выводили из этого состояния. Таким образом, нет никаких сомнений в том, что глицерин играет главную роль в устойчивости этих видов насекомых к зимним холодам [10].

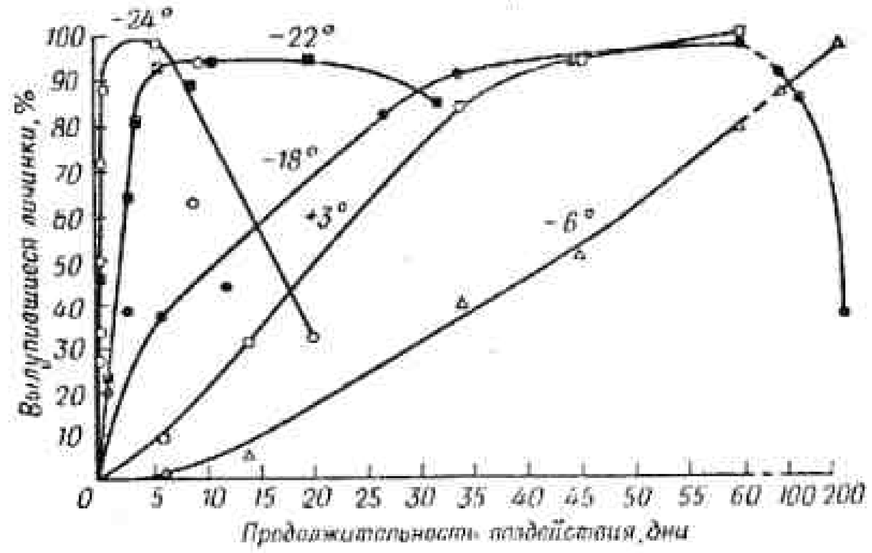
Однако оставалось еще много неясных моментов. Так, например, не известно, откуда берут глицерин личинки *Bracon cephi* и *Camponotus pennsilvanicus* в осеннее время. Чино [9] установил, что глицерин и сорбит в находящихся в диапаузе яйцах тутового шелкопряда *(Bombyx mori)* образуются из гликогена. Уайетт и Мейер [53] полагают, что глицерин является продуктом ферментативного гидролиза *l*-глицерофосфатов во время диапаузы у куколок *Hyalophora cecropia*. Другой невыясненный вопрос касается причины повреждений чувствительных к холоду видов насекомых во время замораживания и оттаивания. Повышение концентрации электролитов, наступающее в процессе вымерзания воды, представляет собой основную причину повреждения эритроцитов и сперматозоидов некоторых видов млекопитающих и, вероятно, различных других клеток в организме млекопитающего. Глицерин в соответствующей концентрации защищает их, по крайней мере частично, действуя как солевой буфер (см. гл. 12). Однако многие насекомые не так уж богаты электролитами. Глицерин в маленьких количествах может оказывать защитное действие на некоторые липопротеидные компоненты оболочек, находящиеся как внутри, так и вне клеток (см. гл. 12). Необходимо провести еще много исследований, чтобы выявить роль глицерина в гемолимфе насекомого, в частности в отношении повышения устойчивости к холоду.

Было сделано еще одно важное наблюдение. Крупные клетки жирового тела устойчивой к холоду золотарниковой мухи-пестрокрылки *(Eurosta solidaginis)* переживают внутриклеточную кристаллизацию льда [42]. Солт [42] изучал процессы замораживания и оттаивания этих клеток непосредственно под микроскопом. Замерзая, они сохраняли свою сферическую форму и первоначальный размер, не сжимаясь, как это обычно бывает с клетками при наступлении внеклеточной кристаллизации [3]. При неоднократном замораживании и оттаивании отдельные капельки жира внутри клеток сливались друг с другом. В естественных условиях зимой клетки жирового тела личинки *E. solidaginis* округлялись, а после наступления теплой погоды процесс развития продолжался. Следовательно, можно предположить, что внутриклеточное замораживание и оттаивание представляют собой нормальное явление у этого насекомого на стадии личинки [42]. Так это или нет, но Солт первый наблюдал (причем совершенно отчетливо) выживание живых клеток после внутреннего замораживания. Возможно, различные клетки других холодоустойчивых пойкилотермных животных также переживали внутриклеточную кристаллизацию льда в естественных условиях [43]. Вновь возникает вопрос: всегда ли внутриклеточное замораживание влечет за собой летальный исход?

Давно известно, что многие насекомые для полного развития нуждаются на определенной фазе их жизненного цикла в пребывании в течение какого-то периода времени на холоду [50]. Например, озимая муха *(Leptohylemyia coarctata* (Fall.)) откладывает яйца на землю в самое жаркое время года, в июле или августе, а ее личинки вылупляются зимой следующего года, между январем и мартом. Таким образом, они переносят воздействие температур от +30° и выше в августе до —5° и ниже в январе и феврале. Первая стадия развития (морфогенез до диапаузы) протекает при температурах от +3 до +30°. За этим следует диапауза с верхним температурным пределом около +12° и оптимальной, как предполагали ранее, температурой примерно +3° [48]. Уэй установил заметное увеличение длительности диапаузы при —6°, как показало сокращение числа

личинок, вылупившихся из яиц через 6, 14 и 34 дня, по сравнению с результатами, полученными, когда яйца инкубировали при +3°. Уэй провел специальный опыт для определения минимальной температуры диапаузы. Яйца, отложенные в середине августа, оставляли в земле, на открытом воздухе, до второй недели ноября, а затем их переносили в сосуды с температурой +3, —6, —18, —22 и —24°. Через определенные промежутки времени яйца извлекали из сосудов и инкубировали при +20°. Регистрировали время вылупления личинок, причем получили неожиданные результаты. При падении температуры ниже —6° диапауза заканчивалась быстрее [48, 49]. Так, из инкубировавшихся при +3° яиц 50% личинок вылупилось через 20 дней, а из инкубированных при температуре —6° — через 45 дней. Однако после воздействия температурой —24° те же 50% личинок вылупилось уже через 6 *час*, а 88% — через 24 *час*. При —24° диапауза длилась в 80 раз меньше, чем при общепризнанной ранее оптимальной температуре +3°, и в 180 раз меньше, чем при —6°. Некоторые результаты, полученные Уэем, приведены на фиг. 47. Находящиеся в диапаузе яйца повреждались, когда их выдерживали при низких температурах дольше, чем это требовалось для завершения диапаузы. Например, Уэй наблюдал, что после выдерживания при температуре —24° в течение 6 дней вывелось 98% личинок, а после выдерживания в течение 20 дней — только 32%. После инкубации при температуре —18° в течение 63 дней вылупилось 97%, а после инкубации в течение 206 дней — лишь 36%. Для того чтобы добиться быстрого окончания диапаузы, необходимо было до хранения яиц при —18 или —24° инкубировать их 50—80 дней при +5°. Совершенно ясно, что существуют по крайней мере две фазы в диапаузе. Первая наступает сравнительно быстро при температуре около +5° и может наступить при +20°, но никогда при —18 или —20°. Вторая быстрее всего наступает при температуре от —18 до —24° и может наступить при +5°, но никогда при +20° [49]. Уэй показал, что яйца в диапаузе переохлаждались даже до таких низких температур, как —25 и —28°, и замораживание не было причиной быстрого окончания диапаузы в яйцах, на которых действовали температурой от —18

до —24°. Переохлажденные до —26,5° и затем замороженные яйца при оттаивании оказывались погибшими. До настоящего времени попытки ввести в яйца глицерин терпели неудачу [49]. Еще неясны физиологические процессы, происходящие во время диапаузы, и неизвестны средства, с помощью которых их можно было бы ускорить, используя низкие температуры. Это, по-видимому,



Фиг. 47. Влияние воздействия низких температур на завершение диапаузы у *Leptohylemyia coarctata* [49].
По оси ординат отложен процент личинок, вылупившихся после перенесения яиц в среду с температурой 20°.

один из немногих примеров, когда течение биологического процесса ускоряется за счет понижения температуры животного до —20 или —24°.

Изучая воздействие низких температур на насекомых и другие живые организмы, важно помнить об основных экологических принципах. Мелланби [25] подчеркивает, что при охлаждении насекомых их возможное переживание и смерть не является ни единственным, ни даже самым важным фактором, которые следует иметь в виду. Выживание вида зависит от многих сторон активности, связанных с жизненным циклом, в том числе от питания и способности размножаться. Выживаемость же отдельной особи связана с ее способностью избегать непосредственно угрожающей ей опасности. Так, например, личинки желтолихорадочного комара (*Aedes aegypti*)

обычно находятся у поверхности воды, но немедленно уходят на дно, как только их встревожит появление какой-либо тени или сотрясение воды. Реакция тревоги исчезает при охлаждении воды до 9—14° (в зависимости от того, к какой температуре привыкли личинки). Последующее охлаждение приводит к тому, что личинки становятся неподвижными, хотя они еще в состоянии реагировать на механическое раздражение. Затем достигается температура холодовой комы, а при дальнейшем понижении температуры насекомые уже находятся в состоянии холодового наркоза. В табл. 49 показано дейст-

ТАБЛИЦА 49

Влияние акклиматизации при различной температуре на реакции личинок комара *Aedes aegupti* [25]

Температуры акклиматизации, °С	Температура, при которой наступает холодовая кома, °С	Температура, при которой возникает реакция тревоги, °С
10	3,4	9,0
17	5,7	11,0
34	10,8	14,3

вие акклиматизации при различных температурах на личинки *A. aegypti.* У согретых после холодовой комы и оживших личинок восстанавливается реакция тревоги.

Многие насекомые погибают при температурах выше нуля. Личинки комара *A. aegypti,* например, погибают при +0,5° через различные сроки в зависимости от температуры, при которой они раньше жили. Все личинки, культивированные при +30°, погибали менее чем через 17 *час* при температуре +0,5°. Если же их предварительно выдерживали при температуре 17°, они переживали такой срок хранения при +0,5°. Через 18 *час* наступала полная акклиматизация к окружающей холодной среде при условии, что температура была все же выше, чем та, при которой наступает холодовая кома [25].

В отношении некоторых насекомых можно добиться того, что они привыкнут к действию низких температур, бывших ранее летальными. Так, пребывание при относительно высокой температуре +15° помогает черным тараканам *(Blatta orientalis)* переживать кратковременное пребывание при такой низкой температуре, как —6,8°, которая летальна для насекомых этого вида, предварительно инкубированных при +30° (табл. 50). Механизм

ТАБЛИЦА 50

Гибель и выживание черных тараканов *(Blatta orientalis)* при воздействии низких температур после инкубации при температуре +15 или +30° (в каждом опыте было 6 особей) [22]

Температура воздействия, °С	Продолжительность воздействия, *час*	Результат	
		15°	30°
—3,0	1,5	Выживание	Выживание
—5,5	1	»	Гибель
—5,5	9	»	»
—6,8	1,25	»	»
—8,0	1	5 погибло, 1 выжил	»
От —4,0 до —8,0	15	Гибель	»

такой быстрой акклиматизации еще не известен, но вряд ли можно сомневаться в наличии приспособительных изменений во всех тканях активного насекомого в ответ на колебания температуры [22, 25]. Насекомые, впадающие под влиянием холода в состояние наркоза, не акклиматизируются. Более того, они подвергаются опасности быть уничтоженными другими животными или различными механическими и физическими силами, помимо самого замерзания. Замерзание не всегда является главной причиной гибели охлажденных насекомых. Для выживания многих видов существенное значение имеет продолжительное пребывание их ежегодно при температуре значительно выше нуля.

МОЛЛЮСКИ И РАКООБРАЗНЫЕ

С экологической точки зрения низкая температура иногда представляет собой важный фактор для определения численности популяции животных различных видов в данной местности. В далеком прошлом изменения температуры в любой ситуации должны были приводить к исчезновению некоторых видов животных. Минимальная температура, действию которой подвергаются многие морские животные, достигает —1,7°, т. е. точки замерзания морской воды. Однако животные литоральной зоны дважды в сутки, во время отлива, подвергаются более или менее продолжительному действию воздуха. Следовательно, в северных широтах зимой они могут охлаждаться до температур на много градусов ниже 0°. Так, например, в зимнее время, когда вода отступает от берегов залива Кейп-Код (Массачусетс), некоторые виды литоральной фауны — устрицы, мидии, литторины, улитки и др.— подвергаются воздействию температур от —15 до —30° [14]. Температура внутри тела у них настолько понижается, что спустя 2 *час* почти не отличается от температуры окружающей среды, а в тканях образуется лед. Тем не менее после оттаивания в лаборатории животные быстро оживали. В естественных условиях они в течение нескольких недель, вероятно дважды в день, подвергаются замораживанию и оттаиванию. Кэнвишер [14] определял общий объем воды, превращавшейся в лед в организме некоторых

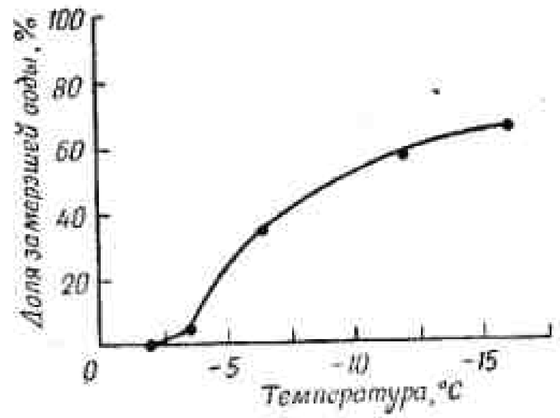
ТАБЛИЦА 51

Вымерзание воды у различных моллюсков при —15° [14]

Вид	Вода, превратившаяся в лед, %
Mytilus edulis . . .	62
Modiola modiola . .	65
Littorina littorea . .	59
Crassotrea virginicus	54
Littorina rudis . . .	67

моллюсков литоральной зоны при различных температурах. Характерные результаты получены на модиоле *Modiola modiola* (фиг. 48). В табл. 51 приведены данные о количестве вымерзшей воды в организме различных видов при —15°.

При понижении температуры до —22° в организме *Modiola modiola* и *Littorina littorea* вымерзало до 71% воды. *Mytilus edulis* и *Littorina rudis* на побережье Лабрадора переживали продолжительное замораживание при температуре —20° и ниже. В том, что они действительно замораживались, не может быть никаких сомнений, поскольку наиболее низкая температура переохлаждения у моллюсков литоральной зоны составляет —7° [14].



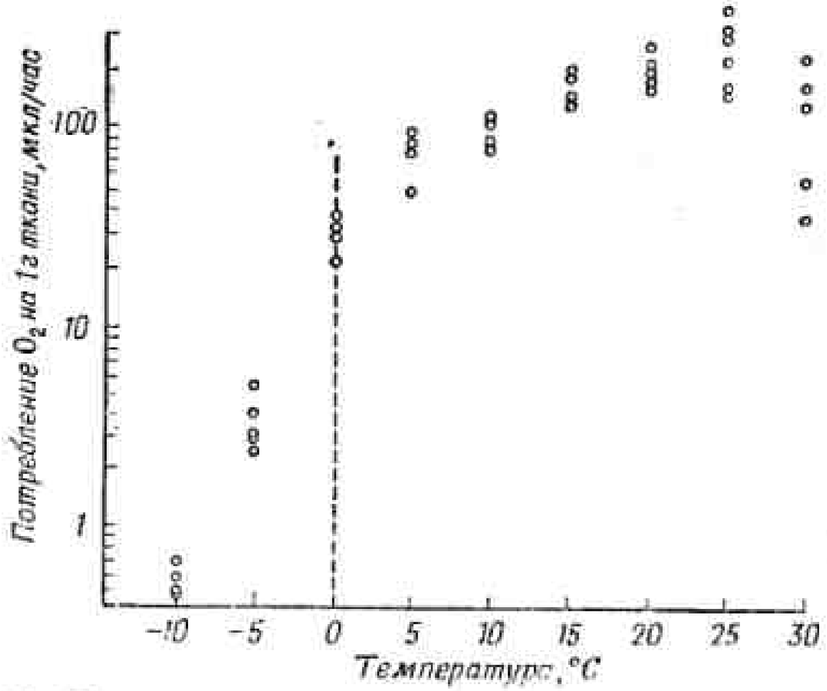
Фиг. 48. Превращение воды в лед в организме *Modiola modiola* при различной температуре [14].

Гистологические исследования [15] показали, что мышечные волокна ноги *Littorina littorea*, будучи замороженными при —10°, сморщились и форма их резко изменилась. Та же самая ткань, зафиксированная во время оттаивания, не отличалась по внешнему виду от нормальной ткани неохлажденного животного (фото 31, *А* и *Б*).

Точно так же приводящая мышца *Crassotrea virginicus*, превратившаяся при замораживании в комки сморщенных волокон с кристаллами льда между ними, после оттаивания приобрела свой обычный вид (фото 31, *В* и *Г*). Особенно поразительные изменения были обнаружены в яйцах *Mytilus edulis* (фото 31, *Д* и *Е*). Любой биолог при виде замороженного, совершенно преображенного яичника пришел бы к выводу о гибели отдельных яиц. И тем не менее, вопреки всем ожиданиям, после оттаивания восстановилась нормальная структура ткани и яйца, по-видимому, сохранили способность к оплодотворению и развитию. Следует вспом-

нить, что в зимнее время ткани два раза в день подвергаются таким изменениям — когда они замерзают на открытом воздухе и когда они оттаивают, покрываясь во время прилива водой с температурой не ниже —1,7°.

Кэнвишер [15] определял потребление кислорода различными моллюсками литоральной зоны при температуре от +30 до —10°. Типичные результаты, полученные

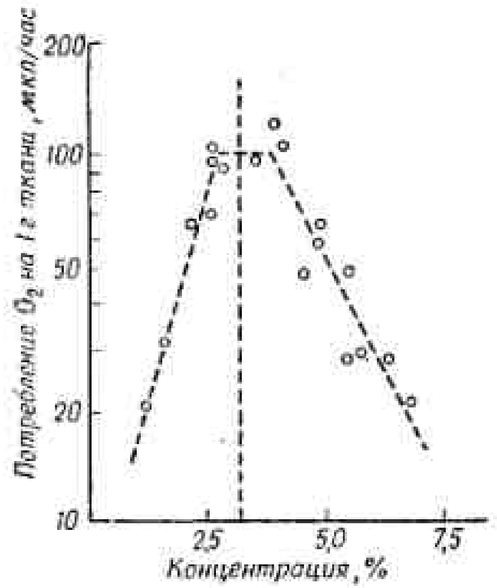


Фиг. 49. Потребление кислорода у *Littorina littorea* при различной температуре [15]

на *Littorina littorea*, представлены на фиг. 49. При температуре выше 25° потребление O_2 снижалось, по-видимому, вследствие повреждений, вызываемых избыточным теплом. Между +20 и 0° при падении температуры на 10° потребление в O_2 увеличивалось в 2—3 раза, что соответствует обычному коэффициенту Q_{10}. При температуре ниже 0° потребление кислорода быстро падало, но при —10° все еще было измеримо. При этом коэффициент Q_{10} достигал 50.

После вымерзания воды в тканях моллюсков повышалась концентрация электролитов, в частности концентрация хлористого натрия была максимальной при температуре на несколько градусов выше эвтектической

точки (—21°). Изолированные ткани становились изосмотическими с концентрированными солевыми растворами, в которые их погружали, и нельзя было предполагать, что животные каким-то образом поддерживали нормальное осмотическое давление. Было выявлено влияние изменения концентрации солей на потребление кислорода при температурах выше нуля. Некоторые результаты, полученные Кэнвишером, представлены на фиг. 50. Повышение вдвое концентрации солей уменьшало потребление кислорода примерно на одну треть. При повышении концентрации солей при температуре выше 0° до концентрации в частично замороженной морской воде при —10° потребление O_2 уменьшалось в 10 раз. Поэтому комбинированным действием пониженной температуры и повышенной концентрации солей нельзя объяснить увеличение коэффициента Q_{10} до 50 при температуре ниже 0. Ослабленная диффузия газов через лед и незамерзшие вязкие жидкости также могут влиять на потребление кислорода частично замороженными моллюсками [15]. Остается выяснить, состоят ли оболочки клеток и другие жизненно важные структуры устойчивых к холоду моллюсков из веществ, резистентных к высоким концентрациям солей, или же в организме самих животных содержатся такие нейтральные растворенные вещества, как глицерин, которые могут служить буфером. Еще не выяснен механизм, при помощи которого эти организмы переживают неоднократное замораживание и оттаивание, а также какая концентрация солей будет летальной для других животных.



Фиг. 50. Потребление кислорода у *Littorina littorea* при различной концентрации солей [15].

Кристенсен [17] установил, что сердцевидки *Cardium*

edule L., обитающие в мелководье у берегов Ютландии, зарывшись глубоко в песок, выживают даже при температуре —7°. Морская вода вблизи этих мест отличается повышенной концентрацией солей, а при —7° содержит до 66,2% хлоридов. Кристенсен полагает, что сердцевидки всасывали и выделяли жидкость, в результате чего концентрация солей в тканевых жидкостях достигала уровня, при котором не происходит замораживания. Подвергшись воздействию воздуха с температурой —1,9° в течение 12 *час* и более, они уже не могли зарываться в песок и погибали через несколько дней или недель. Ни один из моллюсков не пережил пребывания на открытом воздухе при температуре —7° на протяжении 6—12 *час*. Животные, зарывшиеся в песок на возвышенных участках отмелей, покрывались волой всего в течение 4 *час* во время прилива, а во время отлива они не были погружены в соленую среду, да еще подвергались воздействию низкой температуры окружающего воздуха. При —4° они замерзали в песке до твердого состояния. После оттаивания наблюдались слабые движения ресничек на жабрах, но в скором времени моллюски погибали. В суровые зимы смертность среди сердцевидок, обитающих в этом заливе, была довольно значительной и лишь очень немногие пережили зиму 1946/47 г. Кристенсен показал, что результаты, полученные Кэнвишером, применимы не ко всем видам моллюсков литоральной зоны. Необходимо провести дальнейшие исследования, чтобы выявить основные различия между этими моллюсками.

Интересные наблюдения провели Нэйр и Лейвестад [26]. На высоких широтах у берегов Норвегии литоральная зона шириной 3,5 *м* дважды в день на 6 *час* обнажается и таким образом подвергается воздействию воздуха с температурой ниже —20°. Морские древоточцы *Limnoria lignosum* (Rathke) и *Chelura tenebrans* (Philippi) живут в сваях, части которых обнажаются во время отлива. Чем выше граница расселения моллюсков над линией отлива морской воды, тем дольше они подвергаются воздействию низких температур. Исследования показали, что на глубине 2 *м*, т. е. там, где на сваях поселяются моллюски, при продолжительности

отлива 3 *час* температура достигала —6° и ниже. В таких условиях, по-видимому, вымирало до 50% животных. При температуре —8° за 8 *час* погибало 50% *Limnoria* и 90% *Chelura*, а за 4 *час* — 40% *Chelura*. Воздействие температуры —18° в течение 4 *час* убивало до 50% *Limnoria*, а через 8 *час* они погибали все. Следовательно, резкое падение температуры до —20° убивает всех животных, расселяющихся на сваях выше линии отлива, а температура —8° вызывает значительное уменьшение численности популяции. Воздействие температуры —4° в течение 8 *час* влекло за собой смерть 20% *Limnoria* и 40% *Chelura*. Часто целые колонии этих организмов постепенно вымирают в результате неоднократного замораживания при указанных выше температурах и оттаивания. Возможно, такие тяжелые условия и вынуждают колонии моллюсков мигрировать в более глубокие места в литоральных зонах. Такая миграция наблюдается обычно в самые холодные дни февраля.

РЫБЫ

Сколендер и сотрудники [44] исследовали рыб *Dallia pectoralis*, отличающихся необычайной устойчивостью к холоду (см. стр. 324). Рыб, заключенных в резиновые мешки, погружали от хвоста до грудных плавников в замораживающую смесь с температурой —26°, а через несколько минут согревали. Приток крови к замороженному спинному и хвостовому плавникам прекращался и больше не восстанавливался. Рыбы в течение нескольких дней плавали с помощью грудных плавников, но затем погибали. В других опытах рыб при помощи такого же метода замораживали от кончика носа до жабер. После оттаивания у них обнаружили в глазных камерах пузырьки воздуха, а хрусталики стали мутными. Кровообращение в голове, по-видимому, отсутствовало, и жаберная крышка не двигалась. Тем не менее эти рыбы с мертвыми головами плавали на другой день после оттаивания, но через три дня все погибли. Изолированные сердца́ и сердца́ интактных рыб не восстанавливались после замораживa-

ния при —26°. Приведенные наблюдения подтвердили данные Камерона и других исследователей, полученные на рыбах, которые водятся в странах с умеренным климатом. Следовательно, даже рыбы, адаптировавшиеся к суровым арктическим условиям, не выживают после замораживания всего тела, хотя и переживают частичное замораживание поверхностных тканей.

Точка замерзания крови большинства костистых рыб, населяющих водоемы с умеренной температурой воды, лежит между —0,5 и —0,8°. Возникает вопрос, каким же образом рыбы арктического бассейна сохраняют активность в морской воде, температура которой у дна круглый год держится на уровне от —1,7 до —1,8°, а в поверхностных слоях варьирует от —1,7° (под плавающим льдом зимой) до +7° (после весеннего таяния льдов). В одном из фьордов на полуострове Лабрадор, где температура воды у дна достигала —1,73°, были пойманы глубоководные рыбы 5 видов. Температура внутри тела у самой крупной рыбы была между —1,6 и —1,7°, но точки замерзания ее плазмы и глазных жидкостей лежали в пределах от —0,8 до —1,0° (табл. 52).

ТАБЛИЦА 52

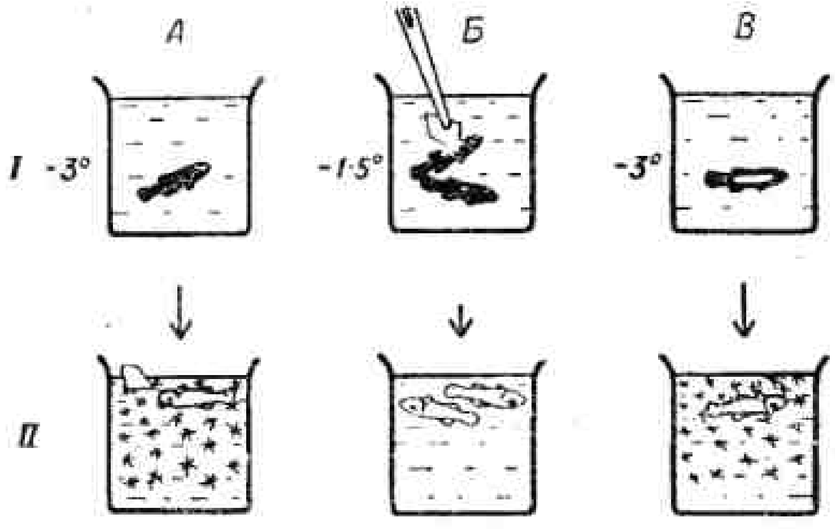
Точки замерзания плазмы и жидкости глаза у глубоководных рыб, пойманных в фьорде Хиброн (Лабрадор) на глубине 100 *м* при температуре воды —1,73° [45]

Вид	Точка замерзания, °С	
	плазма	жидкость из передней камеры глаза
Boreogadus saida . .	—0,97	—
Lycodes turneri . . .	—0,88	—0,91
	—0,98	—
Liparis coefoedi . . .	—0,91	—
Gymnacantus tricuspis	—0,94	—0,84
	—0,95	—0,85
	—0,89	
Icelus spatula . . .	—0,96	—0,84

Примечательно, что эти рыбы активно плавали в воде, температура которой была на 0,75—0,85° ниже точки замерзания их крови и тканевых жидкостей. Единственно возможное объяснение заключается в том, что как кровь, так и тканевые жидкости находились в состоянии переохлаждения. Во всех предыдущих сообщениях говорилось, что пойкилотермные животные при переохлаждении в естественных или экспериментальных условиях были неподвижными и совершенно оцепеневшими (см. стр. 327). Возникает вопрос, будут ли рыбы, находящиеся в состоянии переохлаждения, обладать устойчивостью к замораживанию при наличии в окружающей их среде льда. Различные виды глубоководных рыб вытащили на поверхность из глубины 100 *м* и поместили в корыто с морской водой, охлажденной до —1,7°, причем на поверхности воды плавал лед. *Lycodes* частично замерзали, судя по белому налету и изогнувшемуся хвосту, у *Liparis* появились судороги, и хвост также изогнулся. Холодовое затвердение наступило и у *Icelus*. Вместе с тем отдельные особи сайки *(Boreogadus)* не имели никаких повреждений при температуре —1,73°. Различные виды рыб погибали при температуре от —1,9 до —2,5°. По-видимому, во внутренние жидкости организма рыб попадали плавающие в бане кристаллики льда, становившиеся центрами кристаллизации [45].

После этого были проведены опыты по переохлаждению рыб других видов. Оказалось, что налитую в мензурку морскую воду можно переохладить до —3°, поместив мензурку в баню с регулируемой температурой. Особи *Fundulus*, пойманные у берегов залива Кэйп-Код в зимнее время, оживали после пребывания в течение 12 *час* в морской воде, переохлажденной до —3°. Все это время они находились в состоянии оцепенения, но слабо дышали. Когда в окружающую их воду вносили кристаллик льда и образовавшиеся кристаллы заполняли всю мензурку, у рыб начинались сильнейшие судороги, затем они покрывались белым налетом и замерзали. Очевидно, кристаллики льда проникали через кожный покров в тканевые жидкости и становились центрами кристаллизации (фиг. 51, *А*). Рыб переохлаж-

дали также до —1,5° в морской воде с температурой на 0,2° выше их точки замерзания. Когда к ним прикладывали кусочек льда, у них наступали судороги и они твердели и замерзали, хотя в окружающей их воде льда не было. Незамерзшие рыбы покрывались льдом и промерзали от одного соприкосновения с замерзшими (фиг. 51, *Б*). После перемещения замороженных рыб в



Фиг. 51. Замораживание переохлажденных рыб *Fundulus* [45].

А. Рыба замерзает при внесении в переохлажденную воду кристалла льда. *Б*. Переохлажденная рыба замерзает, когда к ней прикладывают кусочек льда в воде с температурой выше точки замерзания; одна рыба, контактируя с другой, может вызвать замораживание последней. *В*. Не полностью оттаявшая рыба, содержащая внутри себя лед, замерзает и вызывает кристаллизацию переохлажденной воды. *I* — рыбы в состоянии переохлаждения; *II* — замерзшие рыбы.

морскую воду с комнатной температурой они постепенно оттаивали. Когда частично оттаявших рыб помещали в переохлажденную до —3° морскую воду, окружающая их вода замерзала. Процесс кристаллизации в таких случаях распространялся от кожных покровов рыб в окружающую среду (фиг. 51, *В*).

Аналогичные опыты проводили и на других видах, в том числе тautогалабрусе, фахане, тautоге и угрях [45].

Оставалось невыясненным, почему мелководные рыбы арктических бассейнов не замерзают зимой, плавая при —1,7° в покрытой льдом морской воде с бесчисленным множеством кристаллов льда, прикасающихся непосредственно к коже рыбы. Наблюдения показали, что точка замерзания плазмы мелководной трески (*Gadus ogac*) и бычка (*Myoxocephalus scorpius*) летом лежит между —0,77 и —0,87°, когда окружающая морская вода не покрыта льдом и имеет температуру от +4 до +7°. Зимой же, когда рыбы плавают под слоем льда в воде с температурой —1,73° точка замерзания плазмы у *Gadus ogac* лежит при —1,47°, а у *Myoxocephalus scorpius* — при —1,50°. Осмотическое давление плазмы у них почти удваивалось до наступления зимы, и поэтому они только переохлаждались примерно на 0,3°. Таким образом, опасность замораживания от соприкосновения со льдом и проникновения внутрь кристаллов льда значительно уменьшалась. Это может служить прекрасным примером адаптации путем регуляции осмотического давления. Интересно отметить, что у многих глубоководных беспозвоночных морских животных, в том числе у рака-отшельника и у крабов, точка замерзания плазмы лежит между —1,68 и —1,73°, т. е. чуть выше температуры окружающей их воды. Поэтому им мало угрожает опасность замораживания. Анализ плазмы летних рыб, плавающих в поверхностных слоях воды, а также плазмы беспозвоночных животных показал, что повышение осмотической концентрации примерно на 80% происходит за счет хлоридов. При исследовании же плазмы мелководных рыб зимой выяснилось, что повышение концентрации хлоридов лишь наполовину объясняет такое сильное понижение точки замерзания. Другие компоненты, ответственные за повышение осмотической концентрации и понижение точки замерзания, пока еще не известны [45].

Сколендер [43] показал замечательный путь, посредством которого эволюция влияет на заселение самых неподходящих экологических мест. Арктические рыбы дают поразительные примеры активной жизни при температурах ниже нуля. Глубоководные рыбы, выполняющие абсолютно те же жизненные функции, что и рыбы, населяющие воды в странах с умеренным и тропическим климатом, всю свою жизнь проводят в физической среде с неустойчивыми, изменяющимися условиями. При этом они сохраняют полностью жизнеспособность, если только их не извлекают из среды, к которой они адап-

тировались и в которой они не подвергаются опасности соприкосновения с кристаллами льда. В то же время рыбы, плавающие в поверхностных слоях арктических морей, каждую осень вырабатывают какие-то вещества, понижающие точку замерзания их крови и тканевых жидкостей и защищающие от попадания кристаллов льда из плавающих вокруг них льдин. Удвоенное осмотическое давление в плазме требует какого-то процесса адаптации каждой клетки организма к изменившейся внутренней среде. Перед физиологами и биохимиками стоит задача определить состав этих антифризов и природу акклиматизации клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Asahina E., Prefreezing as a method enabling animals to survive freezing at extremely low temperature, Nature, Lond., **184**, 1003—1004 (1959).
2. Asahina E., Aoki K., Survival of intact insects immersed in liquid oxygen without any antifreeze agent, Nature, Lond., **182**, 327—328 (1958).
3. Asahina E., Aoki K., Shinozaki J., The freezing process of frost-hardy caterpillars, Bull. ent. Res., **45**, 329—339 (1954).
4. Becquerel P., La vie latente de quelques Algues et Animaux inférieurs aux basses températures et la conservation de la vie dans l'univers, C. R. Acad. Sci., Paris, **202**, 978—981 (1936).
5. Becquerel P., La suspension de la vie au-dessous de 1/20° K absolu par démagnétisation adiabatique de l'alun de fer dans le vide le plis élevé, C. R. Acad. Sci., Paris, **231**, 261—263 (1950).
6. Becquerel P., La suspension de la vie aux confins du zéro absoluentre 0,0075° K et 0,047° K. Rôle de la synérèse reversible cyto-nudéoplasmique, Proc. VIIIth Internat. Congr. Refrig., pp. 326—329 (1951).
7. Boyle R., New experiments and observations touching cold, London (1683).
8. Cameron A. T., Brownlee T. I., The effect of low temperatures on cold-blooded animals, Quart. J. exp. Physiol., **7**, 115—130 (1913).

9. Chino H., Conversion of glycogen to sorbitol and glycerol in the diapause egg of the bombyx silkworm, Nature, Lond., **180**, 606—607 (1957).
10. Dubach P., Pratt D., Smith F., Stewart C. M., Possible rôle of glycerol in the winter hardiness of insects, Nature, Lond., **184**, Suppl. No. 5, pp. 288—289 (1959).
11. Faulkner P., Polyol dehydtogenase of the silkworm, Biochem. J., **68**, 374—380 (1958).
12. Fischer P. H., Influence des basses températures sur la vie de l'Helix pomatia L. C. R. Acad. Sci., Paris, **105**, 369—371 (1930).
13. Калабухов Н. И., The problem of freezing, undercooling and vitrifying of animal organism. Recent Research in Freezing and Drying, ed. Parkes A. S. and Smith A. U., pp. 101—118, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1960.
14. Kanwisher J. W., Freezing in intertidal animals, Biol. Bull. Woods Hole, **109**, 56—63 (1955).
15. Kanwisher J. W., Histology and metabolism of frozen intertidal animals, Biol. Bull., Woods Hole, **116**, 258—264 (1959).
16. Keilin D., The Leeuwenhoek Lecture. The problem of anabiosis or latent life: history and current concept, Proc. Roy. Sos., B, **150**, 149—191 (1959).
17. Kristensen I., Differences in density and growth in a cockle population in the Dutch Wadden Sea, Arch. néerl. Zool., **12**, 351—453 (1957).
18. Luyet B. J., Sur la survie des poissons plongés dans l'air liquide, C. R. Soc. Biol., Paris, **127**, 788—790 (1938).
19. Luyet B. J., Gehenio R. P., Life and Death at Low Temperatures., Normandy, Missouri, Biodynamica, 1940.
20. Luyet B. J., Hartung M. C., Survival of *Anguillula aceti* after solidification in liquid air, Biodynamica, **3**, 353—362 (1941).
21. Luyet B. J., Hartung M. C., Factors in revival of *Anguillula aceti* after its solidification in liquid air, Amer. J. Physiol., **133**, 368—369 (1941).
22. Mellanby K., Low temperature and insect activity, Proc. Roy. Soc., B, **127**, 473—487 (1939).
23. Mellanby K., The activity of certain Arctic insects at low temperatures, J. Anim. Ecol., **9**, 296—301 (1940).
24. Mellanby K., Acclimatization and the thermal death point in insects, Nature, Lond., **173**, 582—583 (1954).

25. Mellanby K., Life at low temperatures, Advanc. Sci., Lond., **15**, 409—417 (1959).
26. Nair N. B., Leivestad H., Effect of low temperature on the vertical distribution of two woodboring crustaceans, Nature, Lond., **182**, 814—815 (1958).
27. Palmer J. E., The heat of animals. The Works of John Hunter, Vol. I, Ch. VIII, pp. 278—298, London, Longman 1835.
28. Payne N. M., Freezing and survival of insects at low temperatures, J. Morphol., **43**, 521—546 (1927).
29. Payne N. M., Measures of insect cold hardiness, Biol. Bull., Woods Hole, **52**, 449—457 (1927).
30. Pembrey M. S., Animal Heat. In Text Book of Physiology. Vol. 1, ed. Schäfer E. A., pp. 785—863, Edinburgh and London, Pentland (1898).
31. Power H., Experimental Philosophy in three books: containing new experiments: Microscopical, mercurial, magnetical. (цит. по [16]).
32. De Réaumur R. A. F., Memoirs pour servir a l'histoire des Insectes. Tome II, pp. 141—147, Paris, de l'Imprimerie Royale, 1736.
33. Сахаров Н. Л., Studies in cold resistance of insects, Ecology, **11**, 505—517 (1930).
34. Salt R. W., Studies on the freezing process in insects, Tech. Bull. Minn. Agric. Exp. Sta., No. 116, 1—41 (1936).
35. Salt R. W., Time as a factor in the freezing of undercooled insects, Canad. J. Res., D, **28**, 285—291 (1950).
36. Salt R. W., The influence of food on cold hardiness in insects, Canad. Ent., **85**, 261—269 (1953).
37. Salt R. W., Influence of moisture content and temperature on cold-hardiness of hibernating insects, Canad. J. Zool., **34**, 283—294 (1956).
38. Salt R. W., Natural occurrence of glycerol in insects and its relation to their ability to survive freezing, Canad. Ent., **89**, 491—494 (1957).
39. Salt R. W., Cold-hardiness of insects, Proc. 10th Internat. Congr. (1956) Entomology, 2, 73—77 (1958).
40. Salt R. W., Role of glycerol in producing abnormally low supercooling and freezing points in an insect *Bracon cephi* (Gahan), Nature, Lond., **181**, 1281 (1958).
41. Salt R. W., Role of glycerol in the cold-hardening of *Bracon cephi* (Gahan), Canad. J. Zool., **37**, 59—69 (1959).

42. Salt R. W., Survival of frozen fat body cells in an insect, Nature, Lond., **184**, 1426 (1959).
43. Scholander P. F., Supercooling and freezing in poikilotherms, XXIst Int. Congr. Physiol. Sci., Buenos Aires, Symposia and Special Lectures, pp. 77—80 (1959).
44. Scholander P. F., Flagg W., Hock R. J., Irving L., Studies on the physiology of frozen plants and animals in the Arctic, J. cell. comp. Physiol., **42**, Suppl. 1, 1—56 (1953).
45. Scholander P. F., Van Dam L., Kanwisher J. W., Hammel H. T., Gordon M. S., Supercooling and osmoregulation in Arctic fish, J. cell. comp. Physiol., **49**, 5—24 (1957).
46. Spallanzani L., Opuscules de physique animale et vegetale. Vol. 1. Tradvit par J. Senebier, Pavie et Paris, Pierre Duplain, 1787.
47. Уваров Б. П., Insects and climate, Trans. R. ent. Soc., Lond., **79**, 1—247 (1931).
48. Way M. J., The effect of temperature, particulary during diapause, on the development of the egg of *Leptohylemyia coarctata* Fallen (Diptera, Muscidae), Trans. Roy. Ent. Soc., **111**, 351—364 (1959).
49. Way M. J., The effects of freezing temperatures on the developing egg of *Leptohylemyia coarctata* Fall. (Diptera, Muscidae) with special reference to diapause development, J. Insect Physiol., **4**, 92—101 (1960).
50. Wigglesworth V. B., The Principles of Insect Physiology, 3rd Edn. London, Methuen (1947).
51. Wyatt G. R., Kalf G. F., The chemistry of insect hemolymph. II. Trehalose and other carbohydrates, J. gen Physiol., **40**, 833—847 (1957).
52. Wyatt G. R., Kalf G. F., Organic components of insect hemolymph, Proc. Xth Int. Congr. Entomol., Montreal, 1956, **2**, 333 (1958).
53. Wyatt G. R., Meyer W. L., The chemistry of insect hemolymph. III. Glycerol, J. gen. Physiol., **42**, 1005—1011 (1959).
54. Wyatt G. R., Meyer W. L., Kropf R., Organic phosphates and glycerol in blood of the *Cecropia* silkworm, Fed. Proc., **17**, 340 (1958).

Глава 10

ОЖИВЛЕНИЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПОСЛЕ ОХЛАЖДЕНИЯ ИХ ДО ТЕМПЕРАТУРЫ ТЕЛА НИЖЕ НУЛЯ

Ранние исследования

В 1612 г. Санкториус опубликовал описание прибора, с помощью которого он измерял температуру воздуха, а также всех частей человеческого тела. Он применял его для выявления высокой температуры у больных, подойдя таким образом к разрешению задачи, над которой бились врачи еще со времен Гиппократа. Примерно в это же время независимо от Санкториуса изобретали различные термоскопы и термометры Галилей, Фладд и Рэй, причем каждый из этих приборов имел свою шкалу измерения. Такое положение вещей не удовлетворяло Роберта Бойля, который уже в 1665 г. высказывался о неудобствах измерения низких температур, связанных с отсутствием единой шкалы [18, 70]. Бойль прекрасно сознавал, что сильный холод может вызвать поражения в подвергающихся его воздействию частях человеческого тела и что эти поражения могут быть столь же разрушительными, как рак, и столь же мучительными, как ожоги. Бойль описал два вида смерти от холода. При первом, когда охлаждению подвергается все тело, у человека наступает непреодолимая сонливость и, если его не разбудить силой, он умирает во сне. Именно так погибают люди, застигнутые холодом, и лучшего описания этого вида смерти с тех пор еще никто не дал. Второй вид смерти от охлаждения угрожал облаченным в боевые доспехи рыцарям. Холод пронизывал их тело в области поясницы, причиняя невыносимые внутренние боли и вызывая различные нарушения пищеварения, и они в конце концов погибали от сильнейшего истощения. Бойль не отвергал возможности оживления замороженных млекопитающих. Он сообщает, что однажды на Украине несколько поляков раскопали замороженное тело странного животного, которое ожило, как только с него стали снимать шкуру. Бойль испытывал действие сильного холода на молодого кролика. Он оставил кролика на сильном морозе на всю ночь с намерением изучить изменения во внутренних органах животного после его гибели от замерзания. Однако на следующее утро кролик был жив и здоров, тогда как у мертвого кролика, выставленного на мороз на такой же период времени, полностью промерзли все внутренние органы [18].

После смерти Бойля в 1691 г. предпринимались неоднократные попытки установить стандартную шкалу в закрытых спиртовых или масляных термометрах. Проблему можно было решить, выбрав фиксированные и легко воспроизводимые точки. Стабильность температуры человеческого тела в здоровом состоянии была настолько признана, что Исаак Ньютон и Оле Рёмер взяли ее за одну фиксированную точку для своих термометрических шкал, а другой точкой они выбрали температуру таяния снега. В 1714 г. Фаренгейт создал надежные спиртовые и ртутные термометры. В качестве нулевой точки он взял наиболее низкую температуру, какую только мог создать в лабораторных условиях, смешивая лед, воду и хлористый аммоний. Температуру таяния льда он принял за 32° (т. е. за точку, расположенную на $^1/_3$ шкалы), а температуру человеческого тела — за 96° (т. е. за точку, лежащую на другом конце шкалы). Продолжив свою шкалу далее, он смог определить температуру у людей при различных заболеваниях, а также точку кипения воды (212°F) и ртути (600°F). Позднее были созданы и другие точные термометры с различными шкалами, например в 1730 г. Реомюром и в 1742 г. Цельсием. Цельсий принял температуру кипения воды за 0°, а температуру ее замерзания — за 100°. В 1743 г. Кристин перевернул шкалу Цельсия и создал,

таким образом, термометр со стоградусной шкалой, которую используют и в настоящее время (см. [70]).

В конце XVIII в. врачи и физиологи, в том числе Бурхаве, Каллен, Кюрри, Галлер, Гэйлс и Джон Хантер, уже имели в своем распоряжении стандартизированные приборы для измерения температуры тела у млекопитающих в нормальном и патологическом состоянии [58]. В 1755 г. Уильям Каллен открыл, что холод можно создать путем выпаривания жидкостей, и описал устройство для охлаждения мелких млекопитающих [24]. Джэймс Босуэлл пришел в восторг от тех возможностей, которые, по его мнению, открывало для общества изобретение Каллена. Он считал, что с помощью такого прибора можно будет оказывать сдерживающее влияние на чересчур раздражительных, нерешительных или слишком увлекающихся людей. Босуэлл предполагал создание в будущем медицинских учреждений, в которых будут применять банки, ванны, кровопускание и замораживание [17]. Примерно в это же время Джон Хантер установил, что нормальная температура внутри тела у человека и многих других млекопитающих всегда постоянна и поддерживается на уровне около +37° независимо от температуры окружающей среды. В противоположность этому, у ежа, например, температура внутри тела летом постоянна — от +37 до +38°, а зимой, когда он впадает в спячку, снижается до +10° и ниже (см. [58, 75]). Хантер полагал, что человеческую жизнь можно продлить, чередуя периоды «забвения» в замороженном состоянии с периодами активности при нормальной температуре тела. Его очень разочаровала неудача с оживлением замороженных рыб [53].

Время от времени опубликовывались сообщения об оживлении людей после смерти от замерзания. В одном случае, описанном Науклером в 1757 г. [67], больного уже положили в гроб для погребения. У него не было ни пульса, ни дыхания, и тем не менее он ожил благодаря горячим припаркам на туловище и растиранию конечностей, которое осуществляли в теплом помещении. Об этом случае сообщал в 1758 г. журнал «Скотс Мэгэзин». В газетах описывали и менее достоверный случай обнаружения в 1826 г. в Швейцарии под глыбой

льда совершенно замороженного человека. Будучи оживлен, он заявил, что его зовут Рожэ Додсворт, что он сын знаменитого антиквара, скончавшегося в 1654 г., и что сам он был погребен снежной лавиной в 1660 г. Такого рода истории всегда сильно действовали на воображение людей. Они нашли свое воплощение в таких сказках и легендах, как «Спящая красавица» и «Рип Ван Винкль», различных романах и поэмах, в том числе «Человек со сломанным ухом» и «Кремация Сэма Мак-Ги», а позднее в юмористических заметках и карикатурах. Таким образом, идея о возможности хранения человека или любых других млекопитающих в замороженном состоянии не угасает, несмотря на великое множество доказательств противного, накопленных в XIX и в начале XX в.

ОСНОВНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВПАДАЮЩИХ В СПЯЧКУ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

В XIX в. млекопитающих во время зимней спячки изучали Рив, Манжили, Сесси, Холл, Хорват, Дюбуа, Пембри и многие другие биологи. Постепенно было установлено, что впавшие в спячку суслики, сурки, ежи, сони и летучие мыши переживали охлаждение тела почти до 0°. Сердечный ритм и дыхание у них во время спячки замедлялись, но никогда не прекращались полностью [48]. Обмен веществ у них также не был полностью подавлен, судя по потреблению кислорода и выделению углекислоты. В результате температура тела была всегда чуть выше температуры окружающей среды. Хорват сделал важное наблюдение, что животные, впадающие в спячку в естественных условиях, переносили охлаждение в опыте в любое время года до значительно более низких температур, чем животные, не впадающие в спячку. В одном из его опытов сурок с температурой внутри тела —0,2° проснулся и вел себя нормально, когда температура окружающей среды достигла —0,5° ([47]; см. также [48]).

Исключительно важное сообщение сделал в 1912 г. Бахметьев [14]. Он обнаружил, что впадающие в спячку летучие мыши переживали охлаждение тела до тем-

пературы от —7 до —9°. В дальнейшем Н. И. Калабухов в опытах на летучих мышах неопровержимо доказал, что находящиеся в состоянии переохлаждения неполовозрелые и взрослые летучие мыши переживают понижение температуры тела до —5 или —7°, если только они остаются в состоянии переохлаждения. Крайне интересно, что, судя по электрокардиограмме, сердце у такого переохлажденного животного продолжало биться [49—51]. В табл. 53 приведены некоторые данные этих опытов.

Калабухову удавалось выдерживать летучих мышей несколько дней в состоянии переохлаждения при температуре тела от —5 до —7°. После согревания у них восстанавливалась нормальная активность. Кристаллизация льда у переохлажденных животных и постепенное замораживание при температуре ниже —1° неизбежно приводили их к гибели.

Другие впадающие в спячку млекопитающие не обладали такой устойчивостью к переохлаждению. Например, серый суслик *(Citellus pygmaeus)* не переживал переохлаждения до температуры ниже —1°, а ежи часто погибали после переохлаждения до температуры —1,5 или —2,2°, хотя в теле у них не образовывалось льда [66].

ТАБЛИЦА 53

Изменение сердечного ритма у летучих мышей [51]

Состояние животного	Температура тела, °С	Число ударов сердца в 1 *мин*
Активное	+37,3	420
Спячка	+ 4,1	16
Переохлаждение	— 4,33	8,5

К 1949 г. сложилось мнение, что в подавляющем большинстве впадающие в спячку млекопитающие различных видов выходят из состояния оцепенения, в которое они погружены зимой, как только температура окружающей их среды падает ниже нуля. Тогда температура тела у них поднимается до уровня, характерного для

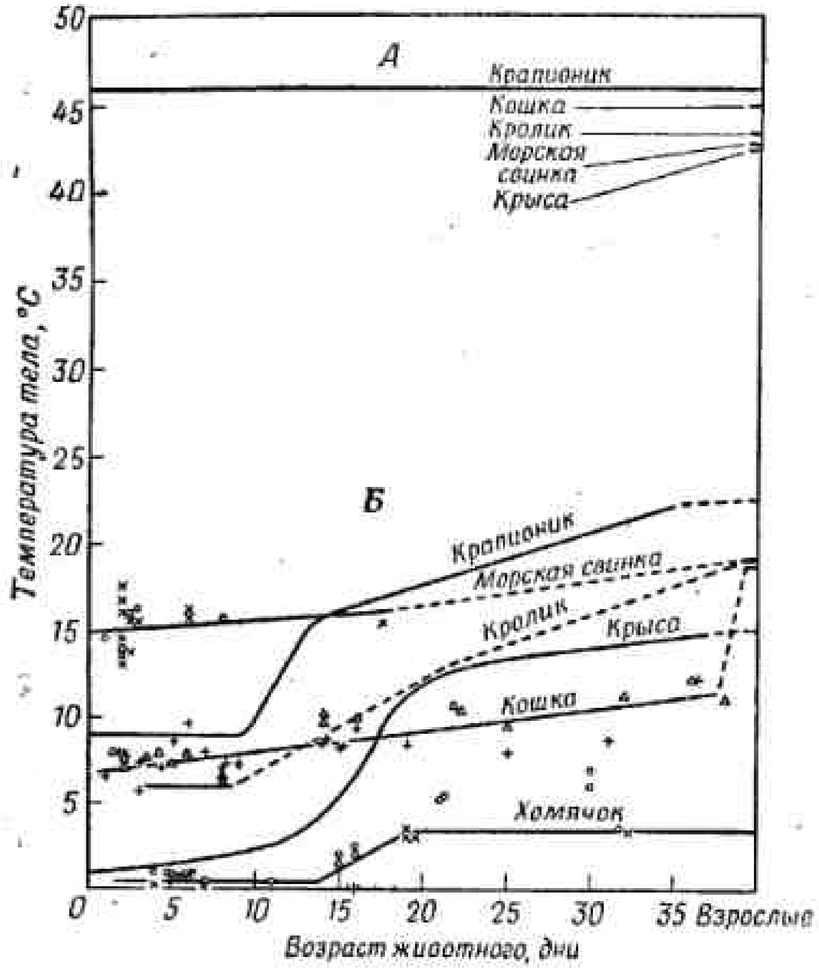
активного животного, т. е. приблизительно до +38°. Иногда интенсивность обмена веществ может повыситься и температура тела будет держаться на несколько градусов выше нуля при продолжающейся спячке. Животные, у которых совершенно отсутствуют такие реакции, а температура тела падает ниже нуля, обычно самостоятельно не просыпаются [48, 64, 65].

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ НОВОРОЖДЕННЫХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Еще в 1824 г. Эдвардс отмечал, что у новорожденных щенят, котят и крольчат, пока они находились при матери, температура тела достигала +38°, но, как только их отнимали от матери, температура их тела падала почти до уровня окружающего воздуха. Эти животные переживали охлаждение до таких температур, которые были бы летальными для взрослых млекопитающих тех же видов. С возрастом животные лучше сохраняли температуру тела в холодной среде, но зато утрачивали способность переносить значительное понижение температуры внутри тела. Эдвардс полагал, что те маленькие млекопитающие и птицы, которые появляются на свет голыми, слепыми и беспомощными и которые не могут сохранять температуру своего тела, переходят от состояния холоднокровных животных к состоянию теплокровных. Отсюда возникло представление о том, что новорожденные млекопитающие являются пойкилотермными животными. Эдвардс сделал также важное наблюдение, что морские свинки и некоторые другие млекопитающие, появляющиеся на свет с хорошим шерстяным покровом, с открытыми глазами и другими признаками относительно хорошего развития, обладали большей устойчивостью к охлаждению, чем животные, рождавшиеся голыми и беспомощными (см. [58, 78]).

Многие факторы, влияющие на развитие способности регулировать температуру тела, были изучены Пембри [77]. Вместе с тем на протяжении всего XIX в., по-видимому, не предпринималось никаких попыток установить минимальные температуры, переживаемые новорожденными млекопитающими, или же сравнить периоды, в течение которых они в холодной среде остаются жизнеспо-

собными. Только в 1948 г. Фэйрфилд сделала замечательное наблюдение, что крысята переживали охлаждение тела до температуры +2,5°, хотя в некоторых случаях у них в течение 1 *час* отсутствовали сокращения сердца и не наблюдалось потребления кислорода [31]. Адолф [1, 2] показал, что продолжительность жизни крыс



Фиг. 52. Летальная температура для новорожденных млекопитающих различных видов и птенцов крапивника [3].
А — верхний предел температуры; *Б* — нижний предел.

при температурах ниже 12° можно увеличить, выдерживая их в кислородной среде. Полное оживление охлажденных детенышей млекопитающего зависит от поведения матери. Адолф [2] нашел, что для предотвращения выбрасывания матерью охлажденного детеныша его перед возвращением в гнездо необходимо предварительно согреть до нормальной температуры. В 1951 г. Адолф [3] установил уровень температур, летальных для детенышей млекопитающих различных видов (фиг. 52). Во всех случаях летальная температура, очевидно, была выше нуля. Примечательно, что выживание охлажденных детенышей не зависело от непрерывности сердечного ритма или дыхания. Способность к восстановлению дыхания имела большее значение для прогноза, чем способность к восстановлению сердечной деятельности. Адолф пришел к выводу, что выживание сильно охлажденных детенышей не ограничивалось никаким уже известным нам фактором [3]. По-видимому, не имело никакого смысла охлаждать детенышей млекопитающих до температур ниже нуля, поскольку они погибали неизвестно по какой причине уже при температуре выше нуля.

ЛЕТАЛЬНАЯ ТЕМПЕРАТУРА ТЕЛА У ВЗРОСЛЫХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ. НЕКОТОРЫЕ КЛАССИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ

В процессе исследования факторов, влияющих на содержание гликогена в печени, Клод Бернар открыл, что морские свинки переживали понижение температуры внутри тела до 18—20°. Если же их оставляли в холодной среде, температура тела продолжала понижаться и животные погибали [15, 16]. Вскоре после этого Вальтер и Хорват обнаружили, что наиболее низкая температура тела, совместимая с восстановлением жизнедеятельности, у кролика составляла +20° (см. [58]). Постепенное понижение температуры внутри тела ниже нормального уровня вызывало наркотическое состояние, подавление рефлексов, затем прекращение дыхания и, наконец, остановку сердца у подопытных грызунов, а также у кошек, собак и обезьян при температурах от +14 до +20° [19, 35, 79]. Ни одно из этих млекопитающих не оживало, если сердце останавливалось до того, как начинали согревать животных.

Гейманс [44] первый изучал на кроликах, кошках и собаках действие охлаждения крови при искусственном кровообращении и пришел к выводу, что сама по себе гипотермия не смертельна для мозга и других жизненно

важных органов. Эти органы переставали функционировать в результате остановки сердца и прекращения дыхания. Таким образом, летальная температура тела для животного в целом лежала у млекопитающих этих видов в пределах от +18 до +20°.

Постепенно определили летальную температуру тела у взрослых млекопитающих различных видов, не впадающих в спячку. В лабораторных условиях, когда анестезированных или неанестезированных животных погружали в ледяную воду, смерть обычно наступала при строго определенной температуре внутри тела — от +15 до +25° в зависимости от вида животного [3, 20, 23, 43].

Относительно человека в настоящее время известен лишь один случай выживания после того, как в результате замерзания температура тела достигла +18°. Речь идет о негритянской женщине, которая всю ночь пролежала в состоянии опьянения на улице при температуре воздуха от —18 до —24°. При поступлении в больницу у нее не было пульса, хотя сердце еще билось (12—20 ударов в 1 *мин*) и сохранялось дыхание (3—5 вдохов в 1 *мин*). Женщина была тяжело обморожена, так что потребовалась ампутация конечностей; тем не менее она осталась жить [57]. Известны другие случаи обморожения людей, у которых температура тела понижалась до +24 или +25°. Интересно, что все они во время замерзания были в состоянии опьянения. Люди, обмороженные в трезвом состоянии, редко переживали охлаждение до такой степени, что ректальная температура падала ниже +27° [19, 43]. Возникает вопрос, действительно ли высокое содержание алкоголя в крови способствует переживанию глубокой гипотермии или же просто люди в состоянии интоксикации лучше переносят воздействие холода. Однако нет никаких данных, что они защищены от обмораживания или что хоть один человек остался жить после понижения температуры внутри тела до точки замерзания. Единственное экспериментальное исследование летальных для человеческого организма температур проводили в концентрационном лагере Дахау. Будем надеяться, что эти ужасающие опыты на людях никогда больше не повторятся. В то же время Смит и Фэй [89] еще в 1940 г. показали, что больных можно

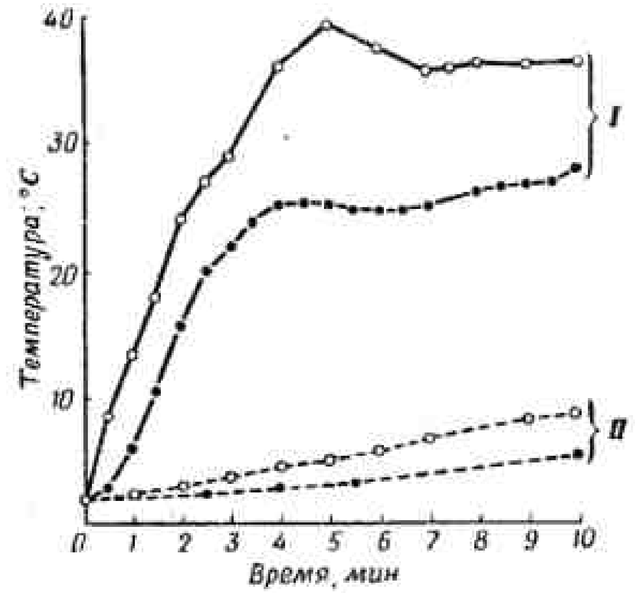
охлаждать в терапевтических целях, не подвергая их опасности, до температуры тела от +25 до +30° [88]. Поэтому внимание физиологов было сосредоточено на изучении действия понижения температуры тела до 28—30° на все системы организма. Умеренная гипотермия оказалась весьма ценным помощником в сердечной хирургии и нейрохирургии. Она бывает очень полезна и при других обстоятельствах, когда хирургическое вмешательство при нормальной температуре тела или опасно, или же совершенно невозможно из-за опасности наступления аноксии (см. [86]). До последнего времени отвергалась всякая возможность переживания охлаждения до температуры внутри тела ниже нуля взрослыми интактными млекопитающими различных видов, не впадающими в спячку. Предполагалось, что они погибнут еще раньше в результате остановки сердца и дыхания при температуре тела значительно выше нуля.

Оживление млекопитающих после вызванной охлаждением остановки сердца и дыхания

Много раз предпринимались попытки оживить взрослых млекопитающих после остановки дыхания и сердца, обусловленных экспериментальной гипотермией. Так, Винтерштейн [97] охлаждал морских свинок и кроликов до температуры внутри тела 6—11° и добивался временного восстановления жизненных функций, вводя в кровоток теплый раствор Рингера с адреналином и проводя искусственное дыхание. Лютц [62, 63] обнаружил, что в некоторых случаях морские свинки, подвергшиеся охлаждению до температуры тела 0°, оживали при погружении их в горячую воду. Однако спустя несколько дней после такого, казалось бы, успешного оживления животные погибали.

В конце второй мировой войны в Белграде во время одного из воздушных налетов была уничтожена университетская библиотека. В связи с этим д-р Анджус, работавший на кафедре физиологии, не знал, что, согласно литературным данным, летальная температура тела у взрослых крыс составляет +15°. Поэтому он и не отка-

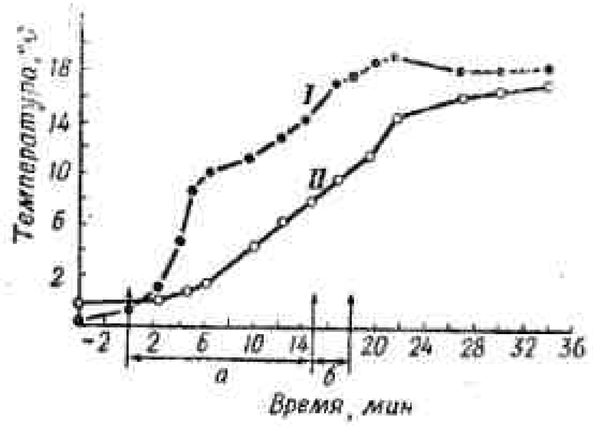
зался от попыток оживлять животных после остановки сердца и дыхания, вызванной охлаждением до значительно более низких температур. Он вызывал у крыс состояние наркоза, помещая их в герметические стеклянные сосуды, обложенные льдом, и заставляя, таким образом, вдыхать ими же выдыхаемый воздух. У животных создавалось одновременно состояние гипотермии, гипоксии и гиперкапнии [36]. Приблизительно через 2 *час* наступала полная летаргия при температуре внутри тела от +18 до +20°. Крыс извлекали из сосудов и обкладывали измельченным льдом. На данном этапе опыта наблюдалось еще глубокое дыхание и роговичные рефлексы. Ректальная температура быстро понижалась до +15°, и в этот момент прекращалось дыхание. Еще через несколько минут ректальная температура достигала +6°, после чего уже не прослушивались тоны сердца. Температура внутри тела продолжала понижаться, пока не падала примерно до +1°. Анджус обнаружил, что в тех случаях, когда он согревал в горячей воде сразу все тело и проводил искусственное дыхание, животные не оживали. Если же он обогревал только область сердца, прикладывая к груди металлическую пластинку, нагретую на бунзеновской горелке, сердечная деятельность всегда восстанавливалась. Затем Анджус вдувал в легкие воздух с помощью резинового баллончика и катетера, введенного в ноздри животного. Он чередовал согревание в области сердца с искусственным дыханием до тех пор, пока ректальная температура не достигала примерно +10°, после чего горячей водой (40—50°) обогревал шею крысы. Согревание в области сердца и вдувание воздуха в легкие возобновляли, а в случае необходимости, кроме того, сжимали грудную клетку. Когда температура внутри тела повышалась примерно до +15°, у крыс, лишенных всяких признаков жизни, восстанавливалось самостоятельное дыхание. После того как сокращения сердца и дыхание становились нормальными, Анджус держал животных в теплой воде до тех пор, пока температура внутри тела не достигала приблизительно +30°. Вскоре крысы поднимались на ноги, и у них восстанавливались остальные рефлексы. До этой стадии удавалось оживлять большинство животных, подвергавшихся охлаждению до +1°, причем около 20% крыс жили несколько дней после опыта. Лишь немногие из крыс, охлажденных до +1°, у которых почти 1 *час* отсутствовали дыхание и сердечная деятельность, жили продолжительное время после полного восстановления жизненных функций [7].



Фиг. 53. Повышение температуры в грудной полости *(I)* и в толстой кишке *(II)* у обледеневших крыс во время местного согревания области сердца с помощью пластинки (●) и лучей света (○) [13]

В наших совместных работах с Анджусом, проводившихся в Национальном институте медицинских исследований в Лондоне, мы исходили из предпосылки, что любая охлажденная до состояния обледенения крыса сохраняет потенциальную жизнеспособность в течение приблизительно 1 *час* после остановки дыхания и сердца. Поскольку успех оживления зависел от местного согревания сердца, необходимо было найти новые, более эффективные методы, чем прогревание кожи с помощью металлической пластинки. Для прогревания подкожных тканей и мышц у человека часто используют инфракрасные лучи. Лучи видимого света также проникают на некоторое расстояние под кожу и прогревают соответствующие ткани. Учитывая это, мы направляли луч света

от мощной проекционной лампы на область сердца обледеневшей крысы [12] и обнаружили, что в таких условиях температура внутри грудной клетки повышалась быстрее, чем при согревании металлической пластинкой (фиг. 53 и 54). Когда крыс, охлажденных обычным способом до 0—2°, оживляли, согревая область сердца металлической пластинкой и проводя искусственное



Фиг. 54. Повышение температуры в грудной полости *(I)* и в толстой кишке *(II)* у живой крысы во время местного согревания области сердца лучами света [13].

а — согревание области сердца; *б* — согревание шеи.

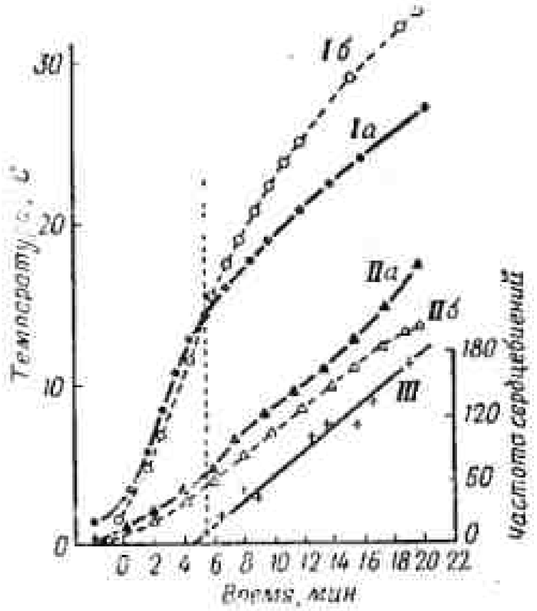
дыхание, только 20% животных жило более 24 *час*. Если же для согревания использовали лучи света и искусственное дыхание, то 76% крыс жили более 24 *час*, а 68% — более 66 дней [13]. Для согревания сердца крысы был специально модифицирован магнетронный сверхвысокочастотный генератор. Генерированные волны сверхвысокой частоты проникали приблизительно на 1 *см* вглубь, а поверхностного перегрева и ожогов кожи удавалось избежать, так как глубокому прогреванию подвергалось только самое сердце. Повышение температуры в грудной клетке показано на фиг. 55. Для одновременного согревания сердца и вдувания воздуха в легкие была разработана стандартная методика. В результате ее применения 80—100% крыс переживали охлаждение и жили после этого длительное время [11].

Одновременно и независимо от нас в этом же направлении работали в Миннеаполисе (США) Ниази и

Льюис, применяя совершенно иные методы охлаждения и оживления. Они также установили, что крысы при понижении температуры тела до уровня от +8,5 до —4° (т. е. значительно ниже той, которую ранее считали летальной, а именно +15°) могут быть оживлены после остановки сердца, продолжавшейся 35—44 мин. Особого внимания заслуживает тот факт, что эти исследователи охлаждали крыс под нембуталовым наркозом, а оживляли их, согревая все тело в теплой воде и проводя искусственное дыхание смесью 95% кислорода и 5% CO_2 [71]. Примерно в это же время Голлан сообщил, что собаки, которых охлаждали, пропуская их кровь через охлаждающий змеевик с оксигенатором, оживали после остановки сердца, продолжавшейся 35—44 *мин*. Особого +1,5° [39, 42]. Важно было поддерживать в течение всего периода остановки сердца циркуляцию насыщенной кислородом жидкости, причем при температуре тела ниже 10° кровь можно было заменять раствором Рингера [41].

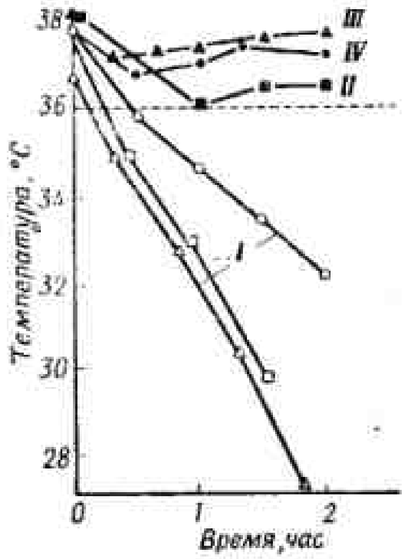
Так был установлен новый физиологический закон: остановка сердца и дыхания, вызванная охлаждением млекопитающего, не всегда приводит к его смерти. Клетки, ткани и органы интактного организма, по-видимому, не повреждаются при временном понижении температуры тела до уровня чуть выше точки замерзания. После возобновления кровообращения и согревания восстанавливается и их координированная деятельность. Сразу же возникли новые самые разнообразные проблемы, разрешению которых было посвящено много исследований. Так, Анджус [8] нашел, что крысы хорошо переносили неоднократное охлаждение до температуры чуть выше нуля. После повторных опытов они оживали быстрее, судя по возвращению к ним способности сохранять нормальную температуру тела в холодной среде (фиг. 56), а также по интервалу времени, в течение которого восстанавливался их исходный вес (табл. 54). Период переносимого животными временного прекращения жизнедеятельности удлинялся, так что, когда число охлаждений до 0° увеличивали от 3 до 10, доля крыс, переживших остановку сердца на 2 *час*, повышалась [8].

В совместных опытах со специалистами в области психологии животных мы установили, что у крыс, приученных отыскивать себе пищу в лабиринтах, не наблюдалось значительной потери памяти после охлаждения их до температуры тела чуть выше точки замерзания



Фиг. 55. Повышение температуры во время согревания с помощью сверхвысокочастотного генератора [11].

I — температура в пищеводе (измеряли в области ниже сердца); *II* — температура в толстой кишке; *III* — частота сердцебиений. *а* — у оживающего животного; *б* — у этого же животного, забитого после оживления, охлажденного и вновь использованного для измерения температуры при согревании.



Фиг. 56. Температура в толстой кишке у крыс, помещенных спустя 1 *час* после оживления в холодильник (0—3°) [8].

I — крысы, оживленные в 1-й раз; *II* — крыса, оживленная в 5-й раз; *III* — крыса, оживленная в 6-й раз; *IV* — крыса, оживленная в 7-й раз.

[9, 10]. Голову животного обкладывали льдом. Таким образом, температура мозга не могла быть выше температуры в толстой кишке. Судя по электроэнцефалограммам, активность коры мозга прекращается у крыс приблизительно при 18°. Следовательно, у всех подопытных животных в течение 1—2 *час* отсутствовали какие-либо проявления деятельности мозга. Тем не менее после оживления они вели себя так же, как и до опыта. Полученный результат не совпадал с теорией, согласно которой память зависит от непрерывного прохождения

импульсов через нейроны мозга, в которых происходит активный обмен веществ [9, 10]. Поведение и общее состояние животных, оживленных после охлаждения до 0°, нормализовалось довольно быстро. Однако способность

ТАБЛИЦА 54

Действие неоднократного охлаждения до 0° на восстановление веса у крыс [8]

Число охлаждений	Число животных	Среднее время, необходимое для восстановления исходного веса, дни
1	17	6,65
2	15	3,65
3	16	3,15
4	10	2,85
5—10	14	1,8

к оплодотворению и половой инстинкт у крыс обоего пола, впервые охлажденных до температуры 0° и затем оживленных, были подавлены полностью в течение 2—4 недель и оставались несколько пониженными примерно 8 недель после опыта [37].

Оживление замороженных крыс путем согревания сердца с помощью сверхвысокочастотного генератора не представляло трудностей. Однако применять такую методику можно только в лабораториях, оборудованных магнетронными сверхвысокочастотными генераторами. Вот почему такое важное значение как с практической, так и с теоретической точки зрения имело открытие, что крыс и мышей, у которых в результате охлаждения прекратились дыхание и сердечная деятельность, можно оживлять, согревая все тело с помощью обычных настольных ламп [38]. Эта несложная методика оживления, включающая в себя и искусственное дыхание, облегчала также проведение других исследований. В частности, Хорнси использовал ее для оживления облученных взрослых мышей с температурой тела 0—1°. Доза, убивавшая 50% мышей (LD_{50}) в течение 30 дней, составляла

1760 г для замороженных мышей и 620 г для мышей с нормальной температурой тела [45, 46]. Величина фактора уменьшения дозы при охлаждении до указанной выше температуры составляла 2,8, т. е. была больше величин, полученных до настоящего времени при использовании других методов биологической или химической защиты.

Кейтер и Вейсс [22] установили, что напряжение кислорода в семенниках, селезенке, костном мозге и в брюшной полости у мышей понижалось приблизительно до 2 *мм* рт. ст. во время охлаждения до 0° и стремительно повышалось при оживлении после восстановления кровообращения и дыхания. Столь тяжелая гипоксия, которую не могли бы пережить мыши с нормальной или слегка пониженной температурой тела, вероятно, и обусловливала, по крайней мере частично, поразительную устойчивость замороженных мышей к летальным (в других условиях) дозам облучения.

Использование многократного оживления обледеневших мышей позволило сравнить действие облучения на семенники, селезенку, костный мозг и другие ткани у большого числа мышей при температуре тела 0, 15° и в норме [93]. Охлаждение до 15° дает незначительный защитный эффект по сравнению с тем, который наблюдается при охлаждении до 0°. В настоящее время имеются основания полагать, что пониженное напряжение кислорода в этих обычно чрезвычайно чувствительных тканях представляет собой основную причину их устойчивости к облучению у животных, находящихся в состоянии глубокой гипотермии при полной остановке кровообращения [91, 92, 94, 95].

Не только грызунов, охлажденных до температуры, близкой к 0°, можно оживить после остановки сердца и дыхания, а также тяжелой гипоксии. Ниази и Льюис [72, 73] показали, что жизненные функции восстанавливаются также у собак и обезьян, перенесших остановку сердца продолжительностью от 40 *мин* до 3 *час* при температуре внутри тела 0—10°. В своих опытах эти исследователи понижали температуру животных путем поверхностного охлаждения тела. Введение с помощью аппарата для искусственного дыхания смеси, состоящей

из 5% CO_2 и 95% O_2, во время охлаждения и последующего оживления ускоряло процесс восстановления жизненных функций и увеличивало число полностью выздоровевших животных. Недавно Ниази и Льюис [74] пытались излечить женщину (в возрасте 51 г.), страдавшую метастазированным неоперабельным раком. Поверхностное охлаждение тела проводили до тех пор, пока ректальная температура не упала до 9° и сердце не остановилось на 45 *мин*. Как только больную согрели, возобновились сокращения сердца и наступило полное восстановление всех жизненных функций. Однако больная умерла через 38 дней в результате дальнейшего развития основного заболевания [74].

Голлан охлаждал собак до 0° с помощью аппарата для искусственного кровообращения (охлаждающий змеевик и оксигенатор) и изучал влияние на процесс оживления таких факторов, как давление, pH, электролитный баланс и вязкость перфузируемой жидкости. Он пришел к заключению, что наиболее важным фактором, способствующим выживанию млекопитающих после остановки сердца при температурах, близких к 0°, является соответствующая и непрерывная перфузия жизненно важных органов насыщенной кислородом кровью. По мнению Голлана, все другие факторы имеют второстепенное значение по сравнению с достаточным снабжением тканей кислородом. Приведем его высказывание по этому поводу: «Все попытки дать более привлекательное и более надуманное объяснение оживлению собак, подвергшихся глубокой гипотермии, с привлечением данных о гормонах, электролитах, CO_2 и вязкости потерпели неудачу. Нет никакой надобности в новой концепции или новом веществе. Вполне достаточно изучавшейся еще Чезальпино непрерывной циркуляции крови, доставляющей клеткам открытый Пристли кислород» [40]. Адолф [4] поддерживает положение, согласно которому недостаток кислорода представляет собой главную причину гибели животных, охлаждаемых до температуры ниже той, при которой наступает остановка сердца. В то же время, Делорм [26] полагает, что аноксия, возможно, не является самым важным фактором, ограничивающим продолжительность остановки сердца, которую может пере-

жить животное в условиях гипотермии. Он считает, что во время прекращения кровообращения происходит тромбоз мелких сосудов сердца и других жизненно важных органов. Это может служить причиной последующей смерти млекопитающих, первоначально успешно оживленных, а также причиной неудач при оживлении животных, охлажденных до температуры тела около нуля, когда не проводят надлежащей перфузии.

Эти взгляды излагаются здесь для того, чтобы не создалось впечатление, что оживление млекопитающих, перенесших остановку сердца при низкой температуре тела, не вызывает никаких трудностей. Важно, однако, отметить, что В. А. Неговский проводил смертельное обескровливание у собак и обезьян при сравнительно высокой температуре тела от +24,5 до +26,5° и затем оживлял их после прекращения кровообращения в течение 1 *час* [68, 69][1]. Кеньон и сотрудники понижали у собак температуру тела внутри (без применения искусственного кровообращения) до 3—5°. Остановка кровообращения и сердца продолжалось 30—45 *мин*. Полностью оживленные животные жили после опыта в течение многих недель. Во избежание развития метаболического ацидоза Кеньон во время охлаждения и согревания вводил подопытным собакам изотонический раствор бикарбоната натрия, содержащий хлористый калий и глюконат кальция. Некоторым собакам проводили различные операции на сердце во время его остановки. У этих животных также полностью восстановились жизненные функции [54, 55].

Много сложных операций по поводу врожденных пороков и других дефектов сердца проведено в последние годы на людях, охлажденных до температуры около +15°. При этом как обычное, так и искусственное кровообращение полностью выключали на различные периоды времени до 46 *мин* [28, 29]. По мнению Дрью и сотрудников, нет никаких оснований не применять еще более низкие температуры. Действительно, может быть,

[1] В настоящее время в опытах, проводимых в Лаборатории экспериментальной физиологии по оживлению организма АМН СССР, удалось продлить срок клинической смерти у собак до 2 *час*.— *Прим. ред.*

безопаснее уменьшать температуру жизненно важных органов и тканей до более низкого уровня, чтобы повысить их устойчивость к аноксии. Эти авторы полагают, что в недалеком будущем глубокое охлаждение в сочетании с кровообращением при выключенном сердце найдет широкое применение в сердечной хирургии за счет более редкого использования кровообращения при выключенном сердце и легких, осуществляемого с помощью оксигенатора при нормальной температуре тела [28].

Следует подчеркнуть, что остается еще много неясных положений в физиологии млекопитающих, охлажденных до сравнительно высоких температур (в пределах от +25 до +30°), при которых продолжаются сокращения сердца и дыхание. Летальные исходы могут иметь место и после согревания млекопитающих, охлажденных до таких температур. Еще не полностью выявлены опасности, связанные с умеренной гипотермией, несмотря на интенсивные поиски в этом направлении (см. [30, 86, 96]). Много задач предстоит разрешить, прежде чем удастся неизменно оживлять млекопитающих, включая человека, охлажденных до температур чуть выше 0°, при которых прекращаются сердечная деятельность и дыхание. Примечательно, как подчеркивает Адолф [4, 5], что еще не полностью выяснены причины смерти млекопитающих, охлажденных до различных уровней температуры выше нуля. Нет также определенного метода, позволившего бы предсказать восстановление жизненных функций у млекопитающих после охлаждения их до температуры выше нуля. И все же, если мы намереваемся восстанавливать жизненные функции после охлаждения млекопитающих до температуры ниже нуля, необходимо продолжать подвергать их охлаждению и согревать в зоне указанных температур.

При температуре внутри тела чуть выше 0° искусственно охлажденные крысы и другие млекопитающие выглядят мертвыми. Они и являются мертвыми, согласно всем общепринятым признакам клинической смерти, и тем не менее их можно оживить. Отсюда возникает вопрос: как же следует определять смерть? Паркс [76] дал единственно приемлемый для физиологов ответ на этот вопрос: «Смерть представляет собой такое состояние,

при котором оживление целого организма существующими в настоящее время средствами невозможно».

Учитывая сказанное, мы приступили к опытам по охлаждению взрослых млекопитающих (с последующим согреванием) до такой степени, что температура их тела падала ниже точки замерзания воды.

Исследования проводили не на крысах, а на золотистых хомячках, поскольку их удавалось оживлять после более продолжительной остановки сердца и дыхания при температуре тела лишь ненамного выше 0° [87]. Хомячков охлаждали так же, как в опытах с крысами, создавая гиперкапнию в герметически закрытых сосудах и затем обкладывая эти сосуды измельченным льдом. Обычно животные полностью оживали после остановки сердца на 2—4, а иногда и 7 *час* [81—84]. Другое преимущество работы с хомячками заключалась в том, что они легче, чем крысы, поддавались оживлению после охлаждения тела до температуры несколько выше нуля и в последующем восстановительном периоде не требовали специально подогретой среды. Следует подчеркнуть, что самостоятельно, без соответствующих мероприятий хомячки не оживали. Однако для того, чтобы добиться у них быстрого восстановления жизненных функций, достаточно было во время согревания всего тела животного посредством диатермии или с помощью настольной лампы проводить искусственное дыхание; местный обогрев области сердца не требовался. В первую очередь восстанавливалась сердечная деятельность, как свидетельствовали электрокардиограмма и пульсация в области сердца. Спустя несколько минут, к тому времени, когда температура внутри тела достигала примерно 10°, прощупывался пульс в периферических сосудах и губы, язык и кожа на лапках из бледно-серых становились розовыми. Затем восстанавливалось самостоятельное дыхание, и вскоре животные начинали сильно дрожать. Дополнительного согревания, однако, не требовалось, и полное восстановление заканчивалось при комнатной температуре.

Такая способность хомячков к восстановлению всех жизненных процессов, возможно, связана с тем, что в естественных условиях они впадают в зимнюю спячку. Однако бо́льшую часть опытов на этих животных проводили в летнее время, когда они не были в состоянии спячки. После охлаждения их тела до температур от +3,5 до +1,8°, при которых сердце переставало сокращаться, хомячки самостоятельно не оживали. Насколько известно, у млекопитающих, которые сами пробуждаются после зимней спячки, дыхание и сердцебиение во время спячки не прекращаются. Нет никаких данных, что во время естественной спячки поверхностные ткани замерзают. Наоборот, понижение температуры окружающей среды ниже точки замерзания воды вызывает пробуждение животного [64]. Нет также никаких данных, что изолированные клетки и ткани животных, впадающих в спячку, более устойчивы к замораживанию и оттаиванию, чем ткани животных, не впадающих в спячку.

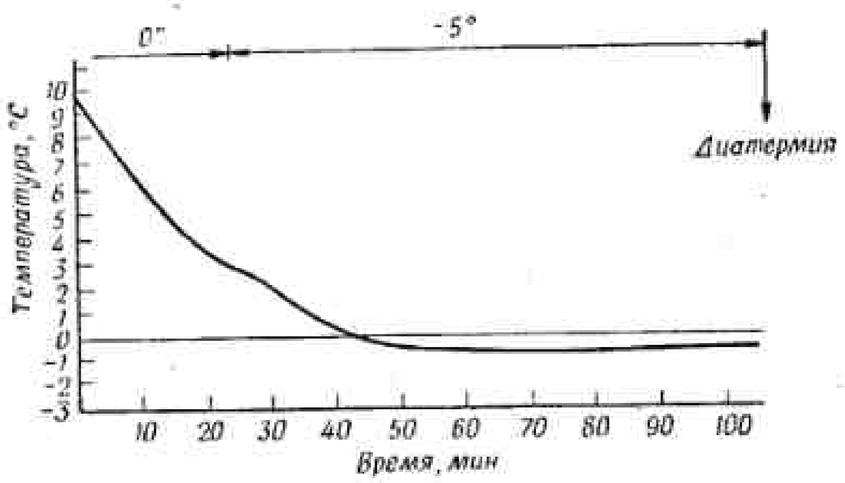
Оживление взрослых млекопитающих охлажденных до температур ниже нуля

опыты по замораживанию хомячков

Хомячков охлаждали до тех пор, пока у них не прекращалось дыхание и температура в толстой кишке не достигала +2,8°. Затем из подтаявшего льда их переносили в баню с температурой —5°, содержащую 50% пропиленгликоля. В результате температура в толстой кишке понижалась до 0° и затем еще ниже.

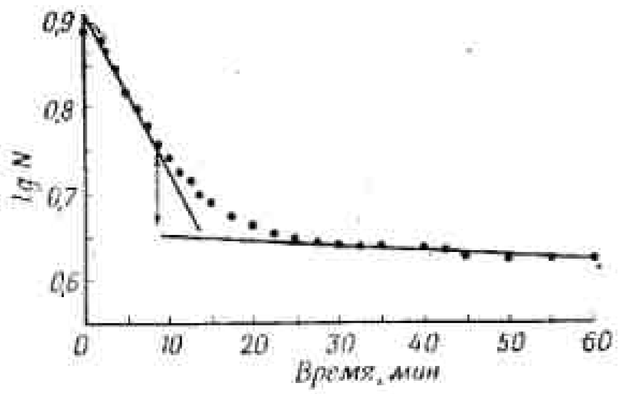
Примерно у 75% животных температура в прямой кишке в течение 10—14 *мин* снижалась с +2,8 до 0°. Затем животные охлаждались медленнее и за последующие 10 *мин* температура в толстой кишке достигала лишь —0,5°. После этого охлаждение шло еще медленнее и требовалось не менее 50 *мин*, чтобы в толстой кишке температура понизилась до —1,0° (фиг. 57). Изменения в скорости охлаждения еще более наглядно представлены на фиг. 58, на которой показано изменение разности между температурой в толстой кишке животного и температурой в охлаждающей бане. Уши и лапы животных начинали затвердевать еще до того, как глубокая температура внутри тела достигла 0°, а температура в подкожной клетчатке быстро падала до уровня ниже нуля. Когда температура в толстой кишке

достигала точки замерзания плазмы, кожа на всем туловище затвердевала, а температура в подкожной клетчатке была на уровне от —2 до —4,5° в зависимости от



Фиг. 57. Изменение температуры в толстой кишке у хомячка во время охлаждения в ледяной воде и во время последующего постепенного замораживания в бане с температурой —5° [84].

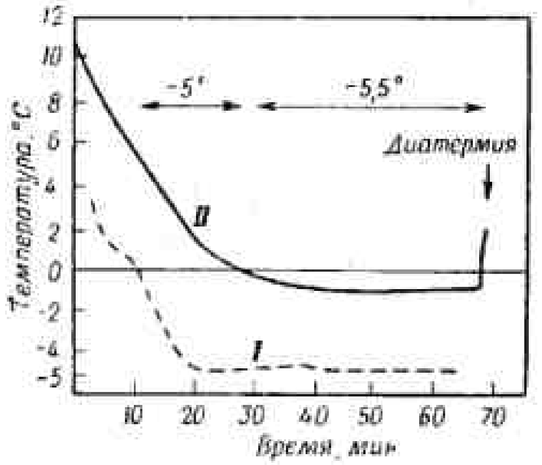
положения термопары (фиг. 59). Температура в грудной полости, измеренная в нижнем конце пищевода, начинала снижаться несколько позже, чем температура в тол-



Фиг. 58. Изменение разности (N) между температурой в толстой кишке хомячка и температурой бани (—5°) [60].

стой кишке, но в конце концов падала примерно до того же постоянного уровня (фиг. 60). Вне всяких сомнений, животные постепенно замерзали. В введенных под кожу

капиллярных трубках с сывороткой или физиологическим раствором образовывались кристаллы льда. Надрезы выявили наличие льда и в подкожных тканях. У многих хомячков вскрыли на разных уровнях грудную и брюшную полости после постепенного замораживания их в течение различных периодов времени. У тех животных, у которых температура в толстой кишке была в течение 40—50 *мин* ниже 0°, кожа, а также грудная и брюшная стенки казались обледеневшими и явно промерзли. На наружной поверхности внутренних органов брюшной и грудной полостей был обнаружен тонкий слой льда. Внутри желудка, кишечника и желчного пузыря, стенки которых затвердели, также имелись кристаллы льда. Печень и почки промерзли на глубину 1—4 *мм*, но внутри оставались мягкими и кровоточили. Мозг на ощупь был твердым; на срезах в нем были обнаружены кристаллы. Когда температура внутри тела держалась в течение 50—60 *мин* на уровне ниже нуля, тело интактного хомячка становилось твердым, как дерево.



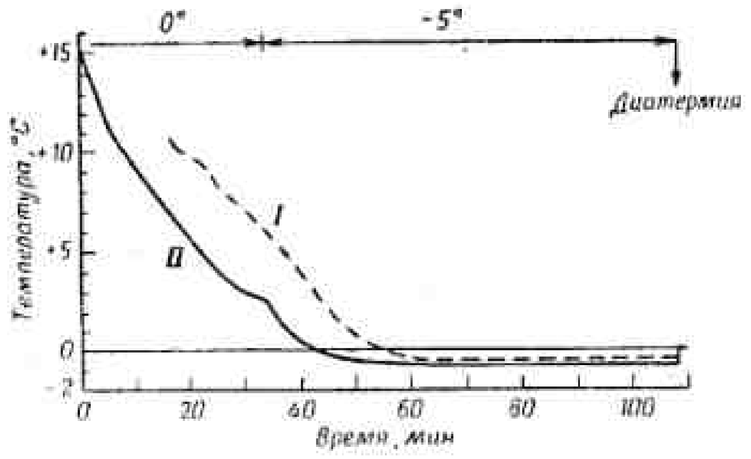
Фиг. 59. Охлаждение хомячка, погруженного на 40 *мин* в баню с температурой —5, а затем —5,5° [80].

I — температура в подкожной клетчатке; *II* — температура в толстой кишке.

Медленное понижение температуры тела при постепенном замораживании связано с выделением скрытой теплоты кристаллизации во время превращения тканевой жидкости в лед. Аналогичные кривые охлаждения получены в опытах по замораживанию лягушек, летучих мышей и других животных [21, 51]. Такие же кривые наблюдали и при замораживании физиологического раствора и различных жидкостей в сосудах [60].

Количество льда, образовавшегося в теле хомячков известного веса, которых постепенно замораживали на различные периоды времени, определяли с помощью калориметрии. Частично замороженных хомячков, а также

хомячков с температурой 0° поместили в сосуды Дьюара, заполненные определенным количеством воды с комнатной температурой. Падение температуры воды и повышение температуры тела непрерывно регистрировали, пока не наступало состояние теплового равновесия. Анализы показали, что содержание воды в теле незамороженного хомячка составляло 66%. Массу льда в теле



Фиг. 60. Температура в грудной полости *(I)* и в толстой кишке *(II)* у постепенно охлаждаемого хомячка [81].

замороженного животного подсчитывали по следующей формуле:

$$ML = C(T_1 - T) - H(T - T_2),$$

где M — масса льда в теле замороженного животного; L — скрытая теплота плавления льда; C — водяной эквивалент калориметра и его содержимого; H — водяной эквивалент хомячка; T — температура, при которой достигнуто тепловое равновесие; T_1 — исходная температура калориметра и T_2 — исходная температура тела хомячка.

При этом не брали никакого поправочного коэффициента на изменение удельной теплоемкости воды при замерзании, поскольку температура внутри тела животных в этих опытах была обычно ниже —1° и погрешность была весьма незначительной. Точность калориметрического определения проверяли, замораживая известное количество дистиллированной воды в полиэтиленовых мешочках. Расчеты показали, что у хомячков, которых замораживали постепенно в течение 50—60 *мин* в бане с температурой —5°, 25—45% находящейся в организме воды превращалось в лед (табл. 55). Животные в процессе калориметрирования погибали (тонули), и нельзя было делать выводы относительно их выживания после замораживания. Необходимо было разработать какой-то метод для определения доли превращающейся в лед воды в организме, не влияющий на последующее оживление животного.

Лавлок указывал, что долю вымерзшей воды при различных температурах в водных растворах с известной исходной концентрацией и осмотическим давлением можно подсчитать по простой формуле

$$T = KX,$$

где T — понижение точки замерзания водного раствора с молярной концентрацией X растворенного вещества, а K — константа. Точка замерзания плазмы хомячка лежала при —0,56°. Температуру измеряли в толстой кишке и в различных тканях и органах животных. Лавлок утверждал, что если T_1 — температура замерзания плазмы и тканевой жидкости, а T_2 — температура какой-либо частично замороженной ткани или органа животного, то соотношение концентраций растворенных веществ (X_1 и X_2) при обеих температурах составит

$$\frac{T_1}{T_2} = \frac{KX_1}{KX_2} = \frac{X_1}{X_2}.$$

Повышение концентрации растворенных веществ при любой температуре обусловлено вымерзанием воды.

Отсюда следует, что

$$P = \frac{1 - T_1}{T_2},$$

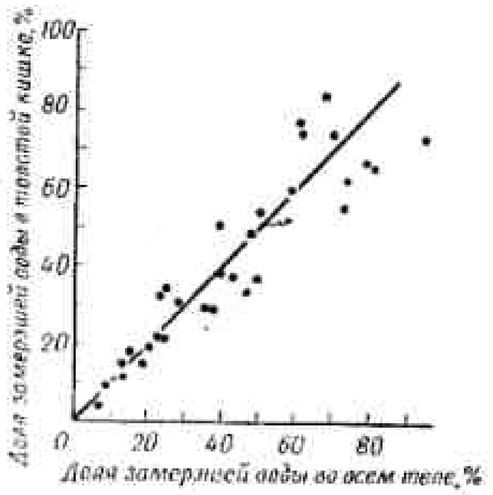
где P — доля вымерзшей воды. С помощью этой формулы подсчитали долю воды, вымерзшей в толстой кишке у хомячков, которых использовали для калориметрии.

ТАБЛИЦА 55

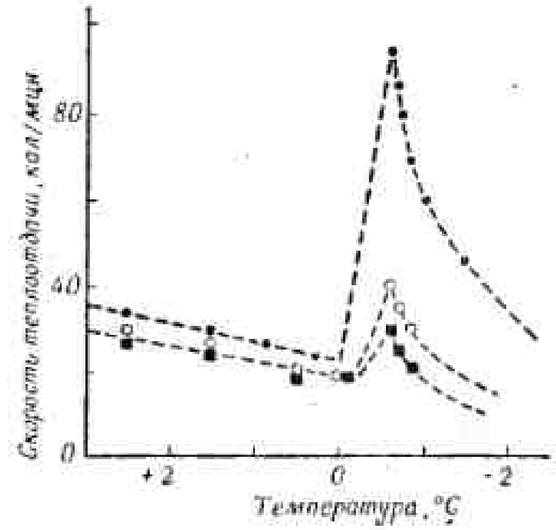
Доля воды, вымерзшей в толстой кишке и во всем теле [60]

Вес тела, *г*	Продолжительность замораживания при температуре в толстой кишке ниже 0°, *мин*	Конечная температура в толстой кишке, °С	Доля вымерзшей воды, %		Разность между Б и А
			А	Б	
			в толстой кишке (рассчитано по конечной температуре)	во всем теле (определено калориметрически)	
105	35	—0,8	4,0	7	+3
94	40	—0,8	12,5	14	+1,5
96	40	—0,78	15	14	—1,0
86	40	—0,85	20	22	+2
97	40	—0,85	15	19	+4
92	45	—0,78	18	16	—2
100	45	—0,8	9	9,5	+0,5
102	50	—0,77	34	26	—8
90	55	—1,70	50	40	—10
96	55	—0,7	21,5	24	+2,5
103	60	—0,7	21,5	25	+3,5
94	60	—0,78	29,5	36	+6,5
96	62,5	—0,85	28	38	+10
96	65	—0,95	38	40	+2
97	65	—0,88	34	47	+11
82	80	—0,78	31	29	—2
91	85	—0,82	33	25	—8
92	90	—1,0	48,5	48,5	0
87	90	—0,85	37,5	43,0	+5,5
85	100	—0,9	37	49,5	+12,5
92	104	—1,4	59,5	59	—0,5
90	120	—1,2	53,5	51	—2,5
87	120	—1,7	66	79	+13
100	150	—1,2	55	73	+18
95	150	—2,2	73,5	70	—3,5
90	160	—1,2	65	81	+16
103	160	—2,2	74,5	62	—12,5
102	170	—2,0	72	95	+23
83	170	—3,2	83	68	—15
100	180	—2,0	74	62	—22
91	180	—2,7	76,5	61	—15,5

Полученные результаты, приведенные в табл. 55, показали удивительное соответствие между долей замерзшей воды во всем теле, определенной с помощью калориметрии, и долей замерзшей воды в толстой кишке (фиг. 61). Был сделан вывод, что расчет доли воды, превратившейся в лед в толстой кишке, даст приблизительное представление о доле замерзшей воды во всем организме.



Фиг. 61. Соотношение между долей замерзшей воды во всем теле (определенной с помощью калориметрии) и долей воды, замерзшей в толстой кишке [60].



Фиг. 62. Скорость теплоотдачи у хомячков до, во время и после начала процесса замораживания [60].

Долю замерзшей воды в других частях тела, куда ввели термопары, определяли по температуре данной части тела с помощью той же самой формулы. Некоторые полученные результаты приведены в табл. 56. Ясно, что в любой момент после начала процесса замораживания в подкожных тканях вымерзало больше воды, чем в толстой кишке [60]. Аналогично этому, когда стеклянные или политеновые сосуды с сывороткой или физиологическим раствором помещали в баню с температурой —5°, в них образовывалась ледяная корка из мелких кристаллов, между которыми находился концентрированный раствор. Кристаллы льда распространялись к центру сосудов, где они еще больше отделялись друг от друга

промежутками с незамерзшим концентрированным раствором. Наличие большого количества льда в коже или в поверхностных слоях жидкости в сосудах влияет на скорость охлаждения внутренних органов тела или центральной части содержимого сосуда. Это вызвано тем, что теплопроводность у льда почти в три раза больше,

ТАБЛИЦА 56

Доля вымерзшей воды в различных частях тела [60]

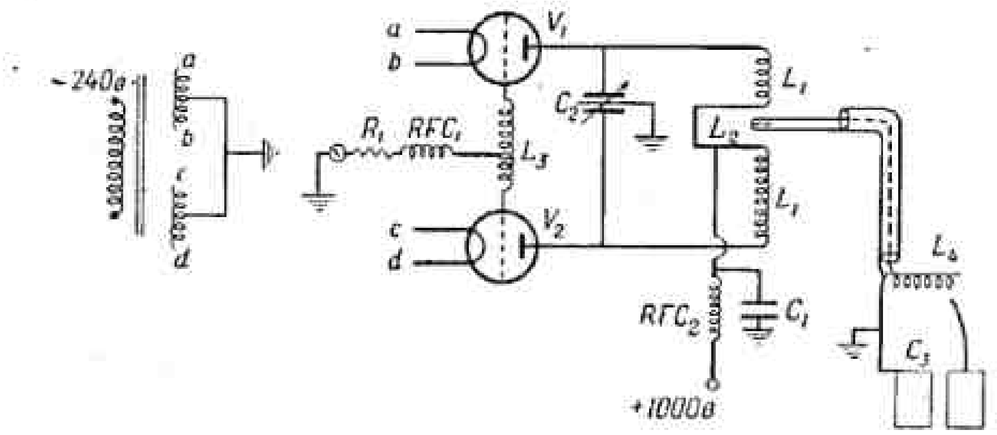
Вес тела, *г*	Продолжительность замораживания при температуре в толстой кишке ниже 0°, *мин*	Конечная температура в толстой кишке, °С	Доли вымерзшей воды в толстой кишке, %	Конечная температура в исследуемом органе, °С	Доля вымерзшей воды в исследуемом органе, %
		Подкожные ткани			
111	38	—0,83	32,5	—1,8	69
102	36	—0,85	34	—2,1	73
100	41	—0,9	38	—4,9	89
97	39	—0,85	34	—2,2	74,5
102	57	—0,85	34	—1,8	69
108	61	—0,9	38	—1,3	57
100	53	—0,9	38	—3,1	82
		Мозг			
103	50	—0,8	30	—1,3	57
91	60	—0,9	38	—1,5	63
92	46	—0,83	33	—1,2	53
92	50	—0,75	24	—1,35	58
		Грудная клетка			
89	30	—0,7	20	—0,6	7
98	65	—1,13	50	—0,78	22

чем у воды, тогда как диффузия тепла происходит во льду почти в 10 раз быстрее, чем в воде. На фиг. 62 показано, как быстро нарастала скорость теплоотдачи,

когда в коже (у трех различных хомячков) вода начинала превращаться в лед. Это явление не учитывали, когда впервые высказали предположение, что лед образуется со скоростью примерно 0,25 *г/мин* [87]. В настоящее время уже ясно, что скорость превращения воды в лед у частично замороженных животных выше.

ОЖИВЛЕНИЕ ЧАСТИЧНО ЗАМОРОЖЕННЫХ ХОМЯЧКОВ

В предварительных опытах были предприняты попытки оживить частично замороженных хомячков, согревая область сердца с помощью сверхвысокочастотного генератора или инфракрасных лучей. Сердечная деятельность вначале восстанавливалась, но вскоре сердце



Фиг. 63. Схема небольшого прибора Лавлока для диатермии [82].
R_1=4000 *ом*; RFC_1 и RFC_2 — высокочастотные дроссели на 27 *Мгц*; C_1=0,001 *мкф*; C_2 — переменный конденсатор на 100 *пф*; C_3 — диатермический электрод; заземленный электрод представляет собой пластинку из перфорированного цинка 175×135 *мм*, покрытую слоем полистирола толщиной 2,5 *мм*, а другой электрод — пластинку из перфорированного цинка 50×110 *мм*, покрытую с обеих сторон слоем полистирола толщиной 2,5 *мм*; L_1 — 6 витков медной трубки диаметром 2,5 *мм*; диаметр витка 50 *мм*; длина трубки 100 *мм*; средний вывод; L_2 — катушка связи; 1 виток медной проволоки (толстой); диаметр витка 75 *мм*; индуктивно связан с L_1; L_3 — 12 витков медной проволоки диаметром 0,9 *мм*; диаметр витка 25 *мм*; длина проволоки 100 *мм*; L_4 — 7 витков медной трубки диаметром 6 *мм*; диаметр витка 75 *мм*; длина трубки 110 *мм*; V_1 и V_2 — 2 выпрямительные лампы RS 31 IV *g* на 100 *в*.

переставало сокращаться еще до того, как успевали оттаять конечности и кожу на туловище животных, которые находились в замороженном состоянии в течение более 15 *мин*. Лавлок сконструировал небольшой прибор для

диатермии, чтобы оттаивать лед на всем теле животного как можно быстрее [61]. Прибор состоял из генератора, работающего на частоте 27 *Мгц* и имеющего мощность примерно 120 *вт* (фиг. 63).

Животное помещали между двумя электродами, присоединенными к внешнему резонансному контуру, связанному с генератором. Медленно охлажденные хомячки, находившиеся в замороженном состоянии в течение 70 *мин* при —5°, полностью оттаивали через 3 *мин* после начала обогрева с помощью указанного прибора. Диатермию не прекращали и после оттаивания, так что температура прибора повышалась от 0 до 10° со скоростью примерно 2° в 1 *мин*. За это время восстанавливались регулярные активные сокращения сердца. Искусственное дыхание поддерживали путем вдувания воздуха в легкие через трубки, введенные в ноздри. Затем диатермию прекращали и с помощью настольной лампы продолжали согревание до тех пор, пока температура в толстой кишке не достигала +10°. Спустя примерно 1 *мин* при температуре в толстой кишке около 11° начиналась пульсация в яремной вене и других периферических сосудах. Быстро восстанавливалось хорошее кровообращение, и, если не прекращали искусственного дыхания, язык, слизистые и кожа из пепельно-серых становились розовыми. Температура в толстой кишке продолжала повышаться со скоростью примерно 1° в 1 *мин*. Через брюшную стенку можно было видеть слабую перистальтику кишечника. Когда температура в толстой кишке достигала 15°, у животного начинали подергиваться усы, шевелились язык и нижняя челюсть и появлялись рефлексы на прикосновение к конечностям и животу. Когда у хомячков, находившихся в замороженном состоянии не более 160 *мин*, температура внутри тела достигала 17—19°, у них появлялось самостоятельное дыхание, глубокое, но неравномерное.

В дальнейшем восстановление функций зависело от продолжительности замораживания, а также от конечной температуры в толстой кишке. Хомячки, охлажденные на 50 *мин* и менее, оживали. Они сильно дрожали и делали напряженные движения конечностями и всем туловищем до тех пор, пока им не удавалось встать на

ноги. После кратковременной «передышки» животные начинали двигаться; постепенно у них восстанавливалась уверенная походка и обычное «исследовательское» поведение. Через несколько часов они уже начинали пить, а позднее и принимать пищу. У 17 хомячков из 20, охлажденных на различные периоды времени от 50 до 70 *мин*, восстановился нормальный внешний вид, однако 7 из них погибли в течение первых суток, а 2 — на протяжении 10 дней после замораживания и оживления. Наибольшее число смертельных исходов наблюдалось среди хомячков, охлажденных более чем на 60 *мин*. Остальные 8 животных из 20 жили различные сроки до 450 дней и все это время были в хорошем состоянии. Лишь у некоторых хомячков, охлажденных на 70—90 *мин*, восстановились нормальный внешний вид и движения, а большинство погибло в течение первых суток. У полностью выздоровевших животных температура в толстой кишке резко падала ниже —1°. Только у одного хомячка, замороженного на 96 *мин*, до тех пор пока температура в толстой кишке не достигла —1,4°, вначале быстро и полностью восстановились жизненные функции, но уже через 18 *час* он погиб. У других животных, замороженных на 90 *мин* и более, наступали судороги, и они погибали через несколько минут после восстановления самостоятельного дыхания, приблизительно через 2 *час* после оттаивания. Примечательно, что выжили буквально все частично замороженные животные, и большинство хомячков, которые находились в замороженном состоянии 50—60 *мин*, пока у них не наступало холодового окоченения, не только оживали, но и жили продолжительное время в явно хорошем состоянии.

В опытах применялись и другие методы оживления, в том числе более быстрое согревание с помощью диатермии, погружение в баню с температурой +40° или медленное оттаивание и согревание либо при комнатной температуре (17—22°), либо с помощью электролампы на 100 *вт*. Частично замороженных хомячков удавалось оживлять всеми указанными способами (при условии непрекращающегося искусственного дыхания), но было больше смертельных исходов в первые сутки после оживления и значительно меньше наблюдалось случаев стой-

кого долговременного выживания [82]. Результаты опытов приведены в табл. 57.

Приблизительное определение (см. стр. 381) доли воды, превратившейся в лед в организме хомячков, согретых с помощью диатермии, показало, что ни у одного из животных, у которых вымерзло более 55% воды, не восстановились нормальный внешний вид и поведение, хотя все они самостоятельно дышали и у многих наблюдалась дрожь. При вымерзании 40—50% общего объема воды у большинства животных восстанавливались нормальный внешний вид и поведение. Однако многие из них погибли в первые 48 *час* после оживления. Только около одной трети животных жили более 10 дней после оттаивания. Они прожили несколько месяцев и внешне имели вполне здоровый вид. Среди хомячков, подвергшихся охлаждению менее чем на 45 *мин* при —5°, не было случаев ранних смертельных исходов или неполного восстановления функций. В эту группу входили животные, у которых 30—40% общего объема воды тела обратилось в лед, причем в мозге вымерзло 50—58% воды, а в коже — 60—90%. Интересно, что самостоятельное дыхание и дрожь наблюдались у хомячков, у которых вымерзло 57—70% воды, а у животных, охлажденных на 170 *мин*, у которых 70—76% воды превратилось в лед, восстанавливались сокращения сердца. В конечном счете мы пришли к выводу, что при использовании вышеупомянутых методов взрослые хомячки не переживают охлаждения в течение более 1 *час* при температуре —5°, или вымерзания более 50% воды, или же падения температуры внутри тела ниже —1° (приблизительно). У хомячков, находившихся в охлажденном состоянии не более 10 *мин* в бане с температурой от —8 до —10° или при температуре воздуха ниже —10°, все жизненные функции никогда полностью не восстанавливались. Ясно, что нет никаких шансов на успешное хранение частично замороженных животных в состоянии приостановленной жизнедеятельности при температурах, близких к нулю. Вряд ли можно надеяться на их оживление и после полного замораживания при более низких температурах [82].

ТАБЛИЦА 57

Результаты применения различных методов оживления хомячков, замороженных постепенно при —5° [82]

Продолжительность замораживания при температуре в толстой кишке ниже 0°, *мин*	Способ отогревания	Число животных	Число животных, забранных для вскрытия до истечения 10 дней	Общее число оставшихся в живых	Соотношение	Число животных, живших в течение длительного времени: 10—100 дней	100—200 дней	200—450 дней
30—39	Диатермия	18	2	16	16/16	5	2	9
	Настольная лампа	4	—	3	3/4	—	3	—
	Комнатная температура	3	—	—	—	—	—	—
	Теплая баня	6	—	5	5/6	1	4	8
40—49	Диатермия	28	4	19	19/24	4	7	—
	Диатермия (искусственное дыхание только при температуре выше 10°)	8	—	5	5/8	—	5	—
	Настольная лампа	6	—	5	5/6	4	1	—
	Теплая баня	7	—	3	3/7	—	3	—
50—70	Диатермия	20	—	8	8/20	4	1	3
	Настольная лампа	4	—	0	0/4	—	—	—
	Теплая баня	5	—	1	1/5	—	1	—

Продолжительность замораживания при температуре в толстой кишке ниже 0°, *мин*	Способ отогревания	Число животных	Число полностью выживших животных	Число смертельных случаев в течение 10 дней после оживления: 6 *час*	6—24 *час*	24—48 *час*	2—10 дней
30—39	Диатермия	18	18	—	—	—	—
	Настольная лампа	4	4	—	1	—	—
	Комнатная температура	3	3	1	1	1	—
	Теплая баня	6	6	—	1	—	—
40—49	Диатермия	28	28	—	3	—	—
	Диатермия (искусственное дыхание только при температуре выше 10°)	8	7	1	1	—	—
	Настольная лампа	6	6	—	—	1	—
	Теплая баня	7	6	1	2	—	—
50—70	Диатермия	20	17	3	4	—	—
	Настольная лампа	4	3	1	1	1	—
	Теплая баня	5	5	—	3	1	—

ОТМОРОЖЕНИЯ У ХОМЯЧКОВ, ОЖИВЛЕННЫХ ПОСЛЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ

Примечательно, что у хомячков, выживших после остановки дыхания и сердечной деятельности и частичного замораживания при —5°, отморожения наблюдались довольно редко. В первой серии из 35 хомячков, охлажденных до —5° и пребывавших в замороженном состоянии различное время от 15 до 60 *мин*, после оживления только у двух имелись признаки отморожений ушных раковин [87]. Решено было проверить этот факт. Четырех хомячков заморозили, а затем согрели с помощью диатермии. Через некоторое время после оживления лапы и уши животных распухли и посинели (цианоз). Затем они сморщились, почернели и в конце концов отпали. Единственно возможное объяснение такого результата заключалось в том, что многие из присутствующих на демонстрационном опыте ученых сжимали и разжимали в своих пальцах лапы и уши замороженных животных для того, чтобы убедиться в холодовом окоченении хотя бы этих частей тела. После этого были проведены опыты, подтвердившие, что поражения кожи весьма напоминают те, которые наблюдаются при отморожении 3-й и 4-й степени (фото 32 и 33); можно искусственно вызвать такие отморожения конечностей посредством насильственной деформации в замороженном состоянии. Сильные отморожения вызывали и другим способом. К замороженным ушам и лапам хомячков, погруженных в баню с температурой —5°, прикладывали твердую углекислоту (—79°). Первые признаки отморожения наблюдали и в течение кратковременного периода частичного оживления хомячков, погруженных на несколько минут в жидкость с температурой —10°, а также у животных, которых охлаждали продолжительное время холодным воздухом с температурой ниже —6°. Когда хомяков охлаждали не в пропиленгликоле при —5°, а в насыщенном солевом растворе с той же температурой, у них распухали конечности.

Полученные результаты окончательно показали, что наличие кристаллов льда в коже и подкожных тканях хомячков не вызывает отморожений, если температура

окружающей среды не ниже —5°. Таким образом, подтвердилось и наблюдение Лэйка, что у человека отморожения возникают только тогда, когда температура окружающей среды ниже —6°, и что хранение кожи при —5° не вызывает в ней повреждений [56]. Китиндж и Кэннон [52] показали, что истинная точка замерзания кожи на интактных пальцах у человека лежит между —0,53 и —0,65°, а замораживание в солевом растворе с температурой —1,9° в течение 4—7 *мин* не вызывает отморожений. Фурман [32] установил, что изолированная кожа крысы относительно мало повреждается при замораживании в течение 1 *час* при температуре —5°, судя по потреблению кислорода и анаэробному гликолизу после оттаивания. Фурман связывает повреждения, вызываемые продолжительным воздействием низких температур, с концентрацией электролитов после вымерзания основной массы воды [33]. Опыты на хомячках показали также, какую опасность влечет за собой нанесение какой-либо травмы замороженным частям тела животного. Если их не трогать, то они после оттаивания выглядят совершенно нормальными. Если же их в замороженном состоянии деформировать, то возникают тяжелые отморожения. Часто в качестве первоочередного мероприятия рекомендуют растирать обмороженные участки снегом, а этого-то, вероятно, и не следовало бы делать. И, во всяком случае, безусловно не следует сгибать обмороженные конечности. Результаты опытов по замораживанию хомячков еще раз подтверждают, что обмороженные части тела надо быстро согревать [34].

ПОВРЕЖДЕНИЯ ГЛАЗ У ХОМЯЧКОВ, ОЖИВЛЕННЫХ ПОСЛЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ

При охлаждении хомячков до такой степени, что температура внутри тела достигала примерно +5°, глаза у животных теряли свой блеск, а роговица становилась мутной. По мере дальнейшего охлаждения тела мутность роговицы слегка усиливалась, хотя сами глаза и не погружали в пропиленгликоль с температурой —5°.

После оттаивания с помощью диатермии глаза вновь приобретали блеск, а роговица становилась прозрачной. Однако у 12 из 150 хомячков, живших продолжительное время после воздействия температуры —5° в течение 15—60 *мин*, на одном или обоих глазах развились катаракты [82].

Тревор-Роупер [90] исследовал действие охлаждения, замораживания и оживления на глаза хомячков. Он обнаружил, что помутнение роговицы неизменно наступало при понижении температуры тела примерно до +5°. При этой же температуре у всех животных начиналось также и помутнение хрусталика (фото 34). После согревания хрусталик почти у всех животных вновь становится прозрачным при температуре около +15°. Явные изменения, ведущие к катаракте, были обнаружены на гистологических срезах глаз лишь у одного хомячка, который жил несколько недель после оживления.

У большинства хомячков, оживленных после замораживания при температуре тела ниже нуля, на задней поверхности роговицы было обнаружено отложение пигмента радужной оболочки с кровью (фото 35). Небольшие кровоизлияния наблюдались на поверхности цилиарного тела (фото 36) и на сетчатке. У хомячков, полностью оправившихся после замораживания и оттаивания, отмечалась вакуолизация в ганглионарном слое сетчатки. Объем поврежденной ткани, однако, был незначительным по сравнению с объемом здоровой, нетронутой ткани даже при тяжелых условиях опыта. Тревор-Роупер изучал также кровоток в сосудах сетчатки во время охлаждения и согревания. Удалив помутневшую роговицу, радужную оболочку и мутный хрусталик, он наблюдал, как в момент прекращения сокращений сердца ток крови в сосудах сетчатки приостанавливался и восстанавливался после оживления. Применение пластмассовой втулки с гладкой передней поверхностью улучшало видимость и позволило Тревор-Роуперу [90] получить более качественные фотографии сетчатки, показавшие полное отсутствие каких-либо изменений в просвете артерий после замораживания и оттаивания интактного животного (фото 37 и 38).

ПОВРЕЖДЕНИЯ ЖЕЛУДКА У ХОМЯЧКОВ, ОЖИВЛЕННЫХ ПОСЛЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ

У многих замороженных хомячков во время последующего оживления и в первые часы после него наблюдалось кровотечение из прямой кишки (свежая кровь). При вскрытии животных, забитых или погибших вскоре после оттаивания и оживления, почти во всех случаях были обнаружены геморрагические участки на большой кривизне нижнего отдела желудка. Кровоизлияние обычно затрагивало только слизистую. Сгустки крови на наружной поверхности желудка или в брюшной полости попадались крайне редко.

У 6 из 9 частично замороженных хомячков, погибших спустя 3—14 дней после оживления, была обнаружена язва желудка, причем у двух язва перфорировала и наступил разлитой перитонит. Еще у двух животных была перфорированная язва двенадцатиперстной кишки [82]. Во всех случаях отмечались обширные инфаркты стенки желудка.

Гистологическое исследование показало, что верхний отдел желудка хомячка выстлан многослойным плоскоклеточным эпителием, который заходит и на верхнюю область нижнего отдела. Кровоизлияния наблюдались только в части желудка, покрытой слизистой, которая содержит железы с главными и обкладочными клетками, вырабатывающими пепсин и соляную кислоту. Подобные же повреждения были обнаружены у кроликов и галаго (лемур), частично оживленных после замораживания в бане с температурой —5°. Возможные причины кровоизлияний в области желудка подробно обсуждаются ниже (см. стр. 412).

Мы привели столь детальное описание различных поражений, обнаруженных у оживленных хомячков, чтобы не создавалось впечатления, что замораживание является совершенно безобидной процедурой. Оживление хомячков во многом зависело от заложенных в самом организме жизненных сил и способности к восстановлению пострадавших кровеносных сосудов и тканей, в которых во время прекращения кровообращения вода превратилась в лед.

ИССЛЕДОВАНИЕ ХОМЯЧКОВ, КОТОРЫХ НЕ УДАЛОСЬ ПОЛНОСТЬЮ ОЖИВИТЬ ПОСЛЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ

У хомячков, которых не удалось полностью оживить после замораживания при —5° в течение более 1 *час*, помимо кровоизлияний в желудке, обнаруживались также кровоизлияния в легких, а часто и в плевральной и перикардиальной полостях. Иногда кровь находили и в желчном пузыре.

ВЛИЯНИЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ БЕРЕМЕННЫХ ХОМЯЧИХ НА ПЛАЦЕНТУ И РАЗВИТИЕ ПЛОДА

Выше мы уже упоминали об исключительной устойчивости новорожденных млекопитающих к сильной гипотермии (стр. 361). В связи с этим возникает вопрос несколько иного порядка: влияет ли на развитие плода вызванная гипотермией остановка сердца и дыхания у матери, а также понижение у нее температуры внутри тела ниже 0°? У золотистых хомячков беременность длится 16 дней. Животных на различных стадиях беременности замораживали до прекращения сердечной деятельности и дыхания. Некоторых оживляли через различное время после того, как температура тела падала до уровня чуть выше нуля. Других охлаждали в бане из пропиленгликоля с температурой —5° до тех пор, пока в результате постепенного замораживания температура внутри тела не падала ниже нуля, и в таком состоянии держали в течение 30 (1 группа) или 45 *мин* (2 группа). Часть хомячих забивали спустя 3 *час* после оживления, чтобы исследовать матку и ее содержимое, а часть — на 13-й день беременности для обследования плода. Остальных оставляли жить до родов.

Опыты показали, что плацентарные кровотечения неизбежно наступали у хомячих, охлажденных до 0° или замороженных на 9, 10 и 11-й дни беременности (фото 39). Гистологические исследования, проведенные совместно с проф. Аморозо, выявили заполнение кровью матки синусов в развивающейся хорио-аллантоидной плаценте, что и послужило причиной кровотечения, тогда как кровеносные сосуды в ткани трофобласта не имели никаких повреждений и не были чрезмерно растянуты

(фото 40 и 41). Примечательно, что у хомячих плацента наиболее быстро растет именно между 9-м и 11-м днями беременности. Одновременно происходят и ее структурные изменения: аллантоис сливается с хорионом и образует гемохориальную плаценту. При этом быстро развиваются кровеносные сосуды матки. После восстановления кровообращения у оттаявших животных сосуды часто кровоточили. Хомячихи, охлажденные до температуры чуть выше нуля или замороженные в этот критический период, никогда не давали потомства. Когда же их забивали на 13-й день беременности, плоды в большинстве случаев были в стадии рассасывания и окружены темной кровью [83, 85].

В противоположность этому хомячихи, которых замораживали на 30 *мин* в первые 8 дней беременности или на 12-й день, производили на свет и выращивали нормальных детенышей. Вскрытие на 13-й день беременности показало, что число рассасывающихся плодов было не больше, чем при обычной беременности, и все развивающиеся плоды выглядели нормальными [85]. Полученные результаты показывают, что прекращение кровообращения у матери и падение температуры внутри тела ниже 0° совместимы с нормальным развитием плода, за исключением той стадии беременности, когда образуется гемохориальная плацента.

Неоднородные результаты получили в серии опытов, в которых беременных хомячих замораживали на 45 *мин*, причем у них вымерзало до 20—30% всей воды. Ни одна из хомячих, охлажденных в течение первой недели беременности, не имела нормально развивающихся плодов. Либо плоды рассасывались, оставив после себя лишь маленькие плаценты, либо развитие протекало значительно медленнее (табл. 58). У хомячихи, замороженной на 2-й день беременности, все 11 плодов были живы, но отличались тяжелыми врожденными уродствами, а также были ненормально маленькими (фото 42); часть плодов хомячих, замороженных на 45 *мин* на 7-й или 8-й день беременности, были нормальными. В других случаях, когда животных забивали на 13-й день беременности, плоды оказывались сильно деформированными и ненормально малого размера (фото 43). Двенадцатый

ТАБЛИЦА 58

Число нормальных, деформированных и рассосавшихся плодов в пометах хомячих, замороженных на 45 *мин* на различных стадиях беременности и забитых через 13 дней [85]

№ животного	Продолжительность беременности в момент замораживания, дни	Число плодов		
		нормальных	деформированных	рассосавшихся
42	0,5	0	0	7 (очень маленькие плаценты)
61	0,5	0	0	0
69	1,5	0	0	0
13	1,5	0	0	0
10	2,5	0	0	0
70	2,5	0	11	0
19	3,5	0	0	0
25	3,5	0	0	0
37	3,5	0	0	0
4	4,5	0	0	0
27	4,5	0	0	0
2	5,5	0	0	0
30	5,5	0	0	4 (плаценты)
31	6,5	2 (отставание в развитии)	5	6
24	6,5	0	3	5
18	6,5	0	0	0
23	6,5	0	0	10 (очень маленькие плаценты)
7	7,5	5 (незначительное отставание в развитии)	0	0
5	7,5	0	6	3
52	8,5	0	7	5
3	8,5	3	0	5
9	9,5	0	0	0
33	9,5	3	0	4
67	9,5	1	0	6

Продолжение

№ животного	Продолжительность беременности в момент замораживания, дни	Число плодов		
		нормальных	деформированных	рассосавшихся
12	10,5	1	0	8
35	10,5	0	0	9
36	10,5	1 и 1 меньшего размера	0	7
49	11,5	4	0	5
1	11,5	3	0	7
8*	12,5	3	0	0
16	12,5	5	0	1
22	12,5	6	0	3

* Имела только один рог матки.

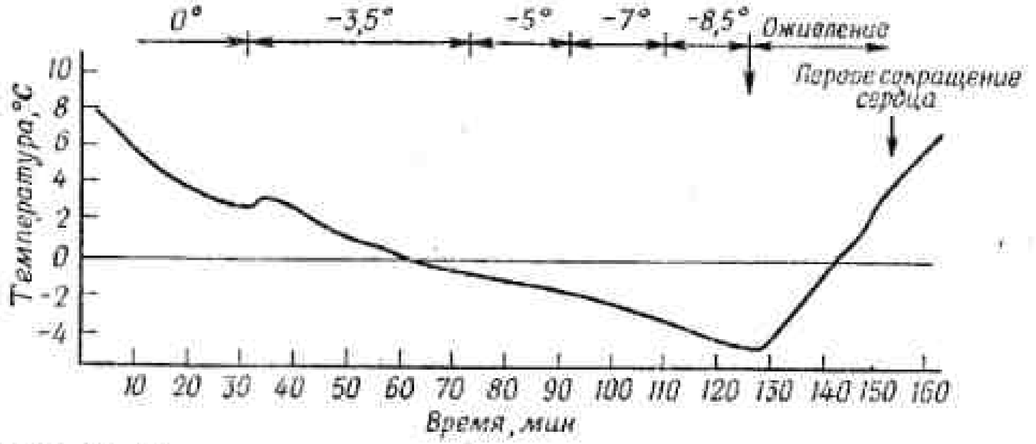
день беременности был единственной стадией, во время которой замораживание на 45 *мин* не оказывало вредного действия на развитие плода [85].

К врожденным уродствам относились такие поражения нервной системы, как гидроцефалия, анэнцефалия и мозговые грыжи. У некоторых из плодов отсутствовал один или оба глаза. У 12 из 25 уродов была заячья губа или волчья пасть. Почти у всех была деформирована нижняя челюсть. У 18 были деформированы ноги и пальцы или срослись вместе, или частично отсутствовали. У большинства плодов отмечались отек и кровоизлияния. Такие же уродства наблюдались и тогда, когда беременным хомячихам вводили различные азотные аналоги иприта и другие токсические вещества, а также выдерживали их на безвитаминной диете или подвергали воздействию рентгеновских лучей в критический период беременности, т. е. непосредственно перед и во время органогенеза [85]. Спустя 2,5 дня после начала беременности зародыш, вероятно, был в стадии морулы, когда еще почти нет никакой дифференциации. Тем не менее замораживание на этой стадии беременности приводило к развитию уродств плода. Причины этих уродств

еще не изучены, но скорее всего они связаны с увеличением доли вымерзшей воды, а не с незначительным удлинением периода гипоксии у животных, замороженных на 45 *мин*. Возможно, сильное охлаждение действовало на митоз или вызывало хромосомные аберрации.

ИССЛЕДОВАНИЯ НА ПЕРЕОХЛАЖДЕННЫХ ХОМЯЧКАХ

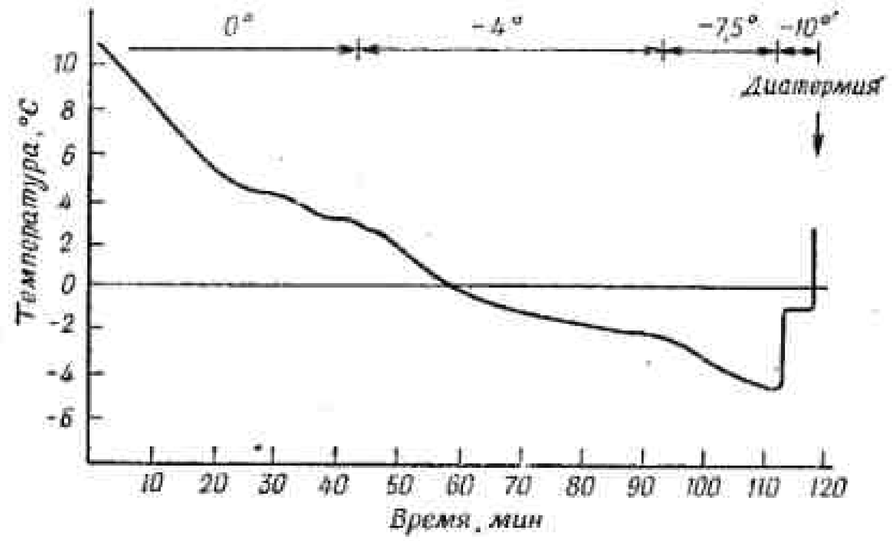
Около 25% общего числа подопытных хомячков, помещенных в баню с температурой ниже нуля, не замораживались постепенно, а переохлаждались. Температура в толстой кишке у них быстро падала от +2,8° до



Фиг. 64. Температура в толстой кишке у хомячка во время погружения его в ледяную воду, переохлаждения в жидкости с температурой от —3,5 до —8,5° и во время оживления с помощью искусственного дыхания [81].

температуры ниже точки замерзания плазмы (—0,6°) без каких-либо признаков образования льда в периферических тканях. Когда температуру бани понижали от —5 до —8°, процесс переохлаждения у некоторых животных продолжался до тех пор, пока температура в толстой кишке не достигла уровня от —4 до —5,7° (фиг. 64). Эти хомячки на ощупь были значительно холоднее, чем частично замороженные, но кожа и конечность у них оставались мягкими и все тело, когда их поддерживали только за затылок и хвост, провисало. Некоторых переохлажденных животных согревали еще

до холодового окоченения туловища и конечностей. После этого у них поднималась температура в толстой кишке и не отмечалось никаких признаков образования льда в какой-либо части тела. У других переохлажденных хомячков температура внутри тела резко повышалась, когда они еще находились в бане при —5 или —8°, а затем стабилизировалась на уровне примерно —6°

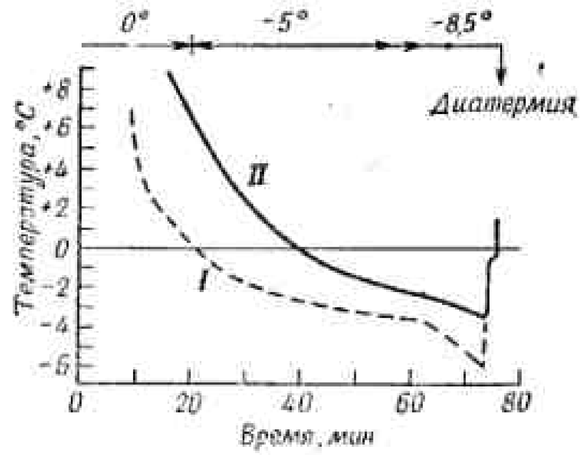


Фиг. 65. Температура в толстой кишке у хомячка во время погружения в ледяную воду, переохлаждения и самопроизвольной кристаллизации льда [81].

(фиг. 65). Одновременно с этим тело животного начало затвердевать. Совершенно ясно, что в ранее переохлажденных крови и тканевых жидкостях началась самопроизвольная кристаллизация льда и что повышение температуры внутри тела обусловлено выделением скрытой теплоты кристаллизации.

У части хомячков одновременно измеряли температуру в толстой кишке, подкожных тканях, грудной полости и мозге. Полученные данные показали, что во время переохлаждения температура в подкожных тканях и мозге изменяется приблизительно одинаково и все время на 1,5—3° ниже температуры в толстой кишке. Температура в грудной области равна или на 1—2° выше температуры в толстой кишке. Когда происходила самопроиз-

вольная кристаллизация льда, температура при всех условиях резко повышалась, но во время последующего замораживания температура в подкожных тканях и мозге стабилизировалась на более низком уровне. Типичные кривые изменения температуры при охлаждении представлены на фиг. 66—68. Наиболее низкая температура в подкожных тканях у переохлажденных хомячков была —7,5° при температуре бани —8,5°. Наиболее низкая температура в мозге достигала —5° при температуре бани —6° и температуре в толстой кишке —3°.

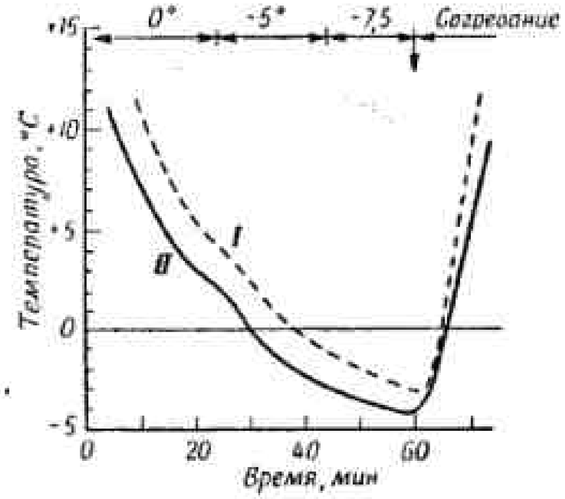


Фиг. 66. Температура в подкожных тканях (*I*) и толстой кишке (*II*) у хомячка во время переохлаждения и самопроизвольной кристаллизации льда [81].

При вскрытии ни в подкожных тканях, ни во внутренних органах переохлажденных хомячков не было обнаружено льда. Когда хомячков вскрывали вскоре после повышения температуры, указывающего на самопроизвольную кристаллизацию льда, в подкожных тканях или внутренних органах трудно было выявить кристаллы, но через 10—30 *мин* после начала замораживания кристаллы легко обнаруживались и в коже и во всех внутренних органах.

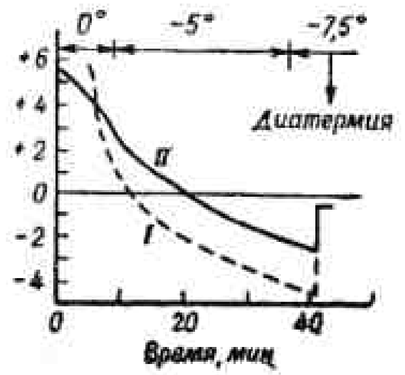
Лавлок подтвердил, что в переохлажденном растворе образуется сравнительно мало льда [60]. Когда объем воды V при 0° переохлаждается на температурный интервал $T°$, количество выделенного тепла составляет VT. Если самопроизвольное замораживание наступает при $-T°$, температура повышается до 0° и доля вымерзшей воды составит $\frac{T}{L}$, где L — скрытая теплота плавления льда (80 *кал/г*). Когда какой-либо водный раствор переохлаждается на температурный интервал $T°$, количество выделяемого тепла зависит от удельной теплоемкости

раствора и составляет приблизительно VT при условии, что удельная теплоемкость раствора близка к удельной теплоемкости воды. Если замораживание происходит в переохлажденном растворе, скрытая теплота выделяется, но тепло поглощается при концентрировании раство-



Фиг. 67. Температура в грудной полости (*I*) и в толстой кишке (*II*) при погружении в ледяную воду хомячка, предварительно убитого хлороформом [81].

ренных веществ. Следовательно, при замораживании переохлажденного раствора образуется меньше льда, чем при замораживании равного объема воды, переохлажденного до той же температуры.



Фиг. 68. Температура в мозге (*I*) и в толстой кишке (*II*) у хомячка после переохлаждения и самопроизвольной кристаллизации льда [81].

Наиболее низкая температура в толстой кишке, зарегистрированная у хомячка во время самопроизвольной кристаллизации льда, равнялась —6°. Когда кристаллизуется чистая вода, переохлажденная до такой степени, доля образо- 6/80 · 100 = 7,5%. Если тканевавшегося льда составляет вые жидкости замерзают после переохлаждения до указанных температур, концентрация рас-

творенных веществ повышается сравнительно мало и долю замерзшей воды для практических целей можно определить по формуле $\frac{T-T_1}{L}$, где T — температура переохлаждения, а T_1 — температура замерзания плазмы. У животного, переохлажденного до —3°, в толстой кишке вымерзало примерно 3% воды [60].

Приведенные величины очень малы по сравнению с количеством льда, образовавшегося у хомячков, переживших постепенное замораживание и имевших в течение 30—60 *мин* температуру внутри тела ниже нуля. Когда же животные замерзали самопроизвольно после переохлаждения до температур ниже —3°, они не выживали. Следовательно, общее количество образовавшегося льда не было единственным фактором, от которого зависело выживание животного.

Оживление переохлажденных хомячков

У 20 хомячков, переохлажденных до такой степени, что температура в толстой кишке составляла от —2,5 до —5,5°, при применении диатермии наблюдалось быстрое восстановление жизненных функций без каких-либо осложнений. Двух животных забили через 18 *час* после оживления для исследования их внутренних органов. Остальные жили в течение многих месяцев и были, по-видимому, вполне здоровы. В другом опыте 6 хомячков переохлаждали до температуры между —3,5 и —4,5° и оживляли, проводя искусственное дыхание при комнатной температуре или при обогревании с помощью настольной лампы. Они также быстро выздоровели без каких-либо видимых последующих осложнений. Двух животных, переохлажденных до —3 и —5°, согревали путем погружения в баню с температурой +40° и у них проводили искусственное дыхание до восстановления самостоятельного дыхания. У этих животных появились судороги, и один хомячок погиб еще до того, как приобрел нормальный внешний вид. Еще одного переохлажденного хомячка очень быстро согрели с помощью диатермии, так что за 3 *мин* его температура повысилась от —4,5 до +10,5°. В конце концов у животного наступили судороги и оно погибло, сделав всего несколько вдохов. Отморожений у переохлажденных и полностью выздоровевших хомячков не наблюдалось, хотя температура тканей у них была на несколько градусов ниже, чем у замороженных животных.

Оживление хомячков, у которых после переохлаждения наступила самопроизвольная кристаллизация льда

У 7 хомячков кристаллизация льда наступила после переохлаждения их до такой степени, что температура внутри тела упала до —1 или —2°. Этих животных постепенно замораживали, погружая их на различные периоды времени от 15 до 61 *мин* в баню с температурой —5°. Затем их согревали с помощью диатермии и проводили искусственное дыхание. Все животные выжили. Один хомячок, замороженный на 50 *мин*, погиб на 9-й день от перфоративной язвы желудка. Остальные жили в течение 100—464 дней. Двух хомяков, переохлажденных до температуры от —1 до —2°, постепенно замораживали, а затем согревали и проводили у них искусственное дыхание, продолжая слегка обогревать их с помощью настольной лампы. У одного из них, замороженного на 45 *мин*, полностью восстановились все жизненные функции. Другой, переохлажденный до —1,5° и замороженный на 35 *мин*, был оживлен с помощью искусственного дыхания при комнатной температуре, но погиб через 24 *час* после, казалось бы, полного оживления. Трех хомячков, замороженных на 1—34 *мин* после переохлаждения до температуры от —1 до —2°, полностью оживили с помощью согревания и искусственного дыхания, которое проводили в теплой бане с температурой +40°. На основании приведенных данных можно сделать вывод, что самопроизвольная кристаллизация и постепенное замораживание после слабого переохлаждения относительно безвредны.

Кратковременное замораживание после переохлаждения до температуры тела ниже —3,0° оказалось опасным. Из 11 хомячков, которых замораживали на 0,5—1 *мин* после переохлаждения до температур от —3,5 до —6,0°, только двоих удалось полностью оживить с по-

мощью диатермии. Один из них погиб через 6 *час*, второй — через неделю. У трех животных этой группы, которых согревали при комнатной температуре с помощью настольной лампы или в теплой бане, восстановились только сокращения сердца.

При промежуточных условиях опыта, когда хомячков замораживали на непродолжительное время после переохлаждения до температур от —2,1 до —3,4°, только трое животных жили продолжительное время. Одного хомячка, замороженного на 0,5 *мин* после переохлаждения до —3,4°, оживили с помощью диатермии. Двух других, замороженных на 0,5—1 *мин* после переохлаждения до температуры от —2,0 до —3,0°, согревали в теплой бане. Хомячки, которых замораживали на 6 и 10 *мин*, жили после оттаивания не более 24 *час*.

Приведенные результаты интересны тем, что в отношении летучих мышей, например, известно, что они оживают после переохлаждения во время естественной зимней спячки или после искусственного охлаждения. У летучей мыши сердце продолжает сокращаться на протяжении всего периода переохлаждения (см. стр. 360), тогда как у хомячков сердце на этот период останавливалось. Ни летучие мыши, ни суслики, ни сурки не переживали самопроизвольной кристаллизации льда даже при незначительном переохлаждении. У большинства же хомячков, переохлажденных до такой степени, что температура внутри тела составляла от —1,0 до —2,0°, и затем постепенно замороженных на сравнительно продолжительное время, все жизненные функции полностью восстанавливались, хотя при кратковременном замораживании после переохлаждения до температуры ниже —3,5° хомячков оживить не удавалось. Это никоим образом не связано с общим количеством льда, образовавшегося в организме, которое у данных хомячков было значительно меньше, чем у многих хомячков, полностью ожившних после постепенного замораживания без предварительного переохлаждения. По-видимому, внезапное превращение небольшой доли воды в кристаллы льда во всем организме более опасно, чем постепенное образование большого количества льда, распространяющееся от периферии к центру.

ВЛИЯНИЕ ПЕРЕОХЛАЖДЕНИЯ НА РАЗВИТИЕ ПЛОДА

Хомячих, переохлажденных на различных стадиях беременности до температур от —2,4 до —3,4°, оживляли с помощью диатермии и затем забивали на 13-й день беременности для исследования плодов. У животных, переохлажденных на 9-й и 10-й дни беременности, большинство плодов рассосалось и наблюдалось такое же плацентарное кровотечение, как у беременных хомячих, которых замораживали в критическую стадию развития плаценты. У животных, переохлажденных в первые 8 дней или на 12-й день беременности, плоды, по-видимому, развивались совершенно нормально (и не отставали в своем развитии), несмотря на охлаждение до температур на несколько градусов ниже нуля на ранних стадиях развития зародыша или плода. Никаких уродств плодов не возникало.

Несколько хомячих, переохлажденных в первые 8 дней беременности, благополучно родили и вырастили нормальное потомство. Через 6 недель их опять спарили и получили также вполне нормальных детенышей. Хомячихи, подвергавшиеся переохлаждению во время утробного развития, впоследствии также имели здоровое потомство. Полученные данные показывают, что охлаждение интактного животного до температур на несколько градусов ниже нуля совместимо с восстановлением всех сложных физиологических функций организма.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ПЕРЕОХЛАЖДЕНИЯ ВМЕСТО ЗАМОРАЖИВАНИЯ

Политеновые мешочки, заполненные сывороткой или изотоническим физиологическим раствором и обернутые в шкурку хомячка, охлаждали до температуры от +5 до 0°, а затем помещали в баню с 50-процентным раствором пропиленгликоля при —5°. Содержимое мешочков всегда переохлаждалось. В некоторых опытах, когда температура жидкости достигла —5°, происходило самопроизвольное замораживание. В других, чтобы вызвать процесс замораживания, в жидкость, находившуюся в мешочках, вносили кристаллы льда [60]. Эти опыты натолкнули на мысль о возможности переохлаждения жид-

костей в организме целого животного. Однако из числа первых 300 хомячков, которых охлаждали в бане с низкими температурами, только 73 (24,3%) переохладились до такой степени, что температура внутри тела упала ниже —1°. Казалось, нет никакого способа добиться переохлаждения у всех без исключения животных.

Чаще всего переохлаждение происходило у хомячков, получавших в качестве питья только 20-процентный раствор пропиленгликоля. Из 10 хомячков, получавших пропиленгликоль и помещенных в баню при —5°, 9 животных переохладилось, когда температура в толстой кишке была +5°. Соотношение уменьшалось, когда в баню с температурой —5° помещали группы животных с более низкой или более высокой температурой в толстой кишке [81].

У хомячков, потреблявших в день в среднем 7,8 *мл* 20-процентного раствора пропиленгликоля, температура замерзания крови понизилась примерно на 0,1°. Это соответствовало присутствию около 0,3% пропиленгликоля в крови, хотя животные весом приблизительно 100 *г* потребляли ежедневно до 1,5 *г* пропиленгликоля. Повышенная способность к переохлаждению явно не зависела от высокой концентрации этого вещества в жидкостях организма. Единственно допустимое предположение заключалось в том, что пропиленгликоль содержится в более высоких концентрациях в слезах, слюне и других секретах, а также в пищеварительном тракте или в каком-либо ином месте, где обычно начинается процесс кристаллизации льда.

Позднее Калабухов [51] описал некоторые детали методики, способствующие переохлаждению млекопитающих. По его словам, для быстрого и равномерного охлаждения всего тела животного необходимо преодолеть теплоизолирующее свойство его меховой шкурки. Если мех удаляют, это следует делать с помощью какого-нибудь депилятория, а не бритвы. Или же мех надо тщательно протирать пропиленгликолем, вазелином или какой-либо другой не содержащей воды жидкостью. Для того чтобы уменьшить количество воды в пищеварительном тракте, животным за несколько дней до опыта нужно давать диету, содержащую минимальное количество воды. Животных не следует охлаждать в смеси из воды и льда или снега, так как это создает благоприятные условия для образования кристаллов льда на поверхности тела, в ноздрях, в ушных раковинах и в ротовой полости. Возможно, при соблюдении всех указанных предосторожностей удалось бы вызвать состояние переохлаждения у большинства подопытных хомячков. Изменив соответствующим образом методику, можно было бы предотвратить самопроизвольную кристаллизацию льда, чего нам в наших опытах не удавалось добиться.

Калабухов [51] считает возможным продолжительное хранение животных в состоянии переохлаждения. Однако нетрудно представить, что у млекопитающих, выдерживаемых длительное время при температуре ниже —10°, когда у них приостановлены сокращения сердца и дыхание, сравнительно быстро наступают различные повреждения. Биохимические процессы при этом не прекращаются, а физические, такие, как диффузия, замедляются сравнительно мало. Внутри клеток и вне их, а также в самих клеточных оболочках могут наступить глубокие изменения. Некоторые из них приводят к смертельному исходу. Можно было бы переохлаждать хомячков или других млекопитающих даже до температуры —40°. Однако по аналогии с опытами на насекомых следует ожидать, что даже при такой низкой температуре сохранению жизнеспособности будут препятствовать как непрекратившиеся химические и физические процессы, так и возрастающая угроза самопроизвольной кристаллизации льда.

Доказано, что в организме млекопитающего может произойти и местное переохлаждение. Так, регистрация температуры мозга у хомячков показала, что в некоторых случаях мозг животного находился в состоянии переохлаждения, хотя все тело замерзло. В организме животного нет четко разграниченных «водонепроницаемых» отделов, поскольку кровеносные сосуды, лимфатические пути и внеклеточные пространства создают непрерывную водную фазу. Как только в каком-нибудь участке тела образуется лед, процесс кристаллизации стремится распространиться во все остальные участки,

где температура ниже точки замерзания. Вместе с тем одна какая-нибудь область может оставаться в состоянии переохлаждения, если ее от замороженных участков отделяют ткани и тканевые жидкости с температурой выше точки замерзания. У такого маленького животного, как хомячок, возможно, трудно вызвать подобное явление. Во всяком случае мы не можем сказать, что добились этого хотя бы в одном опыте или что местное состояние переохлаждения жизненно важных органов можно поддерживать и тогда, когда поверхностные ткани заморожены.

ПРОБЛЕМЫ, СВЯЗАННЫЕ С ЗАМОРАЖИВАНИЕМ И ОЖИВЛЕНИЕМ БОЛЕЕ КРУПНЫХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Много самых разнообразных проблем возникло в связи с попытками оживить кроликов и мелких приматов после остановки у них сердца и дыхания и замораживания периферических тканей при температуре внутри тела ниже нуля. С первыми трудностями столкнулись еще в процессе охлаждения. Чем крупнее животное, тем быстрее по сравнению с поверхностью тела возрастает его общая теплоемкость, связанная с его объемом. Теплоотдача у животного, подвергающегося воздействию холодного воздуха или погруженного в холодную баню, зависит от обмена энергии между молекулами, находящимися в холодной среде, и молекулами поверхностных покровов и более глубоких тканей. Золотистый хомячок весит всего около 100 *г* и охлаждается сравнительно быстро.

Когда же кроликов весом 1—2 *кг* наркотизировали, сочетая вдыхание газовой смеси с высокой концентрацией CO_2 и воздействие холодным воздухом с температурой 0°, то до момента наступления у них коматозного состояния при температуре внутри тела от +18 до +23° проходило около 3 *час*. На этой стадии сердце сокращалось примерно 40 раз в 1 *мин*, а дыхание было глубоким — один-два вдоха в 1 *мин*. Затем животных погружали в тающий лед. Спустя примерно 30 *мин*, когда температура в толстой кишке достигала 13—18°, дыхание прекращалось. Сердце обычно продолжало сокращаться 5—10 *мин*, пока температура внутри тела не падала приблизительно до 12°. Через 40 *мин* температура в толстой кишке понижалась еще на 3° и была равна 8—10°. Такое медленное охлаждение должно быть обусловлено недостаточностью кровообращения и отсутствием какого-либо движения внутри самого организма. Окружающие жидкости также были неподвижными. Шесть кроликов находились в таком состоянии, т. е. без дыхания и кровообращения, при температуре внутри тела от +9 до +12°, затем этих кроликов согревали при помощи излучающей тепло лампы и проводили искусственное дыхание. У животных временно восстанавливались сокращения сердца и самостоятельное дыхание. Однако полное восстановление жизненных функций наблюдалось только у одного кролика, но и он погиб через 3 дня.

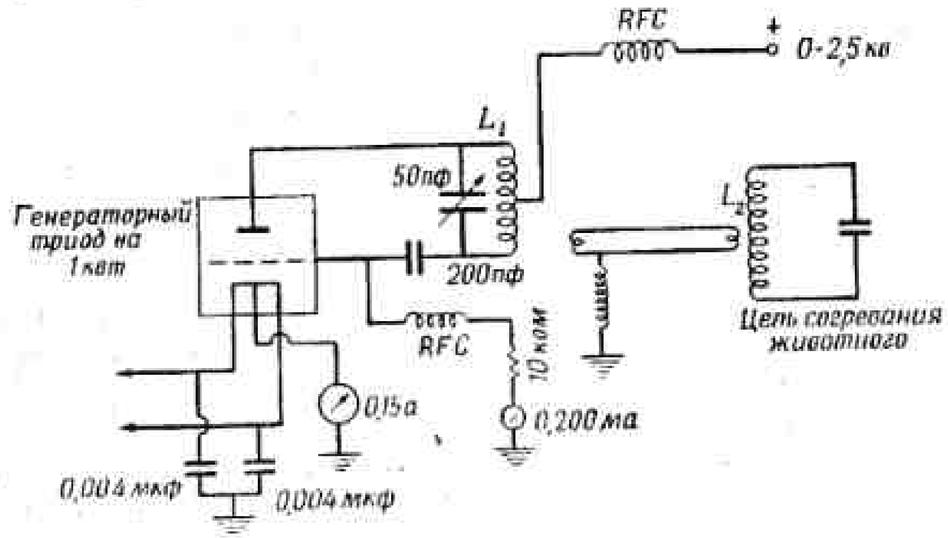
Вполне вероятно, что при более быстром и более глубоком охлаждении тела животного повреждения организма после остановки дыхания и кровообращения должны быть менее тяжелыми. Наиболее подходящим методом повышения скорости теплоотдачи было, по-видимому, нагнетание холодных жидкостей в сосудистую систему посредством искусственного кровообращения. Или же можно было бы проводить орошение плевральной и брюшной полостей холодными жидкостями. Основная цель наших опытов, однако, заключалась в исследовании жизнеспособности интактных млекопитающих после частичного замораживания. Поэтому мы сконцентрировали свое внимание на увеличении теплоотдачи поверхностью тела животного. После полного удаления шерсти кролики замерзали значительно быстрее, но вряд ли можно было рассчитывать на восстановление хорошего состояния у животных, совершенно лишенных мехового покрова. Когда желудок и кишечник орошали замороженной молочной смесью, содержащей многочисленные кристаллы льда, температура внутри тела быстро падала до 0°. Однако после согревания животных в их пищеварительном тракте были обнаружены тяжелые поражения [83]. В последующих опытах область живота выбривали, а остальной мех тщательно промывали детергентом для удаления пузырьков воздуха.

1399-1

Затем наркотизированных кроликов с температурой внутри тела около +18° погружали в энергично перемешиваемый 50-процентный раствор пропиленгликоля с температурой —5°. В течение 10—15 *мин* периферические ткани начинали замерзать и температура в подкожной клетчатке понижалась до —0,5 или —2,5° в зависимости от места измерения. Спустя 1 *час* после прекращения дыхания температура в толстой кишке была около —0,6° и оставалась на этом же уровне, показывая тем самым, что фронт распространения льда достиг внутренних органов тела. К этому времени в периферических тканях содержалось так много льда, что туловище и конечности животных затвердевали. У частично замороженных кроликов в теле образовывалось гораздо больше льда, чем у хомячков, замороженных на такой же период времени. Следовательно, для согревания тканей всего организма требовалось больше энергии, причем оттаивать их следовало как можно быстрее.

Мы предпочитали согревать животных с помощью токов высокой частоты [61, 83]. Для этого применяли генератор, работающий на частоте 27 *Мгц*, с мощностью около 500 *вт*. В предварительных опытах мы вновь испытали метод согревания между двумя электродами, который успешно использовали при оживлении замороженных хомячков. Замороженных кроликов помещали в переменное электрическое поле между двумя пластинками, подключенными к генератору высокочастотных колебаний. Равномерного распределения электрического поля, однако, не удавалось достигнуть. В результате поверхностных ожогов избегали, лишь настолько понизив подводимую мощность, что на оттаивание внутренних органов требовалось более 30 *мин*. Тем не менее у 6 кроликов, согретых таким способом, при вскрытии еще наблюдались сокращения сердца. Других частично замороженных кроликов согревали, помещая их в переменное магнитное поле, так что в тканях возникали вихревые токи высокой частоты и большой силы. Эти токи согревали все тело без опасности поражения электротоком. Животных помещали в трубу из перспекса, вокруг которой шла спиральная медная трубка (фото 44 и фиг. 69). Спираль была присоединена к источнику

переменного тока высокой частоты и служила внешним резонансным контуром, настроенным на ту же частоту, что и генератор [59]. В предварительных опытах токи, проходившие по поверхности тела, вызывали поверхностные ожоги еще до оттаивания внутренних органов. Во избежание этого в дальнейшем все тело животного перед согреванием протирали охлажденным на льду



Фиг. 69. Схема генератора большого прибора Лавлока для диатермии [59].

детергентом и в течение всего периода согревания обдували холодным воздухом. В последующих опытах частично замороженных кроликов согревали за несколько секунд и, если подводили все время одинаковое количество тепла, температура в толстой кишке повышалась со скоростью 16° в 1 *мин*. Через 2 *мин* печень и некоторые другие внутренние органы частично «сваривались», хотя на поверхности тела не было следов ожогов [83].

Была разработана специальная методика, при помощи которой замороженных кроликов согревали в течение нескольких секунд, причем температура внутри тела у них повышалась от 0 до примерно +10° за 1 *мин*. Затем количество подводимого тепла уменьшали, и температура в толстой кишке повышалась уже со скоростью 1—2° в 1 *мин*. Во избежание перегрева кожи и чрезмерного расширения кровеносных сосудов на протяже-

нии всего периода согревания животное непрерывно обдували холодным воздухом. Таким способом согревали 20 кроликов, которых предварительно замораживали на 40—60 *мин*. Сокращения сердца у них восстанавливались, как только температура в толстой кишке достигала примерно +15°. Слизистые и кожа становились розовыми, а зрачки сужались. Когда температура в толстой кишке повышалась до 20—30°, восстанавливалось самостоятельное дыхание, и тогда искусственное вдувание воздуха прекращали. Пять животных продолжали слегка обогревать с помощью диатермии, пока у них через несколько минут не наступила смерть. У 15 других диатермию прерывали, как только появлялось дыхание. Поверхность тела продолжали слегка обогревать либо с помощью теплоизлучения, либо в теплом инкубаторе или же водяной бане. У некоторых кроликов появились самостоятельные движения, один даже встал на ноги, но все они погибли через 1—2 *час* после восстановления сердечной деятельности и дыхания. Подобные же результаты были получены и у мелких лемуров *Galago crassicaudatus agisymbanus*. Возможно, согревание проводили слишком быстро, в результате чего кровообращение и другие физиологические функции не смогли адаптировать к создавшимся условиям.

Единственное видимое повреждение внутренних органов, обнаруженное при вскрытии кроликов и галаго, заключалось в сильном кровотечении в области дна желудка. Гистологическое исследование показало, что эти кровотечения были ограничены той частью желудка, в которой расположены обкладочные клетки (фото 45 и 46). Привратниковая часть желудка, в которой нет клеток, выделяющих соляную кислоту, оставалась нормальной. Кровотечения были обнаружены также и в желудках золотистых хомячков, оживленных после частичного замораживания или продолжительной остановки сердца при температуре внутри тела выше 0° (см. стр. 393) [83]. Возможно, эти повреждения были вызваны пептическим перевариванием слизистой желудка после остановки кровообращения у охлажденного или частично замороженного млекопитающего. Лавлок высказал другое предположение, что присутствующая в полости желудка

или в протоках желез соляная кислота могла диффундировать через стенку желудка и повреждать ткани последней, в том числе стенки капилляров и других кровеносных сосудов. Как только кровообращение восстанавливалось, кровь вытекала из поврежденных сосудов и дальнейшие повреждения вызывались уже чисто механически. Лавлок отметил, что при нормальной температуре тела клетки эпителия желудка активно выделяют соляную кислоту. Когда внутренние органы тела охлаждены до температуры ниже той, при которой останавливается кровообращение, избирательная проницаемость может утратиться в связи с уменьшением интенсивности обмена веществ в охлажденных клетках. Диффузия при температурах, близких к нулю, замедляется сравнительно мало, и ионы водорода и хлора будут быстро двигаться по тканям [83]. Мы проверили эту теорию. Кроликам и галаго не давали пищи в течение 15 *час* до охлаждения. Содержимое желудков нейтрализовали бикарбонатом натрия непосредственно перед остановкой сердца и дыхания у уже охлажденных животных. Затем их переносили в баню с температурой —5° и держали в ней до тех пор, пока температура в толстой кишке не падала ниже 0° и периферические ткани постепенно не замерзали (в течение 45 *мин*). После этого животных согревали с помощью диатермии и проводили искусственное дыхание, как и в предыдущих опытах. Через 2 *час* животных забивали и исследовали их желудок. Никаких признаков кровоизлияний в желудке не обнаруживали. При гистологическом исследовании слизистую желудка нельзя было отличить от нормальной (фото 47).

Додс и его сотрудники еще раньше вызывали морфологически идентичные кровоизлияния в желудке у кроликов, кошек, обезьян и других млекопитающих с нормальной температурой тела, вводя им экстракты задней доли гипофиза, вызывающие сильное сужение сосудов. Повреждения наступали во время местной ишемии, и тяжесть их зависела от кислотности содержимого желудка [27]. Когда же содержимое желудка нейтрализовали, введение экстрактов задней доли гипофиза не вызывало кровоизлияний в области дна желудка [25]. Таким образом, желудочное кровотечение может быть вызвано диф-

фузией кислоты, а предотвращено нейтрализацией содержимого желудка, когда у незамороженных животных прекращается кровообращение в слизистой. Полученные результаты укрепили нас в мнении, что повреждения в желудке подопытных животных были вызваны главным образом соляной кислотой, а не ферментативным перевариванием, разрушающим действием кристаллов льда на слизистую или какой-либо формой стресса или шока во время оживления [83].

Предотвращение желудочного кровотечения удлиняло период восстановления функций у кроликов и галаго, которых частично замораживали после охлаждения до прекращения дыхания и сердцебиения. Тем не менее 4 кролика из этой группы опытов погибли в течение 4 *час* после оживления. Двух галаго, у которых нейтрализовали содержимое желудков, замораживали на 45—60 *мин* при температуре —5°. У них полностью восстановились жизненные функции. У одного животного даже временно восстановились нормальное поведение и аппетит. Однако оба они погибли в течение 24 *час*. При посмертном исследовании обнаружили отек легких, возможно в результате терминальной сердечной недостаточности, обусловленной различными причинами. Не исключено, что выживанию препятствовали некоторые физиологические или физико-химические нарушения, которых можно было бы избежать, если бы удалось диагносцировать.

Опыты были проведены на небольшом числе животных, и полученные результаты не являются обнадеживающими в отношении длительного выживания. Тем не менее и они уже свидетельствуют о возможности оживления взрослых не впадающих в спячку млекопитающих, столь высоко развитых, как приматы, после охлаждения их тела до температур ниже нуля и частичного замораживания жидкостей в поверхностных и внутренних органах. Но при этом у животных могут возникнуть различные повреждения, такие, как повреждения глаз, наблюдавшиеся у согретых и оживленных хомячков.

Обсуждая вопрос о подводе тепла [61], мы пришли к заключению, что вряд ли прогрессу в деле оживления крупных млекопитающих после замораживания будет

мешать несовершенство методики оттаивания и согревания. Увеличение размера сконструированного нами прибора для диатермии и самые разнообразные способы обогревания с помощью токов высокой частоты несомненно смогут обеспечить подвод достаточного количества энергии. Гораздо более сложной проблемой является охлаждение. Вряд ли можно надеяться на открытие каких-то физических агентов, которые подобно охлаждающим лучам, описанным в научно-фантастических романах, оказывали бы действие, противоположное диатермии, и замедляли бы движение молекул в организме. Увеличить скорость охлаждения можно, по-видимому, только путем нагнетания холодной жидкости в кровеносную систему или орошения плевральной и брюшной полости. Таким способом, должно быть, можно в течение нескольких минут после прекращения дыхания понизить температуру внутри тела до нуля. Следовательно, можно увеличить период, в течение которого животное во время постепенного замораживания его при температуре —5° будет сохранять жизнеспособность. Если для ускорения замораживания применяют искусственное кровообращение, то жидкость должна содержать вещество, предотвращающее ее замораживание при температуре ниже нуля. Можно использовать такие инертные жидкости, как силикон. Пригодны также глицерин и близкие ему вещества, имеющие дополнительное преимущество: диффундируя в ткани, глицерин, если только он не оказывает на них токсического действия, защищает клетки от повреждения во время вымерзания воды. Весьма вероятно, что млекопитающее, подвергшееся или подвергающееся перфузии такой защитной жидкостью, можно для ускорения процесса охлаждения погрузить в баню или выставить на холодный воздух с температурой много ниже —5° без риска отморожения. Как только кожа замерзнет, ее теплопроводность повысится в десять раз. Тем не менее температура внутри тела будет еще понижаться медленно вследствие выделения скрытой теплоты кристаллизации при вымерзании воды, содержащейся в тканях.

До настоящего времени еще не разработана мето-

дика перфузии отдельных органов или всего организма млекопитающих глицерином, а также способ удаления последнего без повреждения тканей. Если бы этого удалось добиться, мы могли бы охлаждать интактное животное даже до —70° и затем успешно его оживлять. А тогда уже можно было бы думать о продолжительном хранении замороженных млекопитающих. Следует, однако, подчеркнуть, что нет больших надежд на достижение этого в ближайшем будущем.

Ближайшая задача заключается в выяснении физиологических потребностей млекопитающих, согретых после кратковременных периодов пребывания в замороженном состоянии при температуре тела, близкой нулю. Это, вероятно, потребует изучения как состава крови, так и поведения отдельных органов и систем после охлаждения и согревания интактного животного и проведения различными способами искусственного дыхания. В результате, возможно, удастся разработать соответствующую форму дальнейшего лечения животного после восстановления кровообращения и дыхания. Эффективный уход после первоначального оживления, несомненно, предопределит продолжительность последующей жизни. Для того чтобы добиться успеха, потребуются объединенные усилия целой группы физиологов, включающей специалистов в области хирургии, электроники, патологии, физической химии и других дисциплин. Может быть, все, что сейчас нужно, — это какая-то несложная, но новая идея, претворение которой в жизнь обеспечит полное восстановление жизненных функций и последующую нормальную жизнь млекопитающих. Таким образом удастся спасать жизнь тех, кто преднамеренно или в результате несчастного случая подверглись охлаждению и замораживанию на короткое время при температуре внутри тела ниже нуля.

ЛИТЕРАТУРА

1. Adolph E. F., Lethal limits of cold immersion in adult rats, Amer. J. Physiol., **155**, 378—387 (1948).
2. Adolph E. F., Tolerance to cold and anoxia in infant rats, Amer. J. Physiol., **155**, 366—379 (1948).

3. Adolph E. F., Responses to hypothermia in several species of infant mammals, Amer, J. Physiol., **166**, 75—91 (1951).
4. Adolph E. F., Recovery from deep hypothermia, Symposium on Hypothermia, pp. 464—467. XVth Int. Congr. Milit. Med. Pharm., Belgrade, 1957 (1959).
5. Adolph E. F., Introduction. Zones and stages of hypothermia, Ann. N. Y. Acad. Sci., **80**, 288—290 (1959).
6. Alexander L., The treatment of shock from prolonged exposuer to cold especially in water, Rept. No. 250. Dept. of Commerce, Washington, D. C., National Medical Library (1945).
7. Andjus R., Sur la possibilé de ranimer le rat adulte refroidi jusqu' à proximité du point de congélation, C. R. Acad. Sci., Paris, **232**, 1591—1593 (1951).
8. Andjus R., Suspended animation in cooled, supercooled and frozen rats, J. Physiol., **128**, 547—556 (1955).
9. Andjus R. K., Knöpfelmacher F., Russell R. W., Smith A. U., Effects of hypothermia on behaviour, Nature, Lond., **176**, 1015—1016 (1955).
10. Andjus R. K., Knöpfelmacher F., Russell R. W., Smith A. U., Some effects of hypothermia on learning and retention, Quart, J. exp. Psychol., **8**, 15—23 (1956).
11. Andjus R. K., Lovelock J. E., Reanimation of rats from body Temperatures between 0° and 1°C by microwave diathermy, J. Physiol., **128**, 541—546 (1955).
12. Andjus R. K., Smith A. U., Revival of hypothermic rats after arrest of circulation and respiration, J. Physiol., **123**, 66—67P (1954).
13. Andjus R. K., Smith A. U., Reanimation of adult rats from body temperatures between 0° and +2°C, J. Physiol., **128**, 446—472 (1955).
14. Бахметьев П. И., Как я нашел анабиоз у млекопитающих, Природа, **1**, 606—622 (1912).
15. Bernard C., Leçons de Physiologie Expérimentale. Appliquée à la Medicine, Tome 1, p. 180, Paris, Baillière, 1855.
16. Bernard C., Leçons sur la Chaleur Animale, Paris, Ballière, 1876.
17. Boswell J., The Hypochondriack. No. XLVII, The London Magazine, **50**, 357—359 (1781).
18. Boyle R., New Experiments and Observations Touching Cold, 2nd Edn. London, R. Davis, 1683.

19. Britton S. W., Extreme hypothermia in various animals and man, Canad. Med. Assoc. J., **22**, 257—261 (1930).
20. Burton A. C., Edholm O. G., Man in a Cold Environment. Monographs of the Physiological Society, No. 2, London, Eward Arnold, 1955.
21. Cameron A. T., Brownlee T. I., The effect of Low Temperatures on cold-blooded animals, Quart. J. exp. Physiol., **7**, 115—130 (1913).
22. Cater D. B., Weiss L., Measurements of oxygen tension in the tissues of mice cooled to 1°C, Nature, Lond., **183**, 1521—1522 (1959).
23. Crismon J. M., Elliott N. W., Circulatory faillure in the hypothermic rat and the response to local application of heat to the heart, Stanford med. Bull., **5**, 115—119 (1947).
24. Cullen W., Of the cold produced by evaporating fluids and of some other means of producing cold, Essays and Obs. Phil. Soc., Edin., **ii**, 145—156 (1756).
25. Cutting W. C., Dodds E. C., Noble R. L., Williams P. C., Pituitary control of alimentary blood flow and secretion: the effect of posterior pituitary extract on the alimentary secretions of intact animals, Proc. Roy. Soc., B, **123**, 27—39 (1937).
26. Delorme E. J., Hypothermic cardiac arrest, Symposium on Hypothermia, pp. 459—463. XVth Int. Congr. Milit. Med. Pharm. Belgrade, 1957 (1959).
27. Dodds E. C., Noble R. L., Scarff L. W., Williams P. C., Pituitary control of alimentary blood flow and secretion: changes in the stomach produced by the administration of posterior pituitary extract, Proc. Roy. Soc., B, **123**, 22—27, 1937.
28. Drew C. E., Anderson I. M., Profound hypothermia in cardiac surgery. Report of 3 cases, Lancet, i, 748—750 (1959).
29. Drew C. E., Keen G., Benazon D. B., Profound hypothermia, Lancet, **i**, 745—747 (1959).
30. Dripps R. D., The Physiology of Induced Hypothermia, Publication 451, Washington D. C., National Academy of Sciences — National Research Council (1956).
31. Fairfield J., Effects of cold on infant rats: body temperatures, oxygen consumption, electrocardiograms, Amer. J. Physiol., **155**, 355—365 (1948).
32. Fuhrman F. A., Experimental frostbite: oxygen consumption and anaerobic glycolysis of rat tissues after freezing and cooling in vitro, J. Appl. Physiol., **10**, 224—230 (1957).

33. Fuhrman F. A., Metabolism of excised rat skin in hypertonic media, J. gen. Physiol., **40**, 351—355 (1957).
34. Fuhrman F. A., Fuhrman G. J., Treatment of experimental frostbite by rapid thawing, Medicine, **36**, 465—487 (1957).
35. Giaja J., Le métabolisme de sommeil, C. R. Soc. Biol., Paris, **101**, 3—23 (1929).
36. Giaja J., Andjus R., Sur l'emploi de l'anesthesie hypoxique en physiologie opératoire, C. R. Acad. Sci., Paris, **229**, 1170—1172 (1949).
37. Goldzveig S. A., Smith A. U., The fertiliry of male rats after moderate and after severe hypothermia, J. Endocrin., **14**, 40—53 (1956).
38. Goldzveig S. A., Smith A. U., simple method for reanimating ice-cold rats and mice, J. Physiol., **132**, 406—413 (1956).
39. Gollan F., Cardiac arrest of one hour duration in dogs during hypothermia of 0°C followed by servival, Fed. Proc., **13**, 57 (1954).
40. Gollan F., Physiology of deep hypothermia by total body perfusion, Ann. N. Y. Acad. Sci., **80**, 301—314 (1959).
41. Gollan F., Hoffman J. E., Jones R. M., Maintenance of life of dogs below 10°C without hemoglobin, Amer. J. Physiol., **179**, 640 (1954).
42. Gollan F., Tysinger D. S., Grace J. T., Kory R. C., Meneeley G. R., Hypothermia of 1—5°C in dogs followed by survival, Amer. J. Physiol., **181**, 297—303 (1955).
43. Hegnauer A. H., Lethal hypothermic temperatures for dog and man, Ann. N. Y. Acad. Sci., **80**, 315—319 (1959).
44. Heymans J. F., Iso-, hyper- et hypothermisation des mammiféres par calorification et frogorilication du sang de la circulation carotido-jugulaire anastomosée, Arch. int. Pharmacodyn., **25**, 1—215 (1919).
45. Hornsey S., Protection from whole body X-irradiation afforded to adult mice by reducing the body temperature, Nature, Lond., **178**, 87 (1956).
46. Hornsey S., The effect of hypothermia on the radiosensivity of mice to whole-body irradiation, Proc. Roy. Soc., B, **147**, 547—549 (1957).
47. Horvath A., Einfluss verschiedener temperaturen auf die winterschläfer, Verhandl. d. Phys. Med., N. F., **15**, 187—219 (1881).

48. Johnson G. E., Hibernation in mammals, Quart. Rev. Biol., **6**, 439—461 (1931).
49. Калабухов Н. И., Анабиоз у позвоночных и насскомых при температуре ниже нуля. К вопросу о переохлаждении и замораживании животных, ДАН СССР, **7**, 8—12 (1934).
50. Калабухов Н. И., Anabiose bei Wirbeltieren und Insekten bei temperaturen unter 0°, Zool. Jahrb. Abt. allg. Zool. Physiol., **55**, 47—64 (1935).
51. Калабухов Н. И., The problem of freezing, undercooling and vitrifying of animal organism, Recent Research in Freezing and Drying, ed. Parkes A. S. and Smith A. U., pp. 101—118, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1960.
52. Keatinge W. R., Cannon P., Freezing point of human skin, Lancet **i**, 11—14 (1960).
53. Keilin D., The Leeuwenhoek Lecture. The problem of anabiosis or latent life: history and current concept, Proc. Roy. Soc., B, **150**, 149—191 (1959).
54. Kenyon J R., Ludbrook J., Hypothermia below 10° C in dogs, Lancet, **ii**, 171—173 (1957).
55. Kenyon J. R., Ludbrook J., Downs A. R., Tait I. B., Brooks D. K., Pryczkowski J., Experiental deep hypothermia, Lancet, **ii**, 41—45 (1959).
56. Lake N. C., An investigation into the effects of cold upon the body, Lancet, **ii**, 557—562 (1917).
57. Laufmann H., Profound accidental hypothermia, J. Amer. med. Ass., **147**, 1201—1212 (1951).
58. Lorain P., De la température du corps humain et de ses variations dans les diverses maladies. Tomes 1 and 2, Paris, L'Imprimerie Nationale, 1877.
59. Lovelock J. E., Diathermy apparatus for the rapid rewarming of whole animals from 0° C and below, Proc. Roy. Soc., B **147**, 545 (1957).
60. Lovelock J. E., Smith A. U., Studies on golden hamsters during cooling to and rewarming from body temperatures below 0° C. III. Biophysical aspects and general discussion, Proc. Roy. Soc., B, **145**, 427—442 (1956).
61. Lovelock J. E., Smith A. U., Heat transfer from and to animals in experimental hupothermia and freezing, Ann. N. Y. Acad. Sci., **80**, 487—499 (1959).

62. Lutz W., Die experimentelle Verkaltblüterung des Warmblüters Ein Beitrag zum Mechanismus des Kältetodes, Klin. Wschr., **22**, 727—733 (1943).
63. Lutz W., Die Uberwindung des Kältetodes, Ztschr. ges. exper. Med., **115**, 615—637 (1950).
64. Lyman C. P., The oxygen consumption and temperature regulation of hibernating hamsters, J. exp. Zool., **209**, 55—78 (1948).
65. Lyman C. P., Chatfield P. O., Physiology of hibernation in mammals, Physiol. Rev., **35**, 403—425 (1955).
66. Мурыгин И. И., К вопросу о выживании млекопитающих, впадающих в спячку, при температуре ниже нуля, Бюлл. Эксп. Биол. Мед., **4**, 109—111 (1937).
67. Naucler S., Berichte von einem Mannes welcher dem Anschein nach efroren war denn aber wie der zum Leben verhollen war, K. Schwedischen Akademie der Wissenschaften, **18**, 107—110 (1757). Reprorted in The Scots Magazine, **21**, 251 (1759).
68. Неговский В. А., L'utilisation de l'hypothermie dans la méthode complexe de réanimation (Recherches expérimentales), Symposium on Hypothermia, pp. 452—458, XVth int. Congr. Milit. Med. Pharm., Belgrade, 1957, 1959.
69. Неговский В. А., Патофизиология и терапия агонии и клинической смерти, Медгиз, М., 1954.
70. Negretti, Zambra Ltd., A Story of Temperature Measurement, London, 1958.
71. Niazi S. A., Lewis F. J., Tolerance of adult rats to profound hypothermia and simulateous cardiac arrest, Surgery, **36**, 25—32 (1954).
72. Niazi S. A., Lewis F. J., Profound hypothermia in the dog, Surg. Gynec. Obstet., **102**, 98—106 (1956).
73. Niazi S. A., Lewis F. J., Profound hypothermia in the monkey with recovery after long periods of cardiac standstill, J. appl. Physiol., **10**, 137—138 (1957).
74. Niazi S. A., Lewis F. J., Profound hypothermia in man. Report a case, Ann. Surg., **147**, 264—266 (1958).
75. Palmer J. F., The Works of John Hunter, London, Longmans (1835).
76. Parkes A. S., Some biological effects of low temperatures, Advanc. Sci., Lond., **15**, 46—53 (1958).
77. Pembrey M. S., The effect of variations in external temperature upon the output of carbonic acid and the temperature of young animals, J. Physiol., **18**, 363—379 (1895).

78. Pembrey M. S., Animal heat. Textbook of Physiology, Vol. i. ed. Schäfer E. A., pp. 787—867, Edinburgh and London, Pentland, 1898.
79. Simpson S., Herring P. T., Effect of cold narcosis on reflex action in warm-blooded animals, J. Physiol., **32**, 305—311 (1905).
80. Smith A. U., Frostbite in golden hamsters revived from body temperatures below 0° C, Lancet, **ii**, 1255—1259 (1954).
81. Smith A. U., Studies on golden hamsters during cooling to and rewarming from body temperatures below 0° C. 1. Observations during chilling, freezing and supercooling, Proc. Roy. Soc., B, **145**, 391—407 (1956).
82. Smith A. U., Studies on golden hamsters during cooling to and rewarming from body temperatures below 0° C. II. Observations during and resuscitation, Proc. Roy., Soc., B, **145**, 407—426 (1956).
83. Smith A. U., Problems in the resuscitation of mammals from body temperatures below 0° C, Proc. Roy. Soc., B, **147**, 533—544 (1957).
84. Smith A. U., Experimental hypothermia in animals. In Lectures on the Scientific Basis of Medicine. Vol. 5 (1955—1956), University of London, London, Athlone Press, 1957.
85. Smith A. U., The effects on foetal development of freezing pregnant hamsters, J. Embryol. exp. Morph., **5**, 311—323 (1957).
86. Smith A. U., The resistance of animals to cooling and freezing, Biol. Rev., **33**, 197—253 (1958).
87. Smith A. U., Lovelock J. E., Parkes A. S., Resuscitation of hamsters after supercooling or partial crystallization at body temperatures below 0° C, Nature, Lond., **173**, 1136—1137 (1954).
88. Smith L. W., Refrigeration in cancer. Pathological observations in 100 advanced cases, N. Y. St. J. Med., **40**, 1355—1361 (1940).
89. Smith L. W., Fay T., Observations on human beings with cancer maintained at reduced temperatures of 75° to 90° F, Amer. J. clin. Paht., **10**, 1—11 (1940).
90. Trevor-Roper P. D., Hypothermia in hamsters. The ocular response to freezing and resuscitation, Trans, ophthal. Soc., **77**, 401—414 (1957).
91. Weiss L., Alteration of radiosensitivity of the testis by extreme hypothermia, J. Endocrin., **19**, 22—28 (1959).

92. Weiss L., Decrease in radio-sensitivity of the intact mouse spleen produced by hypoxia, Nature, Lond., **184**, 1156—1157 (1959).
93. Weiss L., A multiple resuscitator for ice-cold mice, J. Physiol., **146**, 9P (1959).
94. Weiss L., The alteration in radiosensitivity of the intact mouse spleen by exterme hypothermia, Brit. J. Radiol., **33**, 32—35 (1960).
95. Weiss L., The alterations in radiosensitivity of the mouse haematopoietic system produced by extreme hypothermia, Int. J. Rad. Biol., **2**, 409—423 (1906).
96. Whitelock O. V. St., Hypothermia, Ann. N. Y. Acad. Sci., **80**, 285—550 (1959).
97. Winterstein H., Uber wiederbelebung bei Herzstillstand, Munch. Med. Wschr., **64**, 153—155 (1917).

Глава 11

ДЕЙСТВИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА ВОДУ И НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ СРЕДЫ

В последние годы для изучения клеточной физиологии стали применять новые методы исследования. В связи с этим потребовалось пересмотреть многие уже общепризнанные теории относительно нормального строения и функции живых клеток, а также их реактивности на физические и химические агенты. Крайне важно, что многие из положений, касающихся поведения клеток при нормальной температуре, сейчас претерпевают изменения. Другой результат применения новых методов исследования заключается в том, что большинство прежних противоречий, описанных многими авторами [17, 31, 35], уже устарели и нет смысла их обсуждать. В то же время относительно различных физических и химических изменений, наступающих в физиологических средах во время охлаждения их ниже точки замерзания, большинство исследователей было единодушно. В количественном и качественном отношении вода наряду с собственно живыми клетками представляет собой один из важнейших компонентов этих сред. Кроме того, она образует естественную среду обитания для бесчисленного множества видов одно- и многоклеточных беспозвоночных, а также некоторых позвоночных. Единственной возможной отправной точкой для изучения явлений, происходящих в клетках, является обсуждение тех изменений, которые наступают в воде и в водных средах при температурах ниже нуля. В настоящей главе будут рассмотрены некоторые элементарные физико-химические положения, связанные с указанными изменениями. При этом мы используем произвольные классификации температурных зон и скоростей охлаждения (табл. 59 и 60), которые были приняты в более ранней нашей работе [31].

ТАБЛИЦА 59

Характеристика температурных зон

Температурная зона, °С	Характеристика
От +20 до 0	Субнормальная
От 0 до —70	Низкая
От —71 до —273	Очень низкая

ТАБЛИЦА 60

Характеристика скоростей охлаждения

Температурная зона, °С	Время	Характеристика	Автор
От 0 до —190	2 *сек* или менее	Сверхбыстрое	Люйет
От 0 до —79	От 2 *сек* до 5 *мин*	Быстрое	Смит и Полдж
От 0 до —79	10 *мин* и более	Медленное	Смит и Полдж
20 в любой зоне	1 *час* и более	Очень медленное	Полдж и Лавлок

Вода

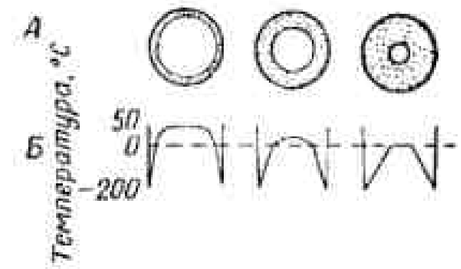
ЗАМОРАЖИВАНИЕ ВОДЫ

Когда чистую воду при нормальном атмосферном давлении охлаждают в естественных или лабораторных условиях до 0° (в виде маленьких капель, тонкой пленки и в несколько больших количествах), в ней всегда наблюдается перемещение молекул и выделение льда.

При значительно повышенном атмосферном давлении температура замерзания воды и водных растворов понижается, поскольку лед при 0° занимает больший объем, чем вода. В результате сжатия лед превращается в воду. Количество выделяемого тепла составляет 80 *кал* на каждый грамм льда, образующегося при замерзании воды, и, пока не отведено все это количество тепла, равное скрытой теплоте кристаллизации, вода не замерзает. Объем образовавшегося льда зависит от количества отведенного тепла. При атмосферном давлении льда и вода и лед при 0° остаются в равновесии, но на границе между этими двумя фазами происходит интенсивный обмен молекул. Обмен молекул происходит также между льдом и водяным паром в атмосфере, с которой соприкасается лед. Это создает давление пара над льдом, которое заметно даже при очень низких температурах. Если в равновесном состоянии при 0° к воде и льду подводится немного тепла, некоторое количество льда плавится, а при отведении тепла образуется больше льда. Когда тепло удаляется постепенно, температура жидкой фазы остается на 0°, пока вся вода не превратится в лед. После этого температура всей массы льда резко падает. Лед обладает хорошей теплопроводностью, но при большом его объеме температура на поверхности, где происходит охлаждение, может быть ниже, чем в центре глыбы льда или на глубине, где лед соприкасается с водой при температуре 0°. Так, глубокое озеро, расположенное высоко в горах Аляски, покрыто льдом в течение всего года, и его наружная поверхность может находиться в равновесном состоянии с окружающим воздухом, температура которого зимой достигает —40°. В то же время не замерзшая в глубине вода с температурой 0° всегда будет в равновесном состоянии с внутренней поверхностью ледяного слоя, покрывающего озеро. Эта вода, вытекающая через отверстие в склоне горы, приводит в действие электрический генератор, работающий круглый год в соседней долине. Такое же явление, только в меньших масштабах, можно воспроизвести и в лабораторных условиях, когда вода, разлитая в пробирки, колбы или другие сосуды, под воздействием низких температур будет замерзать по краям,

а в середине до того момента, пока не наступит термическое равновесие, будет находиться свободная вода. На фиг. 70 показано замерзание воды в шаровидном сосуде, погруженном в жидкий азот.

Взвешенные в воде частицы отталкиваются от фронта льда по мере его продвижения и не включаются в кристаллы льда, даже будучи окруженными со всех сторон



Фиг. 70. Процесс замерзания воды в шаровидном сосуде [20].

А — местоположение границы замерзания; *Б* — температурные градиенты. Особый интерес представляет тот факт, что внутреннее содержание уравновешивается в точке замерзания задолго до приближения границы замерзания. К периферии от границы замерзания температурный градиент весьма крут и по мере продвижения границы температура какой-либо частицы резко падает сразу же после замерзания.

наступающим на них льдом. Атмосферные газы при температуре 0° остаются растворенными в воде. При определенных условиях между кристаллами льда могут образовываться пузырьки газа, часто видимые на животных или растениях, окруженных кристаллами льда. Скорость диффузии кислорода, углекислоты и других газов через лед [29] незначительна, но с ней надо считаться.

Лед оседает в виде тонкой пленки на стекле и других поверхностях в результате конденсации и последующего вымерзания молекул воды, находившихся ранее в состоянии пара. Скорость роста и форма отдельных кристаллов варьируют в зависимости от температуры, влажности и характера поверхности. Примером могут служить разнообразные сложные рисунки кристаллов льда, образующиеся зимой на замерзших оконных стеклах.

Люйет [15, 16] описал методику измерения низких температур и усовершенствованные оптические методы кинематографической регистрации развития кристаллов

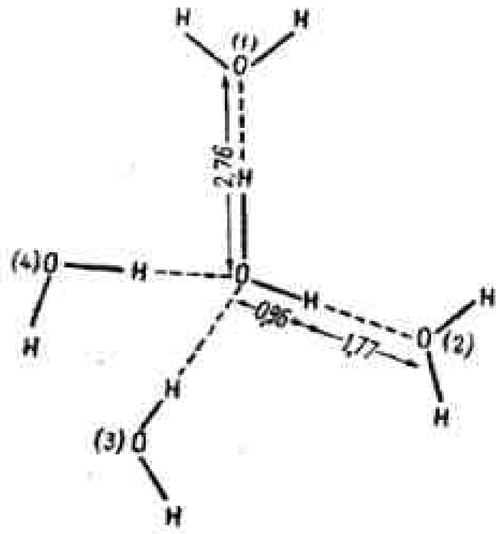
в тонких пленках чистой воды, охлаждаемой медленно или, наоборот, со скоростью нескольких сот градусов в 1 *сек*. При образовании льда в чистой воде с температурой 0° уголки ледяных пластинок имеют закругленную форму, так же как и острие и края игловидных кристаллов (фото 48). Чем выше скорость охлаждения, тем больше число образовавшихся кристаллов и тем меньше первоначальный их размер. Люйет [15] подчеркивает, что под микроскопом можно наблюдать мельчайшие кристаллы размером около 1 *мк*³. Самое близкое расстояние между центральными кислородными атомами в отдельных молекулах воды составляет 2,76 Å. Таким образом, самые маленькие видимые кристаллики льда должны содержать не менее $27 \cdot 10^9$ молекул. Может показаться, что пленка воды, охлажденная со скоростью нескольких сот градусов в 1 *сек*, превращается в однородную стеклянную массу. Если бы она витрифицировалась, в ней наблюдалось бы беспорядочное расположение молекул. Недавно с помощью электронной микроскопии и рентгеновской спектроскопии удалось обнаружить в пленке воды, охлажденной с максимально доступной скоростью, крошечные кристаллики, неуловимые для оптических методов.

Прайд и Джонс [26] указывали на трудности, связанные с превращением воды в стеклообразное состояние. Плотную стекловидную массу, содержащую то или иное количество кристаллического льда, можно было получить и поддерживать при температурах ниже —130°. Но при согревании до температуры выше —129° процесс кристаллизации завершался. Меримэн и Кэйфиг [22] добились исключительно быстрого охлаждения путем возгонки и медленной конденсации льда в вакууме на металлической поверхности при температуре жидкого азота (—196°). Приготовляли реплики поверхности кристаллов для исследования под электронным микроскопом. Такие пленки оказались мелкозернистыми, причем отдельные зерна достигали в диаметре около 150 *мк*. Возможно, это были очень мелкие кристаллы или агрегаты молекул. Пленки согревали до температуры между —70 и —120° в течение различных периодов времени (от 30 *сек* до 5 *мин*), затем вновь охлаждали до температуры жидкого азота и снимали с них реплики. Результаты исследований (фото 49) говорят о чрезвычайно интенсивном росте кристаллов льда в течение коротких периодов времени при очень низких температурах (от —70 до —96°). Миграционная перекристаллизация такого рода может происходить в тонких пленках льда при любой температуре от 0 до —120°. Подвижность льда при низких температурах можно наблюдать и в бытовых холодильниках, и в промышленных холодильных установках. Само собой разумеется, вода, превращенная в лед, не находится в статическом состоянии. Отдельные кристаллики льда мигрируют, соединяются с другими и таким образом увеличиваются в объеме, независимо от того, контактируют ли они со свободной водой или с водяным паром в воздухе.

Рентгенографические исследования показали, что незамерзшая вода, по-видимому, имеет «структуру битого льда» [24]. А это означает, что незамерзшая вода всегда содержит несколько молекул, которые связаны с четырьмя соседними молекулами водородными связями так же, как молекулы льда, образуя тетраэдр. Эти связи непрерывно разрываются и перестраиваются. По мере повышения температуры среднее число связей на одну молекулу уменьшается и при температуре около +40° достигает двух. Само собой разумеется, однако, что, если мы рассматриваем воду как некое скопление молекул, нельзя считать лед совершенно чуждым ей веществом. Каждая молекула воды имеет V-образную форму, причем атом кислорода расположен у вершины V. Угол у вершины V между двумя связями OH равен 103—106°. Длина каждой связи OH составляет 0,96 Å [1,2]. Расположение молекул воды в виде тетраэдра показано на фиг. 71.

Каждый атом кислорода окружен четырьмя другими, причем водородные ионы располагаются на линиях, соединяющих ядра атомов кислорода. Таким образом, положительно заряженные протоны одной молекулы воды связаны с отрицательными зарядами двух соседних молекул. Каждая из четырех внешних молекул воды первоначального тетраэдра притягивает к себе три молекулы, которые также образуют тетраэдр. Число молекул, свя-

занных с центром кристаллизации льда, постепенно возрастает и первоначальная структура (в виде тетраэдра) сохраняется на протяжении всего периода роста кристалла или пластинки льда. Поскольку тетраэдры не могут очень тесно прилегать друг к другу, плотность льда невелика, он плавает на поверхности воды, и, как уже упоминалось, сжатие вызывает таяние льда при температуре 0°, так как открытая «рыхлая» решетка кристаллов льда не может сохраняться при высоком атмосферном давлении. В противоположность этому многие другие вещества при повышении давления легче затвердевают.



Фиг. 71. Расположение молекул воды во льду в виде правильного тетраэдра [2].

Молекулы 1 и 2, а также центральная молекула лежат в плоскости бумаги, тогда как молекула 3— выше этой плоскости, а молекула 4— ниже нее. Таким образом, атомы кислорода 1, 2, 3 и 4 расположены в углах правильного тетраэдра. Расстояния даны в ангстремах.

Отдельные молекулы воды в растущем кристалле льда имеют значительную степень свободы. Однако для того, чтобы разорвать водородные связи, требуется энергия, и массу льда в некотором отношении можно рассматривать как одну гигантскую молекулу. Необходимо усвоить, что связывание молекул воды со сложными соединениями, содержащими гидроксильные группы, по существу не отличается от связывания во льду молекул воды друг с другом. Лишь немногие вещества связывают молекулы воды лучше, чем сама вода, особенно при пониженных температурах. Подтверждением этого может служить тот факт, что для превращения льда при 0° в водяной пар, в котором связанных молекул меньше, требуется 600 *кал* на 1 *г* [2].

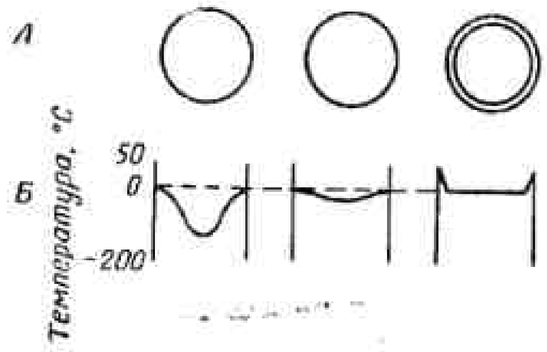
ПЕРЕОХЛАЖДЕНИЕ ВОДЫ

При охлаждении чистой воды до температур ниже 0° ее молекулы не всегда образуют правильные четырехгранные кристаллы. Иногда они сохраняют беспорядочное расположение, характерное для жидкого состояния; в таких случаях говорят, что вода переохладилась и может оставаться в таком метастабильном состоянии при очень низких температурах (до —40°). Известно, что мельчайшие капельки воды в облаках переохлаждены и температура их достигает —40°. Переохлажденная вода не может находиться в состоянии равновесия с кристаллами льда. Если внести кристалл льда в облако, состоящее из отдельных капелек переохлажденной воды, или же в сосуд с переохлажденной водой, то сразу же во всем облаке или во всей жидкости в сосуде начнется процесс кристаллизации. Благодаря большой скорости этого процесса образовавшиеся кристаллики очень малы. Однако впоследствии они разрастаются и подвергаются миграционной перекристаллизации, как говорилось выше. Доля переохлажденной воды, превращающейся в лед, зависит от температуры. Следует помнить, что в процессе кристаллизации выделяется скрытая теплота (80 *кал/г*), в результате чего температура повышается до 0°. Если не устранить достаточного количества тепла, кристаллы льда будут соприкасаться с жидкой водой с температурой 0°, которая уже не находится в состоянии переохлаждения. При дальнейшем же устранении тепла кристаллы льда разрастаются за счет воды, которая, как известно, в их присутствии не может оставаться в состоянии переохлаждения. Образование центров кристаллизации в переохлажденной воде может происходить самопроизвольно, по-видимому вследствие стремления молекул воды объединяться в тетраэдры. При низких температурах динамическое равновесие между разрушением и образованием тетраэдров, по-видимому, нарушается и возникают агрегаты молекул; этот процесс получил название гомогенного образования центров кристаллизации [19]. Или же введение какой-нибудь инородной частицы (например, кристалла иодистого серебра, пылинки и т. п.) приводит к

нарушению равновесия и вызывает кристаллизацию, которая в дальнейшем распространяется по всей массе воды при температуре ниже 0°; этот процесс называют гетерогенным образованием центров кристаллизации.

ТАЯНИЕ ЧИСТОЙ ВОДЫ

Лед обладает более высокой теплопроводностью, чем вода. Когда солнце согревает поверхность замерзшего озера или же когда сосуд, заполненный льдом с низкой температурой, погружают в теплую воду, тепло распре-



Фиг. 72. Процесс таяния льда в шаровидном сосуде [20]

Обозначения те же, что и на фиг. 70. Видно резкое различие между процессами таяния и замерзания. Тепло равномерно распределяется по всему твердому материалу образца еще до таяния. Таким образом, внутреннее равновесие в точке таяния достигается почти перед самым началом процесса таяния.

деляется по всему плотному льду. Следовательно, температура всей массы льда повышается до 0°, прежде чем на его поверхности появляются признаки таяния. Процесс таяния льда в шаровидном сосуде показан на фиг. 72. Различие между процессами замерзания и таяния хорошо видно: во время замерзания между периферией и движущимся фронтом льда существует температурный градиент (см. стр. 427), тогда как до таяния во всей массе льда температура однородна. После начала таяния лед окружен слоем воды, которая обладает относительно низкой теплопроводностью. Разумеется, лед стремится всплыть. Если, однако, закрепить лед в определенном положении, как, например, в порах замороженной губки или ткани, то между центральной частью, где тающий лед находится в состоянии равновесия с водой при 0°, и поверхностью ледяной массы, соприкасающейся с источником тепла, возникает значительный температурный градиент.

Очень важно определить количество энергии (из расчета 80 *кал/г*), требующееся для превращения массы льда с температурой 0° в воду с этой же температурой.

Физиологические растворы и другие среды

Все физиологические среды представляют собой разбавленные водные растворы. Самой простой из них, применяемый для клеток млекопитающих, безусловно, является 0,85-процентный (0,15 *М*) раствор NaCl. Более сложные среды включают в себя соли натрия, калия, кальция, магния и других металлов. При определенных концентрациях водородных ионов они могут быть забуферены соответствующими количествами различных фосфатов, карбонатов или других систем. Питательные среды для культивирования клеток и тканей обычно содержат декстрозу или иные сахара, а также смеси белков, аминокислот, витаминов, гормонов и различных сложных веществ, включая антибиотики. В некоторых случаях в них вводят плазму или сыворотку для того, чтобы обеспечить наличие какого-то количества гормонов, витаминов и других физиологических веществ. Большое значение, вероятно, имеют также содержащиеся в плазме и сыворотке липиды [25].

Любой раствор, как бы ни были многочисленны и разнообразны входящие в его состав вещества, представляет собой гомогенную систему. Некоторые его свойства, так называемые коллигативные, зависят от числа молекул растворенных веществ. Эти свойства включают в себя понижение давления паров воды, понижение температуры замерзания и повышение осмотического давления. Если добавить к воде хлористый натрий или другое растворимое вещество, то давление паров воды, которое зависит от скорости испарения и конденсации молекул воды на поверхности, понизится при любой

температуре. Происходит это потому, что число молекул воды на каждую единицу поверхности уменьшилось благодаря присутствию молекул растворенного в воде вещества. Увеличение концентрации этого вещества или введение других растворимых веществ понижает давление паров воды раствора. Молекулы воды во всем объеме раствора отделены друг от друга молекулами растворенных веществ. Теперь при падении температуры молекулам воды труднее объединяться в тетраэдры, характерные для льда. Следовательно, точка замерзания понижается и зависит от концентрации растворенных веществ. Точнее говоря, точка замерзания зависит от числа молекул каждого из растворенных веществ и растворителя в разбавленном растворе. По этой причине часто целесообразно выражать концентрацию различных растворенных веществ и самого растворителя в молях или в мольных долях.

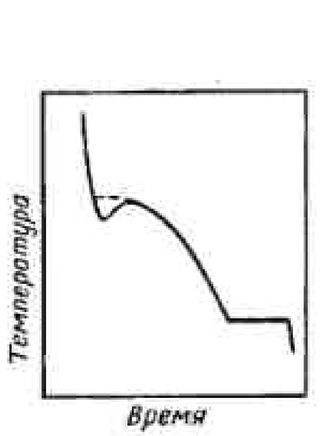
ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ РАСТВОР

Когда 0,85-процентный раствор хлористого натрия охлаждают до температуры ниже его точки замерзания (—0,55°), он может переохладиться. При внесении в него кристалла льда раствор начинает замерзать, и одновременно его температура повышается до —0,55° благодаря выделению скрытой теплоты кристаллизации. При постепенном понижении температуры до —21° все большее количество воды в растворе вымерзает. Следовательно, концентрация хлористого натрия в остатке воды повышается, но уменьшается объем раствора, находящегося в состоянии равновесия с увеличивающимся объемом льда. Если к частично замерзшему раствору добавить воду с температурой 0°, образуется еще больше льда, пока не наступит состояние равновесия при температуре, установившейся после добавления воды. Если же добавить хлористый натрий (при любой температуре), лед начинает плавиться и, таким образом, состояние равновесия сохраняется. Затем при температуре —21° концентрация хлористого натрия достигает максимальной величины — приблизительно 30 *г*% (5,2 *М*). Температура —21° представляет собой эвтектическую точку, т. е.

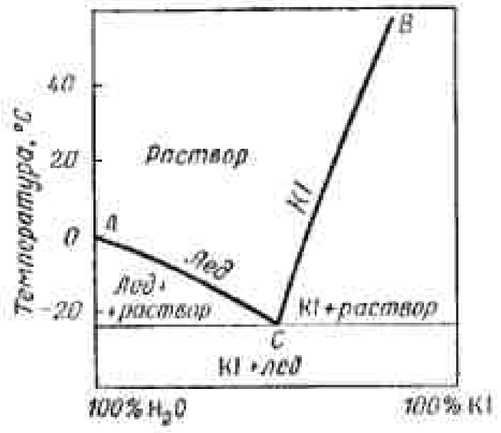
самую низкую температуру, при которой раствор хлористого натрия, оставаясь еще жидким, находится в состоянии равновесия: с одной стороны, лед, с другой — твердый хлористый натрий. При этом температура держится на уровне —21° до тех пор, пока не выделится весь хлористый натрий, а вся вода не превратится в лед. После полного исчезновения жидкой фазы дальнейшее охлаждение вызывает падение температуры (фиг. 73).

ЭВТЕКТИЧЕСКИЕ ТОЧКИ И ПЕРЕСЫЩЕНИЕ

Водные растворы других солей ведут себя при охлаждении так же, как и физиологический раствор. Однако эвтектическая точка и концентрация растворенного вещества в эвтектике в каждом случае зависят от растворимости отдельных солей. Можно вычертить кривые,



Фиг. 73. Кривая охлаждения с переохлаждением [3].



Фиг. 74. Система из соли KI и воды [3].
Подробности см. в тексте.

отражающие состав раствора в состоянии равновесия со льдом или с твердой солью при различных температурах. На фиг. 74 показана диаграмма равновесия между иодистым калием и водой при атмосферном давлении. По мере падения температуры разбавленного раствора происходит выделение льда. На диаграмме этому процессу соответствует линия *AC*, показывающая

точки замерзания растворов, содержащих различные концентрации иодистого калия в воде. В результате понижения температуры концентрированного раствора происходит выпадение кристаллов иодистого калия. Линия *BC* отражает растворимость соли. Наклон этой линии зависит от теплоты растворения соли. Она будет менее крутой в тех случаях, когда растворимость солей быстро понижается по мере падения температуры. Температура замерзания и растворимость пересекаются в точке *C*. Это и есть эвтектическая точка (—23°), когда отделяются лед и иодистый калий. Эвтектическая точка является самой низкой температурой, при которой раствор может существовать сколь угодно долго. При охлаждении же раствора ниже его эвтектической точки наступает его пересыщение. В состоянии пересыщения раствор, будучи неустойчивой системой, может находиться лишь незначительный период времени. Он не может оставаться пересыщенным в присутствии растворимого вещества. Поэтому внесение кристалла соли в пересыщенный раствор при любой температуре выше эвтектической точки вызовет выпадение кристаллов одной этой соли. Если же температура пересыщенного раствора ниже эвтектической точки, внесение кристалла льда приведет к выпадению кристаллов всех солей и одновременному вымерзанию всей воды. Иногда можно наблюдать одновременное существование пересыщенного раствора хлористого натрия с температурой —28° и льда с той же температурой. Вероятно, именно так обстояло дело в опытах Рэ [28], который описал это явление как равновесие между переохлажденным до —28° хлористым натрием и кристаллами льда (фото 50, *А*). Рэ показал также образование в растворе кристаллов хлористого натрия при эвтектической точке (—22°) вместе с ранее выпавшими кристаллами льда (фото 50, *Б*).

Другое осложнение заключается в том, что некоторые соли образуют с водой один или несколько гидратов. Гидраты, так же как и безводные соли, обладают различной степенью растворимости и имеют разные эвтектические точки. Так, хлористый натрий при температуре ниже +0,15° может образовать гидрат $NaCl \cdot 2H_2O$. При охлаждении разбавленного раствора, когда эвтектическая точка составляет —21,2°, твердыми фазами будут лед и $NaCl \cdot 2H_2O$. В то же время, эвтектическая точка может иногда лежать при —22,4°. При этой температуре твердая фаза будет состоять из безводного хлористого натрия и льда.

УРАВНОВЕШЕННЫЕ СОЛЕВЫЕ РАСТВОРЫ

При составлении физиологических растворов основная задача заключается в создании осмотического давления, достаточного для поддержания такого состояния равновесия, при котором взвешенные в этих растворах живые клетки не выделяют содержащуюся в них воду и не вбирают воду из окружающей их среды. Как и понижение точки замерзания, осмотическое давление зависит от числа молекул растворенного вещества или нескольких веществ. В 0,85-процентном растворе NaCl не удается поддерживать нормальную функцию многих клеток, в том числе волокон сердечной мышцы, нервных клеток и их аксонов и дендритов, поскольку эта функция зависит от присутствия в определенном соотношении ионов натрия, калия, кальция и магния. Жизнедеятельность указанных клеток зависит также от концентрации в среде водородных ионов, а для постоянного обмена веществ требуется глюкоза. Таким образом, основное условие приготовления физиологических растворов заключается в создании общей концентрации молекул для поддержания нормального осмотического давления. Практически наиболее целесообразна концентрация около 0,15 *М*. Тогда точки замерзания этих растворов лежат приблизительно при —0,55°, т. е. так же, как у 0,85-процентного раствора хлористого натрия. В большинстве уравновешенных солевых растворов преобладает хлористый натрий; концентрации хлоридов калия, кальция и магния и других солей по сравнению с хлористым натрием относительно невелики. В качестве примера приведем раствор Тироде (табл. 61). В этом растворе имеет место ионизация, и в качестве буфера для предотвращения изменения концентрации водородных ионов часто используют карбонат и бикарбонат натрия или калия, а также различные фосфаты.

Когда эти уравновешенные солевые растворы охлаждают до температуры ниже их точки замерзания, выпадает лед и общая молярная концентрация, а также концентрация хлористого натрия и других ионов повыша-

ТАБЛИЦА 61

Раствор Тироде

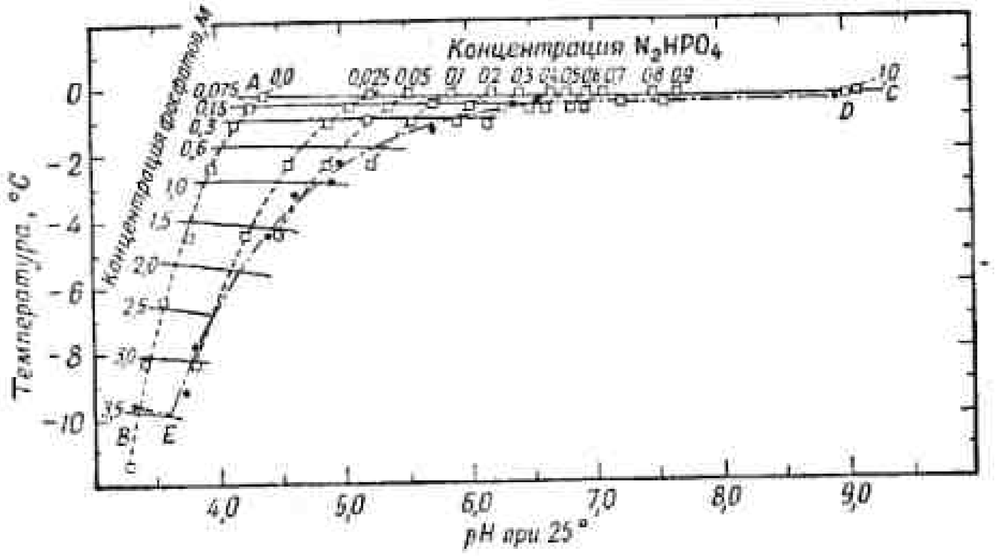
Компонент	Количество	Компонент	Количество
NaCl	8 *г*	NaH_2PO_4	0,05 *г*
KCl	0,2 *г*	$NaHCO_3$	1,0 *г*
$CaCl_2$	0,2 *г*	Глюкоза	1,0 *г*
$MgCl_2$	0,2 *г*	Дистиллированная вода	1000 *мл*

ются. Разные соли при любой температуре обладают разной растворимостью. Во время постепенного охлаждения одна или несколько солей выпадают в осадок. Таким образом, молярные доли их в растворе уменьшаются, и с физиологической точки зрения раствор становится неуравновешенным. Это, вероятно, особенно важно в тех случаях, когда рассматриваемые соли относятся к буферной системе и применяются для создания соответствующего pH при температуре выше точки замерзания раствора.

ФОСФАТНЫЕ БУФЕРНЫЕ СИСТЕМЫ

Ван ден Берг и Роуз [33, 34] изучали действие замораживания на pH и на состав растворов различных фосфатов натрия и калия, обычно используемых в качестве буферов в физиологических средах. Точка замерзания 0,02 *M* раствора NaH_2PO_4 была —0,1°. Во время охлаждения от —0,1 до —9,7° наблюдалось выпадение только кристаллов льда, а концентрация раствора повысилась до 3,42 *M*. В то же время величина pH понижалась от 4,05 до 3,3 (см. кривую *AB* на фиг. 75). При охлаждении 0,02 *M* раствора Na_2HPO_4 замерзание начиналось при температуре —0,1° и выпадение одних кристаллов льда продолжалось до температуры —0,5°, при которой величина pH понизилась от 9,3 до 8,9, а концентрация раствора повысилась до 0.11 *M* (см. кри-

вую *CD*). Когда охлаждали растворы, содержащие обе соли, общая концентрация повышалась до тех пор, пока температура не достигала эвтектической точки при —9,9° (фиг. 75). Во всех растворах, в которых молярное соотношение NaH_2PO_4 и Na_2HPO_4 было меньше 3,42 : 0,06, величина pH понижалась, когда выпадали кристаллы льда и Na_2HPO_4, в пределах температуры



Фиг. 75. Влияние замораживания на pH и состав растворов NaH_2PO_4 и Na_2HPO_4 [34].

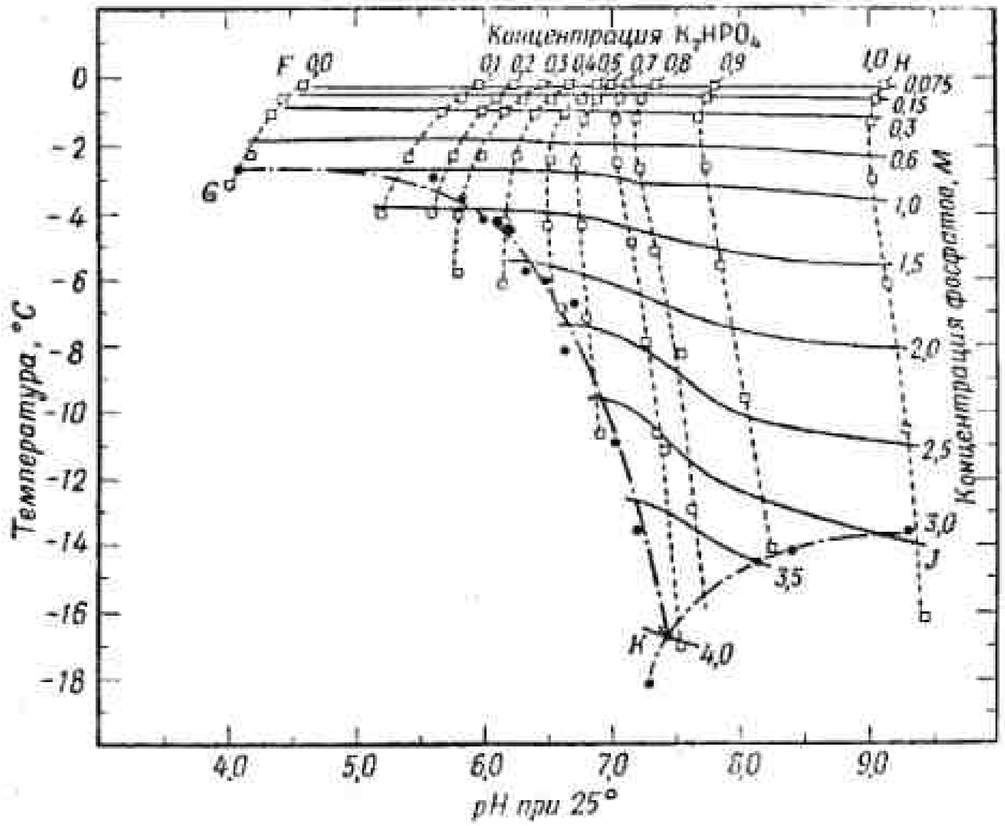
Концентрация Na_2HPO_4 выражена как доли общей концентрации фосфатов. □ выпадение кристаллов льда; ● выпадение кристаллов льда и одной соли; × выпадение кристаллов льда и двух солей; — линии эквивалентности.

от —0,1 до —9,9° (кривая *DE* на фиг. 75). В растворах, в которых соотношение NaH_2PO_4 и Na_2HPO_4 было больше 3,42 : 0,06, величина pH повышалась во время охлаждения при выпадении кристаллов льда и NaH_2PO_4 (кривая *BE*).

Эвтектическая точка растворов, содержащих KH_2PO_4 и K_2HPO_4, лежала при —16,7°, а конечная величина pH равнялась 7,5 (фиг. 76). В растворах, содержавших первоначально обе соли в различном соотношении, pH варьировал между 4,0 и 9,0. Во всех растворах, в которых молярное соотношение KH_2PO_4 и K_2HPO_4 было меньше 1,30 : 2,70, величина pH понижалась при выпадении кристаллов K_2HPO_4 и льда (фиг. 76). В тех

случаях, когда исходное соотношение солей в растворах было больше, величина pH повышалась, когда выпадали кристаллы KH_2PO_4 и льда [34].

Ван ден Берг и Роуз [34] изучали также изменение pH и состава растворов, содержащих 2, 3 и 4 различных



Фиг. 76. Влияние замораживания на pH и состав растворов KH_2PO и K_2HPO_4 [34].

Концентрация K_2HPO_4 выражена как доля общей концентрации фосфатов. Условные обозначения те же, что и на фиг. 75.

фосфата натрия и калия. Они составили таблицы и специальный график, с помощью которых можно было определить влияние выпадения кристаллов солей и льда на pH любого раствора, содержащего фосфаты натрия и калия. Эти авторы обнаружили, что в данном растворе при определенной температуре пересыщение может вызвать временные, но значительные отклонения pH от нормы. Такие метастабильные состояния не влияли на окончательную величину pH и на соотношение солей при конечном стабильном состоянии. Однако они могли

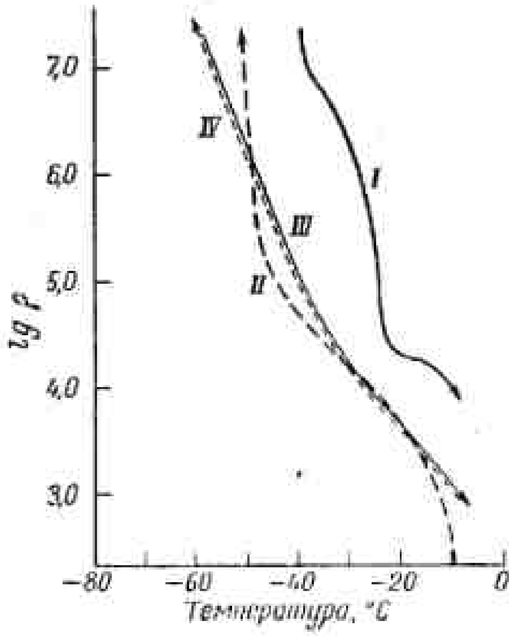
служить источником некоторых нарушений и затруднений во время замораживания забуференных растворов, в которых были взвешены живые клетки. Авторы пришли к выводу, что в тех случаях, когда во время замораживания не желательно увеличение кислотности, в буфере должны преобладать K_2HPO_4 и KH_2PO_4. Устойчивую величину pH можно поддерживать, используя раствор, в котором исходной концентрацией солей является концентрация, наблюдавшаяся в эвтектической точке. Это так называемый эвтектический раствор, или эвтектическая смесь. Так, в растворе, содержащем 2,75 *M* K_2HPO_4, 0,96 *M* KH_2PO_4 и 0,17 *M* Na_2HPO_4, исходная величина pH была 7,5. Точка замерзания данного эвтектического раствора лежит при —17,2°, и его pH при охлаждении до этой температуры не изменяется.

Величина pH различных растворов с фосфатным буфером значительно изменяется при замораживании, если эти растворы содержат также хлористый натрий и хлористый калий. В присутствии хлористого натрия pH обычно понижается больше, а pH эвтектического раствора подвергается значительным изменениям. Добавление хлористого калия относительно мало влияет на pH эвтектического раствора, но повышает pH во время начальной фазы замораживания в некоторых буферных растворах [33]. Работы ван ден Берга и Роуза [34] в большой степени способствовали выяснению механизма действия замораживания на pH физиологических сред. Их следовало бы изучить всем, кто интересуется влиянием низких температур на биологические системы. Полученные этими авторами данные показывают, что даже применение различных буферов не устраняет изменения pH, вредно влияющих на клетки во время замораживания.

ЭЛЕКТРОПРОВОДНОСТЬ СРЕДЫ ВО ВРЕМЯ ЗАМОРАЖИВАНИЯ

Рэ [28] определял сопротивление при прохождении электрического тока через физиологическую среду при различных температурах ниже нуля. Как только исчезала жидкая фаза, удельное сопротивление ρ сразу же становилось бесконечным. При охлаждении уравновешен-

ного раствора Эрла такое резкое повышение удельного сопротивления происходило при —45° (фиг. 77). Интересно, что при последующем согревании раствора удельное сопротивление можно было определить только после того, как температура достигала —35°. Следовательно, таяние льда начиналось только при этой температуре.



Фиг. 77. Изменение удельного сопротивления ρ уравновешенного солевого раствора (раствора Эрла) во время замораживания и оттаивания [28].

I — раствор Эрла, согревание; *II* — раствор Эрла, охлаждение; *III* — раствор Эрла с добавлением 30% глицерина, согревание; *IV* — раствор Эрла с добавлением 30% глицерина, охлаждение.

Удельное сопротивление резко понижалось, пока температура не достигала —22°. Эта температура, по-видимому, является эвтектической точкой для основного компонента раствора — хлористого натрия. Единственно возможное объяснение различий в величине удельного сопротивления при данной температуре во время охлаждения и согревания заключается в том, что растворы во время охлаждения пересыщаются.

КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ ЛЬДА ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ СРЕДЫ

При охлаждении физиологических солевых сред, как только их температура падает ниже точки замерзания по всему объему жидкости, начинается выпадение кристаллов льда. Строение последних в основном не отличается от строения кристаллов, образовавшихся в чистой воде. Эти кристаллы, однако, отделены друг от друга

каналъцами, заполненными концентрированными солевыми растворами. По мере понижения температуры кристаллы льда растут за счет уменьшения количества жидкости, заполняющей каналъцы. Форму этих растущих кристаллов изучали при помощи специальных микроскопов с устройством для охлаждения исследуемых проб до очень низких температур [15, 16, 28]. Скорость роста кристаллов, а также их форма зависят от природы раствора и от скорости охлаждения. До достижения эвтектической точки кристаллизация льда, по-видимому, происходит постепенно. Затем внезапно жидкость в протоках между крупными кристаллами льда мутнеет вследствие образования многочисленных мельчайших кристалликов, состоящих, вероятно, из смеси соли или солей со льдом.

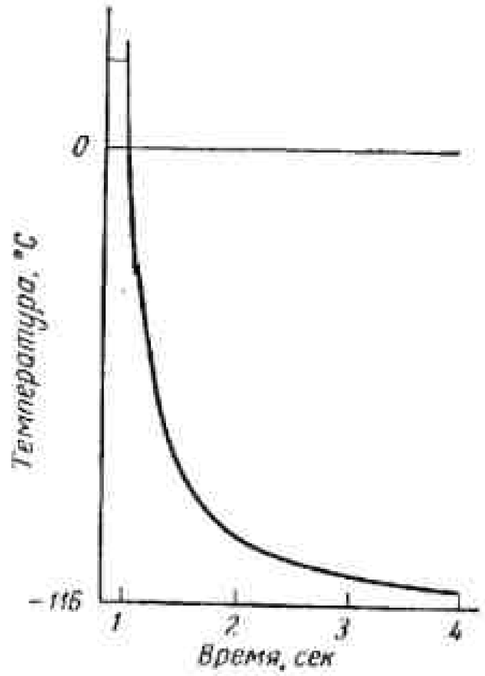
СРЕДЫ, СОДЕРЖАЩИЕ БЕЛКИ

Наилучшими средами для многих целей являются разбавленные или не разбавленные плазма или сыворотка. Прочие среды содержат сывороточный или какой-либо иной альбумин или же другие белки, включая желатин, растворенные в солевых растворах. В связи с этим возникла необходимость изучения различных сторон воздействия белков на процесс замораживания в разбавленных водных средах. Так, Лузена [11] показал, что присутствие в низкой концентрации альбумина сильно задерживает рост кристаллов льда в воде и в растворах неорганических солей. Повышение концентрации свыше 10% давало слабый эффект.

Исключительный интерес представляют исследования Люйета [15, 16], который при помощи специального замораживающего микроскопа наблюдал образование кристаллов льда в тонких пленках растворов с высокой концентрацией бычьего альбумина и в гелях, содержащих 30—50% желатины, при разных скоростях замораживания. При этом ему удалось сфотографировать призмы, звезды, розетки и шестиугольные кристаллы разнообразной формы, образовавшиеся в тонких пленках 35-процентного раствора бычьего альбумина, замороженных при —3° (фото 51). Когда препараты замо-

раживали при более низких температурах и, следовательно, с большей скоростью, гексагональная симметрия узора кристаллов несколько нарушалась и образовывались неправильные розетки.

Люйет [16] установил, что при сверхбыстром охлаждении тонких пленок гелей, содержащих 30—50% желатины, или растворов с высокой концентрацией других белков кристаллизация проходила в виде появления тончайшей легкой дымки, покрывавшей весь препарат. Эта дымка постепенно бледнела, и вскоре вся пленка при рассмотрении ее под обычным микроскопом оказывалась прозрачной. Люйет назвал кристаллы такого типа «быстроисчезающими шарообразными дисками». Не ясно, происходила ли здесь истинная кристаллизация или же пленки витрифицировались. В настоящее время Люйету удалось доказать, что пленка желатины после сверхбыстрого охлаждения имеет кристаллическую структуру, сохраняя внешне вид прозрачного аморфного вещества. Люйет зарегистрировал за кратковременный период охлаждения временное повышение температуры в препарате. Это повышение температуры совпадало с моментом появления и распространения тончайшей дымки, о которой говорилось выше (фиг. 78). При согревании в результате перекристаллизации прозрачная пленка становилась мутной. Меримэн для изучения прозрачных пленок, образующихся при сверхбыстром охлаждении гелей желатины, использовал дифракцию рентгеновских лучей. Рентгенограммы показали присутствие кристаллов, отражавших рентгеновские



Фиг. 78. Охлаждение пленки 30-процентного геля желатины толщиной 30 *мк*, внезапно погруженной в изопентан с температурой −116° [16].

Пик показывает выделение тепла, совпадающее по времени с „первичной" кристаллизацией.

лучи под одним углом. После перекристаллизации, наступавшей во время согревания, рентгеновские лучи отражались под тремя углами [16].

На основании описанных наблюдений был сделан один важный вывод. Стекловидное вещество, образующееся в результате сверхбыстрого охлаждения до очень низких температур, содержит мельчайшие кристаллики льда. Это не истинное стекловидное вещество, являющееся аморфным, с беспорядочным расположением молекул [16]. Микроскопические препараты живых клеток и тканей, переживших сверхбыстрое охлаждение до очень низких температур, которые раньше считали витрифицированными [14, 17], вероятно, содержали такие кристаллики. Люйет [16] подчеркивает, что надо с величайшей осторожностью употреблять такие термины, как «стекловидный», «остекленение» («витрификация»), «остекленевший», «расстекленение» («девитрификация»). Назрела необходимость в новой терминологии, однако введение этих новых терминов в настоящее время может усугубить путаницу.

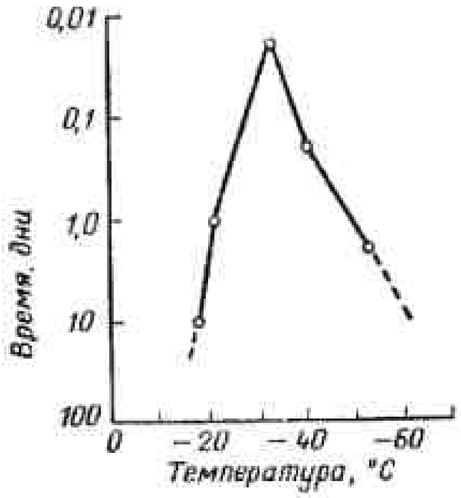
Люйет различает четыре фактора, которые теоретически могут препятствовать процессу кристаллизации при быстром охлаждении: 1) уменьшение числа центров кристаллизации; 2) замедление роста кристаллов из центров; 3) уменьшение всего общего количества образовавшегося льда; 4) ухудшение степени «упорядоченности» молекул. Он показал экспериментально, что повышение скорости охлаждения разбавленных водных растворов не препятствовало образованию центров кристаллизации. Наоборот, число их увеличивалось при ускорении охлаждения с 300 до 1200° в 1 *сек*. Не было также никаких признаков замедления роста кристаллов при повышенных скоростях замораживания 40-процентных гелей желатины. Соотношение между скоростью охлаждения и количеством образовавшегося льда не было определено. Рентгенографические исследования показали, что кристаллизация начиналась при охлаждении 30-процентного раствора желатины со скоростью нескольких тысяч градусов в 1 *сек*. Таким образом, имело место хотя бы частичное «упорядочение» молекул [16].

Значение этих результатов для хранения клеток при низких температурах будет рассмотрено в гл. 12.

Некоторые ферменты и многие другие белки, растворенные в физиологических солевых средах, переносят продолжительное хранение в замороженном состоянии и последующее согревание, не дегенерируя и не утрачивая характерных свойств. Лецито-вителлин же, основной липопротеид яичного желтка, наоборот, быстро дегенерирует при замораживании и оттаивании. На это указывает утрата текучести яичным желтком, замороженным при температуре ниже —6° [23]. Лецито-вителлин осаждается также и при замораживании физиологической солевой среды, в которой его развели. Из комплекса липопротеидных молекул выпадает липид [4]. При быстром замораживании раствора при очень низкой температуре с последующим быстрым согреванием повреждения наступают не так скоро [4]. Весьма примечательно, что потеря растворимости лецито-вителлином в растворах хлористого натрия и выпадение липидов наступают при —3° раньше, чем при —20°. При температуре —20° концентрация солей в частично замороженной среде очень высока (около 30 *г* на 100 *г* воды). Таким образом, повреждения, наступающие во время замораживания, нельзя приписать действию концентрации соли. В то же время лецито-вителлин повреждается, если pH суспензионной среды падает ниже 5,2, а это может происходить при замораживании забуференных физиологических солевых сред (см. стр. 438). Реакция липовителлина на замораживание обсуждается в работе Лавлока [10].

Другим белком, который, как известно, повреждается при замораживании, является β-липопротеид человеческой плазмы. Денатурация его выражается прежде всего в том, что он перестает растворяться в физиологическом растворе. Лавлок [10] замораживал на разное время и при различных температурах растворы β-липопротеида в 0,16 *М* хлористом натрии. Затем он их оттаивал и регистрировал наименьшую продолжительность замораживания, требуемую для появления первых признаков помутнения. Результаты опытов (фиг. 79) показали, что при —18° признаки денатурации появились только через 10 дней, при —20° — через 1 сутки, а при —33° — уже

через несколько минут. Изменения в белке явно происходили быстрее при температурах ниже эвтектической точки хлористого натрия. β-Липопротеид в насыщенном растворе хлористого натрия при 0° почти не утрачивал своей растворимости. Влияние изменения величины pH испытывали путем сравнения повреждений, происшедших в тех случаях, когда забуференные при различных

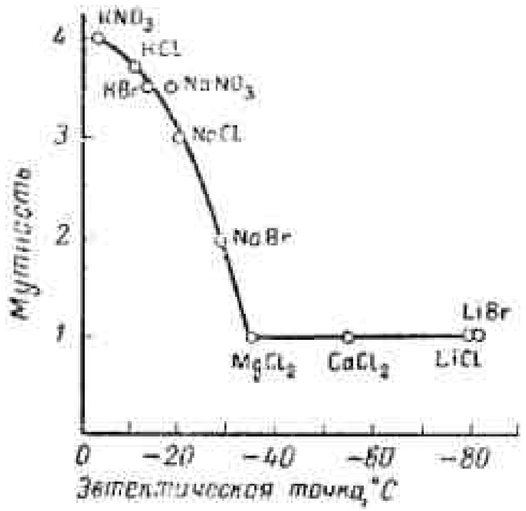


Фиг. 79. Скорость денатурации β-липопротеида, замороженного в 0,16 *М* растворе хлористого натрия при различных температурах [10].

Скорость денатурации выражена как продолжительность пребывания в замороженном состоянии до появления первых признаков нерастворимости после оттаивания.

pH растворы β-липопротеида замораживали при —40°. Полученные результаты показывали, что имели место более выраженные отклонения pH раствора от нормы, но они все же не были единственной причиной денатурации [10]. Затем липопротеид растворяли в растворах других солей с эвтектическими точками от —4 до —86°. Растворы охлаждали, выдерживали 15 *час* при —40° и оттаивали. Наиболее тяжелые повреждения были в растворах с самой высокой эвтектической точкой, а наиболее легкие — в тех случаях, когда эвтектическая точка лежала ниже —40° (фиг. 80). Следовательно, денатурация, по-видимому, зависит от вымерзания воды из раствора и бывает особенно выраженной, когда вымерзают последние остатки воды. Это может привести к физическому соприкосновению отдельных молекул липопротеида и даже к вымерзанию некоторых обычно ассоциированных с ним молекул воды. Высушивание как при нормальной температуре, так и после частичного замораживания тоже влечет за собой денатурацию β-липо-

протеида плазмы. Это подтверждает предположение, что причиной повреждения во время замораживания служит исчезновение даже следов воды, превратившейся в лед



Фиг. 80. Связь между эвтектической точкой суспензионной среды и повреждениями, полученными при замораживании β-липопротеида на 15 *час* при —40° [10].
Мутность раствора выражена в условных единицах.

[10]. В следующем разделе будут изложены способы предотвращения указанных повреждений, а в гл. 12 рассмотрено особое значение изменений, наступающих в липопротеидах в среде и в самой клеточной оболочке.

Среды, содержащие глицерин или другие многоатомные спирты, сахара и прочие нейтральные растворимые вещества

Глицерин и некоторые родственные ему многоатомные спирты защищают живые клетки от губительного действия замораживания и оттаивания. В связи с этим возникла мысль о возможности изменения с помощью этих веществ характера повреждений, наступающих при замораживании и оттаивании сред, в которых взвешены живые клетки.

При охлаждении (с непосредственным наблюдением под микроскопом) тонких пленок раствора Рингера с взвешенными в нем сперматозоидами при температуре от 0 до —8° начиналась кристаллизация льда. Кристаллы быстро росли в виде пластинок и многоугольников, а иногда и копий с тупыми концами, которые разрастались в ширину и в длину. Все эти кристаллы как бы подталкивали впереди себя сперматозоиды, пока температура не достигла примерно —20°. Теперь между крупными кристаллами оставались только очень узкие щели, забитые живыми клетками. При согревании проб кристаллы при температуре от —10 до —2° заметно уменьшались по величине и между ними появлялись пузырьки и щели. Когда последние кристаллы льда исчезали, можно было наблюдать, как сперматозоиды располагались вдоль контуров тех пространств, которые ранее были заняты кристаллами [32]. Если сперматозоиды взвешивали в растворе Рингера, содержащем 15—20% глицерина, замораживание наступало при температуре от —10 до —20°. Кристаллы имели форму пера или листьев папоротника с центральным стержнем, от которого они расходились лучами. При температуре —40° между кристаллами были отчетливо видны каналы, в которых располагались клетки. При согревании кристаллы оттаивали постепенно, и этот процесс протекал не так бурно, как при согревании в отсутствие глицерина. Глицерин явно видоизменял течение процессов замораживания и оттаивания среды. Ниже мы рассмотрим механизм защитного действия глицерина, предохраняющего сперматозоиды, эритроциты и другие клетки и ткани от повреждений во время образования и таяния льда.

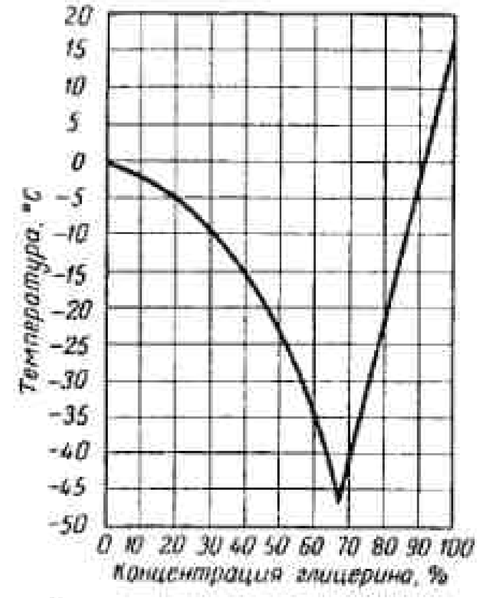
Люйет [16] с помощью более совершенного прибора изучал формы микроскопических кристаллов льда, образующихся в присутствии глицерина. Он подтвердил, что кристаллы льда распространены в виде древовидных образований с тупыми концами, между которыми пролегают широкие каналы (фото 52). Когда тонкие пленки 3 *М* раствора глицерина охлаждали со скоростью 300—1200° в 1 *сек*, число центров кристаллизации неизменно увеличивалось. Никаких признаков витрификации даже при самых высоких скоростях охлаждения не наблюдалось. При медленном охлаждении растворов сахарозы также появлялись ветвящиеся кристаллы льда, отходящие от центрального ствола [15]. При более быстром охлаждении кристаллизация шла в радиальном направлении, а при сверхбыстром охлаждении до очень низких температур появлялись быстро исчезающие шаро-

видные диски. Препарат имел вид «остекленевшего», но только в смысле его прозрачности, а не отсутствия в нем кристаллов [16].

Интересные исследования о распространении льда в биологических средах и системах провели Лузена и Кук [11—13]. Когда растворы с глицерином и сахарозой охлаждали медленно, кристаллизация начиналась в точке замерзания. При быстром же охлаждении кристаллы появлялись только после падения температуры ниже точки замерзания [13]. Следовательно, растворы, по-видимому, переохлаждались. Последующий рост кристаллов льда значительно задерживался в присутствии глицерина или других многоатомных спиртов и сахаров [11]. Лузена указывал, что концентрация этих растворенных веществ постепенно повышалась по мере вымерзания воды, вследствие чего и происходила задержка роста кристаллов после падения температуры.

Считается, что точка замерзания чистого глицерина лежит приблизительно при +18°, но его редко можно наблюдать в кристаллическом состоянии [30]. Отчасти это обусловлено выраженной способностью глицерина к переохлаждению, а отчасти — его чрезвычайно сильной гигроскопичностью. Присутствие небольших количеств воды значительно понижает точку замерзания глицерина и препятствует его кристаллизации. Глицерин растворяется в воде в любом соотношении при температуре выше 0°. Он растворяется также в водных растворах всех электролитов и неэлектролитов, обычно присутствующих в физиологических средах. Кроме того, глицерин сам по себе служит хорошим растворителем электролитов и других компонентов этих сред. Точки замерзания растворов с различными концентрациями глицерина (фиг. 81) определены Сегюром [30]. Как мы уже говорили, эти растворы имеют сильно выраженную способность к переохлаждению. Если концентрация глицерина меньше 66,7% (по весу), то внесение в раствор кристалла льда обеспечит выпадение кристаллов льда при точке замерзания раствора. Самая низкая температура, при которой система содержит воду, лед и глицерин, составляет —46,5°. Это — эвтектическая точка раствора, состоящего из 66,7 весовой части глицерина и

33,3 весовой части воды. Без внесения кристалла глицерина вряд ли удастся вызвать выпадение кристаллов глицерина из раствора в эвтектической точке или при более низких температурах или же из растворов, содержащих более 66,7% (по весу) глицерина. Скорее глицерин и в присутствии льда останется в состоянии переохлаждения. Если даже процесс кристаллизации глицерина и наступит при температуре —46,5° и ниже, он будет



Фиг. 81. Точки замерзания растворов глицерина в воде [30].

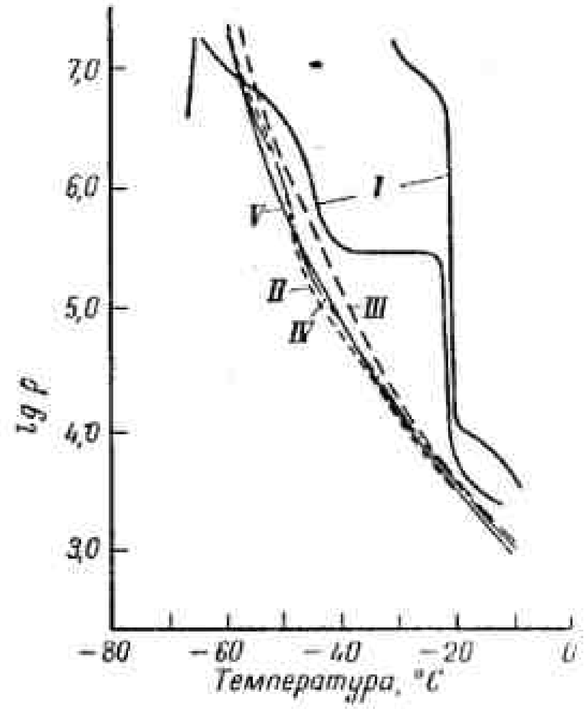
протекать очень медленно. Сегюр [30] говорит, что скорость кристаллизации переохлажденного глицерина в пробирке диаметром 10—12 *мм* при температуре ниже —43° не превышала 0,0001 *мм* в 1 *мин*.

При температурах выше 0° переохлажденный глицерин отличается высокой вязкостью, причем его вязкость достигает примерно 10^{13} *пз* по мере падения температуры до —89°, когда он затвердевает. Данные о вязкости глицерина при различных температурах приводит Сегюр [30]. Он определил также вязкость водных растворов с различной концентрацией глицерина при температурах ниже —40°. Полученные высокие величины позволяют предполагать, что в присутствии глицерина при низких температурах диффузия происходит очень медленно и соответственно понижается скорость физических и химических процессов. Такое соображение может играть

большую роль в вопросе о хранении живых клеток при температурах ниже нуля. Кроме того, растворы с высокой концентрацией глицерина не теряют текучести, несмотря на наличие в них кристаллов льда, при температуре —41,5°. Превращение вязкой жидкости в твердую стекловидную массу происходит только тогда, когда чистый глицерин переохлажден до температуры ниже —83° [30]. Не установлено, влияет ли присутствие электролитов или неэлектролитов на образование «стекловидного» глицерина и имеет ли оно какое-либо значение для хранения живых клеток в потенциально жизнеспособном состоянии.

Много исследований посвящено воздействию глицерина на электролиты в физиологических средах при различных температурах во время замораживания и оттаивания. Так, Рэ [27, 28] разработал специальную методику для изучения термодинамических изменений и электропроводности. Он обнаружил, что при охлаждении уравновешенного солевого раствора Эрла, содержащего 30% глицерина, до —60° удельное сопротивление постепенно повышалось, а при его согревании понижалось таким образом, что обе полученные кривые изменения удельного сопротивления можно наложить друг на друга (см. фиг. 77). Эти результаты находились в явном противоречии с данными, полученными при определении удельного сопротивления во время замораживания и оттаивания раствора Эрла, не содержавшего глицерина. Внезапное резкое повышение удельного сопротивления при температуре около —40° во время замораживания такого раствора, по-видимому, объяснялось полным исчезновением жидкой фазы (см. фиг. 77), которое в присутствии глицерина могло происходить только при температуре ниже —60°. Кривая изменения удельного сопротивления при согревании не содержащего глицерина раствора хлористого натрия резко отличалась от кривых, полученных при охлаждении данного раствора как с примесью глицерина, так и без него. Пока температура не повышалась до —35°, не было никаких признаков понижения удельного сопротивления. На уровне —22° отмечалось резкое падение, а затем от температуры —20 до 0° удельное сопротивление понижалось уже постепенно

(фиг. 82). Резкое его падение во время оттаивания предположительно наступает в эвтектической точке хлористого натрия, являющегося главным (по объему) компонентом раствора Эрла. Эвтектическая точка совершенно не была обнаружена при определении удельного сопротивления содержащих глицерин растворов во время



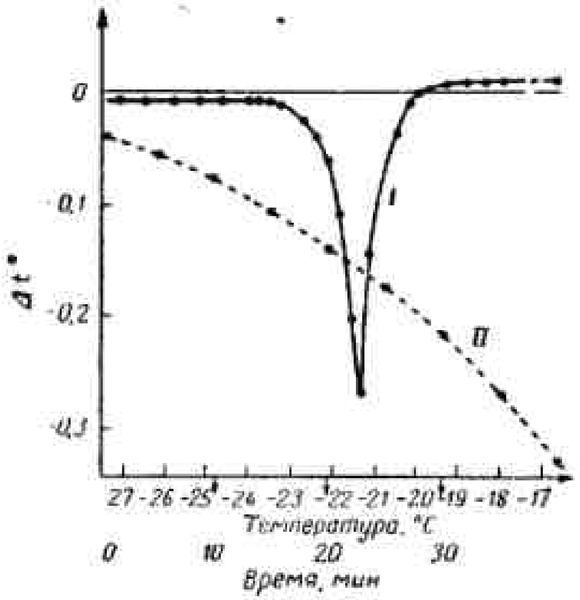
Фиг. 82. Изменение удельного сопротивления ρ водного раствора хлористого натрия во время оттаивания [28].

I — 1-процентный раствор хлористого натрия в дистиллированной воде; *II* — такой же раствор, содержащий 5% глицерина; *III* — такой же раствор, содержащий 10% глицерина; *IV* — такой же раствор, содержащий 20% глицерина; *V* — такой же раствор, содержащий 30% глицерина.

их замораживания при —60° или последующего оттаивания. При этом поражала исключительная закономерность и полная обратимость кривых.

Термодинамические изменения изучали с помощью дифференциального термического анализа при согревании физиологических сред и сред, содержавших глицерин [27, 28]. Во время оттаивания 1-процентного раствора хлористого натрия в дистиллированной воде при температурах от —22 до —21°, т. е. в том интервале, в котором эвтектическая смесь таяла, отмечалось заметное поглощение тепла (фиг. 83). В присутствии глицерина постепенное таяние начиналось при температурах от —27 до —20°. Разрыв в температуре исследуемого раствора и дистиллированной воды (в соседних пробирках, помещенных в один и тот же сосуд с охлаждающей смесью)

заметно увеличился. Наличие в среде глицерина обусловливает также существенные изменения теплопроводности при температурах от —80 до —20° (фиг. 84). Рэ полагает, что имеются данные о таянии эвтектической смеси глицерин — вода — соль при температурах от —65 до —55°, после чего наступает постепенное таяние льда. Термодинамические изменения происходят также и в со-



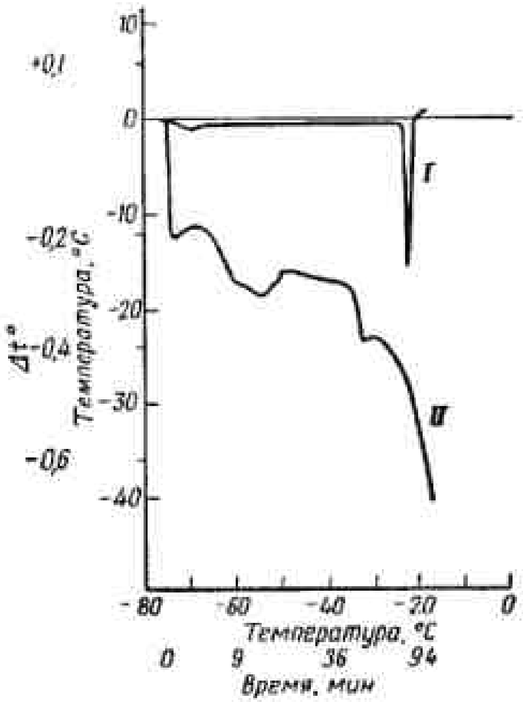
Фиг. 83. Дифференциальный термический анализ 1-процентного водного раствора хлористого натрия во время согревания [28].

Разность температур исследуемого раствора и контрольного (дистиллированная вода) отложена в зависимости от температуры. *I* — разность температур 1-процентного раствора NaCl и контрольного; *II* — разность температур 1-процентного раствора NaCl, содержащего 30% глицерина, и контрольного раствора.

держащих глицерин смесях при температурах от —80 до —160°, но не при —190°. Следовательно, полная физическая стабилизация растворов глицерина наступает только при температуре жидкого азота.

Особые свойства глицерина при низких и очень низких температурах не могут оказывать влияния на последующую выживаемость живых клеток, если эти клетки уже погибли ранее в результате изменений, наступивших в среде во время замораживания и оттаивания при сравнительно высоких температурах (ниже 0°). Существует критический температурный интервал, в пределах которого в клетках млекопитающих, замороженных в физиологическом растворе или в других средах, не содержащих глицерина, происходят повреждения. Для эритроцитов человека этот интервал составляет от —3 до —40°, для бычьих сперматозоидов — от —1,5 до —30°. Лавлок с помощью простых физико-химических методов

изучал действие глицерина и других нейтральных растворенных веществ на среду в этом температурном интервале [5—9]. Первое наиболее явное влияние глицерина на физиологический раствор заключается в понижении температуры замерзания. Это обусловлено просто самим присутствием молекул глицерина, благодаря которому молекулы воды отделяются друг от друга в еще



Фиг. 84. Термодинамические свойства растворов хлористого натрия во время согревания после охлаждения до —80° (дифференциальный термический анализ) [28].

I — разность температур 1-процентного раствора NaCl и контрольного раствора (дистиллированная вода); *II* — разность температур 1-процентного NaCl, содержащего 30% глицерина, и контрольного раствора.

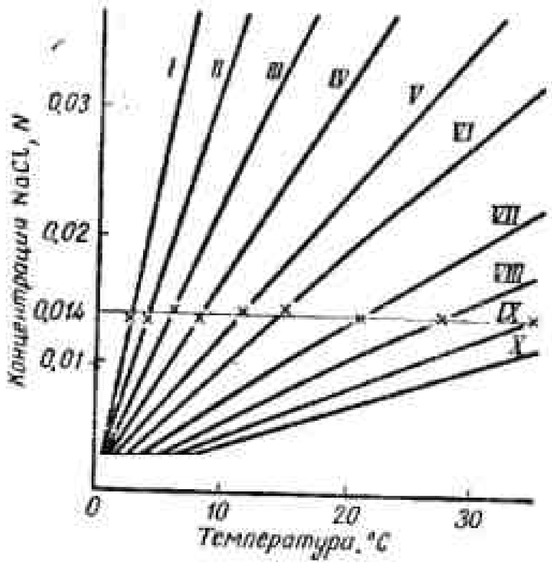
большей степени, чем они уже были отделены в результате присутствия молекул хлористого натрия, и требуется дальнейшее понижение температуры, чтобы молекулы воды смогли образовать характерную для льда структуру. Такое же действие оказывают и другие нейтральные растворенные вещества. Понижение температуры замерзания T можно рассчитать по формуле

$$T = K(2x + y),$$

где x и y — концентрации соответственно хлористого натрия и нейтрального растворенного вещества. Если концентрации выражены в моляльных единицах или в мольных долях, то K будет постоянной величиной, отражающей наблюдаемое понижение температуры замерзания

водных растворов хлористого натрия или какой-либо другой соли на единицу концентрации нейтрального растворенного вещества. Величина K может слегка варьировать в зависимости от природы и от концентраций растворенных веществ. Поскольку лед выпадает в чистом виде, концентрации соли и нейтрального растворенного вещества в процессе замерзания соответственно повышаются.

Лавлок [6] определял состав жидкой фазы при замораживании растворов, содержащих 0,16 M NaCl и различные концентрации глицерина. Полученные им результаты (фиг. 85) показывают, что повышение исходной концентрации глицерина приводит к понижению концентрации хлористого натрия, находящегося в состоянии равновесия со льдом, при любой температуре ниже точки замерзания раствора. Такое же влияние оказывает любое другое нейтральное растворенное вещество, в том числе и диметилсульфоксид, который не относится к многоатомным спиртам. Снижение точки замерзания и дальнейшее падение температуры, необходимое для того, чтобы концентрация электролитов достигла определенного уровня, представляет собой пример проявления коллигативных свойств любых растворов. Уменьшение концентрации электролитов в исходном растворе влечет



Фиг. 85. Концентрация хлористого натрия в жидкой фазе при замораживании 0,16 M раствора NaCl с различными исходными концентрациями глицерина [6].

I — без глицерина; *II* — 0,15 *M* глицерина; *III* — 0,3 *M*; *IV* — 0,5 *M*; *V* — 0,75 *M*; *VI* — 1,0 *M*; *VII* — 1,5 *M*; *VIII* — 2,0 *M*; *IX* — 2,5 *M*; *X* — 3,0 *M* глицерина. Отметка × на каждой линии показывает температуру, при которой впервые наблюдался гемолиз клеток, взвешенных в среде с соответствующей исходной концентрацией глицерина. Горизонтальная линия, пересекающая эти точки, лежит при концентрации NaCl, равной 0,014 *N*, т. е. 0,8 *M* в воде.

за собой понижение их концентрации при любой температуре во время замораживания в присутствии определенного количества нейтрального растворенного вещества. Их концентрация во время замораживания определяется исходным соотношением между числом молекул различных веществ в данном растворе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bull H. B., Physical Biochemistry, 2nd Edn. London, Chapman and Hall, 1951.
2. Edsall J. T., Wyman J., Water and its biological significance. Biophysical chemistry, Vol. 1, Chap. 2, New York, Academic Press, 1958.
3. Glasstone S., Textbook of Physical Chemistry, 2nd Edn, London Macmillan, 1951.
4. Lea C. H., Hawke J. C., Lipovitellin. 2. The influence of water on the stability of Lipovitellin and the effects of freezing and drying, Biochem. J., **52**, 105—114 (1952).
5. Lovelock J. E., The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing, Biochim. biophys. Acta, **10**, 414—426 (1953).
6. Lovelock J. E., The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing, Biochim. biophys. Acta, **11**, 28—36 (1953).
7. Lovelock J. E., Biophysical aspects of the freezing of living cells. Preservation of Normal Tissues for Transplantation, ed. Wolstenholme G. E. W. and Cameron M. P., pp. 131—138, Ciba Foundation Symposium, London, Churchill (1953).
8. Lovelock J. E., The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing, Biochem. J., **56**, 265—270 (1954).
9. Lovelock J. E., Biophysical aspects of the freezing and thawing of living cells, Proc. R. Soc. Med., **47**, 60—62 (1954).
10. Lovelock J. E., Denaturation of lipid-protein complexes as a cause of damage by freezing, Proc. Roy. Soc., B, **147**, 427—433 (1957).
11. Lusena C. V., Ice propagation in systems of biological interest. III. Effect of solutes on nucleation and growth of ice crystals, Arch. Biochem. Biophys., **57**, 277—284 (1955).

12. Lusena C. V., Cook W. H., Ice propagation in systems of biological interest. I. Effect of membranes and solutes in a model cell system, Arch. Biochem. Biophys., **46**, 232—240 (1953).
13. Lusena C. V., Cook W. H., Ice propagation in systems of biological interest. II. Effect of solutes ar rapid cooling rates, Arch. Biochem. Biophys., **50**, 243—251 (1954).
14. Luyet B. J., Survival of cells, tissues and organisms after ultrarapid freezing, Freezing and Drying, ed. Harris R. J. C., pp. 77—98, London, Institute of Biology, 1951.
15. Luyet B. J., On the growth of the ice phase in aqueous colloids, Proc. Roy. Soc., B, **147**, 434—451 (1957).
16. Luyet B. J., On the mechanism of growth of ice crystals in aqueous solutions and on the effect of rapid cooling in hindering crystallization. Recent Research in Freezing and Drying, ed. Parkes A. S. and Smith A. U., pp. 3—22, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1960.
17. Luyet B. J., Gehenio P., Life and Death at Low Temperatures, Normandy, Missouri, Biodynamica, 1940.
18. Luyet B. J., Rapatz G., Patterns of ice formation in some aqueous solutions, Biodynamica, **8**, 1—68 (1958).
19. Meryman H. T., Mechanics of freezing in living cells and tissues, Science, **124**, 515—521 (1956).
20. Meryman H. T., Physical limitations of the rapid freezing methods, Proc. Roy. Soc., B., **147**, 452—459 (1957).
21. Meryman H. T., The mechanisms of freezing in biological systems, Recent Research in Freezing and Drying, ed. Parkes A. S., Smith A. U., pp. 23—39, Oxford, Blackwell Scientific Publications (1960).
22. Meryman H. T., Kafig E., The study of frozen specimens, ice crystals and ice crystal growth by electron microscopy, Res. Rep. N. M. R. I., Maryland, **13**, 529—544 (1955).
23. Moran T., The effect of low temperatures on hen's eggs, Proc. Roy. Soc., B, **98**, 436—456 (1925).
24. Morgan J., Warren B. E., X-ray analysis of the structure of water, J. chem. Physics, **6**, 666—673 (1938).
25. Paul J., Cell and Tissue Culture, Edinburgh, Livingstone, 1959.
26. Pryde J. A., Jones G. O., The properties of vitreous water, Nature, Lond., **170**, 685—688 (1952).

27. Rey L. R., Conservation de la Vie par le Froid, Actulités sci. industr., No. 1279, Paris, Herman, 1959. (Луи Рэ, Консервация жизни холодом, Госмедиздат, М., 1962.)
28. Rey L. R., Study of the freezing and drying of tissues at very low temperatures, Recent Research in Freezing and Drying, ed. Parkes A. S. and Smith A. U., pp. 40—62, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1960.
29. Scholander P. F., Flagg W., Hock R. J., Irving L., Studies on the physiology of frozen plants and animals in the Arctic, J. cell. comp. Physiol., **42**, Suppl., 1, 1—56 (1953).
30. Segur J. B., Physical properties of glycerol and its solutions. Glycerol, A. C. S. Monograph, No. 117, ed. Miner C. S. and Dalton N. N., pp. 238—334, New York, Reinhold, 1953.
31. Smith A. U., Effects of low temperature on living cells and tissues. Biological Applications of Freezing and Drying, Chap. i. ed. Harris R. J. C. New York., Academic Press, 1954. (О. Смит. Влияние низких температур на живые клетки и ткани. См. «Применение замораживания — высушивания в биологии», под ред. Р. Харриса, стр. 9—90, ИЛ, М., 1956.)
32. Smith A. U., Polge C., Smiles J., Microscopic observation of living cells during freezing and thawing, J. R. micr., **71**, 186—195 (1951).
33. Van den Berg L., The effect of addition of sodium and potassium chloride to the reciprocal system: KH_2PO_4—Na_2HPO_4—H_2O on pH and composition during freezing, Arch. Biochem, Biophys., **84**, 305—315 (1959).
34. Van den Berg L., Rose D., Effect of freezing on the pH and composition of sodium and potassium phosphate solutions the reciprocal system KH_2PO_4—Na_2HPO_4—H_2O, Arch. Biochem, Biophys., **81**, 319—329 (1959).
35. Wood T. H., Lethal effects of high and low temperatures on unicellular organisms. Advances in Biological and Medical Physics, Vol. 4, 119—165, New York, Academic Press, 1956.

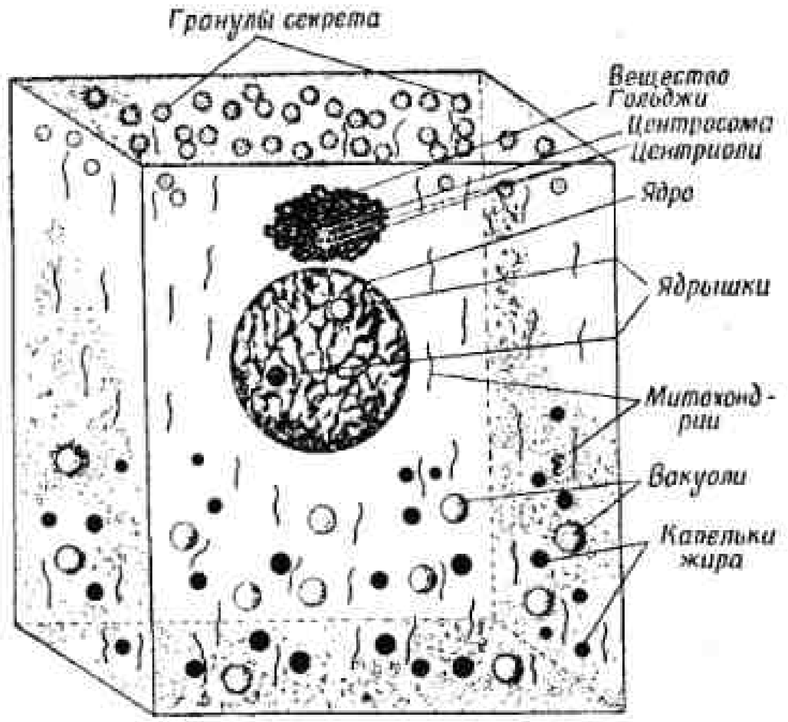
Глава 12

ДЕЙСТВИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА ЖИВОТНЫЕ КЛЕТКИ И ТКАНИ

Судьба одноклеточных организмов, а также клеток и тканей многоклеточных животных зависит не от места их естественного обитания, а от тех изменений, которые происходят в среде, непосредственно окружающей отдельные клетки, и вызывают в свою очередь изменения в их оболочках, цитоплазме и ядрах. В последние годы в связи с появлением новых данных о строении, составе и биохимической деятельности живых клеток пришлось пересмотреть многие положения относительно действия на них различных химических и физических агентов. Так, с помощью электронного микроскопа было показано, что цитоплазма не представляет собой гомогенный гель, а содержит сложную сеть мембран — эндоплазматическую сеть. Изменения нашего представления о живой клетке хорошо видны при сравнении типичных схем строения животной клетки, опубликованных Грессоном [11] и Полом [40] в 1948 и 1959 гг. (фиг. 86 и 87). За эти годы были предприняты попытки установить корреляцию между нормальной биохимической деятельностью митохондрий и других внутриклеточных органелл и их структурой [16]. Большое внимание уделяли также изучению структуры и функции внутри- и внеклеточных мембран.

Биохимические исследования показали, что различные клеточные оболочки содержат большой процент липидов — свободных или связанных с белком. Следует отметить, однако, что точная структура оболочки любого

типа до настоящего времени еще не известна, несмотря на интенсивные исследования, многие из которых проводили на эритроцитах. Изучение проницаемости оболочки для глицерина и других соединений обнаружило существенное различие в физической структуре оболочек эритроцитов у млекопитающих разных видов [8]. Химический



Фиг. 86. Схема строения животной клетки, составленная на основе данных, имевшихся в 1946 г. [11].

состав их также варьирует. Применение газовой хроматографии позволило выявить значительную разницу в содержании различных жирных кислот в липидах из оболочки эритроцитов млекопитающих разных видов [25]. Состав и соотношение различных липидов в оболочке эритроцитов зависит также от возраста, пола, режима питания, температуры окружающей среды и других факторов. С помощью радиоактивных изотопов и других методов было показано наличие постоянного обновления жирных кислот, аминокислот, а также других органических и неорганических компонентов оболочки и цитоплазмы эритроцита. Ясно, что при нормальной темпера-

туре каждая отдельная клетка находится в состоянии динамического равновесия с окружающей ее средой. При понижении температуры это равновесие нарушается [24].

Хуже изучен состав оболочек у других клеток. Скорее всего эти оболочки более сложны, чем оболочки эритроцитов животных тех же видов. Не установлена до сего



Фиг. 87. Схема строения клетки, составленная на основе данных имевшихся в 1959 г. [40].

времени и функция других клеток, например лимфоцитов. Между тем и структура и функция, по-видимому, влияют на реакцию различных клеток на холод и другие агенты. Отсюда ясно, какую величайшую осторожность следует проявлять, перенося выводы, полученные для клеток одного типа, на клетки другого типа, даже если эти клетки принадлежат животному того же вида. И, разумеется, совершенно неприменимы к животным положения, основанные на изучении растительных тканей.

В подавляющем большинстве исследований биологическое действие низких температур изучали на изолированных клетках и тканях в плазме или в искусственных средах in vitro, а не на интактном животном in situ. Такой подход вполне оправдан потому, что некоторые современные тонкие методики можно использовать только

in vitro. Кроме того, результаты этих исследований находят непосредственное применение при решении проблемы хранения клеток и тканей в жизнеспособном состоянии для будущих опытов и использования их в терапевтических целях. Изучение разных типов клеток, принадлежащих млекопитающим различных видов и животным других классов, дает иногда самые разнообразные результаты. Противоречивые и по-разному интерпретируемые результаты могут быть получены вследствие различий в экспериментальных условиях. И все же, несмотря на все указанные трудности, в настоящее время уже начинает складываться какое-то общее представление об опасностях, которым подвергаются живые клетки, особенно клетки млекопитающих, при охлаждении их в лабораторных условиях до низких температур. Получены данные, по-новому объясняющие механизмы выживания интактных животных, подвергающихся воздействию низких температур в естественных условиях. В некоторых исследованиях не требовалось применения сложных методов, в других — для изучения биологического действия низких температур приходилось прибегать к сложной аппаратуре.

Данные микроскопического исследования

НАБЛЮДЕНИЕ ЖИВЫХ КЛЕТОК НЕПОСРЕДСТВЕННО ПОД МИКРОСКОПОМ

Много лет назад Левенгук и Спалланцани, замораживая под микроскопом каплю воды, наблюдали метавшихся в ней крошечных животных, несмотря на образование кристаллов льда. Эти животные сохраняли активность, пока не вымерзала вся вода. Некоторые из них оживали, как только замороженную каплю воды оттаивали. Уже в наше время Чемберс и Гэйл [6] установили, что пресноводных амеб и окружающую их воду можно переохлаждать до температуры —5°. При этой температуре наблюдались некоторые изменения формы амебы и движения жидкости внутри ее, но пелликула, по-видимому, затвердевала. Примечательно, что при температуре —1,4°, когда вода, окружающая амебу, уже замер-

зала, внутренняя среда ее сохраняла жидкое состояние самопроизвольно. Иногда наступала кристаллизация льда и во внутренней среде. Такое замораживание всегда можно было осуществить при температуре ниже —0,8°, проколов клеточную оболочку микропипеткой с кристалликом льда на ее конце. После такого промораживания изнутри амебы никогда не оживали.

Использование простого замораживающего предметного стекла облегчило наблюдение амеб под микроскопом при более низких температурах [51]. Наши наблюдения подтвердили, что пресноводные амебы при температуре около —5° переохлаждались. Затем в окружающей среде появлялись кристаллы льда, которые росли до тех пор, пока полностью не окружали амеб. При этом края кристаллов были закруглены, а рост их сдерживался присутствием амеб, у которых они, по всей видимости, не вызывали никаких повреждений. Окруженные кристаллами льда амебы сохраняли свою форму и прозрачность. Когда температура достигала приблизительно —8°, внутренняя среда амебы внезапно темнела и в цитоплазме, а также в вакуолях появлялись мелкие кристаллики. Потемнение обусловливалось рассеянием света с поверхности бесчисленных кристалликов. После оттаивания клеточная оболочка обычно оказывалась разорванной в нескольких местах и цитоплазматические гранулы выпадали в окружающую среду. Удивительно, что растущие в окружающей среде кристаллы льда, по-видимому, не сдавливали амебы. Амебы выдерживали гидростатические давления, в сотни раз превышающие нормальное атмосферное давление при температуре выше нуля. Возможно, другие клетки не обладают такой устойчивостью к сдавливанию, но до настоящего времени еще не доказано, что давление ледяных кристаллов льда является летальным.

Промежуток времени между наступлением вне- и внутриклеточной кристаллизации льда у амеб составлял иногда несколько минут. Клеточные оболочки, по-видимому, были непроницаемы для льда, так же как они непроницаемы для воды при температурах выше нуля. Выделение воды, как полагают, зависит от активных метаболических процессов внутри самой клетки. При понижении интенсивности или прекращении обмена веществ, когда амебы переохлаждены, их оболочки начинают пропускать отдельные молекулы воды или даже целые агрегаты молекул, достаточно крупные, чтобы образовать центр кристаллизации льда. Не ясно, будет ли лед проникать через оболочку внутрь клетки или же молекулы воды будут выделяться из клеток, способствуя образованию кристаллов льда в окружающей среде. При относительно кратковременном изучении не было обнаружено никаких признаков изменения величины амебы после вымерзания окружающей ее среды ни при переохлаждении цитоплазмы, ни после ее замерзания [6, 51]. Нельзя исключить возможность попадания внутрь клетки ультрамикроскопической частицы льда. Нет вещества более водонепроницаемого, чем кутикула насекомых. И тем не менее, если на наружной поверхности переохлажденного насекомого замерзает капля влаги, все тканевые жидкости под кутикулой моментально вымерзают. Это, должно быть, какая-то форма осеменения льдом. Возможно, нечто подобное происходило и с амебами, хотя не было никаких видимых признаков связи между внутри- и внеклеточной кристаллизацией.

Если не вся, то бо́льшая часть воды, вымерзшей внутри амебы, должна была присутствовать в ней ранее и действовать как растворитель содержащихся в цитоплазме электролитов и неэлектролитов, участвующих в обменных процессах. Введенный в незамороженную амебу (при 0° или при температуре чуть ниже 0°) кристалл льда, несомненно, будет представлять собой инородное тело. Спрашивается, можно ли считать инородными телами кристаллы льда, образовавшиеся из молекул воды, уже присутствовавших внутри клетки. Меримэн [31—33] и другие рассматривали их именно как инородные, и всякие сомнения по этому поводу, вероятно, лишены какого-либо смысла. Не раз утверждали, что гибель клеток и их структурный распад после внутриклеточной кристаллизации и оттаивания представляют собой непосредственный результат разрушения их кристаллами льда. В действительности же наблюдение под микроскопом процесса образования льда отнюдь не подтвердило пра-

вильности мнения, согласно которому кристаллы льда вызывают механические нарушения [51]. Гибель клеток после замораживания изнутри приписывали также миграционной перекристаллизации, наступающей после первоначального процесса замораживания [43]. Или же повреждения клеток могут происходить во время таяния кристаллов льда [28, 43].

Препараты живых клеток или тканей млекопитающих и других позвоночных при медленном охлаждении в физиологических средах часто переохлаждаются до температуры —5°, а иногда и до —10 или —15°. После согревания таких незамороженных клеток наблюдалось следующее: волокна поперечнополосатой мышцы лягушки реагировали на раздражение, у сперматозоидов петуха восстанавливалась подвижность, эритроциты человека и других млекопитающих не имели никаких следов повреждений, а оплодотворенные кроличьи яйца нормально дробились. При замерзании кристаллы льда всегда в первую очередь образовывались в среде, окружавшей клетки, или же во внеклеточных тканевых жидкостях. Сами клетки не замерзали, хотя и были окружены кристаллами льда [6, 52]. Чемберс и Гэйл [6] установили, что у мышечных волокон лягушек можно вызвать внутриклеточную кристаллизацию при температурах ниже —1,6° путем прикосновения кристаллом льда к обрезанному концу волокна. Эти авторы наблюдали быстрое распространение льда по поверхности волокна, сопровождавшееся более медленным ростом в цитоплазме столбиков ледяных кристаллов.

Когда препараты ткани семенника морской свинки погружали в раствор Рингера, в переохлажденной среде при температуре от —2 до —5° происходило самопроизвольное замораживание. Клетки оставались незамороженными, пока температура не понижалась до уровня от —6 до —12°. После этого внутри клеток образовывались кристаллики, часто настолько мелкие, что попадавший на них свет рассеивался и клетки внезапно темнели. В других опытах ледяные кристаллы внутри клеток были немного бо́льшие и пропускали какое-то количество света. При этом еще можно было различить контуры замороженных клеток (фото 53, *А* и *Б*). При согревании препаратов в первую очередь оттаивала среда. После таяния внутриклеточных кристаллов льда клеточные оболочки исчезали, оставляя, по-видимому, неповрежденные ядра, окруженные остатками цитоплазмы (фото 53, *В*). Когда ткань семенника морской свинки закрывали силиконом, удалив как можно больше жидкости, клетки и окружающая их среда не замерзали, пока температура не достигала уровня от —5 до —10°. Иногда они оставались в состоянии переохлаждения до —20°. После этого внутри клеток образовывались кристаллы льда, которые продолжали расти до тех пор, пока температура не падала до уровня от —40 до —50°. В окружающей клетки среде ледяных кристаллов не было. После согревания препаратов клетки распадались так же, как и в препаратах, замороженных и согретых в растворе Рингера [52]. Эти опыты имеют важное значение, поскольку они показывают, что при медленном охлаждении клеток млекопитающих внутриклеточная кристаллизация льда может наступить самопроизвольно, независимо от наличия или отсутствия видимых кристаллов во внеклеточном пространстве. При замораживании сперматозоидов млекопитающих, даже если в них образуются кристаллы льда, то вследствие исключительно малого размера клеток их нельзя обнаружить, так как эти кристаллы не могут быть разрешены имеющимися оптическими приборами. Не обнаружены также кристаллы в эритроцитах млекопитающих в промежуток времени между образованием льда в растворе Рингера и наступлением гемолиза [51].

В ткани семенника морской свинки, медленно охлажденной под микроскопом в растворе Рингера с добавлением 15% глицерина, кристаллы образовывались в жидкости, омывающей клетки. Сперматозоиды, сперматиды и другие клетки не подвергались изменениям даже при температуре от —45 до —50°. В этом температурном интервале некоторые более крупные клетки темнели, что указывало на образование в них кристаллов льда. Даже в самых тонких препаратах нельзя было различить, где именно образовывались кристаллы — в ядре или в цитоплазме. На протяжении 15—20 *мин*, пока температура понижалась до —79°, а часто и в течение последующих

20 *мин* при этой температуре бо́льшая часть клеток оставалась светлой и по внешнему виду казалась незамороженной (фото 54, *А* и *Б*). После оттаивания препаратов клетки, в том числе и кристаллизовавшиеся изнутри, оказывались неповрежденными и никаких признаков распада не отмечалось (фото 54, *В*). В опытах с эпителием роговицы также отмечено, что медленно охлаждаемые до —79° клетки роговицы, предварительно обработанные глицерином, сохраняли прозрачность и, по-видимому, не замерзали. К сожалению, не удалось установить, сохранили ли они жизнеспособность. В препаратах ткани семенника с большим количеством жидкости хвосты сперматид были подвижными до и после замораживания, но благодаря наличию кристаллов в среде трудно было определить, какие клетки замерзли изнутри [52]. Полученные весьма важные результаты показывают, что в присутствии глицерина внутренняя среда некоторых клеток хотя бы непродолжительное время остается незамороженной при столь низких температурах, как —79°. Возможно, клетки семенников проницаемы и для воды и для глицерина, и во время замораживания среды вода выходит из клеток в окружающий их остаточный гипертонический раствор и затем превращается в лед и наращивает образовавшиеся вне клеток кристаллы. Одновременно глицерин проникает в клетки, так что его концентрация внутри клеток все повышается, и в конечном счете клетки, вероятно, не могут замерзнуть вследствие сильного обезвоживания. Конечно, не исключена возможность образования ультрамикроскопических кристаллов.

Рэ [43], используя специально сконструированный микроскоп с приспособлением для регулирования и измерения температуры, очень быстро охлаждал фибробласты мышей линии L. В окружающей среде и внутри клеток одновременно образовывались мелкие кристаллики. В процессе медленного согревания при температуре выше —40° наступала миграционная перекристаллизация, в результате которой мельчайшие внутриклеточные кристаллики увеличивались в размере и при —20° клетки разрушались. Судя по внешнему виду клеток, их разрушение, по-видимому, было обусловлено образованием

новых кристаллов. Как подчеркивали Сколендер и сотрудники [49], основная трудность экспериментального замораживания животных в воде заключается в том, что газы попадают в лед, образуя маленькие пузырьки, и вызывают повреждения во время оттаивания. Такие пузырьки образуются также в замороженных тканях [3] и могут привести к разрушению клеток при оттаивании.

Ткани насекомых замораживали при непосредственном наблюдении под микроскопом (см. гл. 9). При медленном охлаждении сердец устойчивых к замораживанию предкуколок *Monema flavescens* кристаллы льда образовывались вне клеток, и сердца после оттаивания начинали сокращаться. При более быстром охлаждении происходила внутриклеточная кристаллизация и сердца после оттаивания уже не сокращались [2]. Сколендер [48], однако, полагает, что было бы неправильным безапелляционно заявлять, что внутриклеточное замораживание неизбежно влечет за собой гибель клеток. Солт [47] недавно показал, что крупные клетки жирового тела золотарниковой мухи-пестрокрылки (*Eurosta solidaginis* Fitch) переживают внутреннее замораживание при температурах от —15 до —25°. Единственное видимое изменение после оттаивания заключалось в слиянии капелек жира внутри клеток. То же наблюдалось и в клетках интактных личинок, которые переживали многократное замораживание и оттаивание или же продолжительное замораживание в естественных условиях. Вряд ли можно сомневаться в том, что внутриклеточная кристаллизация в клетках жирового тела этих насекомых представляет собой вполне обычное явление. Остается лишь выяснить, образуются ли кристаллы льда внутри клеток в других тканях или животных, переживающих замораживание (см. гл. 9).

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гистологические исследования проводили на тканях, медленно охлажденных до —79° и фиксированных при этой температуре абсолютным спиртом или 10-процентным раствором формалина в спирте в течение 3—21 дня.

Фиксированные ткани согревали, обезвоживали, просветляли и заключали; затем приготовляли срезы и окрашивали обычно принятыми способами [9, 12, 13]. Херд [12] установил, что медленное замораживание при —79° вызывало заметные гистологические изменения в свежих тканях печени, сердца, мышц, селезенки, мозга и других органах крыс. Медленно охлаждая печень до —4, —6 и —26° и фиксируя ее при этих температурах, Херд обнаружил, что многие ядра растянулись и в них появились большие палочковидные пространства, заполненные, по его предположению, кристаллами льда. Повторное исследование охлажденного и фиксированного при —79° материала показало, что многие из этих пространств были окаймлены тонкой темной полоской хроматина. Херд пришел к заключению, что в процессе медленного охлаждения внутри ядер образовывались кристаллы льда. Динсли [9] также наблюдала в замороженных и фиксированных при —79° половых железах крысы появление внутри клеток и внутри ядер пространств, по-видимому, образованных кристаллами льда. При этом она отметила также сморщивание всех клеток. Такой же вид имели ткани, предварительно пропитанные средами с глицерином, охлажденные и фиксированные при температуре —79°. Это наблюдение представляет определенный интерес, так как оно позволяет надеяться, что обработанные глицерином половые железы крысы при трансплантации их после замораживания до —79° и оттаивания окажутся жизнеспособными, тогда как половые железы крысы, пропитанные физиологическим раствором, замороженные по тому же способу, не приживали после трансплантации и, по-видимому, погибали. Динсли обратила внимание также на то, что ткани, фиксированные после оттаивания, имели нормальный вид независимо от того, были ли они заморожены в присутствии глицерина, когда хотя бы какая-то часть клеток была потенциально жизнеспособной, или без него, когда подавляющее большинство клеток погибало.

Всякого рода гистологические нарушения всегда очень трудно истолковать. Известно, что многие изменения гистологического и цитологического порядка наступают в тканях во время фиксации при комнатной температуре в результате диффузии, растворения, осаждения и других процесссов. Особенно трудно объяснить появление отверстий в клетках и тканях, поскольку это может быть следствием удаления липидов или других компонентов клетки. Медленное проникновение и действие фиксаторов при низких температурах может вызвать дополнительно какие-то артефакты, помимо тех, которые возникают при температурах выше нуля. Тем не менее нельзя не обратить внимания на наблюдения Херда и Динсли, согласно которым во время медленного охлаждения может происходить внутриядерная кристаллизация льда. Не получены еще ответы на два основных вопроса: переживают ли клетки внутриядерную и внутриклеточную кристаллизацию, а если нет, то не являются ли кристаллы, как таковые, причиной гибели клеток?

ДАННЫЕ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Для электронной микроскопии обычно требуются лиофилизированные образцы материала, замороженного при температуре от —30 до —60°. Высушенные образцы заключают, а затем приготовляют срезы. Полученные препараты, как полагают, сохраняют полностью вид ткани, который она имела в замороженном состоянии, и на них можно различить пустые пространства, показывающие места расположения кристаллов льда. С помощью электронной микроскопии были получены поразительные результаты. Меримэн и Платт [34], например, обнаружили, что при быстром замораживании печени кролика, когда фронт кристаллизации распространялся со скоростью более 6 *мм/мин*, микроскопические кристаллики льда равномерно распределялись внутри и вне клеток, как показывало расположение отверстий в приготовленных препаратах (фото 55, *В*). При скорости распространения фронта кристаллизации 1,6 *мм/мин* кристаллы были крупнее и располагались вне клеток (фото 55, *А*). Размеры внеклеточных кристаллов и сморщивание клеток были еще бо́льшими, когда скорость распространения фронта кристаллизации понизилась до

0,5 *мм/мин*. Подобные результаты были получены и при замораживании волокон поперечно-полосатой мышцы кролика. Примечательно, что образцы замороженной и согретой ткани печени и мышцы с гистологической точки зрения почти не отличались от незамороженных контрольных тканей (фото 55, *Б*).

Внешний вид препаратов медленно замороженных тканей заставляет предполагать, что центры кристаллизации образовывались во внеклеточном пространстве и что по мере их роста они удаляли воду как из этого пространства, так и из самих клеток до тех пор, пока вся присутствующая вода не превращалась в лед. Чем медленнее протекало охлаждение, тем крупнее были кристаллы льда. При быстром охлаждении печени кристаллы, очевидно, образовывались и росли одновременно как внутри, так и вне клеток [31, 34].

Меримэн [30, 33] пришел к выводу, что, если скорость замораживания не очень высока, кристаллы льда образуются только вне отдельных клеток независимо от того, замораживают ли эти клетки в виде ткани или в виде взвеси. По мере роста кристаллов внеклеточное осмотическое давление повышается, в результате чего вода выходит из клеток и вымерзает во внеклеточном пространстве. Следовательно, клетки обезвоживаются и кристаллы льда образуют инертные инородные тела между ними. Исследования, проведенные на собаках, показали, что нога может выжить после того, как в глубоко лежащих тканях температура была в течение 15—30 *мин* ниже точки замерзания [32]. Несомненно, при этом происходила кристаллизация льда, но, как предполагает Меримэн, кристаллы образовывались вне клеток и не причиняли им механического повреждения. Следует, однако, помнить, что при медленном охлаждении, как показали наблюдения непосредственно под микроскопом, кристаллы образовывались не только вне, но и внутри клеток (см. стр 463—469).

В настоящее время уже имеются некоторые данные относительно действия сверхбыстрого охлаждения. Меримэн [33] сообщает, что рентгенографические исследования показали наличие мельчайших кристаллов в препаратах эритроцитов после сверхбыстрого охлаждения

их до очень низких температур. Сейчас еще нет достаточно убедительных доказательств того, что цитоплазма живых клеток может перейти в стекловидное состояние и совершенно не содержать кристаллов льда.

Вейсс и Армстронг [55] изучали с помощью электронного микроскопа цитологические изменения в клетках, согретых после замораживания при —79°. Они использовали для этого взвеси клеток асцитной мышиной саркомы 37 и клеток HeLa (из раковой опухоли шейки матки женщины). Суспензионной средой служил уравновешенный солевой раствор Хэнка, содержащий человеческую сыворотку. В некоторых опытах в раствор добавляли 15% глицерина. Пробы медленно охлаждали до —79° по методике, принятой для охлаждения бычьих сперматозоидов и ткани яичника (см. гл. 2). Затем их быстро отогревали, фиксировали при комнатной температуре и делали срезы. Замороженные и оттаянные клетки наблюдали под фазовоконтрастным, а также под электронным микроскопом и сравнивали с образцами, приготовленными при комнатной температуре. В цитологической характеристике клеток, замороженных без глицерина, отмечались резкие отклонения от нормы (фото 56, *А* и 57). В частности, отделялись друг от друга два слоя ядерной оболочки и между ними образовывались большие пузыри, по-видимому, в результате локализованного расширения оболочки (фото 57). Хроматин ядра склеивался в бесформенные комочки, и некоторые наиболее поврежденные ядра имели характерный бледный вид (фото 56, *А*). При предварительной обработке глицерином все эти явления не наступали (фото 56, *Б*). Плотные ядрышки не повреждались. В цитоплазме также имелись пузыри, причем некоторые из них образовывались внутри двойной мембраны, окружающей митохондрии, как показывают разорванные, но опознаваемые остатки крист. Другие пузыри, по-видимому, были связаны с эндоплазматической сетью. Доля поврежденных клеток была меньшей, а цитологические изменения выражены не так сильно в образцах, замороженных и оттаянных в присутствии глицерина (фото 56, *Б*), хотя глицерин иногда вызывал набухание митохондрий в незамороженных клетках. Клетки HeLa не переживали

замораживания без глицерина, но при обработке глицерином большое число их, судя по размножению в культуре тканей, сохраняло жизнеспособность после замораживания. Клетки саркомы 37 переживали замораживание при —79° в неразбавленной асцитической жидкости или в среде, содержащей глицерин. Когда же их замораживали и оттаивали в уравновешенном солевом растворе, содержащем человеческую сыворотку, но без примеси глицерина, они погибали. Введение этих клеток мышам не вызывало у них образования опухоли [55].

При помощи электронной микроскопии изучали также клетки щитовидной железы и яичника после охлаждения их до —79° в различных средах и последующего оттаивания. Полученные результаты показали, что внутриклеточные мембраны нормальных клеток, в частности эндоплазматическая сеть, получают тяжелые повреждения при замораживании и оттаивании в отсутствие глицерина [1]. Эти результаты особенно интересны и важны, поскольку наблюдавшиеся между двойными мембранами пространства нельзя было приписать образованию ледяных кристаллов, так как материал подвергали оттаиванию до фиксации. Очевидно, внутриклеточные мембраны повреждаются не кристаллами льда в процессе замораживания и оттаивания, а в результате каких-то других изменений. Известно, что различные внутри- и внеклеточные мембраны содержат много липопротеида. Лавлок [25] показал, что в связи с повышением концентрации солей или изменениями pH при вымерзании воды (см. стр. 446—448) молекулы липопротеида особенно чувствительны к повреждениям во время замораживания и оттаивания. Исследования Вейсса и Армстронга подкрепляют тот взгляд, что кристаллы льда не обязательно являются причиной повреждения живых клеток во время охлаждения до низких температур и последующего оттаивания.

Данные микроскопических наблюдений можно суммировать следующим образом.

1. При медленном охлаждении до низких температур живых клеток, взвешенных в обычной физиологической среде, наблюдается тенденция к переохлаждению материала. В точке замерзания или после предшествующего переохлаждения может наступить кристаллизация льда. Кристаллы льда в первую очередь образуются в среде или в тканевых жидкостях, омывающих клетки. По мере понижения температуры некоторые виды клеток постепенно обезвоживаются, так как молекулы воды выходят из клеток во внешнюю среду и там превращаются в лед. Чем медленнее охлаждение, тем больше размер кристаллов. Другие клетки вначале частично обезвоживаются, но затем в них наступает процесс внутриклеточной кристаллизации. Кристаллы льда могут образоваться как в ядре, так и в цитоплазме. Может происходить также миграционная перекристаллизация, в результате которой как внутри, так и вне клеток мелкие кристаллы превращаются в крупные. Особенно часто подобная перекристаллизация наблюдается во время медленного оттаивания и при температуре выше —40°. После оттаивания иногда наблюдается полный распад клеток или же клетки полностью восстанавливают свой нормальный гистологический вид независимо от того, происходила ли внутриклеточная кристаллизация. Клетки млекопитающих, медленно охлажденные до —79° в отсутствие глицерина, редко сохраняют жизнеспособность. Если даже гистологически они выглядят нормальными, под электронным микроскопом обнаруживаются глубокие цитологические изменения. Различные мембраны (цитоплазмы и ядра) получают тяжелые повреждения в результате каких-то других процессов, а не образования кристаллов льда.

2. Во время быстрого охлаждения живых клеток и тканей до низких температур кристаллизация может происходить одновременно внутри самих клеток и в окружающей их среде или в тканевой жидкости. Чем быстрее проводят охлаждение, тем меньше размер первоначально образовавшихся кристаллов. Впоследствии в результате процесса миграционной перекристаллизации размер кристаллов может увеличиться. Этот процесс оказывает разрушающее действие. Согласно общему мнению, клетки не переживают внутриклеточной кристаллизации. В настоящее время правильность этого положения вызывает некоторые сомнения. Известен один тип клеток насекомых, переживающих образование вну-

триклеточных кристаллов как в естественных, так и в экспериментальных условиях [47] (см. гл. 9). Потребуется много исследований для выяснения совместимости внутриклеточной кристаллизации с выживанием клеток после быстрого или медленного охлаждения. Имеются данные, позволяющие предполагать, что в препаратах живых клеток после сверхбыстрого охлаждения образуются крошечные кристаллы, не обнаруживаемые с помощью простого микроскопа. Эти кристаллы, очевидно, располагаются как внутри, так и вне клеток. Тем не менее в некоторых случаях клетки сохраняют жизнеспособность. В настоящее время нельзя окончательно решить, что служит причиной гибели клеток после внутриклеточной кристаллизации — повреждения, причиненные кристаллами льда, или какое-то другое действие, связанное с кристаллизацией.

3. При медленном охлаждении в присутствии глицерина кристаллы образуются и растут в среде, окружающей клетки. Клетки не сморщиваются. При охлаждении до —45° не наблюдается никаких признаков внутриклеточной кристаллизации. Некоторые обработанные глицерином клетки замерзают изнутри при температуре от —45 до —50°. Другие остаются прозрачными и, по-видимому, не промерзают при медленном охлаждении до —79°. Образование ультрамикроскопических кристалликов возможно, но маловероятно, поскольку при медленном охлаждении обычно наблюдается образование крупных кристаллов. В некоторых случаях клетки бывают достаточно водопроницаемыми. Тогда бóльшая часть воды выделяется в окружающую среду и там вымерзает. Одновременно в клетки проникает глицерин, и благодаря повышению его концентрации предотвращается внутриклеточная кристаллизация. В настоящее время еще не выявлено, сохраняют ли жизнеспособность обработанные глицерином клетки, замерзшие изнутри.

4. В связи с такими явлениями, как миграционная перекристаллизация, высвобождение пузырьков газа и т. п., оттаивание может быть более опасным, чем замораживание.

Данные физико-химических исследований

РАННИЕ НАБЛЮДЕНИЯ

Во время замораживания живых клеток концентрация хлористого натрия и других электролитов в окружающей их среде повышается в связи с вымерзанием воды. При согревании по мере таяния льда эта концентрация понижается. Мысль о том, что такие изменения концентрации причиняют клеткам вред, не является новой. Первые данные, подкрепляющие это положение, были получены ботаниками. Так, Горке в 1907 г. обнаружил, что при повышении концентрации солей в результате либо их добавления при температуре выше нуля, либо вымерзания воды при температуре ниже нуля белки в соке чувствительных к холоду растений выпадали в осадок. Морские водоросли разных видов погибают в результате замораживания при специфической температуре. В 1917 г. Кайлин установил, что они погибали при температуре выше нуля, когда их погружали в растворы хлористого натрия, достаточно крепкие, чтобы вызвать понижение точки замерзания до летального уровня [50].

Позднее, в 1925 г., Моран [35] обнаружил, что консистенция яичного желтка, выдерживавшегося в замороженном состоянии при температуре —6°, после согревания не восстанавливалась. Если температура внутри желтка была —6° или ниже, в оплодотворенных яйцах зародыши не развивались. При этой температуре концентрация хлористого натрия в остаточной жидкости в желтке составляла 10%. Лецито-вителлины желтка растворяются в 10-процентном хлористом натрии при температуре от 0 до —10°. В разбавленном растворе или же при таянии льда в желтке, подвергающемся воздействию этой температуры, они денатурируют и выпадают в осадок. Мышечные волокна лягушки, замороженные при температуре ниже —2°, утрачивают характерную раздражимость. При этой температуре 78% воды превращается в лед. Выделение такого же объема воды путем высушивания при температуре выше нуля также приводит к гибели клеток [35—37]. Финн [10] установил, что жидкость, выжатая из мышечных волокон быка, содержала около 90% воды и змерзала при —1,1°. Основ-

ным компонентом ее был хлористый калий, концентрация которого достигала примерно 0,3 *М*. Растворенные белки денатурировали и оставались нерастворимыми, когда эту жидкость подвергали воздействию температуры от —2 до —3°. При такой температуре 78% воды превращалось в лед, концентрация хлористого калия повышалась до 0,8 *М*, а pH сдвигался в кислую сторону (pH 6,0). Денатурацию белка можно было приписать повышению концентрации KCl и падению pH; ее можно было вызвать также при температуре выше 0° путем высушивания и подкисления до такого же pH. В настоящее время хорошо известно, что мышечные волокна, сперматозоиды, эритроциты и многие другие виды клеток млекопитающих повреждаются в результате изменения общей концентрации ионов или ионного равновесия в окружающих их жидкостях. Некоторые из этих клеток особенно чувствительны к изменению pH в тканевой жидкости или суспензионной среде.

ГЕМОЛИЗ ЭРИТРОЦИТОВ ВО ВРЕМЯ ЗАМОРАЖИВАНИЯ И ОТТАИВАНИЯ

Лавлок [18, 19] определял степень гемолиза, наступавшего после оттаивания в пробах эритроцитов, которых замораживали в физиологическом растворе (0,15 *М* NaCl) на 5 *мин* при температуре от —3 до —20°. Кроме того, он готовил взвеси других проб эритроцитов в растворах, содержащих хлористый натрий в таких концентрациях, что они замерзали при этой температуре, и через 5 *мин* определял степень гемолиза. Оставшиеся клетки он переносил в 0,15 *М* раствор NaCl и опять определял степень гемолиза. Полученные результаты показывали, что гемолиз, наступивший в результате замораживания при данной температуре и последующего оттаивания, можно было в точности воспроизвести, инкубируя клетки в течение 5 *мин* при 0° в растворе хлористого натрия, замерзающем при этой температуре, и затем перенося их опять в физиологический раствор.

Когда клетки пребывали в концентрированном растворе хлористого натрия менее 0,5 *мин*, степень гемолиза понижалась (табл. 62).

ТАБЛИЦА 62

Степень гемолиза при выдерживании эритроцитов в течение различного времени в крепких растворах NaCl при 0° и последующем перенесении их в 0,15 *М* раствор NaCl

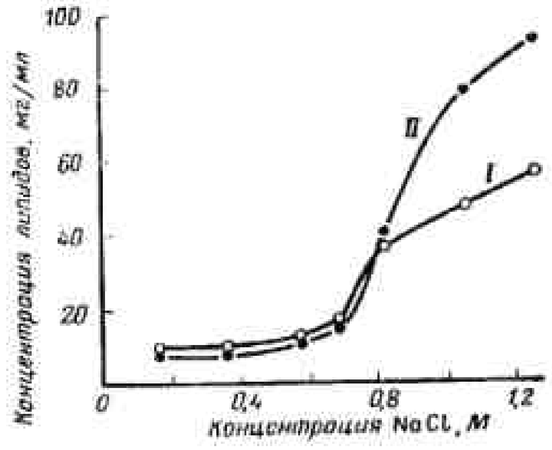
Концентрация NaCl, *М*	Степень гемолиза после инкубирования в течение различного времени, %					
	1 *сек*	2 *сек*	5 *сек*	10 *сек*	30 *сек*	60 *сек*
1,5	2	2	4	8	11	11
3,0	8	15	53	60	64	64
4,0	10	22	60	80	80	80

Ясно, что концентрированный раствор NaCl вызывает разрушения относительно медленно. Лавлок [18] определял степень гемолиза в пробах эритроцитов, замороженных и согретых с различной скоростью. В клетках, подвергавшихся в течение 1,8 и 5 *сек* воздействию температур от —3 до —40°, гемолиз был незначительным, тогда как после воздействия в течение 30 *сек* почти все клетки гемолизировались. Не имело существенного значения, подвергались ли клетки продолжительному воздействию этих критических температур во время замораживания или же во время оттаивания. Степень гемолиза соответственно снижалась, когда эритроциты находились менее 5 *сек* в растворах с концентрацией NaCl более 0,85 *М*.

Лавлок [25] подчеркивает, что чувствительность эритроцитов к изменениям ионной силы суспензионной среды весьма велика. При медленном и умеренно быстром охлаждении до температур ниже нуля эритроциты еще до того, как на них мог бы оказать вредное действие процесс замораживания, неизбежно повреждаются в результате повышения концентрации солей. Критическая концентрация солей достигается в то время, когда температура еще слишком высока, чтобы другие возможные факторы могли причинить клеткам вред. Меримэн [30, 33] согласен с Лавлоком в том, что гемолиз, наступающий при охлаждении эритроцитов до очень низких температур и последующем медленном согревании их, обуслов-

лен продолжительным воздействием концентрированных растворов солей во время образования и таяния льда. Ринфрет [46] считает, что отсутствие гемолиза в пробах крови, которые были охлаждены и согреты с максимальной скоростью, зависит, по крайней мере частично, от того, что таким путем удается избежать продолжительного действия концентрированных растворов солей.

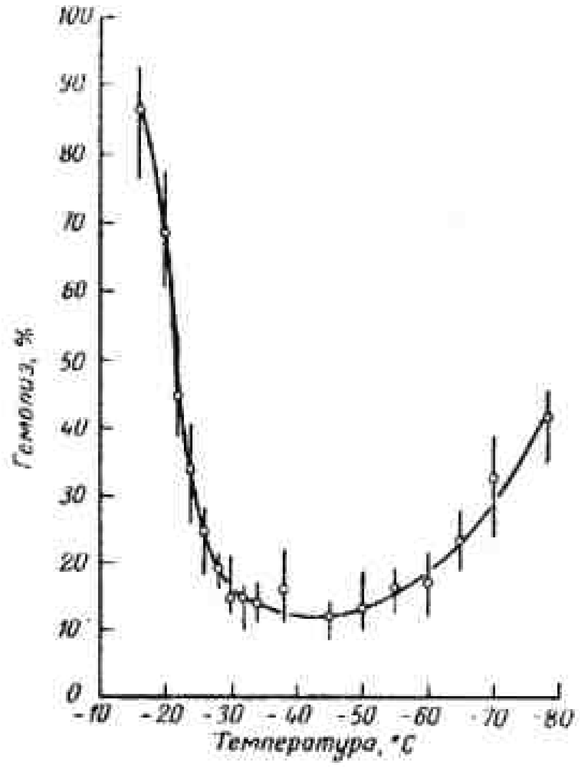
Основная причина лизиса эритроцитов заключается в изменении физической и химической структуры их оболочки, богатой липидами и липидно-белковыми комплексами. Лавлок [20—23, 25] показал, что эритроциты, взвешенные в растворах хлористого натрия при 0°, теряют



Фиг. 88. Концентрации холестерина *(I)* и фосфолипида *(II)* в суспензионной среде после 10 *мин* воздействия на эритроциты человека при 0° растворов хлористого натрия с различной концентрацией [25].

холестерин и фосфолипиды. При повышении концентрации хлористого натрия от 0,16 до 0,85 *М* при 0° или же во время частичного замораживания количество выделяющихся из клеток липидов увеличивается. При концентрации хлористого натрия выше 0,85 *М* по мере усиления выделения липидов соответственно возрастает и выделение фосфолипидов. Результаты анализа суспензионной среды после воздействия на эритроциты растворов NaCl в течение 10 *мин* показаны на фиг. 88. После пребывания в течение 1 *час* в 1,03 *М* растворе NaCl при 0° эритроциты утрачивали 9% холестерина и 26% фосфолипидов. Следовательно, отношение содержания холестерина к содержанию лецитина в клеточной оболочке увеличивалось. Такая избирательная потеря фосфолипидов делает эритроциты проницаемыми для катио-

нов. В результате клетка медленно набухает и в конечном счете разрывается. Или же при возвращении «перегруженных» катионами клеток в физиологический раствор молекулы воды быстро проникают в них, и немедленно наступает лизис. Таковы процессы, протекающие



Фиг. 89. Гемолиз эритроцитов, замороженных в стеклянных капиллярах путем погружения последних в баню с различной температурой [31].

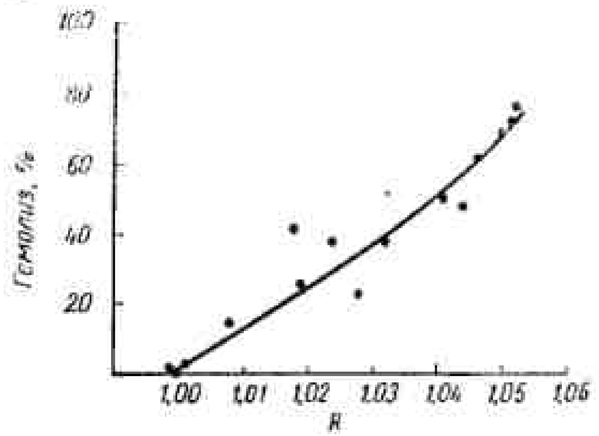
Видно действие различных скоростей охлаждения на выживание клеток

в клетках во время медленного замораживания и оттаивания.

Труднее понять причину гемолиза при чрезвычайно быстром охлаждении эритроцитов. Однако и здесь нет никаких сомнений. И Меримэн, и Люйет считают, что существует оптимальная скорость охлаждения небольших проб эритроцитов до низких температур. При превышении этой скорости часть клеток после оттаивания гемолизируется (фиг. 89). Одни исследователи предполагают, что клетки повреждаются в результате образо-

вания внутриклеточных кристаллов при превышении критической скорости охлаждения [33]. По мнению других, структурные изменения и повреждения оболочки эритроцитов наступают при слишком быстром охлаждении до температур ниже нуля [22, 23].

Нормальные эритроциты в физиологической среде не повреждаются при резком охлаждении до температур выше нуля. Наоборот, эритроциты, подвергшиеся воздействию некоторых животных ядов или бактериальных



Фиг. 90. Гемолиз эритроцитов, взвешенных в растворах хлористого натрия и резко охлажденных от +37 до 0°, в сравнении с отношением (R) содержания холестерина к содержанию лецитина в клеточной оболочке до охлаждения [22].

токсинов, склонны к гемолизу при резком охлаждении от температуры тела или комнатной температуры до 0°. Это связано с наличием в токсинах ферментов, гидролизирующих лецитин в оболочках эритроцитов [22, 23]. Лавлок [18, 22, 23] установил, что эритроциты могут стать чувствительными также к резкому охлаждению до температуры выше нуля, если их взвесить в гипертонических солевых растворах с концентрацией NaCl более 0,8 *М*. В своих опытах он определял потерю клетками липидов и рассчитывал отношение между оставшимися в клетках холестерином и лецитином. Чем выше было отношение содержания холестерина к содержанию лецитина, тем бóльшая доля клеток гемолизировалась после резкого охлаждения от +37 до 0° (фиг. 90). Долю гемолизировавшихся клеток можно было сократить, добавив лецитин в среду, в которой клетки были взвешены до охлаждения, и, наоборот, степень гемолиза повышалась при добавлении в среду холестерина. Кроме того, гемолиз

усиливался при добавлении в среду α-токсина *Clostridium welchii*, содержащего лецитиназу.

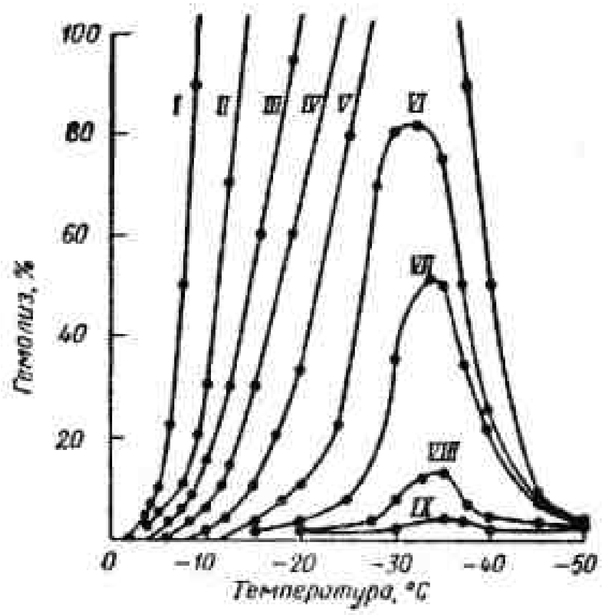
Согласно одной из существующих теорий, оболочка эритроцита состоит из волокон липопротеида эленина, расположенных параллельно поверхности клетки и скрепленных между собой липидами [38]. Лавлок [22, 23] высказал предположение, что температурный шок при температурах выше нуля обусловлен физическими изменениями, вызываемыми повышением относительного содержания холестерина в цементирующих липидах. Холестерин плавится при 148,5°, тогда как лецитин становится мягким уже при 0°. Таким образом, чем больше отношение содержания холестерина к содержанию лецитина, тем тверже цементирующее вещество при температурах как выше, так и ниже нуля. При очень быстром охлаждении клеток до температур ниже нуля цементирующие липиды испытывали резкое напряжение. Если они затвердевали и становились хрупкими, то могли ломаться. Не исключено, что основной причиной температурного шока при температурах ниже нуля было разное сжатие различных компонентов клеточной стенки. Пока мы не имеем более точных данных о структуре оболочек эритроцитов и других клеток, мы не можем делать никаких окончательных выводов о природе температурного шока при температурах выше и ниже нуля. Результаты, полученные при медленном или быстром охлаждении эритроцитов млекопитающих до очень низких температур, и различные теории, возникшие на их основе, вряд ли могут объяснить чувствительность к холоду у пойкилотермных животных и у растений. Критические замечания по поводу исследований Лавлока исходят из данных, полученных на растениях [17], и, следовательно, не могут быть убедительными.

ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ГЛИЦЕРИНА ПРИ ОХЛАЖДЕНИИ ЭРИТРОЦИТОВ ДО НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР

Лавлок [19] определял долю гемолизировавших эритроцитов в пробах, содержавших глицерин в разной концентрации и замороженных на 10 *мин* при различных температурах (фиг. 91). Полученные им результаты по-

казывают, что чем выше концентрация глицерина, тем ниже температура, при которой начинается гемолиз, и тем меньше диапазон температур, при которых он происходит.

Глицерин, добавленный в физиологический раствор, используемый в качестве суспензионной среды, понижает концентрацию хлористого натрия и приводит его в



Фиг. 91. Гемолиз эритроцитов, взвешенных в 0,16 *М* растворе NaCl с различной концентрацией глицерина [19].

I — без глицерина; *II* — в 0,15 *М* глицерине; *III* — в 0,3 *М*; *IV* — в 0,5 *М*; *V* — в 0,75 *М*; *VI* — в 1,0 *М*; *VII* — в 1,5 *М*; *VIII* — в 2,0 *М*; *IX* — в 2,5 *М* глицерине. Во всех опытах клетки замораживали на 10 *мин* при указанных температурах.

равновесное состояние со льдом при различных температурах. Такое действие глицерина было объяснено выше (см. стр. 454—457). При любой концентрации глицерина гемолиз всегда начинается при такой температуре, при которой концентрация соли, находящейся в равновесном состоянии со льдом, достигает 0,8 *М*. В незамороженной среде, при 0° или выше, такая концентрация хлористого натрия быстро оказывает разрушающее действие на эритроциты. Когда в опытах Лавлока исходная концентрация NaCl составляла 0,16 *М*, а исходная концентрация глицерина 2,5 *М*, никакого гемолиза не наблюдалось при температуре выше —30 и ниже —50°. Незначительный гемолиз происходил при температуре от —30 до —40°. Количество клеток, гемолизировавшихся за 10 *мин* при —30° в средах с примесью 1,0, 1,5 и 2,0 *М* глицерина, можно было уменьшить, понизив исходную концентрацию соли до 0,12 *М*, и, наоборот, увеличить,

повысив исходную концентрацию соли с 0,2 до 0,6 *М*. Полученные результаты позволяют предполагать, что основное действие глицерина заключается в том, что он служит буфером для солей в среде, окружающей клетки после начала вымерзания воды. Именно отношение между исходными молярными концентрациями глицерина и солей предопределяет температуру, при которой клетки начинают повреждаться.

Эритроциты человека крайне проницаемы для глицерина, содержащегося в обычных физиологических средах. В присутствии ионов меди они становятся непроницаемыми для глицерина при 0° и начинают медленно пропускать его лишь при температуре +37°. Лавлок определял долю эритроцитов, гемолизировавшихся после замораживания при различных температурах в присутствии 1,5 или 2,5 *М* глицерина и небольшого количества меди ($3 \cdot 10^{-5}$ *М*). В пробах, замороженных непосредственно после суспензирования, было много гемолизировавших клеток. Значительно меньше их было в тех случаях, когда пробы до замораживания инкубировали в течение 20 *мин* при +40° (табл. 63). Полученные результаты показывают, что избежать гемолиза во время замораживания клеток при —80°, хранения их при этой

ТАБЛИЦА 63

Гемолиз замороженных эритроцитов, ставших непроницаемыми для глицерина благодаря присутствию меди [19]*

Концентрация глицерина, *М*	Инкубация до замораживания	Гемолиз при различной температуре, %			
		−15°	−20°	−25°	−80°
2,5	Без инкубации	11,5	21,5	42	33
2,5	20 *мин* при +40°	1,0	1,5	2,0	3,0
1,5	Без инкубации	18,0	28	49	37
1,5	20 *мин* при +40°	2,0	3,0	7,0	3,5

* Клетки суспендировали в 1,5 и 2,5 *М* растворе глицерина, содержащем 0,16 *М* NaCl и $3 \cdot 10^{-5}$ *М* Cu^{++}, при 0°. Одну часть клеток замораживали сразу же, а другую — после предварительной инкубации в течение 20 *мин* при +40°. Замораживание при указанных температурах продолжалось 10 *мин*.

температуре и оттаивания можно только при условии, что клетки проницаемы для глицерина. Эритроциты крупного рогатого скота значительно менее проницаемы для глицерина, чем эритроциты человека или кролика. Интересно, что глицерин не защищает эритроциты быка от гемолиза во время их замораживания при низких температурах и оттаивания. Отсюда напрашивается следующий вывод. Для того чтобы защитить клетки от вредного действия повышенной концентрации солей калия внутри клеток, а также повышенной концентрации солей натрия в окружающей их среде, глицерин должен проникать внутрь клеток до замораживания. Непроницаемые для глицерина клетки частично обезвоживались при высокой его концентрации в окружающей их среде. Их гемолиз при замораживании и оттаивании показывает, что защита клеток от повреждения во время замораживания не зависит от уменьшения содержания воды, а защитное действие глицерина выражается не только в дегидратации цитоплазмы.

Эритроциты человека суспендировали в растворах, содержащих 1—2 *M* NaCl и 0—5 *M* глицерин. Через 10 *мин* их переносили в 20 раз больший объем раствора

ТАБЛИЦА 64

Действие глицерина на гемолиз при перенесении эритроцитов из крепкого раствора NaCl в 0,16 *M* раствор NaCl

Концентрация глицерина, *M*	Гемолиз после перенесения эритроцитов из растворов NaCl различной концентрации, %		
	1,05 *M*	1,5 *M*	2,0 *M*
5,2	16	39	—
3,7	15	39	65
2,9	15	38	60
2,2	15	39	62
1,5	12	34	53
0,7	12	34	62
0,0	10	33	51

с примесью 0,16 *M* NaCl и исходной концентрацией глицерина. Полученные результаты, приведенные в табл. 64, показывают, что степень гемолиза была приблизительно одинаковой как в присутствии глицерина, так и без него. Этот опыт подтвердил, что глицерин не предотвращает разрушения клеток при резком перенесении их из крепкого солевого раствора в слабый [19]. Мы подчеркиваем это обстоятельство, так как позднее Рэ [42, 43] и другие авторы установили, что глицерин защищает клетки от осмотического шока во время замораживания и согревания и что согревание для клеток таит в себе бо́льшую опасность, чем замораживание. Результаты, полученные Рэ, показывают, что в присутствии глицерина эвтектическая точка при оттаивании не бывает так резко выражена и среда постепенно разбавляется льдом, который тает при температуре от —35 до 1°. Таким образом устраняется опасность развития осмотического шока. Следовательно, эти результаты находятся в соответствии с данными Лавлока.

Отсутствие резко выраженной эвтектической точки во время замораживания в присутствии глицерина также способствует выживанию клеток. В отсутствие же глицерина большинство клеток претерпевает необратимые изменения еще до того, как в результате повышения концентрации достигается эвтектическая точка. В среде, содержащей глицерин, концентрация хлористого натрия во время охлаждения продолжает повышаться по крайней мере вплоть до —60°, но скорость разрушения эритроцитов значительно меньше при температурах ниже —35°. Частично это обусловлено повышением вязкости благодаря высокому содержанию глицерина в остаточной среде в указанном интервале температур. Меримэн [31—33] установил, что при низких температурах молекулы глицерина связывают молекулы воды. По его мнению, это может играть важную роль в предотвращении повреждений, возникающих в противном случае при медленном охлаждении клеток и хранении их при низких температурах. Таким образом, здесь в других выражениях пересказывается положение о понижении точки замерзания и уменьшении концентрации других растворенных веществ при низких температурах в растворах,

содержащих глицерин. В настоящее время нет никаких данных, показывающих, что при низких температурах молекулы воды лучше связываются с помощью водородных связей молекулами глицерина, чем другими молекулами воды. Не исключено, что концентрированные растворы глицерина при низких температурах в присутствии кристаллов льда остаются либо пересыщенными, либо переохлажденными.

ПРЕДОТВРАЩЕНИЕ РАЗРУШЕНИЯ КЛЕТОК ВО ВРЕМЯ ХРАНЕНИЯ ИХ ПРИ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Рэ [42, 43] обнаружил в средах с высокими концентрациями глицерина термодинамические изменения, происходящие при температурах ниже —80°. Эти изменения показывают, что глицерин при температуре от —87 до —112° переходит в стекловидное состояние. Рэ полагает, что в цитоплазме клеток при медленном охлаждении до низких температур в средах с высоким содержанием глицерина наступает витрификация. По его мнению, витрификации внутренней среды клеток способствует наличие в цитоплазме макромолекул. Наиболее опасным фактором для живых клеток, хранящихся при температурах выше —75°, Рэ считает миграционную перекристаллизацию. Маленькие кристаллики льда, первоначально образовавшиеся в присутствии глицерина, превращаются в большие кристаллы, которые повреждают внутриклеточные структуры. В связи с этим Рэ рекомендует во избежание перекристаллизации льда консервировать клетки при температуре ниже —75°, а предпочтительно ниже —120°, сохраняя, таким образом, глицерин и все компоненты цитоплазмы в стекловидном состоянии.

Другое объяснение медленного разрушения клеток во время хранения их при низких температурах заключается в том, что глицерин становится очень вязким, но остается в жидком состоянии до температуры около —80° и количества растворенного в нем хлористого натрия вполне достаточно, чтобы оказывать медленное разрушающее действие на эритроциты. Повреждения эритроцитов при —79° можно ослабить, заменив в среде

хлористый натрий цитратом натрия. Цитратные ионы меньше гидратируются, чем ионы хлора, и во время хранения эритроцитов при температурах выше нуля вызывают меньшую потерю липидов [19—23]. Восстановление эритроцитов, оттаявших после продолжительного хранения при низкой температуре, также улучшается, если концентрацию глицерина в исходной среде повышают до 3,0 *М*. Добавление декстрозы и фосфатного буфера при pH 7,0 способствует дальнейшему сохранению жизнеспособности эритроцитов человека при —79° [7, 14]. Если концентрация глицерина в среде достигает 4,5 *М*, эритроциты можно хранить при —45° в течение не менее 1 года без возникновения гемолиза или потери аденозинтрифосфата; не уменьшается и продолжительность их жизни после переливания [14].

ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ДРУГИХ НЕЙТРАЛЬНЫХ РАСТВОРЕННЫХ ВЕЩЕСТВ НА ЭРИТРОЦИТЫ ВО ВРЕМЯ ЗАМОРАЖИВАНИЯ И ОТТАИВАНИЯ

Если защитное действие глицерина на эритроциты в процессе их замораживания и оттаивания объясняется лишь коллигативными свойствами растворов, то подобное действие должны оказывать и другие нейтральные растворенные вещества. Лавлок [21] испытывал защитное действие 15 растворимых веществ, в том числе одно-, двух- и многоатомных спиртов, моно- и дисахаридов, а также амидов. Оказалось, что одни вещества, в том числе этиленгликоль и диэтиленгликоль в надлежащих концентрациях, защищали эритроциты человека от гемолиза после замораживания при любой температуре между —3 и —80° и последующего оттаивания. Другие вещества, такие, как метанол, этанол, ацетамид, формамид и пропиленгликоль, защищали клетки, замороженные при температурах от 0 до —30° или —40°, но не ниже. Все эти вещества быстро проникали в клетки. Вещества первой группы даже в высоких концентрациях при 0° не оказывали токсического действия. Вещества второй группы в высоких концентрациях при температурах выше 0° вызывали гемолиз незамороженных эритроцитов. Возможно, гемолиз в пробах, охлажденных

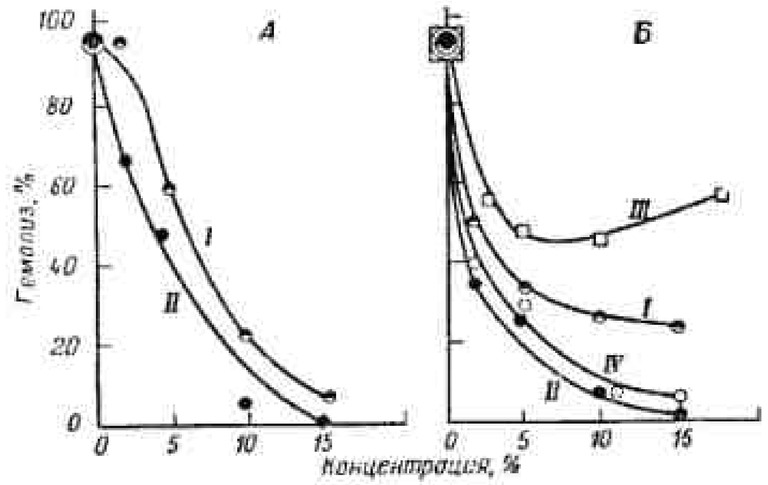
до температуры ниже —30 или —40°, объясняется повышением концентрации нейтральных растворенных веществ второй группы до критического уровня. В третью группу входили такие вещества, как глюкоза, эритрит и ксилоза, которые не полностью защищали эритроциты от повреждения во время замораживания при любой температуре. Эритроциты были лишь частично проницаемы для веществ этой группы. Вещества четвертой группы, к которой относились сахароза и полиэтиленгликоль, совсем не защищали (или защищали в очень малой степени) эритроциты от повреждений во время замораживания при различных температурах. Эритроциты были для них совершенно непроницаемы.

Лавлок [21] пришел к выводу, что защитный агент, действующий в качестве буфера для солей при замораживании эритроцитов, должен хорошо растворяться в водных солевых растворах при температурах между +40 и —40°. Он должен легко и быстро проникать в клетки и иметь небольшой молекулярный вес. Кроме того, он не должен оказывать токсическое действие на клетки или вызывать у них повреждения даже при высокой его концентрации в суспензионной среде. Наконец, им не может быть вещество, обычно используемое для приготовления физиологических сред.

Из всех испытывавшихся Лавлоком [21] веществ наиболее эффективным в отношении защиты эритроцитов человека оказался глицерин. Глицерин не предотвращает гемолиза бычьих эритроцитов во время их замораживания и оттаивания, по-видимому, по той причине, что он не проникает в них. Недавно Лавлок и Бишоп [26] установили, что диметилсульфоксид легко проникает как в человеческие, так и в бычьи эритроциты. При концентрации 15% (по весу) он предотвращал наступление гемолиза во время охлаждения до любой температуры от 0 и до —79°, а также последующего оттаивания (фиг. 92). Получены данные, показывающие, что молекулы диметилсульфоксида способны связывать молекулы воды с помощью водородных связей при любой температуре. Водные растворы диметилсульфоксида также способны переохлаждаться, но пока еще не известно, могут ли они переходить в стекловидное состояние. Нет

оснований предполагать, что защитное действие этого вещества на живые клетки при низких температурах зависит от водородных связей. Наоборот, имеющиеся в нашем распоряжении данные позволяют думать, что такое действие обусловлено коллигативными свойствами вещества в растворе.

Эритроциты во многих отношениях отличаются от других клеток млекопитающих. Например, у них нет ядра и они не делятся. Трудно допустить, что в других



Фиг. 92. Защитное действие глицерина и диметилсульфоксида против гемолиза эритроцитов человека (*А*) и быка (*Б*) при замораживании и оттаивании [26].

I — после предварительной обработки глицерином в течение 30 *сек*; *II* — после предварительной обработки диметилсульфоксидом в течение 30 *сек*; *III* — после предварительной обработки глицерином в течение 2 *час*; *IV* — после предварительной обработки диметилсульфоксидом в течение 2 *час*.

клетках повреждения во время замораживания и оттаивания будут развиваться точно таким же образом, как и в эритроцитах, а защита от этих повреждений будет основана на тех же принципах. Лавлок [25] полагал, что в некоторых случаях источником повреждений клеток могут быть изменения концентрации водородных ионов или таких веществ, как мочевина и антибиотики, происходящие во время вымерзания воды в плазме или сложных средах. Лизис может служить показателем повреждения только в случае эритроцитов, но не других клеток. Поэтому делались попытки оценивать действие

концентрированных растворов солей и замораживания в присутствии и в отсутствие глицерина на подвижность сперматозоидов различных животных.

УТРАТА СПЕРМАТОЗОИДАМИ ПОДВИЖНОСТИ ВО ВРЕМЯ МЕДЛЕННОГО И БЫСТРОГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ И ОТТАИВАНИЯ; ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ГЛИЦЕРИНА И ДРУГИХ НЕЙТРАЛЬНЫХ РАСТВОРЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

Сперматозоиды различных животных обладают разной степенью устойчивости к изменениям концентрации солей в окружающей их среде. Так, при повышении концентрации среды от 0,12 до 0,32 *М* сперматозоиды кролика полностью и безвозвратно утрачивают подвижность. В то же время сперматозоиды селедки отличаются высокой активностью в морской воде с концентрацией электролитов 0,68 *М*. Необратимые повреждения наступают у них только тогда, когда концентрация повышается до 1,7 *М* [27]. Лавлок и Полдж [27] определяли уровень температуры, ниже которого сперматозоиды кролика, быка, петуха и селедки претерпевают необратимые повреждения. Кроме того, они определяли концентрации электролитов x_D, наносившие необратимые повреждения сперматозоидам указанных выше животных в течение 10-минутного инкубирования при 0°. Точки замерзания растворов с концентрацией электролитов x_D сравнивали с температурой T , которая считалась летальной. Полученные результаты (табл. 65) показывают, что существует удивительное совпадение между расчетной и наблюдавшейся летальной температурой. Воздействие повышенной концентрацией солей в момент вымерзания воды было, вероятно, первой и наиболее важной причиной повреждений сперматозоидов. При этом повреждения наступали при температурах на много градусов выше эвтектической точки и при концентрациях солей значительно более низких, чем в эвтектических смесях (см. табл. 65).

Лавлок рассчитал наименьшее количество глицерина, требующееся теоретически для защиты сперматозоидов разных видов во время замораживания при различных температурах, исходя из того, что защитное

ТАБЛИЦА 65

Сравнение расчетных и наблюдавшихся температур, ниже которых сперматозоиды при замораживании претерпевали необратимые повреждения

Виды клеток	Суспензионная среда	Концентрация электролитов x в среде M	x_D, M	T_D, °C	
				расчетная	наблюдавшаяся
Сперматозоиды кролика	NaCl	0,12	0,32	—1,2	—1,0
Сперматозоиды быка	Цитрат натрия	0,09	0,18	—1,5	—1,5
Сперматозоиды петуха	NaCl	0,15	0,35	—1,5	—2,0
Сперматозоиды селедки	Морская вода	0,68	1,7	—6,2	—6,0
Эритроциты человека	NaCl	0,15	0,9	—3,2	—3,0

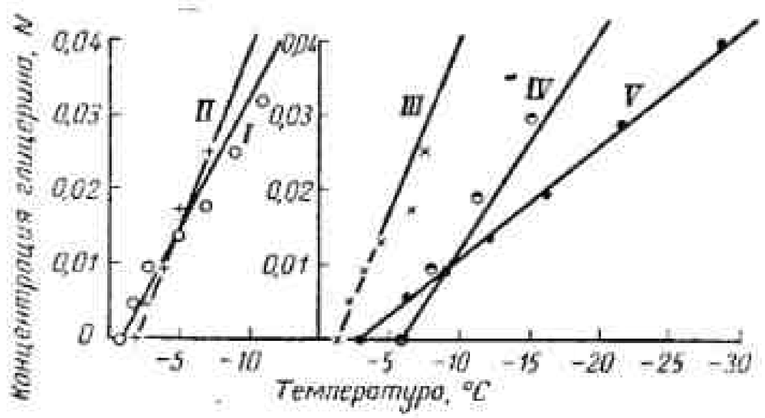
действие зависит от коллигативных свойств растворов, и вывел следующее уравнение:

$$y=\frac{T_D-2Kx_D}{Kx_{D;x}}=\left(\frac{T_D}{Kx_D}-2\right)x,$$

где y — концентрация глицерина, необходимая для защиты от необратимых повреждений; x — концентрация электролита в суспензионной среде; x_D — концентрация электролита, при которой наступают первые повреждения; T_D — температура ниже 0°, при которой появляются первые повреждения; K — постоянная, обозначающая понижение точки замерзания водного раствора на единицу концентрации растворенного вещества [27].

Величины x и x_D, приведенные в табл. 65, использовали для расчета концентрации глицерина, теоретически оказывающей защитное действие на сперматозоиды разных видов во время замораживания при различных температурах. Полученные результаты графически представлены на фиг. 93 (сплошные линии).

Концентрации глицерина, необходимые для защиты сперматозоидов разных видов во время замораживания при различных температурах и последующего оттаивания, определяли опытным путем, наблюдая подвижность этих сперматозоидов при замораживании в различных концентрациях (фиг. 93). Наблюдается поразительное соответствие между расчетной и требуемой на практике



Фиг. 93. Связь между концентрацией глицерина (выраженной в мольных долях) и температурой, до которой можно охлаждать сперматозоиды без потери ими подвижности [27].

Сплошные линии — теоретически необходимая концентрация глицерина; точки — концентрация, требовавшаяся на практике. *I* — сперматозоиды кролика; *II* — сперматозоиды быка; *III* — сперматозоиды петуха; *IV* — сперматозоиды селедки; *V* — данные, полученные на эритроцитах человека (показателем повреждения служил гемолиз клеток).

концентрацией глицерина, обеспечивающей защиту от повреждений во время замораживания при различных температурах [27].

Результаты этих опытов на сперматозоидах 4 видов животных лишний раз подтверждают правильность представления, что защитное действие глицерина во время замораживания обусловлено его способностью предотвращать повышение концентрации солей до критического уровня при температуре ниже —30°. Это исключает возможность того, что глицерин оказывает защитное действие другими путями при более низких температурах или на сперматозоиды других животных, или на иные клетки во время их замораживания, хранения при низких температурах и последующего оттаивания.

До настоящего времени единственным нейтральным растворимым веществом, так же эффективно защищающим сперматозоиды быка при их замораживании и оттаивании, как глицерин, является диметилсульфоксид [26]. Другие вещества, в том числе метанол, ацетамид и сахара, оказались токсичными в высоких концентрациях и менее эффективно, чем глицерин, защищали сперматозоиды от необратимой потери подвижности во время замораживания при различных температурах [41].

Сперматозоиды быка крайне чувствительны к температурному шоку и теряют подвижность при резком понижении температуры от +38 до 0°. Они становятся неподвижными также при слишком быстром охлаждении до температур ниже нуля в среде, содержащей глицерин. Тяжесть шока можно ослабить, добавив в среду, в которой разбавлена сперма, яичный желток или молоко. В яичном желтке агентом, защищающим от температурного шока, служит лецитин, и существует предположение, что резкое падение температуры вызывает удаление лецитина из оболочки сперматозоида. Усилить тяжесть шока можно, добавив в разбавитель спермы холестерин или токсин *Clostridium welchii* [22, 23]. Результаты опытов (табл. 66) аналогичны тем, которые были получены на эритроцитах. Следовательно, суще-

ТАБЛИЦА 66

Влияние изменения состава суспензионной среды на потерю бычьими сперматозоидами подвижности при температурном шоке

Вещество, растворенное в 0,16 *M* NaCl при pH 7,0	Продолжительность инкубации при 30°, *мин*	Подвижность при 30° в присутствии указанного вещества			Подвижность после резкого охлаждения до 0° в присутствии указанного вещества		
		0,0 *мг/мл*	0,1 *мг/мл*	0,4 *мг/мл*	0,0 *мг/мл*	0,1 *мг/мл*	0,4 *мг/мл*
Лецитин яйца	15	7	8	8	1	2	4
Холестерин	15	7	7	6	1	1	0
Токсин *Clostridium welchii*	15	7	7	6	2	1	0

ствует некоторое сходство между химическим составом и физическими свойствами при низких температурах у оболочек эритроцитов человека и сперматозоидов быка.

ДЕЙСТВИЕ КОНЦЕНТРИРОВАННЫХ РАСТВОРОВ СОЛЕЙ, А ТАКЖЕ ПОВРЕЖДАЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ И ОТТАИВАНИЯ НА КЛЕТКИ ДРУГИХ ТИПОВ

Возможность гибели клеток во время замораживания и оттаивания в результате повышения концентрации солей в среде подверглась количественной и качественной проверке на клетках самых различных типов. За счет летального действия концентрированных растворов солей можно в известной степени отнести гибель некоторых видов бактерий после неоднократного замораживания и оттаивания, а также после консервации при температурах от 0 до —30° [56] (см. гл. 6). Этим же объясняется защитное действие глицерина на микроорганизмы.

Однако не все явления объясняются так просто. Например, относительное число некоторых патогенных простейших, а также некоторых опухолевых клеток, переживающих медленное охлаждение до низких температур, выше, чем число этих же клеток, переживающих быстрое охлаждение до тех же температур в обычной среде, не содержащей ни глицерина, ни других защитных веществ [5, 54]. По-видимому, эти клетки переносят длительное воздействие концентрированных солевых растворов лучше, чем быстрое падение температуры. Клетки многослойного плоского эпителия кожи кролика переживают и быстрое и медленное охлаждение до —79°, если их быстро согревают [29]. Клетки мальпигиевого слоя погибают при быстром охлаждении и переживают медленное при условии быстрого согревания. Следовательно, клетки кожи, по-видимому, переносят воздействие концентрированных солевых растворов. Это предположение подтверждается и тем фактом, что кожа кролика в растворе Рингера переживает лиофилизацию при температурах от —30 до —32°, пока содержание воды не снизится с 70 до 25% [4, 29]. Глицерин повышает выживаемость кожи после замораживания и оттаивания.

В присутствии 15% глицерина эпителиальные клетки переживают медленное оттаивание, а клетки мальпигиевого слоя — быстрое замораживание (согревание по-прежнему должно происходить быстро). Следовательно, глицерин действует не только в качестве буфера для солей. Для того чтобы объяснить все описанные явления, необходимо изучить физико-химическую структуру клеточных оболочек и те пути, посредством которых эти клетки получают повреждения.

Нервные клетки, их волокна и ганглии служат еще одним примером живой материи, для которой повышение концентрации солей не является основной причиной их повреждений во время замораживания. Паско [39] обнаружил, что препараты верхнего шейного ганглия крысы вместе с пре- и постганглионарными волокнами переживали замораживание при —5° в уравновешенном солевом растворе Кребса, почти не утрачивая своей физиологической функции. Об этом можно было судить по проведению потенциалов действия после оттаивания. Повреждения усиливались при температурах от —5 до —15°, но и после 12 *час* пребывания при —15° в некоторых случаях можно было зарегистрировать потенциал действия в постганглионарном нервном волокне. При охлаждении до —79° в растворе Кребса препараты неизменно погибали. Разрушения клеток не удавалось избежать, применяя быстрое охлаждение препарата от —5 до —40° с помощью методов, предотвращающих гемолиз эритроцитов. Препараты, предварительно обработанные 15-процентным раствором глицерина, переживали охлаждение до —79° и хранение при этой температуре. После оттаивания они давали такую же реакцию, как и до замораживания. Повреждение нервных клеток и волокон, по-видимому, нельзя объяснить исключительно действием высокой концентрации солей. Очевидно, глицерин оказывает защитное действие посредством какого-то другого механизма (помимо его действия в качестве буфера для солей) [39]. Возможно, нервные волокна, чувствительные к изменениям ионного равновесия в среде при нормальной температуре, получают необратимые повреждения в результате изменения соотношения ионов кальция и ионов натрия и калия при

температурах ниже 0°, поскольку различные соли выпадают в осадок при разных температурах. Нет ничего удивительного в том, что оболочки нервных волокон, некоторые чрезвычайно богатые мислином, отличаются от оболочек эритроцитов своей устойчивостью к лиотропному действию концентрированных растворов хлористого натрия и других солей.

Мышечные волокна обладают особой чувствительностью к изменениям соотношения ионов кальция и ионов натрия и калия в окружающей их среде. Наличие в среде избытка кальция может привести к необратимой контрактуре мышц во время замораживания. Кроме того, на мышечные волокна влияют изменения pH, которые вызывают денатурацию липопротеидов в оболочках отдельных волокон, а также денатурацию миоглобина и других белков, находящихся в растворе в самих клетках [10, 15, 25, 35].

Ридж [44, 45] установил, что эндотелий роговицы переносит высокие концентрации глицерина при pH 8,8 лучше, чем при pH 5,85, судя по потреблению кислорода при соответствующих условиях инкубации. Замораживание и оттаивание в отсутствие глицерина вызывало гибель клеток. При добавлении же в среду глицерина они выживали, особенно при высокой величине исходного pH.

Лавлок всегда подчеркивал, что при вымерзании воды в сложной среде повышается концентрация не только хлористого натрия и других солей, но и водородных ионов. Кроме того, на величину pH в процессе замораживания влияет выпадение в осадок менее растворимых солей буферной системы [53] (см. стр. 438). Этому способствует присутствие хлористого натрия и других солей, концентрация которых по мере падения температуры повышается. Другой результат повышения концентрации солей заключается в том, что белки, изоэлектрическая точка которых лежит при кислом pH, становятся еще более кислыми и впоследствии могут денатурировать как в цитоплазме, так и в среде, окружающей клетки [25].

Во время замораживания концентрация таких веществ, как мочевина и другие конечные или промежуточные продукты обмена веществ, может повыситься до такой степени, что они станут токсичными. Этот вопрос еще не исследован. Концентрация различных лекарственных препаратов и антибиотиков также иногда достигает токсичного уровня. Например, сульфамиды, добавляемые в разбавитель бычьей спермы для предотвращения размножения бактерий, во время хранения при температуре выше 0° оказались токсичными для сперматозоидов, которых замораживали и хранили при низких температурах в среде, содержащей глицерин.

Не изучено еще действие повышенных концентраций газов в растворах с промежуточными температурами, а также влияние затвердевания CO_2 при —79° и сжижения других газов при более низких температурах. Вопрос о повреждениях, вызываемых образованием пузырьков газа во время оттаивания, уже подвергался обсуждению.

Полное вымерзание воды может повлечь за собой такое тесное соприкосновение структур и составляющих их молекул, что после таяния льда они не смогут отделиться друг от друга в результате денатурации или по какой-либо иной причине. В конечном счете молекулы воды, необходимые для сохранения структурной целостности белков, могут выделяться [25].

ЛИТЕРАТУРА

1. Armstrong J. A., Personal communication, 1960.
2. Asahina E., Aoki K., Shinozaki J., The freezing process of frost-hardy caterpillars, Bull. ent. Res., **45**, 329—339 (1954).
3. Billingham R. E., Bubbles in thawed cornea, Proc. Roy. Soc., B., **147**, 530 (1957).
4. Billingham R. E., Medawar P. B., The freezing, drying and storage of mammalian skin, J. exp. Biol., **29**, 454—468 (1952).
5. Breedis C., The action of extreme cold on leukaemic cells of mice, J. exp. Med., **76**, 221—240 (1942).
6. Chambers R., Hale H. P., The formation of ice in protoplasm, Proc. Roy. Soc., B, **110**, 336—352 (1932).
7. Chaplin H. Jr., Crawford H., Cutbsh M., Mollison P. L., Preservation of red cells at —79° C, Clin. Sci., **15**, 27—39 (1956).

8. Danielli J. F., Surface chemistry and cell mebranes, Surface Prenomena in Chemistry and Biology, ed. Danielli J. F., Pankhurst K. G. A. and Riddiford A. C., pp. 246—265, London, Pergamon Press, 1958.
9. Deanesly R., Histological appearance of rat gonads fixed while frozen, J. Endocrin., **15**, v. (1957).
10. Finn D. B., Denaturation of proteins in muscle juice by freezing, Proc. Roy. Soc., B, **111**, 396—411 (1932).
11. Gresson R. A. R., Essentials of General Cytology, Edinburgh, University Press, 1948.
12. Heard B. E., The histological appearances of some normal-tissues at low temperatures, Brit. J. Surg., **42**, 430—437 (1955).
13. Heard B. E., Nuclear crystals in slowly-frozen tissues at very low temperatures. Comparison of normal and ascites tumour cells, Brit. J. Surg., **42**, 659—663 (1955).
14. Jones N. C. H., Mollison P. L., Robinson M. A., Factors affecting the viability of erythrocytes stored in the frozen state, Proc. Roy. Soc., B., **147**, 476—497 (1957).
15. Lea C. H., Hawke J. C., Lipovitellin. 2. The influence of water on the stability of Lipovitellin and the effects of freezing and drying, Biochem. J., **52**, 105—114 (1952).
16. Lewis P. R., Lever J. D., The association of certain chemical activities with intra-cellular structure, J. R. micr. Soc., **78**, 104—110 (1958).
17. Levitt J., Frost, drought and heat resistance. In Protoplasmologia, VIII, Physiologie des Protoplasmas, 6, Vienna, Springer, 1958.
18. Lovelock J. E., The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing, Biochim. biophys. Acta, **10**, 414—426 (1953).
19. Lovelock J. E., The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing, Biochim. biophys. Acta, **11**, 28—36 (1953).
20. Lovelock J. E., Physical instability and thermal shock in red cells, Nature, Lond., **173**, 659—661 (1954).
21. Lovelock J. E., The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing, Biochem. J., **56**, 265—270 (1954).
22. Lovelock J. E., Haemolysis by thermal schock., Brit. J. Haematol., **1**, 117—129 (1955).

23. Lovelock J. E., The physical instability of human red blood cells, Biochem. J., **60**, 692—696 (1955).
24. Lovelock J. E., The physical instability of human red blood cells and its possible importance in their senescence, Ciba Fdn. Colloq. Ageing, **2**, 215—232 (1956).
25. Lovelock J. E., Denaturation of lipid-protein complexes as a cause of damage by freezing, Proc. Roy. Soc., B, **147**, 427—433 (1957).
26. Lovelock J. E., Bishop M. W. H., Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide, Nature, Lond., **183**, 1394—1395 (1959).
27. Lovelock J. E., Polge C., The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol, Biochem. J., **58**, 618—622 (1954).
28. Mazur P., The effects of subzero temperatures on micro-organisms. Recent Research in Freezing and Drying, ed. Parkes A. S. and Smith A. U., pp. 65—77, Oxford, Blackwell Scientific Publication, 1960.
29. Medawar P. B., Billingham R. E., The viability of mammalian skin after freezing, thawing and freeze-drying. Freezing and Drying, ed. Harris R. J. C., pp. 55—62, London, Institute of Biology, 1951.
30. Meryman H. T., Mechanics of freezing in living cells and tissues, Science, **124**, 515—521 (1956).
31. Meryman H. T., Physical limitations of the rapid freezing method, Proc. Roy. Soc., **B, 147**, 452—459 (1957).
32. Meryman H. C., Tissue freezing and local cold injury, Physiol. Rev., **37**, 233—251 (1957).
33. Meryman H. T., The mechanisms of freezing in biological systems. Recent Research in Freezing and Drying, ed. Parkes A. S. and Smith A. U., pp. 23—39, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1960.
34. Meryman H. T., Platt W. T., The distribution and growth of ice crystals in frozen mammalian tissue, Res. Rep. nav. med. Res. Inst., Maryland, **13**, 1—30 (1955).
35. Moran T., The effect of low temperatures on hen's eggs, Proc. Roy. Soc., **B., 98**, 436—456 (1925).
36. Moran T., Critical temperature of freezing living muscle, Proc. Roy. Soc., **B, 105**, 177—197 (1929).
37. Moran T., The frozen state in mammalian muscle, Proc. Roy. Soc., **B, 107**, 182—187 (1930).

38. Moskowitz M., Calvin M., On the components and structure of the human red cell membrane, Exp. Cell Res., 3, 33—46 (1952).
39. Pascoe J. E., Survival of the rat's superior cervical ganglion after cooling to —79° C, Proc. Roy. Soc., B, **147**, 510—519 (1957).
40. Paul J., Cell and Tissue Culture, Edinburgh, Livingstone, 1959.
41. Polge C., Soltys M. A., Protective action of some neutral solutes during the freezing of bull spermatozoa and trypanosomes. Recent Research in Freezing and Drying, ed. Parkes A. S. and Smith A. U., pp. 87—100, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1960.
42. Rey L. R., Conservation de la Vie par le Froid. Actualités sci industr., No. 1279, Paris, Hermann, 1959.
43. Rey L. R., Study of the freezing and drying of tissues at very low temperatures. Recent Research in Freezing and Drying, ed Parkes A. S. and Smith A. U., pp. 40—62, Oxford, Blackwell Scientific Publication, 1960.
44. Ridge J. W., Preservation of corneal endothelium by freezing, Nature, Lond., **178**, 1404—1405 (1956).
45. Ridge J. W., Freezing of the cornea, Proc. Roy. Soc., B, **147**, 531 (1957).
46. Rinfret A. P., Factors affecting the erythrocyte during rapid freezing an thawing, Ann. N. Y. Acad. Sci., **85**, 576—594 (1960).
47. Salt R. W., Survival of frozen fat body cells in an insect, Nature, Lond. **184**, 1426 (1959).
48. Scholander P. F., Supercooling and freezing in poikilotherms. Symposium on Hypothermia, pp. 77—80, XXIst int. Congr. Physiol. Sci., Buenos Aires, 1959.
49. Scholander P. F., Flagg W., Hock R. J., Irving L., Studies on the physiology of frozen plants and animals in the Arctic, J. cell. comp. Physiol, **42**, Suppl. I, 1—56 (1953).
50. Smith A. U., Effects of low temperature on living cells and tissues. Biological Applications of Freezing and Drying, Chap. i. ed. Harris R. J. C. New York, Academic Press, 1954. (О. Смит, Влияние низких температур на живые клетки и ткани. См. «Применение замораживания — высушивания в биологии», под ред. Р. Харриса, стр. 9—90, ИЛ, М., 1956.)

51. Smith A. U., Polge C., Smiles J., Microscopic observation of living freezing and thawing, J. R. micr. Soc., **71**, 186—195 (1951).
52. Smith A. U., Smiles J., Microscopic studies of mammalian tissues during cooling to —79° C, J. R. micr. Soc., **73**, 134—139 (1953).
53. Van den Berg L., Rose D., Effect of freezing on the pH and composition of sodium and potassium phosphate solutions: the reciprocalsystem KH_2PO_4—Na_2HPO_4—H_2O, Arch. Biochem. Biophys., **81**, 319—329 (1959).
54. Weinman D., McAllister J., Prolonged storage of human pathogenic protozoa with conservation of virulence: observations on the storage of helminths and Leptospira, Amer. J. Hyg., **45**, 102—121 (1947).
55. Weiss L., Armstrong J. A., Structural changes in mammalian cells associated with cooling to —79° C, J. Biophys. Biochem, Cytology, **7**, 673—678 (1960).
56. Wood T. H., Lethal effects of high and low temperatures on unicellular organisms, Advances in Biological and Medical Physics, Vol. iv, 119—165, New York, Academic Press, 1956.

ФОТОГРАФИИ

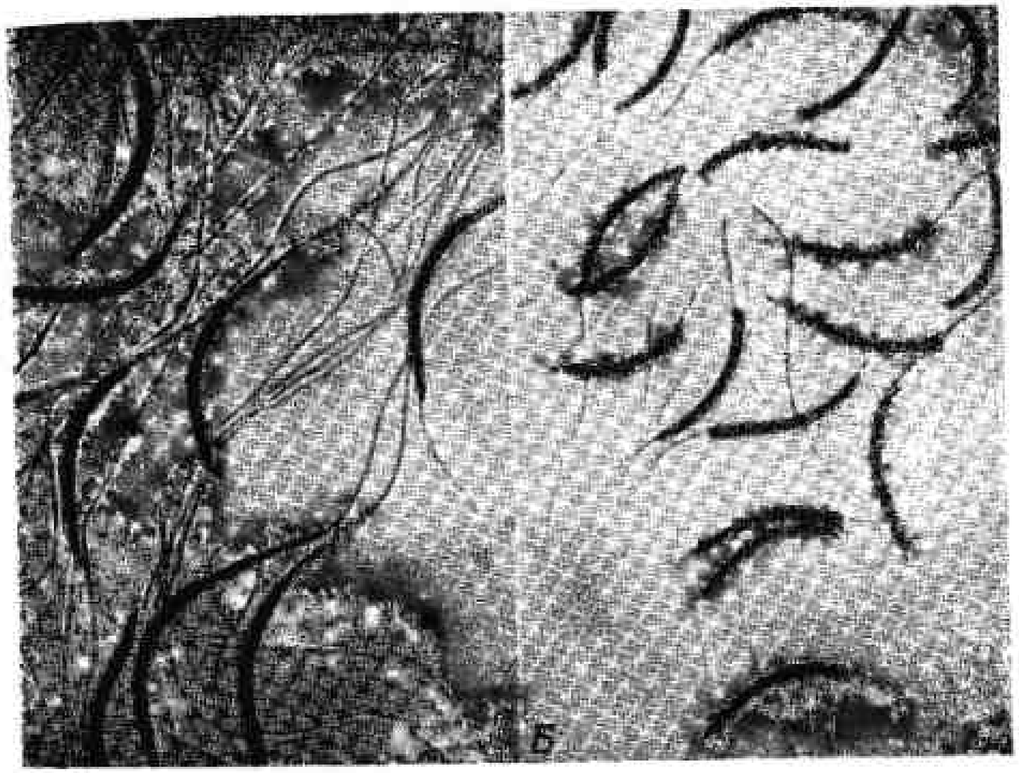


Фото 1. Живые сперматозоиды петуха. ×~1600.

А – нормальные; *Б* – после замораживания при —79° и оттаивания в рингеровском растворе, содержащем 15% глицерина. Снимки в ультрафиолете при длине волны 2750 Å.

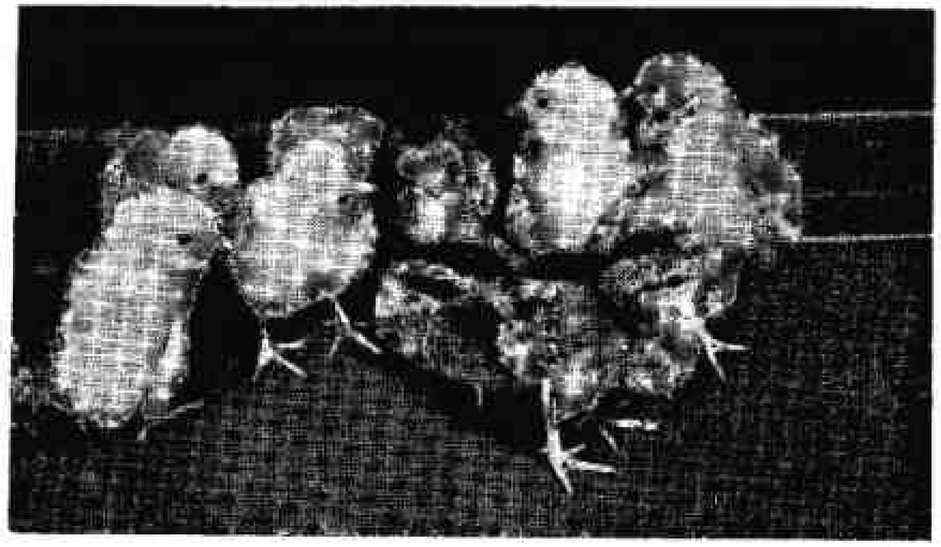


Фото. 2. Цыплята, вылупившиеся из яиц кур, которых осеменили спермой, замороженной при —190° в растворе Рингера, содержащем 15% глицерина, хранившейся при этой температуре и оттаянной. Глицерин выделен до осеменения посредством диализа. (Polge C., Nature, Lond., 167, 949—950, 1951.)

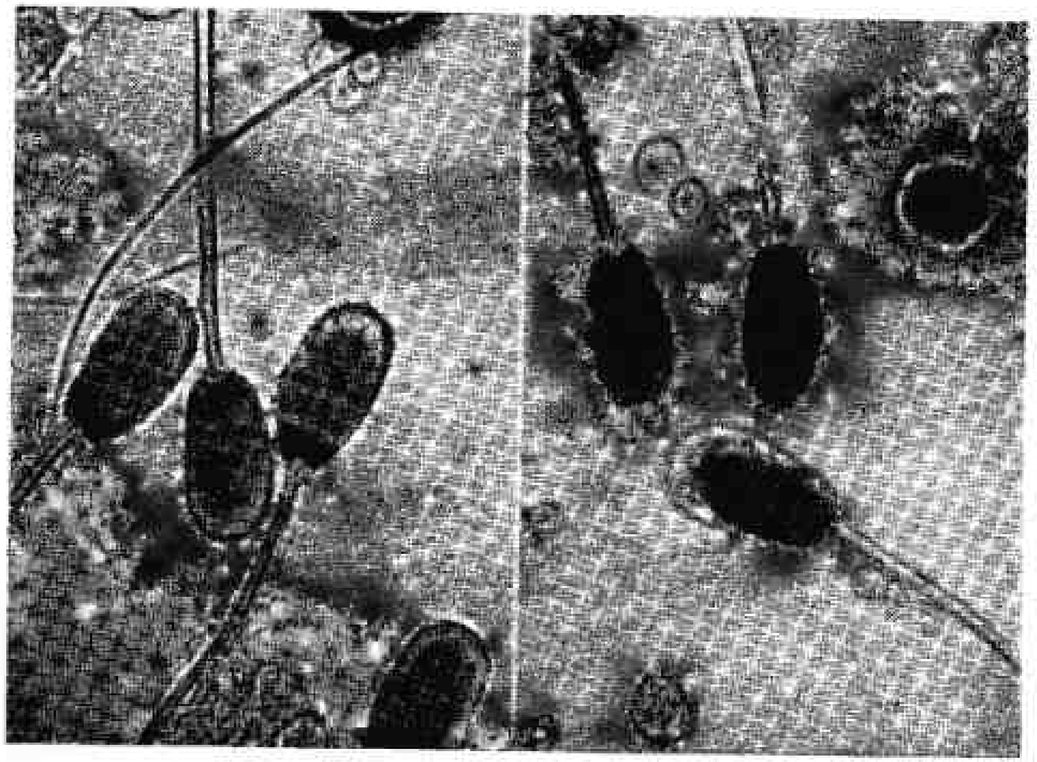


Фото 3. Сперматозоиды кролика. ×2000.

А — нормальные живые сперматозоиды: *Б* — сперматозоиды, взвешенные в разбавителе спермы, содержащем 15% глицерина; акросомы сморщились. Снимки в ультрафиолете при длине волны 2750 Å.

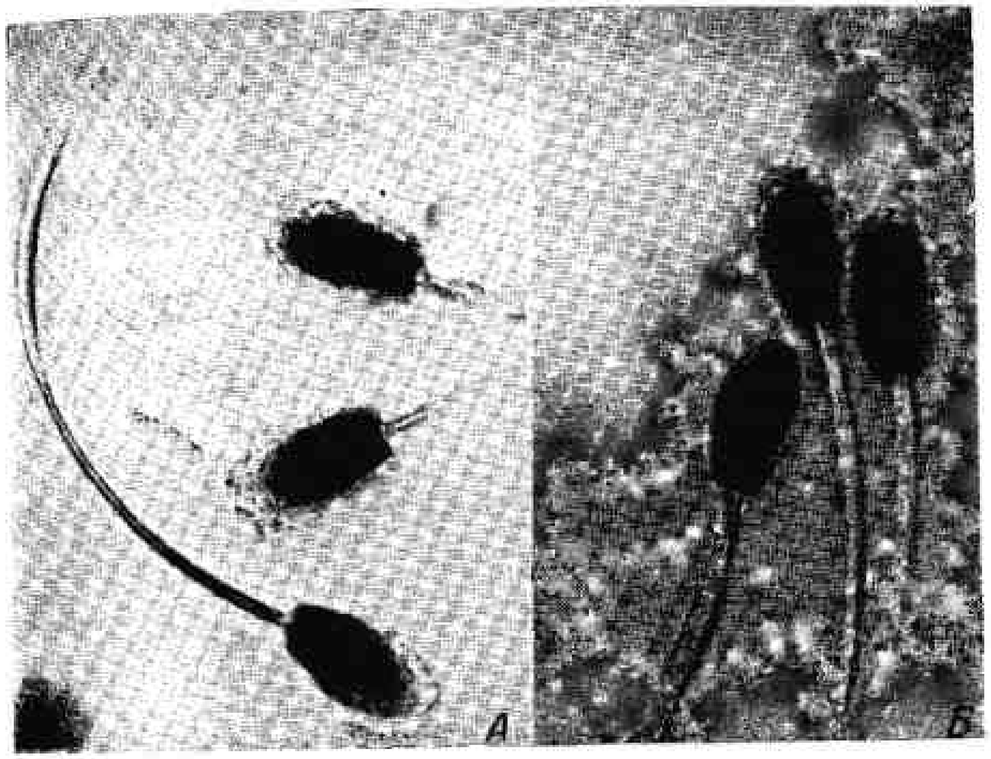


Фото 4. Сперматозоиды кролика, диализированные против 20-процентного раствора глицерина, охлажденные до —79° и согретые. ×2000.

А. При быстром охлаждении; видны тяжелые повреждения акросом. *Б*. При медленном охлаждении и быстром согревании; акросомы некоторых сперматозоидов имеют почти нормальный вид. Снимки в ультрафиолете при длине волны 2750 Å.



Фото 5. «Фрости» — один из первых бычков, родившихся в результате осеменения бычьей спермой, содержащей после разбавления 10% глицерина, охлажденной до —79° и хранившейся при этой температуре.

(Polge C., Rowson L. E. A., Nature, Lond., 169, 626—627, 1952.)

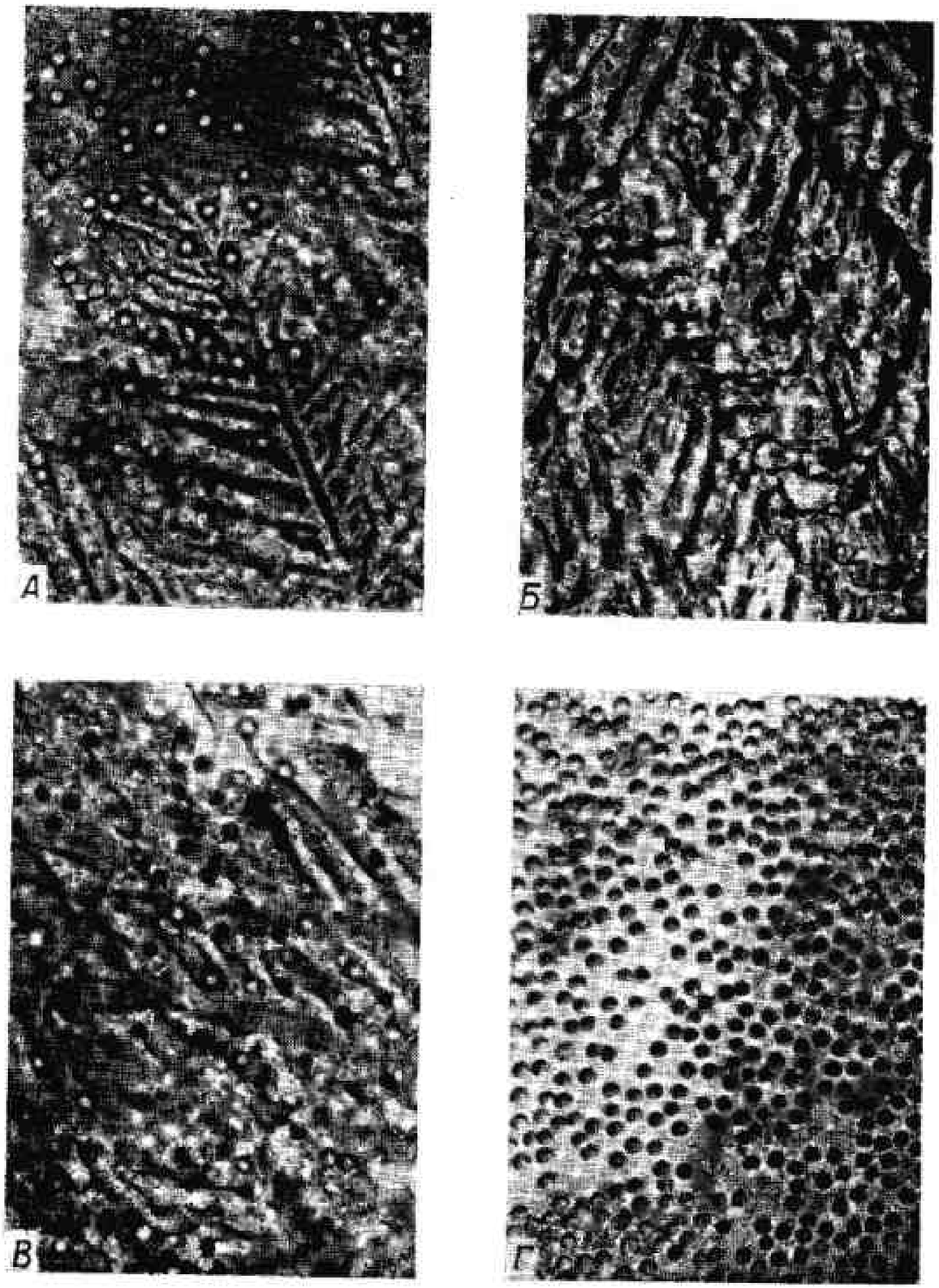


Фото 6. Картина замораживания и оттаивания под микроскопом крови кролика, разбавленной в 20 раз раствором Рингера, содержащим 20% глицерина. ×~395.

А — начало кристаллизации после охлаждения до —12°; *Б* — форма кристаллов при —30°; *В* — процесс оттаивания; *Г* — после оттаивания. (Smith A. U., Polge C., Smiles J., J. R. micr. Soc., 71, 186—195, 1951.)

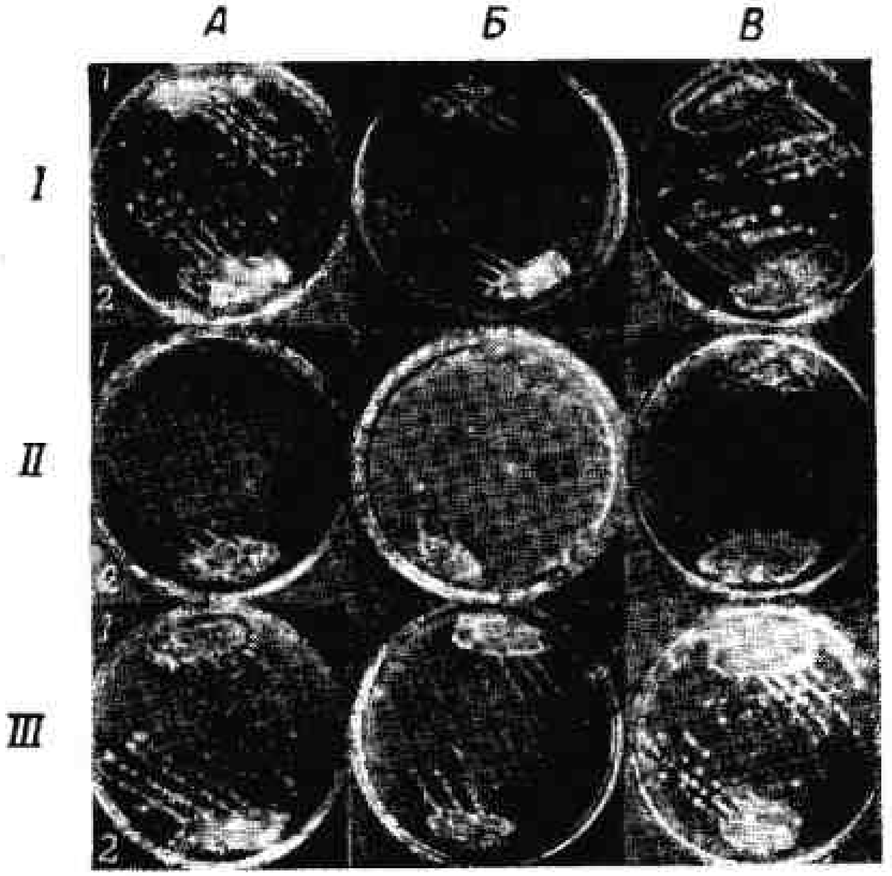


Фото 7. Влияние скорости охлаждения и глицерина на выживание дрожжей, хранившихся при температуре —79°.

А. Saccharomyces cerevisiae 212. *Б. S. cerevisiae* Thorne. *В. Pichia alcoholophila*. *I* — контрольные незамороженные; *II* — быстро замороженные при —79°; *III* — медленно охлажденные до —79°. *1* — простой бульон; *2* — бульон, содержащий 15% глицерина.

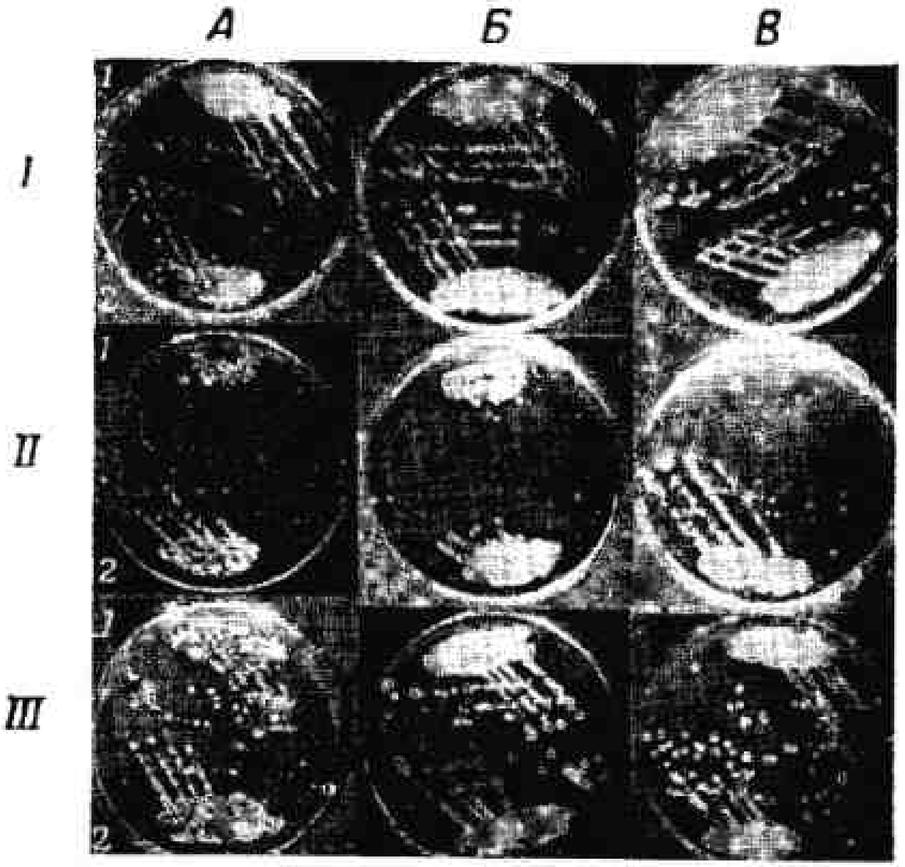
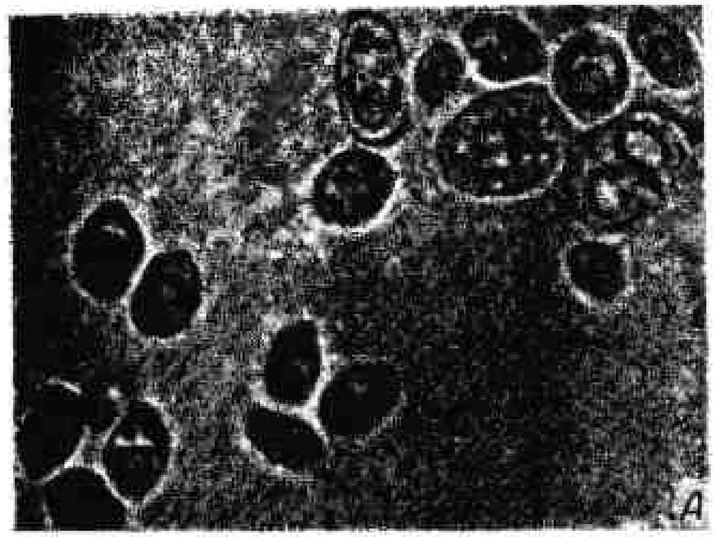


Фото 8. Влияние скорости охлаждения и глицерина на выживание дрожжей, хранившихся при температуре —190°.

А. Saccharomyces cerevisiae Thorne. *Б. S. cerevisiae* Gebruder-Meyer. *В. S. cerevisiae* D. C. L. *I* — контрольные незамороженные; *II* — быстро замороженные при —190°; *III* — медленно охлажденные до —190°. *1* — простой бульон; *2* — бульон, содержащий 15% глицерина.





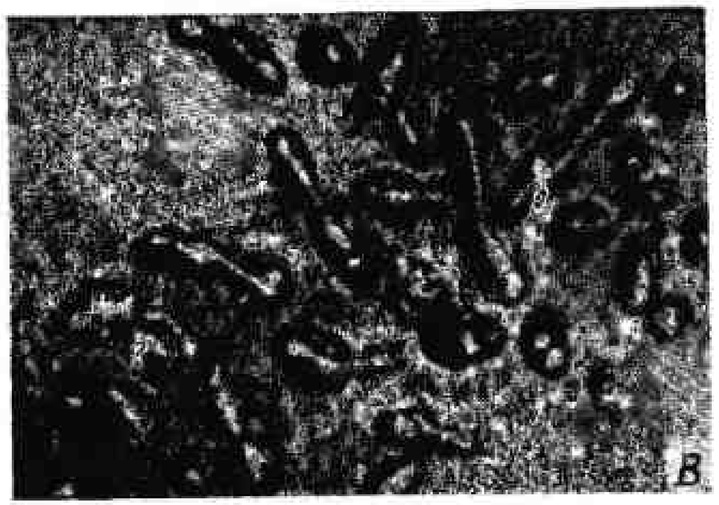


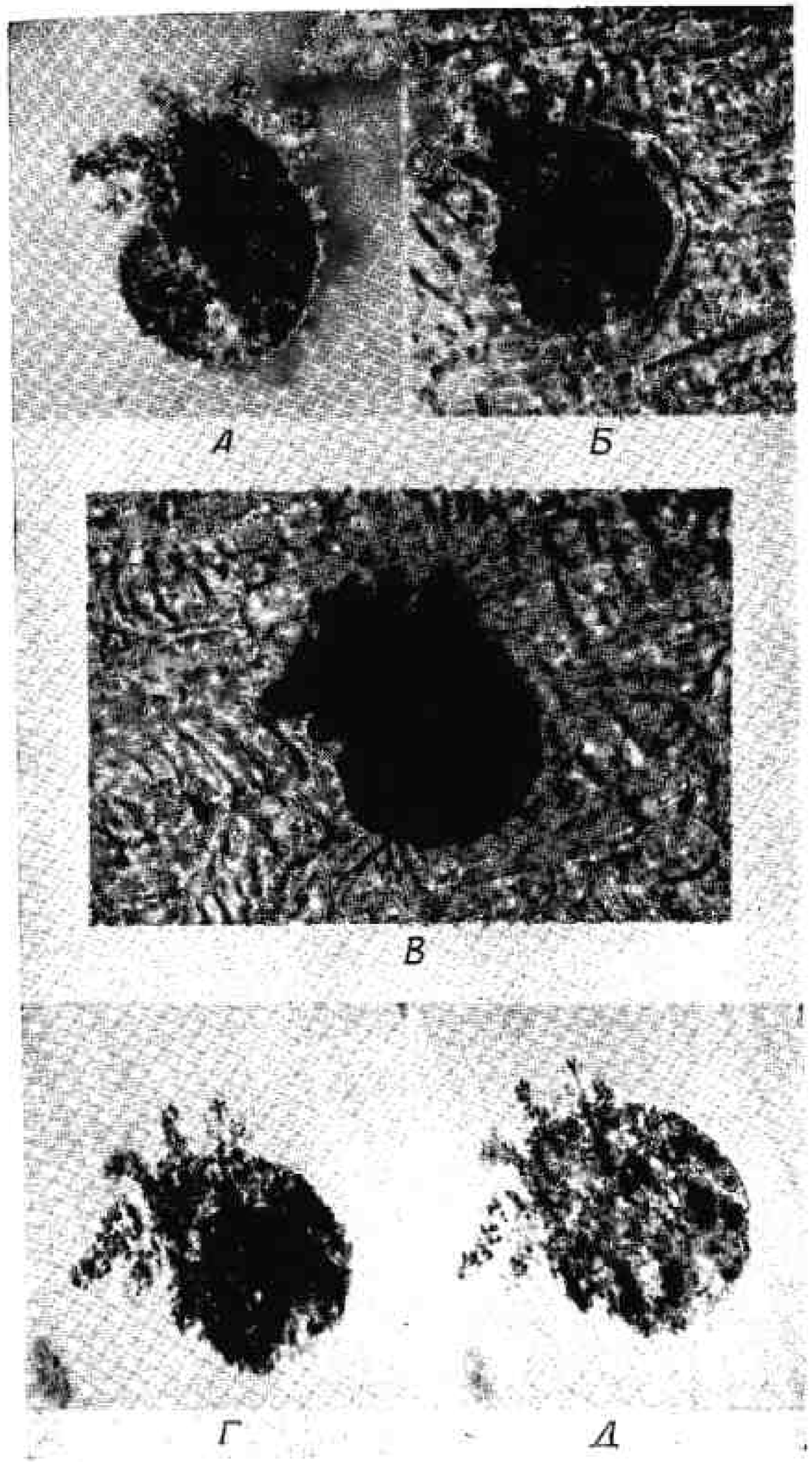
Фото 9. Микрофотография дрожженых клеток до замораживания и в замороженном состоянии. ×~1700.

А. Необработанные незамороженные клетки. *Б.* Внутриклеточная кристаллизация льда в результате быстрого охлаждения. *В.* Сморщившиеся клетки, окруженные внеклеточным льдом, образовавшимся при медленном замораживании. (N e i T., In «Recent Research in Freezing and Drying», pp. 78—86, 1960.

→

Фото 10. Пресноводная амёба в капле дождевой воды, содержащей 5% глицерина. ×175.

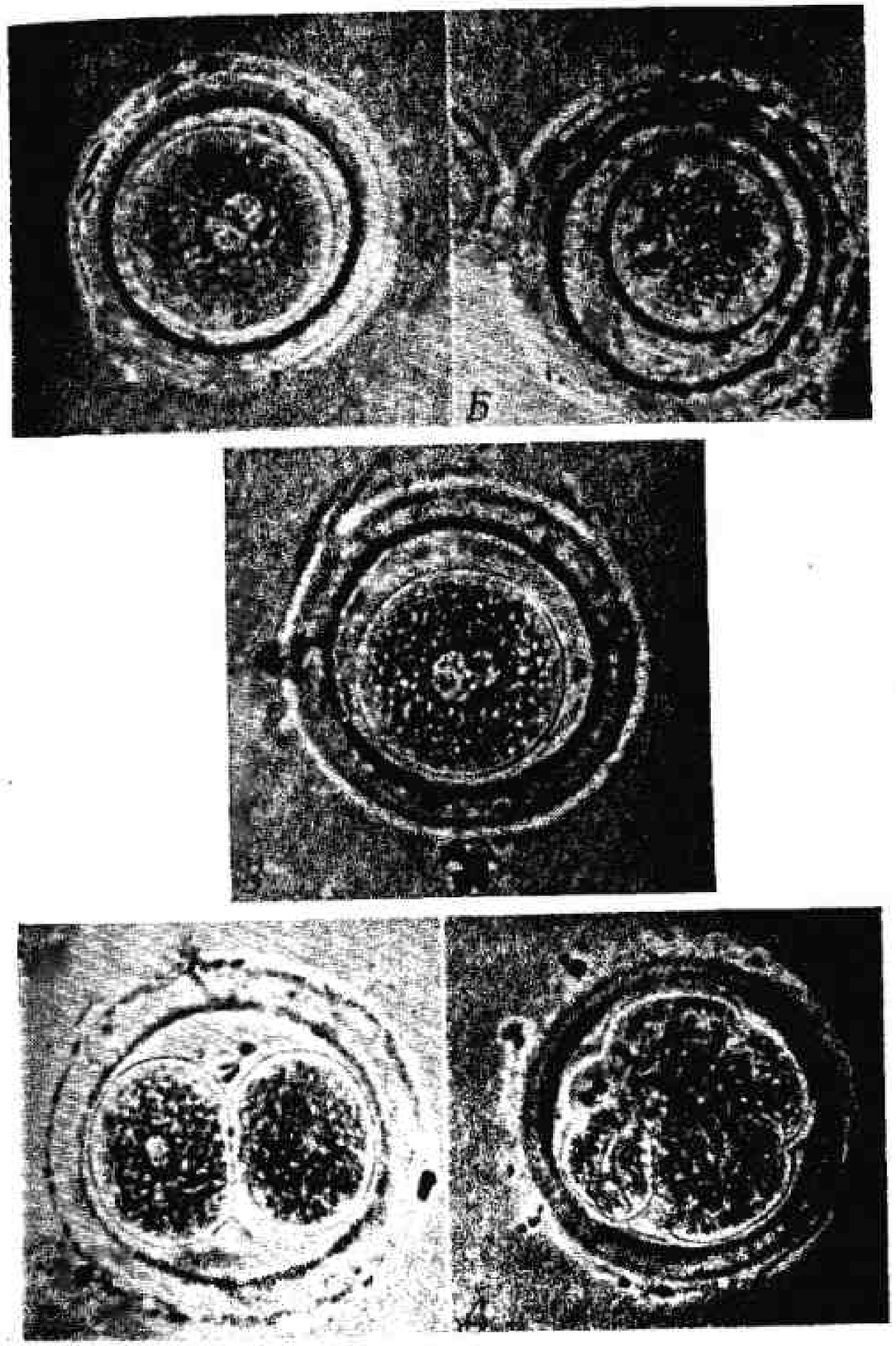
А — при температуре —5° движение протоплазмы прекращено; *Б* — при температуре —10° среда кристаллизовалась, но цитоплазма не замерзла; *В* — при температуре —15° замерзло внутреннее содержимое клетки; *Г* — при оттаивании среды внутриклеточные кристаллы растворяются; *Д* — при согревании до +20°. (Smith A. U., Polge C., Smiles J., J. R. micr. Soc., 71, 186—195. 1951.)



→

Фото 11. Оплодотворенное яйцо кролика. Фазовый контраст. ×250.

А. Нормальное одноклеточное оплодотворенное яйцо. *Б.* Одноклеточное оплодотворенное яйцо, помещенное в сыворотку, содержащую 15% глицерина, при +20°. *В.* Одноклеточное оплодотворенное яйцо, обработанное при +37° глицерином с концентрацией, постепенно повышающейся до 15%. *Г.* Двухклеточное яйцо, обработанное глицерином при +37°, медленно охлажденное до —79° и согретое; после постепенного удаления глицерина при +37° яйцо культивировали в сыворотке в течение 18 *час*. *Д.* Шестиклеточное яйцо, обработанное глицерином, охлажденное до —79° и согретое; после удаления глицерина яйцо культивировали в сыворотке в течение 48 *час*.



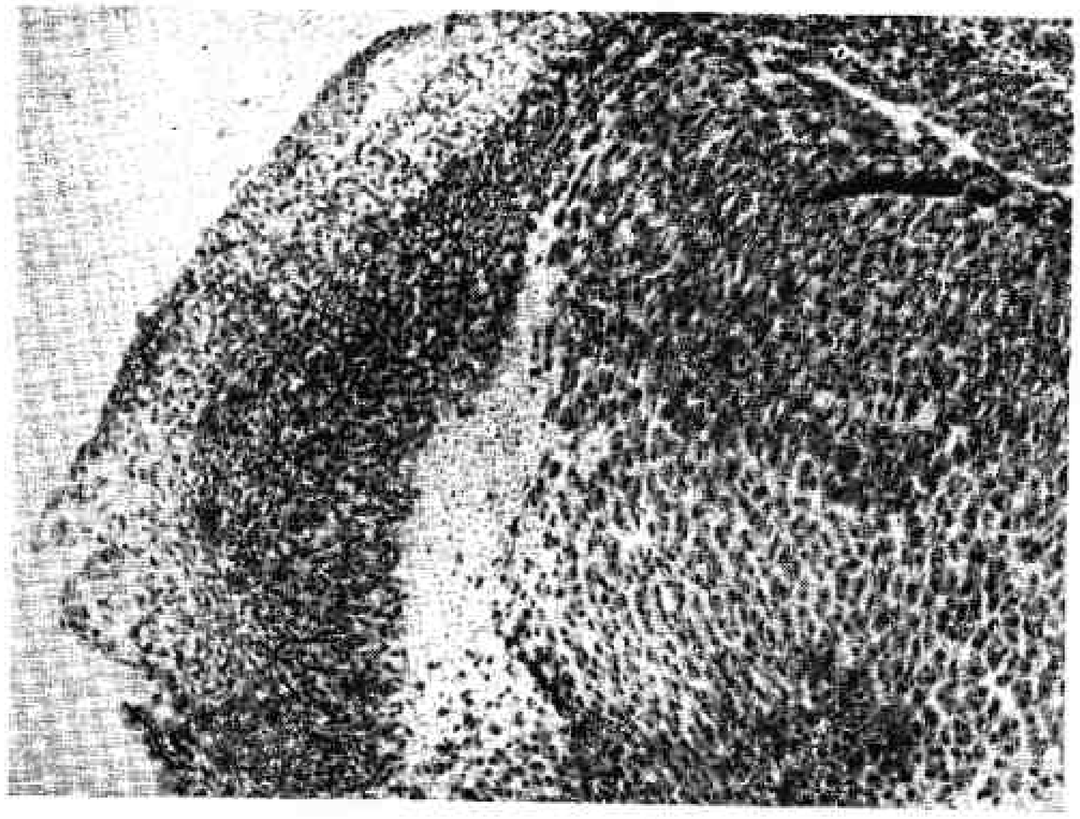


Фото 12. Эпифиз большой берцовой кости куриного эмбриона, культивированный в течение 3 дней после замораживания. ×100.
(Biggers J. D., Experientia, 13, 483—484, 1957.)

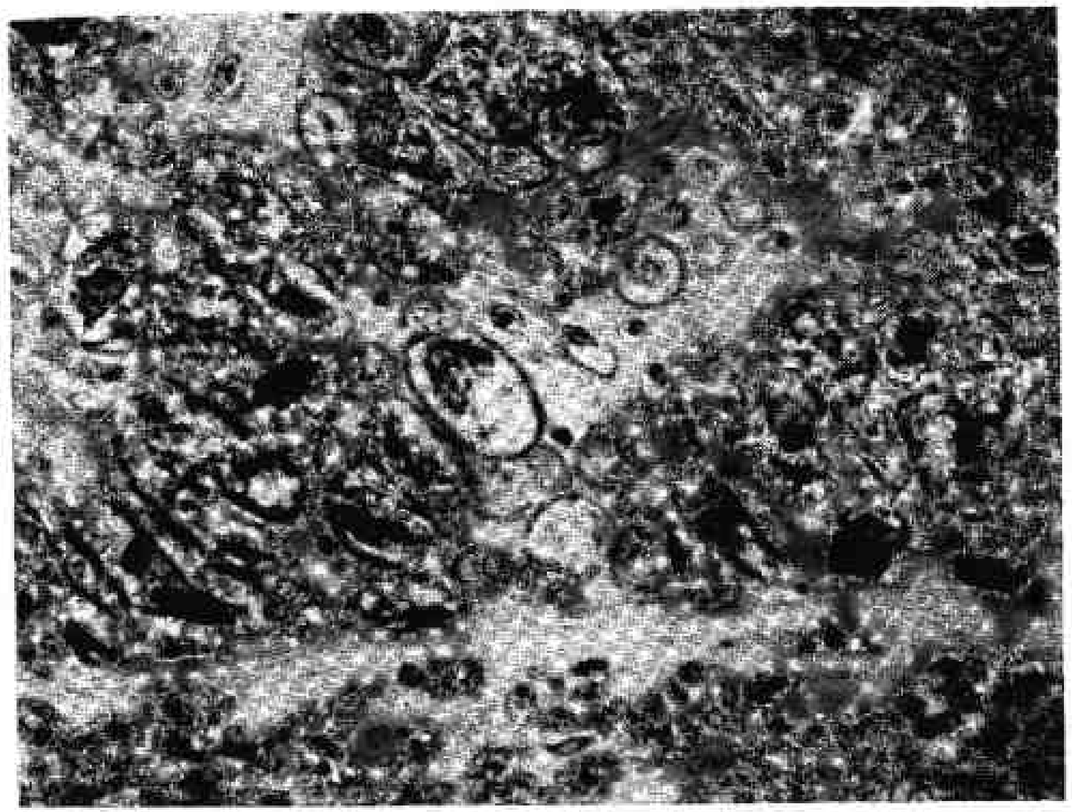


Фото 13. Диафиз большой берцовой кости куриного эмбриона, культивированный в течение 3 дней после замораживания. ×400.
(Biggers J. D., Experientia, 13, 483—484, 1957.)

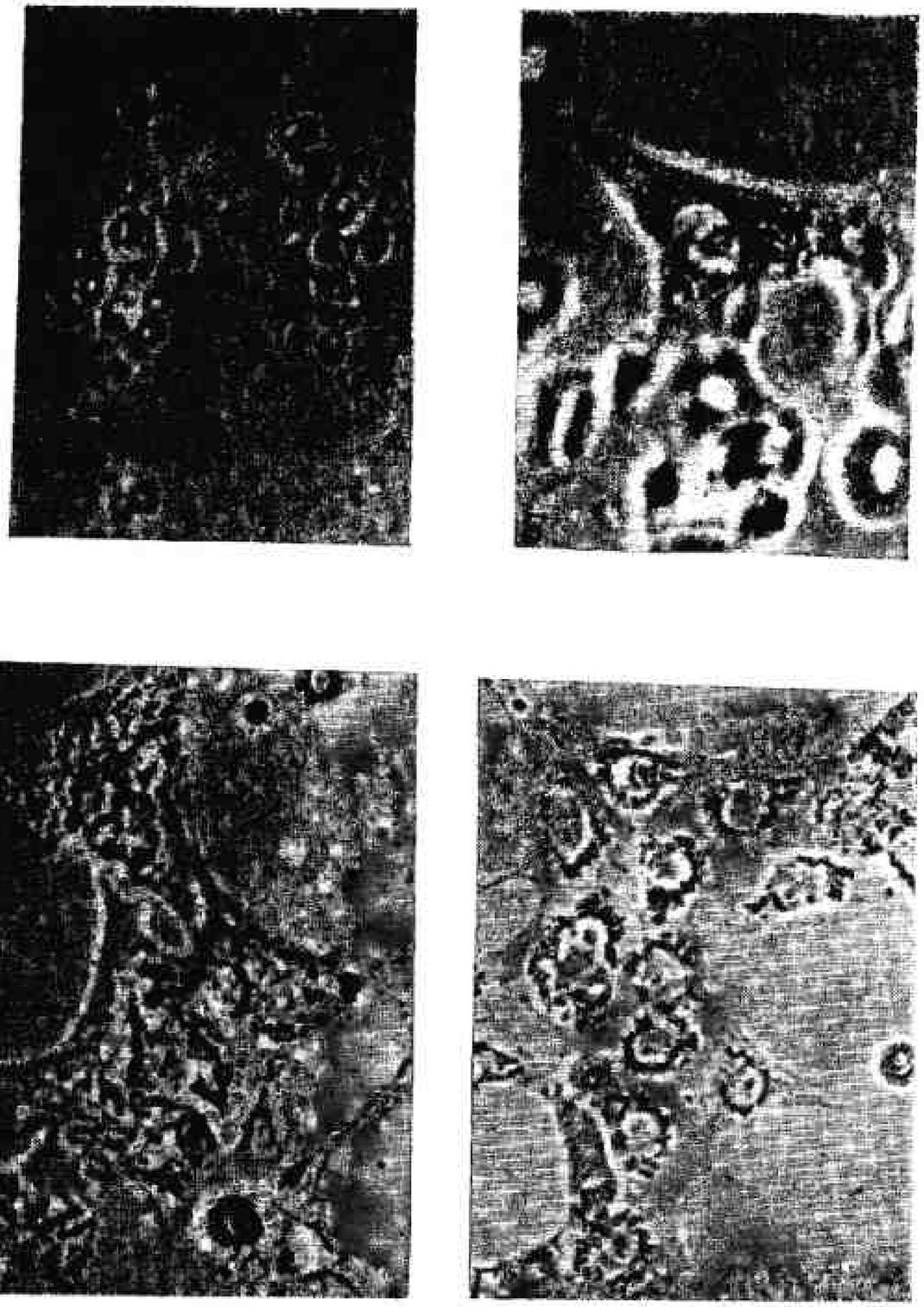


Фото 14. Влияние низкой температуры на клетки яйценосного бугорка. Фазовый контраст. ×400.

А. Клетки, замороженные в жидком воздухе (—196°). *Б*. Клетки, быстро замороженные при —79° и инкубированные при этой температуре в течение 20 *час*. *Б*. Клетки, медленно охлажденные до —79° и инкубированные при этой температуре в течение 24 *час*. *Г*. Незамороженные контрольные клетки. Клетки яйценосного бугорка взвешивали в сыворотке, замораживали различными способами, согревали при +40°, культивировали и инкубировали 24 *час*. (Smith A. U., Exp. Cell Res., 3, 574—583, 1952.)

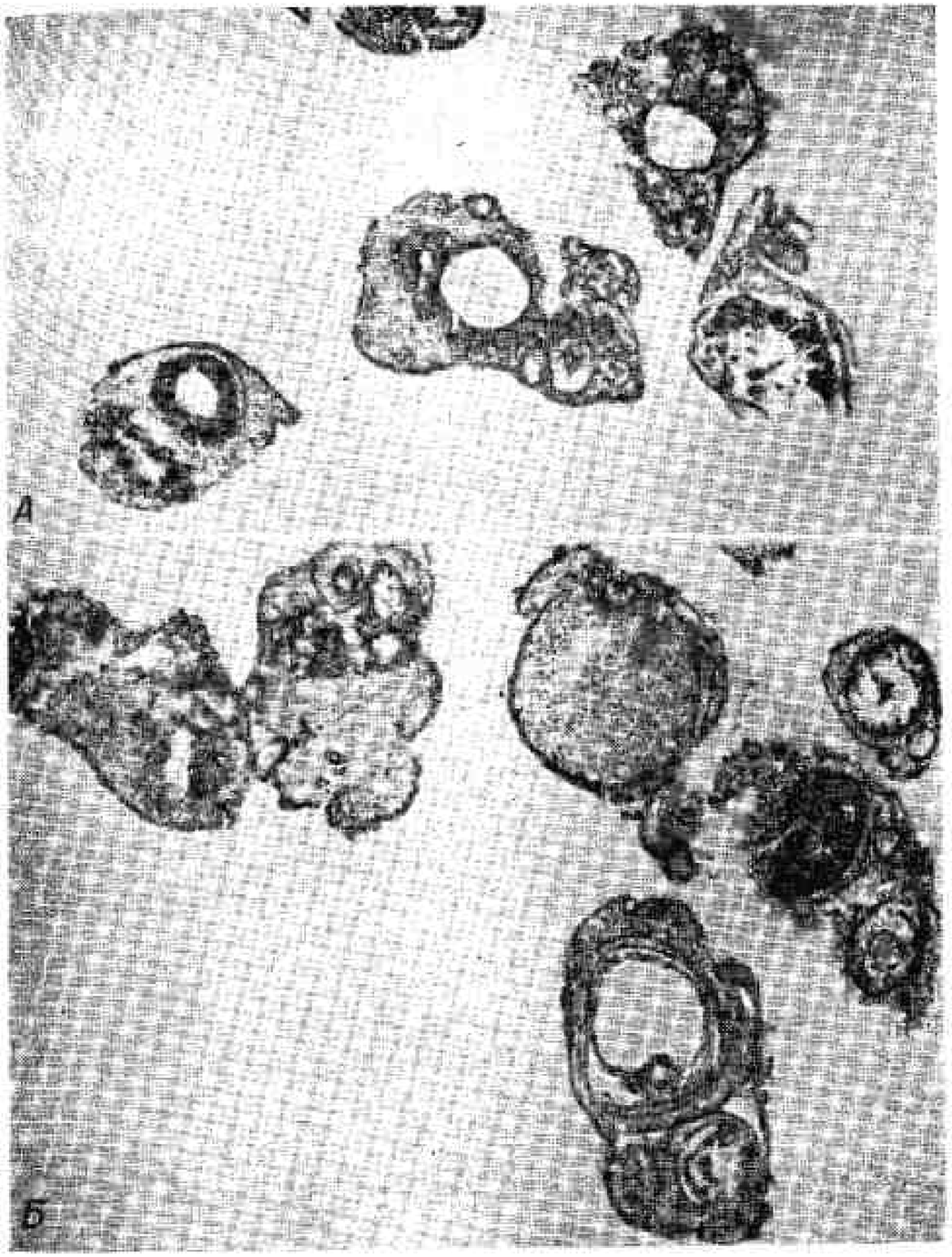


Фото 15. Кусочки яичника до имплантации.

Ткань яичника взрослого животного, измельченная в физиологическом растворе, содержащем 15% глицерина; имплантации не проводили. *А*. Ткань пропитывали в течение 2 *час* при +20°; замораживания не осуществляли. *Б*. Ткань медленно охлаждали до —79°, хранили 1 *час* в жидком воздухе и оттаивали при +40°. (Parkes A. S., Smith A. U., Proc. Roy. Soc., B, 140, 455—470, 1953.)

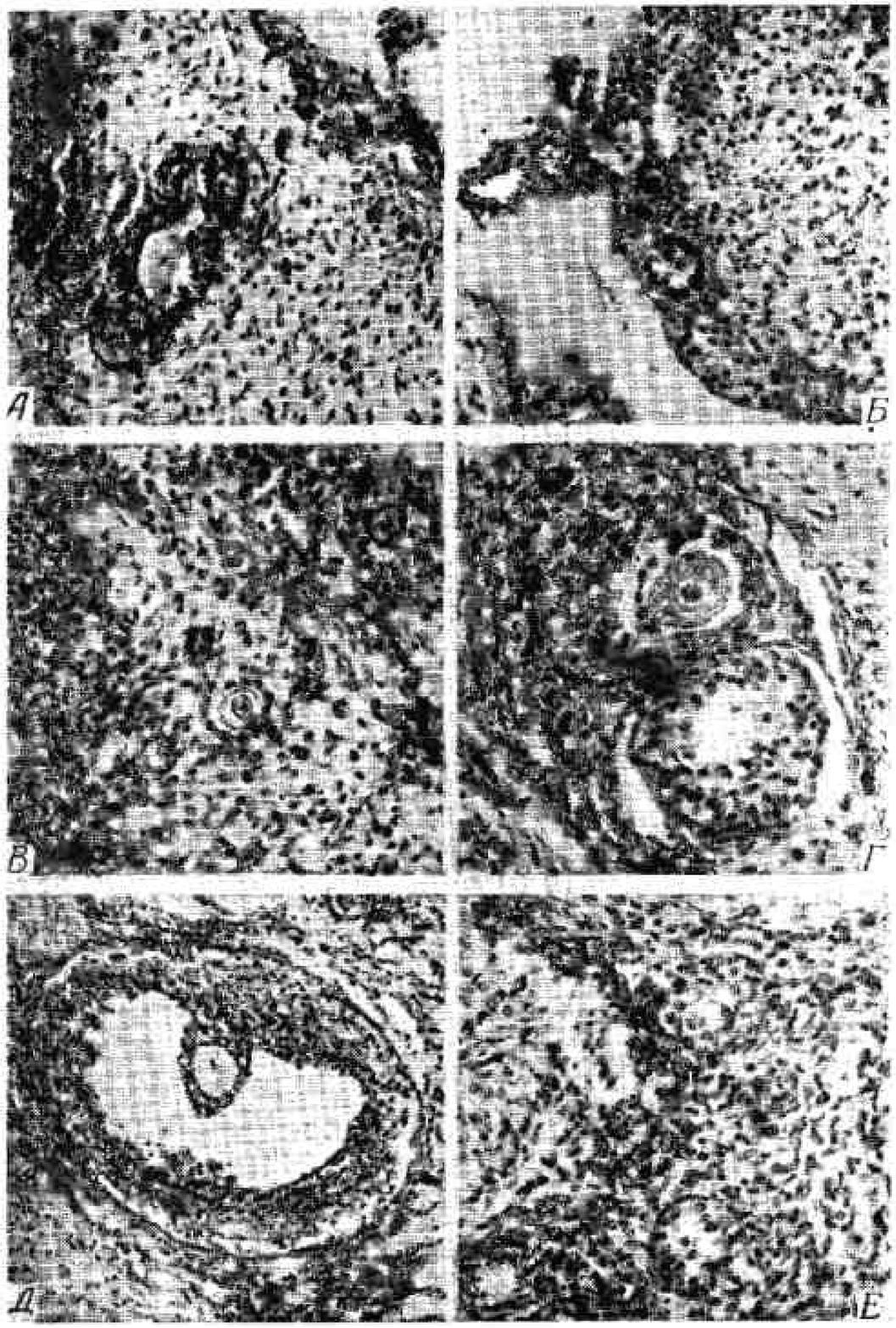


Фото 16. Развитие трансплантатов из замороженной ткани яичника.

Ткань яичника обрабатывали физиологическим раствором, содержащим 15% глицерина, медленно охлаждали до —79° и выдерживали в течение 1—2 *час* при температуре —190 или —79°. *А* — спустя 1 день после имплантации; × ~ 205; *Б* — спустя 3 дня; × ~ 205; *В* — спустя 4 дня; × ~ 205; *Г* — спустя 6 дней; × ~ 205; *Д* — спустя 22 дня; × ~ 90; *Е* — спустя 98 дней после имплантации; × ~ 205. (Parkes A. S., Smith A. U., Proc. Roy. Soc., B, 140, 455—470, 1953.)

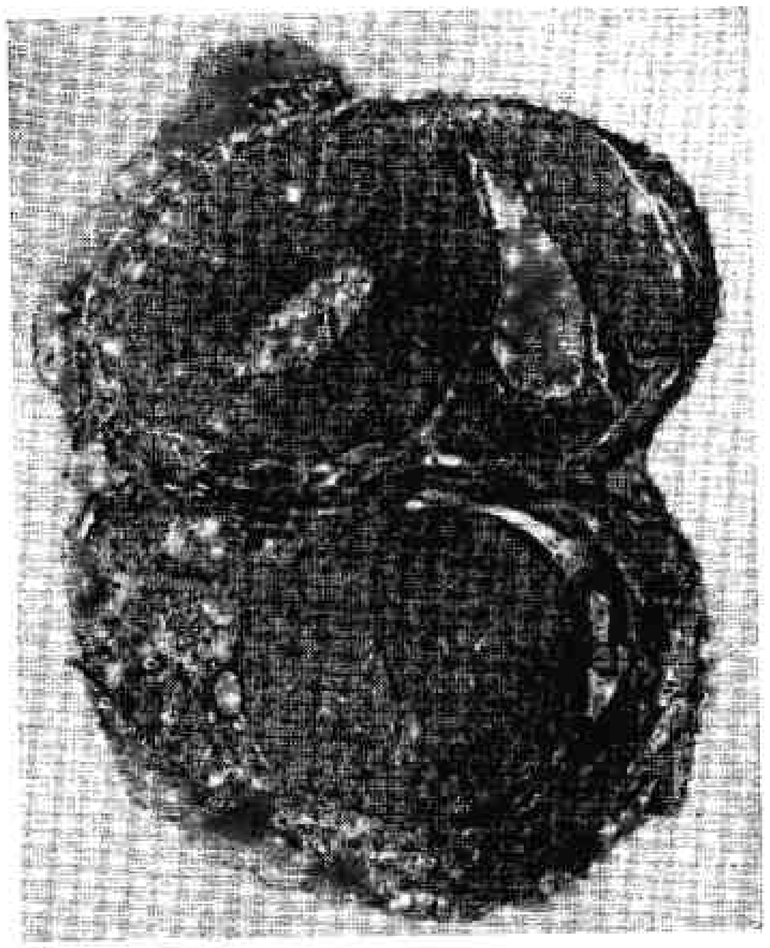


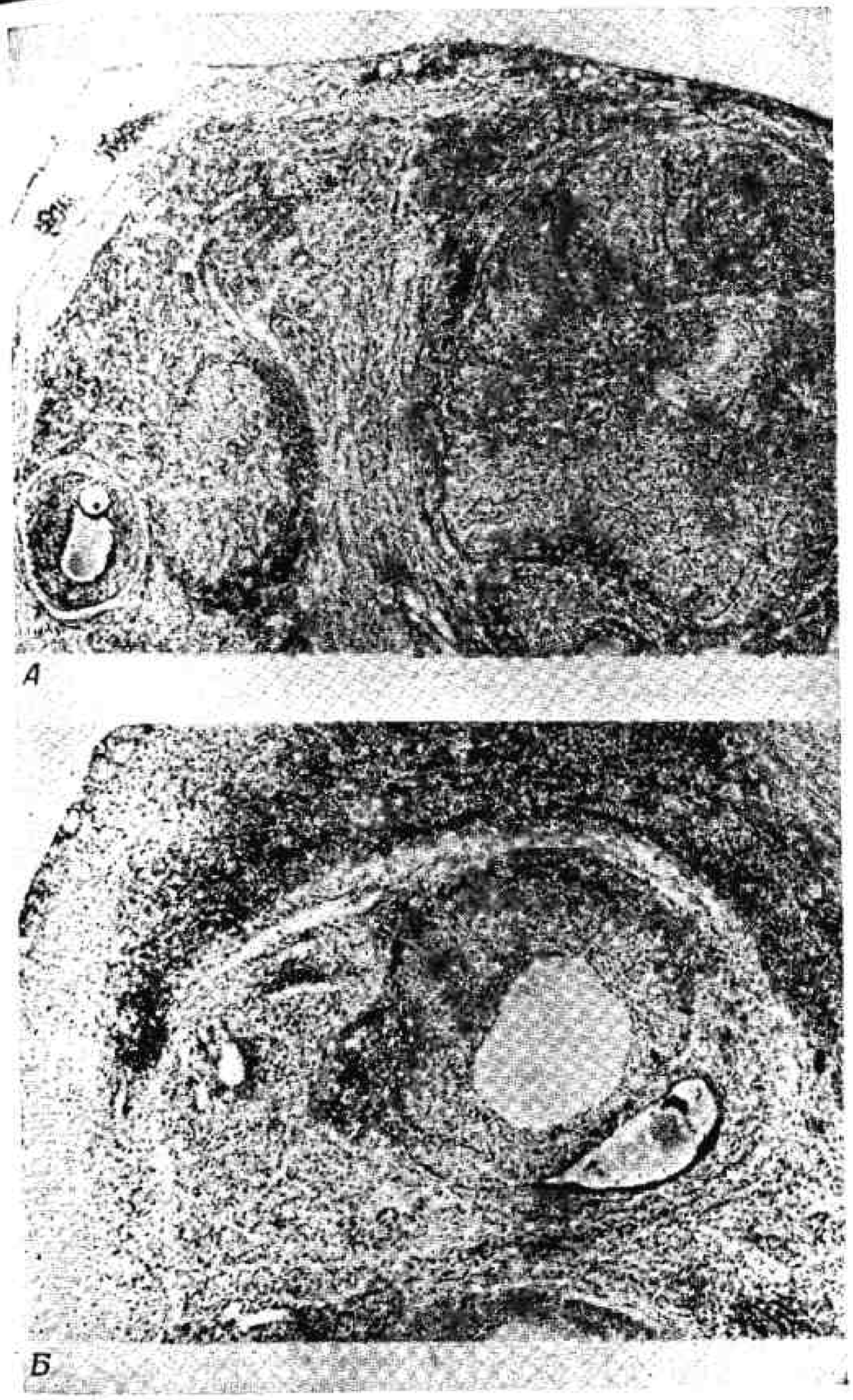
Фото 17. Аутотрансплантат ткани яичника крысы, пропитанной крысиной сывороткой с добавлением 15% глицерина, медленно замороженной при —79° и хранившейся при этой температуре в течение 70 недель. ×32.

Трансплантат изъяли спустя 145 дней после имплантации (за это время отмечалось 17 нерегулярных эстральных циклов) и спустя 7 дней после последнего периода ороговения. Видно желтое тело, вероятно образовавшееся без овуляции, и маленькие фолликулы. (Parkes A. S., Proc. Roy. Soc., B, 147, 520—528, 1957.)

→

Фото 18. Яичники 7—10-дневных крыс, имплантированные под кожу. ×48.

А. Спустя 83 дня после гомотрансплантации. Реципиента спарили за 7 дней до этого. Трансплантат сильно инфильтрирован лимфоцитами, однако отмечается свежее большое желтое тело того типа, какое бывает при ложной беременности, а также нормальный средний фолликул и дегенерирующие остатки старого желтого тела. *Б.* Спустя 40 дней после гомотрансплантации крысе с одним удаленным яичником и 12 дней после удаления у реципиента второго яичника. Видно нормальное увеличение и разрыв фолликула, а также большое количество лимфоцитов по краям трансплантата и внутри него. (Deanesly R., J. Endocrin., 13, 211—220, 1956.)



А

Б

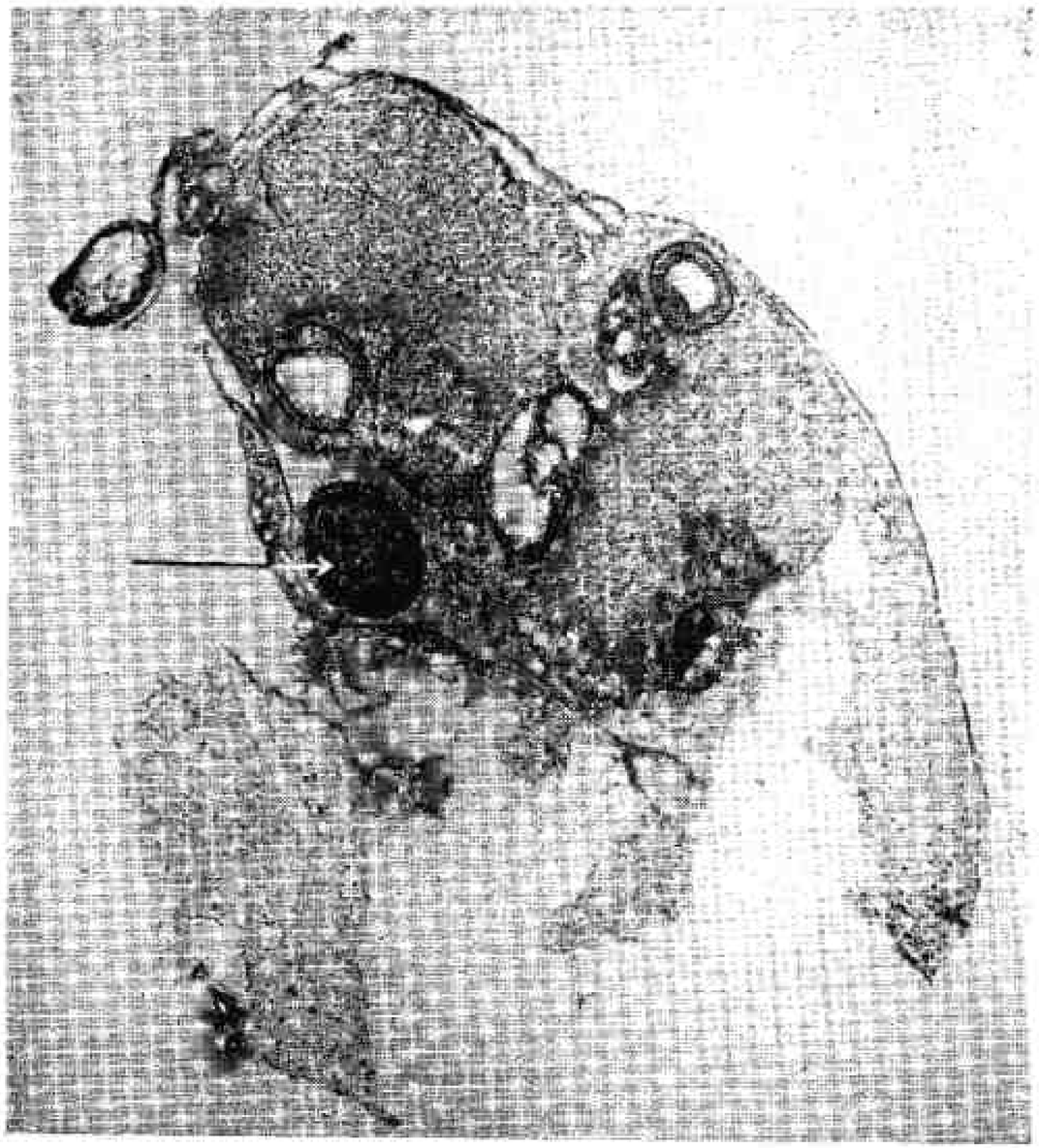


Фото 19. Ортотопическая трансплантация яичника у мыши одной породы и той же линии. ×~28.

Яичник хранили 6 недель при —79° до трансплантации стерилизованному путем облучения реципиенту. Животное забили во время первой беременности спустя 38 дней после трансплантации. Стрелка показывает стерилизованный яичник. (Parrott D. M. V., Gerontologia, 3, 91—96, 1959.)

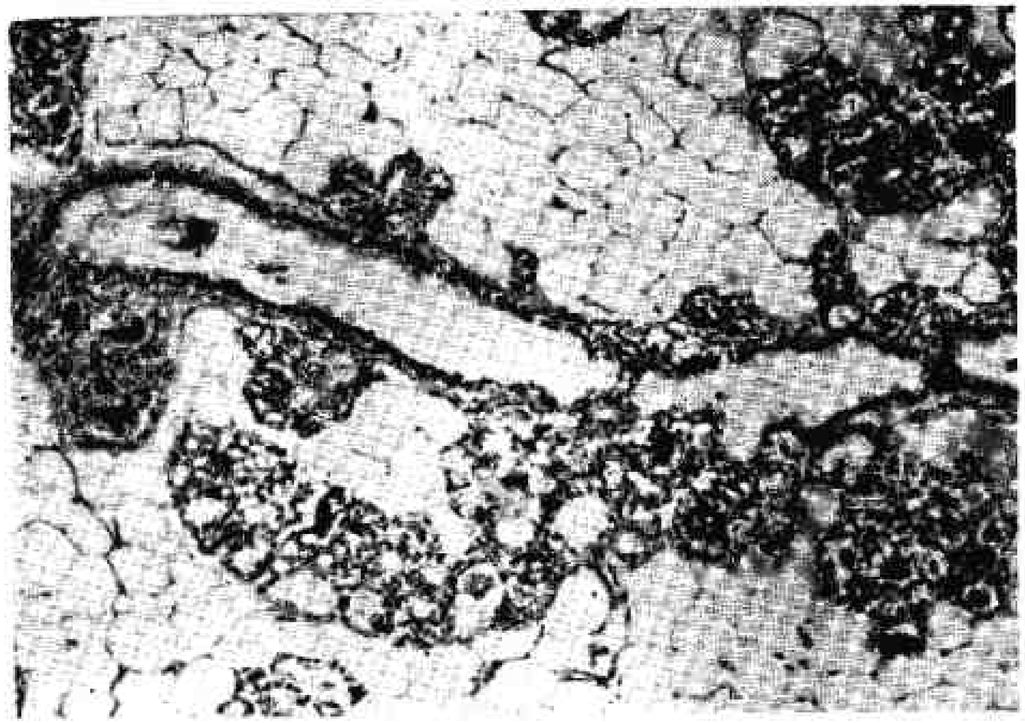


Фото 20. Трансплантация кусочков фаллопиевой трубы, обработанных физиологическим раствором с примесью 15% глицерина, охлажденных до —79° и хранившихся при этой температуре в течение 45 дней. ×20.

Кусочки фаллопиевой трубы имплантировали под кожу; спустя 28 дней после имплантации.

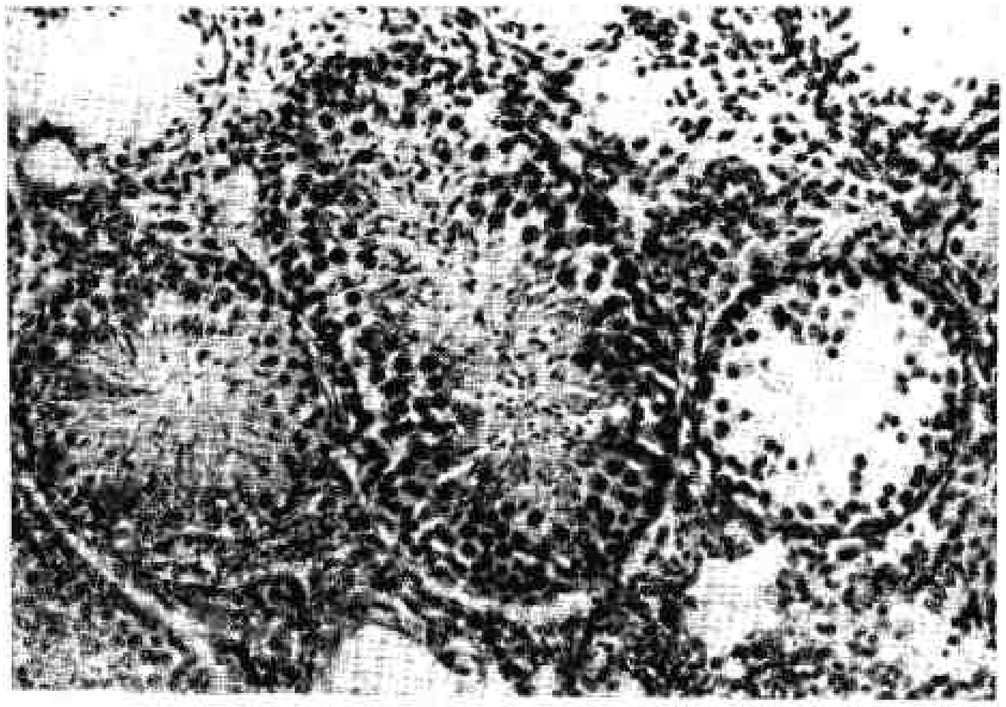


Фото 21. Замороженный семенник неполовозрелой крысы, имплантированный в мошонку 84 дня назад. $\times \sim 100$.

В некоторых семенных канальцах наблюдается нормальный сперматогенез.

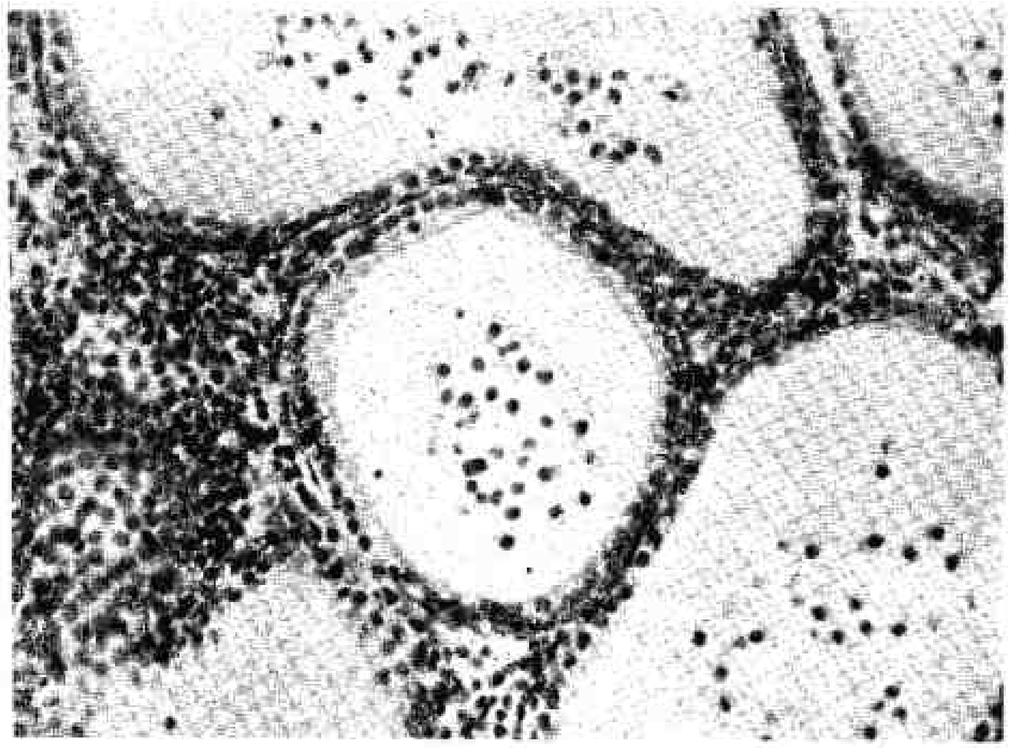


Фото 22. Трансплантат эпидидимиса крысы, обработанный физиологическим раствором с добавлением 15% глицерина, охлажденный до —79° и хранившийся при этой температуре 7 дней. $\times \sim 100$.

Эпидидимис имплантировали под кожу; спустя 55 дней после имплантации. (Deanesly R., J. Endocrin., 11, 201—206, 1954.)

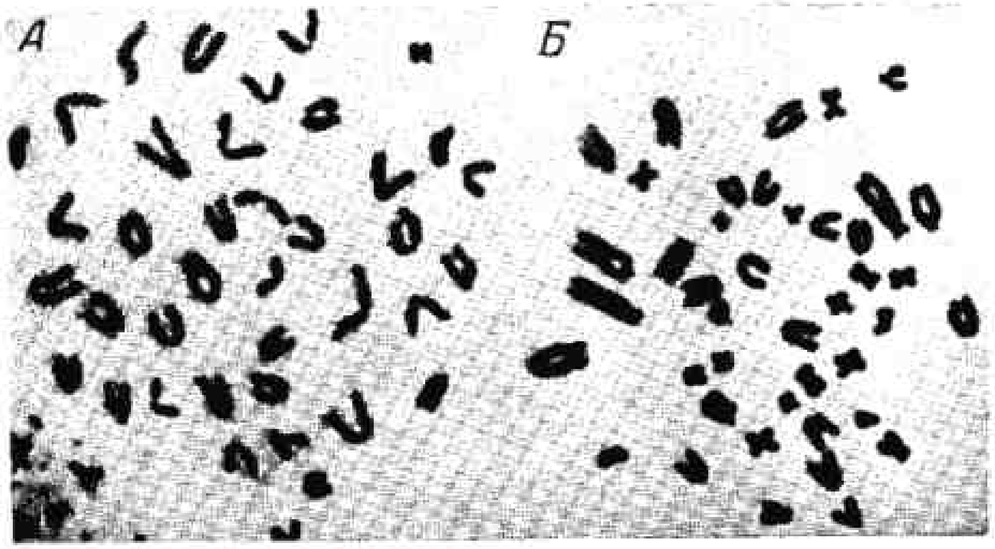


Фото 23. Хромосомы в клетке костного мозга во время митоза. $\times 1650$.

А. Клетка мыши; в поле зрения видны 40 пар хромосом. *Б.* Клетка крысы; в поле зрения видны 42 пары хромосом; для крысы особенно характерны «мальтийские кресты».

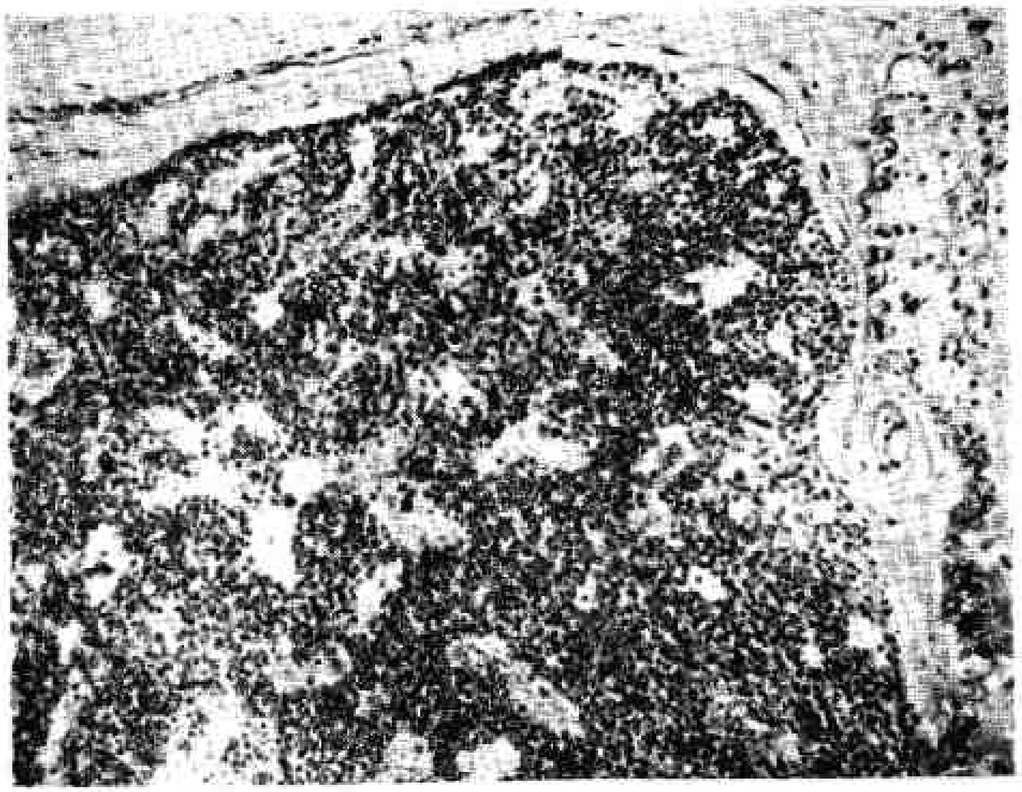


Фото 24. Костный мозг летально облученной мыши, которой ввели обработанный глицерином замороженный костный мозг крысы (см. текст).

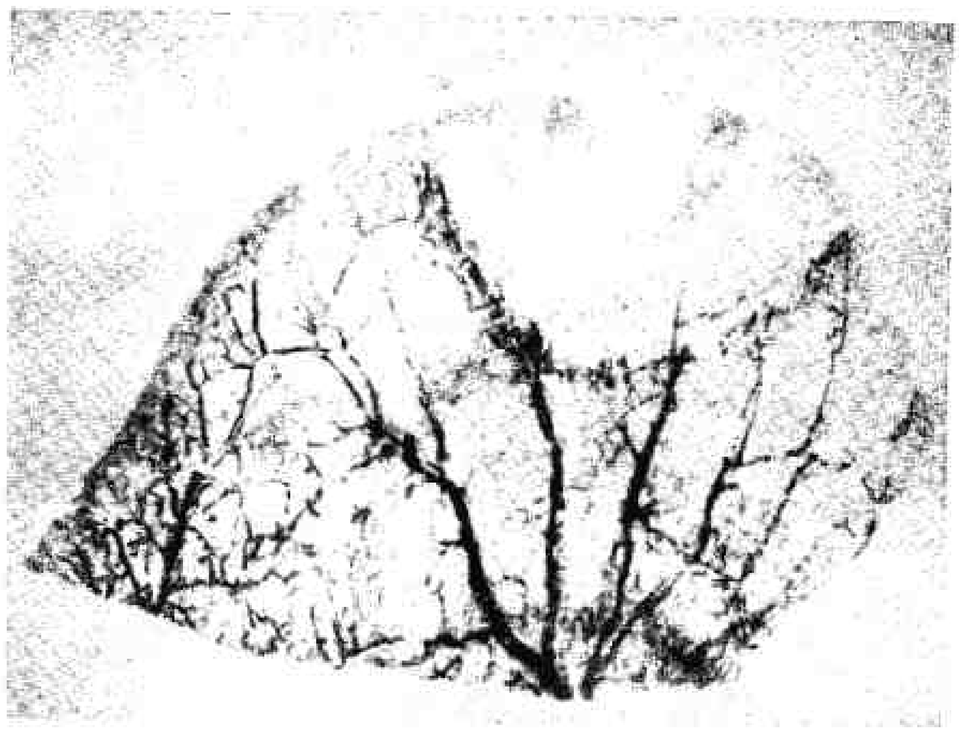


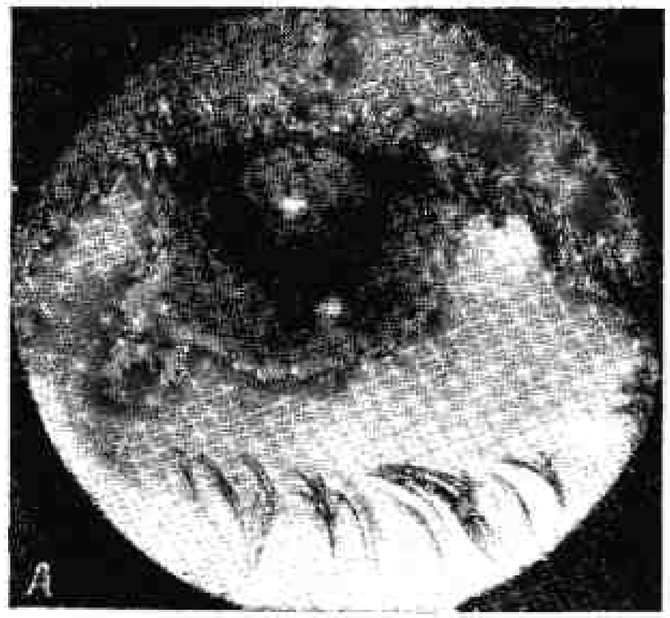
Фото 25. Ушная раковина мыши, замороженная на 4 *сек* с помощью твердой CO_2.

Спустя 70 *час* внутривенно была введена тушь, которая не достигла области стаза.



Фото 26. Ушная раковина мыши, замороженная на 5 *сек* с помощью твердой CO_2 при —78°.

Кусочек кожи вырезали во время оттаивания и трансплантировали. Трансплантат обследовали спустя 12 дней. На срезе видно, что трансплантированный замороженный эпителий прижился и пролиферировал.



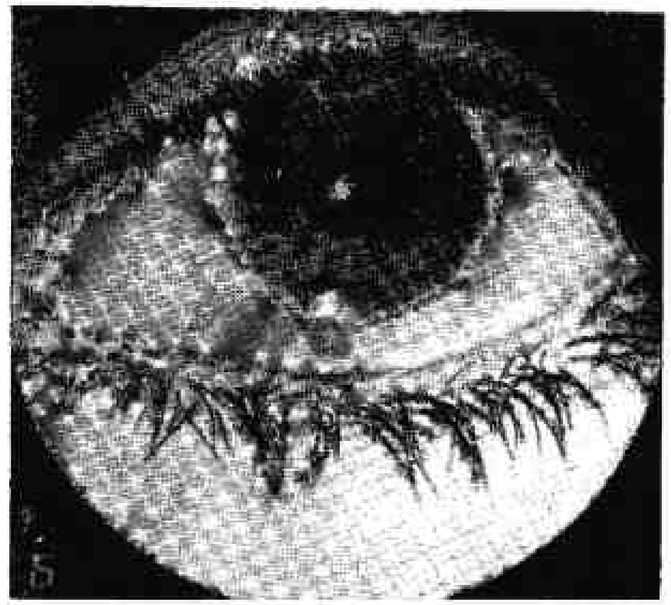
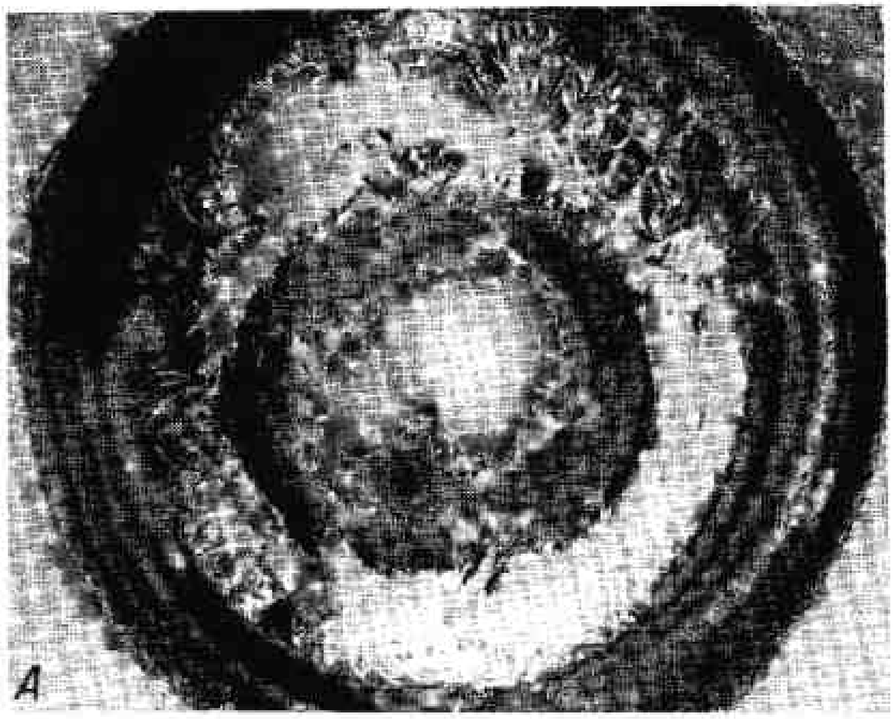


Фото 27. Успешная гетеротрансплантация роговицы у человека. *А*. Рубец от ожога соляной кислотой. *Б*. Тот же глаз спустя 11 месяцев после гетеротрансплантации лиофилизированной роговицы собаки; функциональные результаты относительно удовлетворительные; острота зрения $\frac{4}{10}$ нормы. (Henaff F., In «Recent Research in Freezing and Drying», pp. 295—302, 1960.)



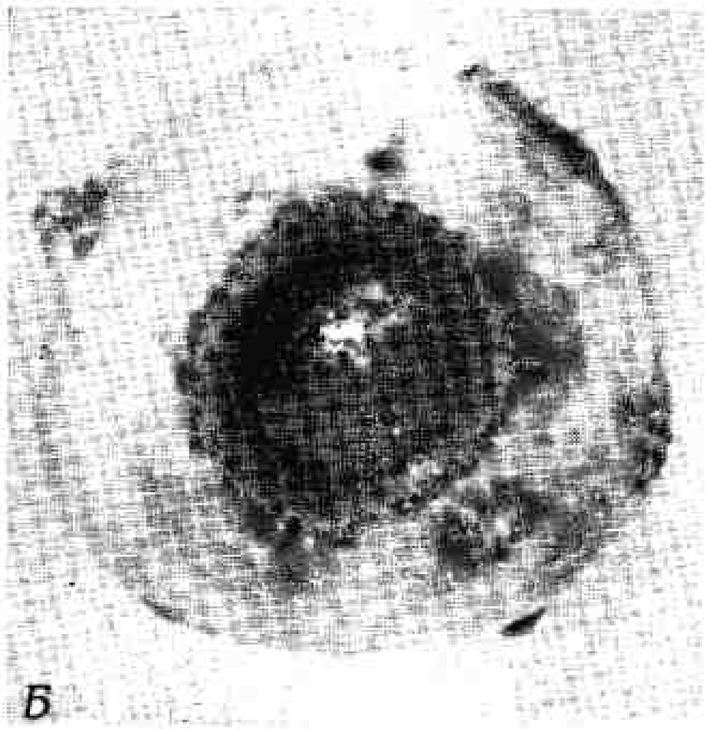
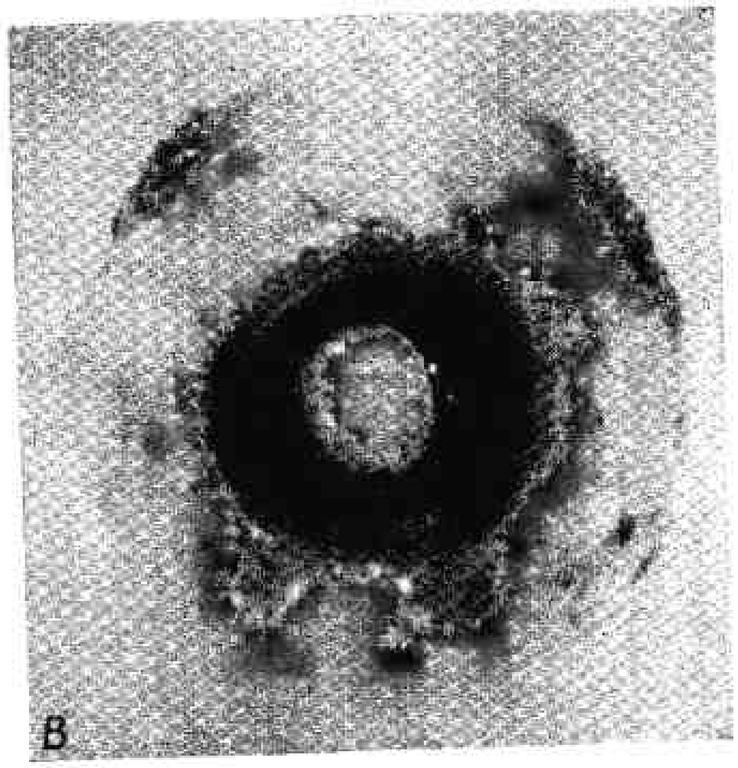
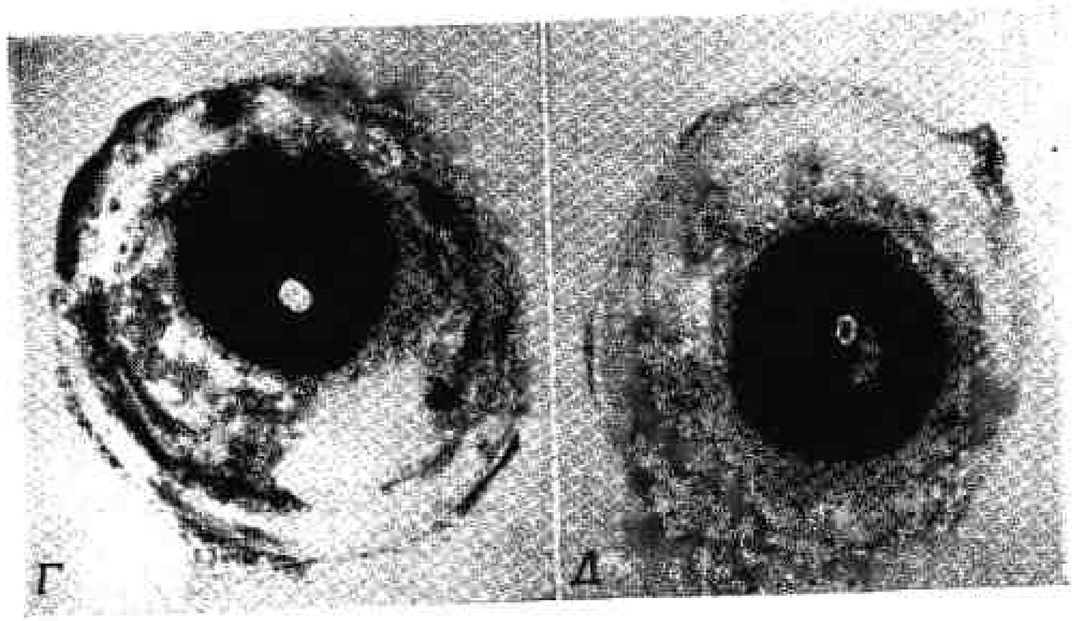


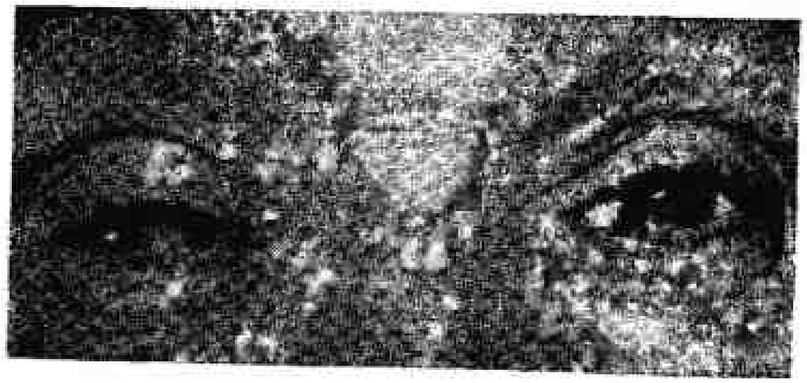
Фото 28. Замораживание и оттаивание цельного глаза.

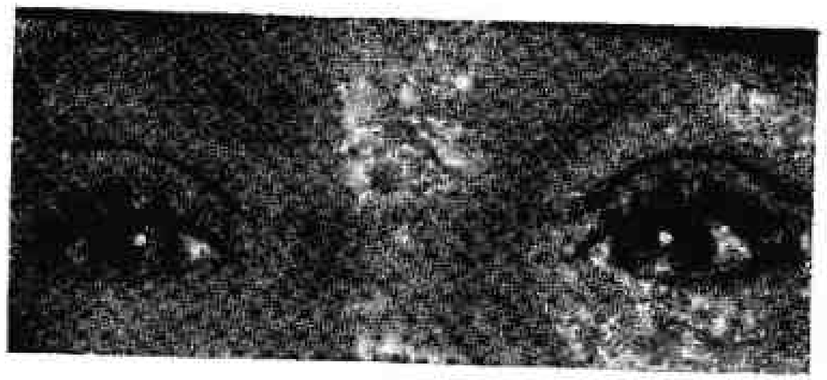
А. Замороженный глаз (в контейнере), извлеченный из холодильника, где он хранился 6 месяцев. *Б*. Тот же глаз после пребывания в течение 3 *мин* при температуре +37°; роговица постепенно становится прозрачной; в строме видны мельчайшие пузырьки воздуха; хрусталик мутный; глаз еще твердый.





В. Глаз после пребывания в течение 15 *мин* при температуре +37°; роговица и хрусталик прозрачные; пузырьки воздуха слились вместе и образовали большой пузырь в центре; глаз стал мягким. *Г*. Глаз, хранившийся в течение 3 недель в парафине при +4°. *Д*. Глаз, хранившийся в течение 6 месяцев при −79°; видны пузырьки воздуха, которые иногда скапливаются в передней камере. (Rycroft B. W., Corneal Grafts, 1955.)





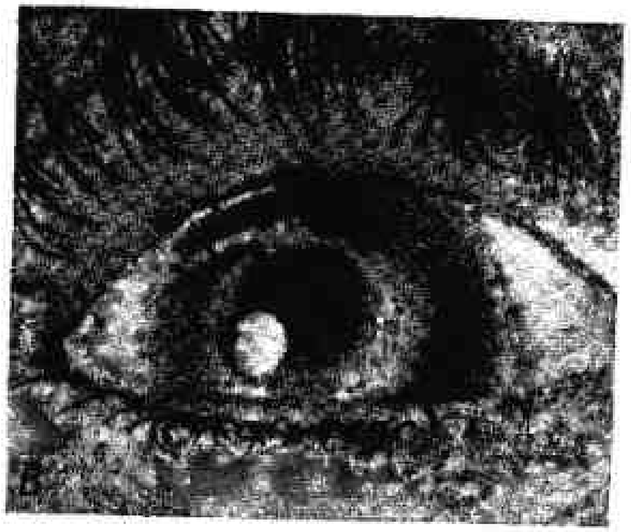
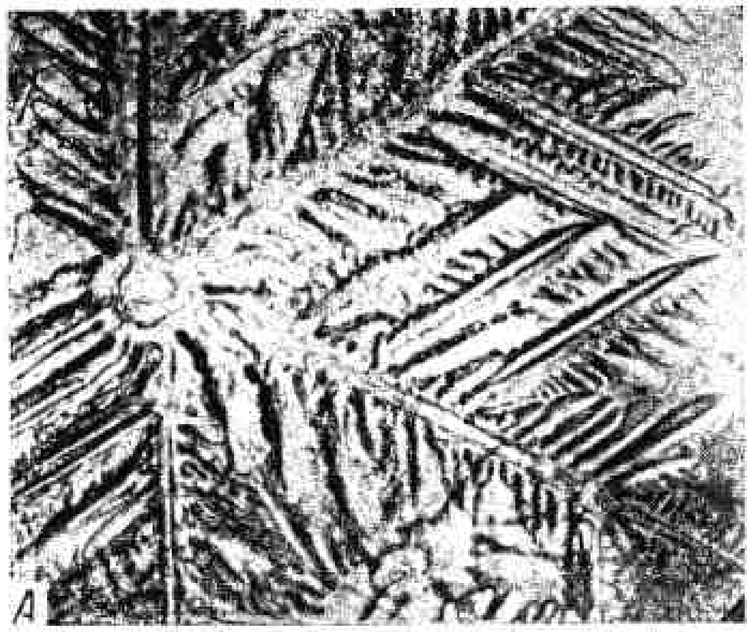
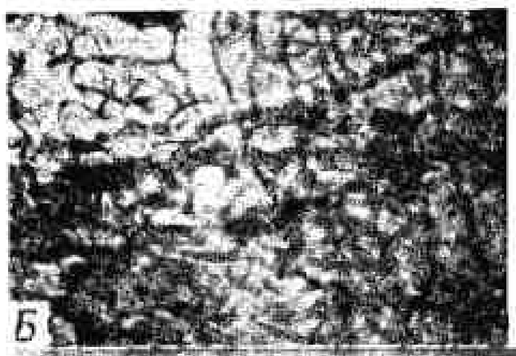
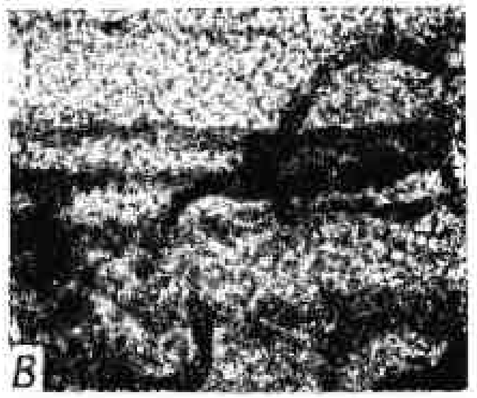


Фото 29. Лечение помутнения роговицы.

А. До операции, виден правый глаз с помутневшей роговицей. *Б*. Примерно спустя 2 года после трансплантации роговицы, взятой у трупа и хранившейся 4 недели при —79°; трансплантат прозрачный, острота зрения $\frac{6}{12}$ (без очков). *В*. Спустя 2 года после операции; глаз показан при большем увеличении (Rycroft B. W., Brit. J. Ophthal., 41, 759—766, 1957.)









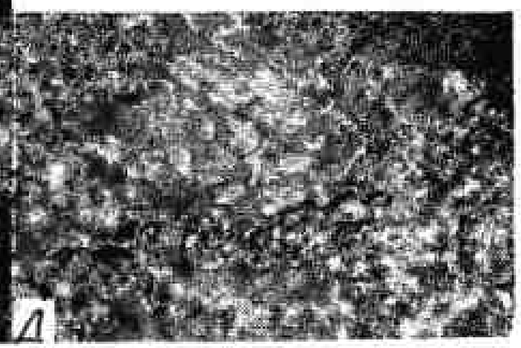


Фото 30. Кристаллизация льда у зимующей предкуколки *Cnidocampa flavescens*.

А. Кристаллы льда в крови; снимок сделан при —2,8° спустя 1 *мин* после внесения кристалла льда при температуре —2,6°. × 60. *Б*. Клетки перикардо и мышца крыла; внеклеточная кристаллизация льда при —4,2°. × ~ 70. *В*. Клетки перикарда и мышца крыла; внутриклеточная кристаллизация льда и потемнение клеток при —10°. × ~ 70. *Г*. Незамерзшая внутренняя среда клетки и внеклеточная кристаллизация (часть фиг. *Б*). × ~ 240. *Д*. Внутренняя среда клетки спустя 11 *мин* после внутриклеточной кристаллизации при —10° (часть фиг. *В*). ×~240. (Asahina E., Aoki K., Shinozaki J., Bull. ent. Res., 45, 329—339, 1954.)

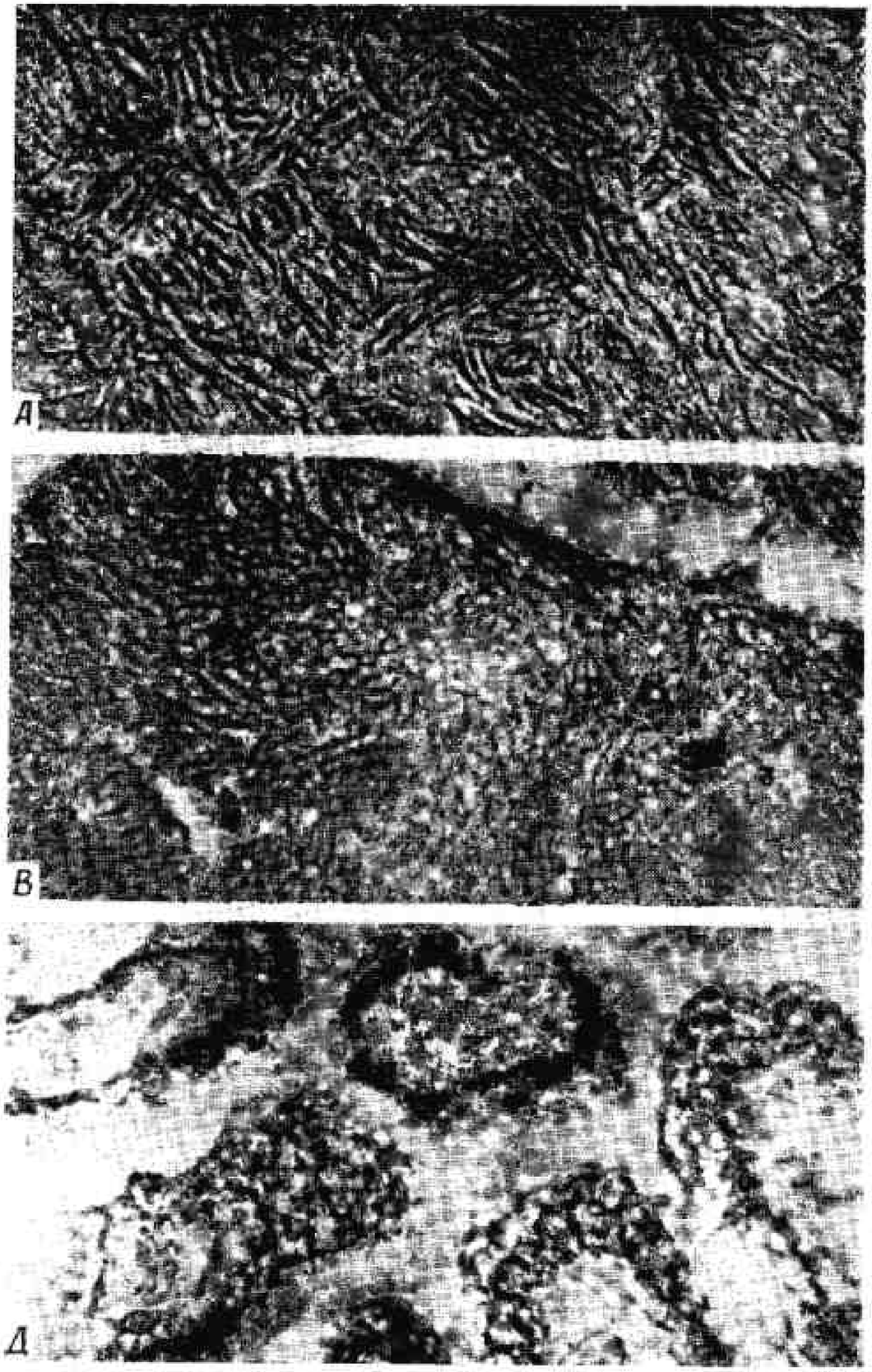


Фото 31. Замораживание некоторых тканей различных моллюсков.

А. Срез незамороженной ноги *Littorina littorea*. *Б*. Срез замороженной ноги *Littorina littorea*. *В*. Поперечный срез незамороженной приводящей мышцы *Crassotrea virginicus*. *Г*. Поперечный срез замороженной приводящей мышцы *Crassotrea virginicus*. *Д*. Срез незамороженного яичника *Mytilus edulis*. *Е*. Срез замороженного яичника *Mytilus edulis*. (Kanwisher J. W., Biol. Bull., Woods Hole, **116**, 258—264, 1959.)

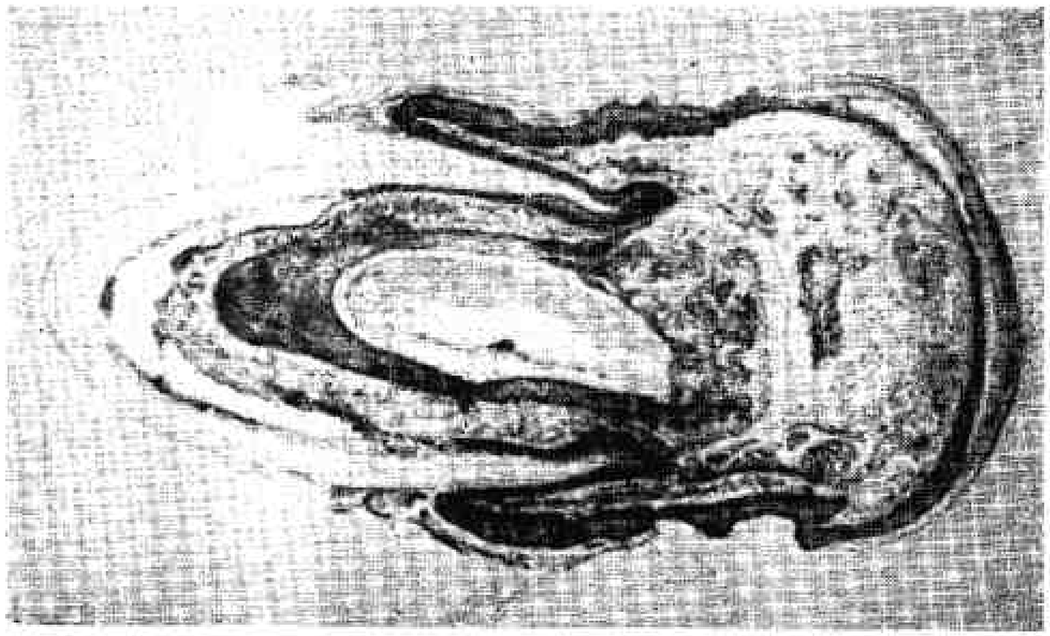


Фото 32. Концевая фаланга пальца на ноге через 3 дня после деформации замороженного предплюсно-фалангеального сочленения. ×~40.

(Smith A. U., Lancet, II, 1255—1259, 1954.)

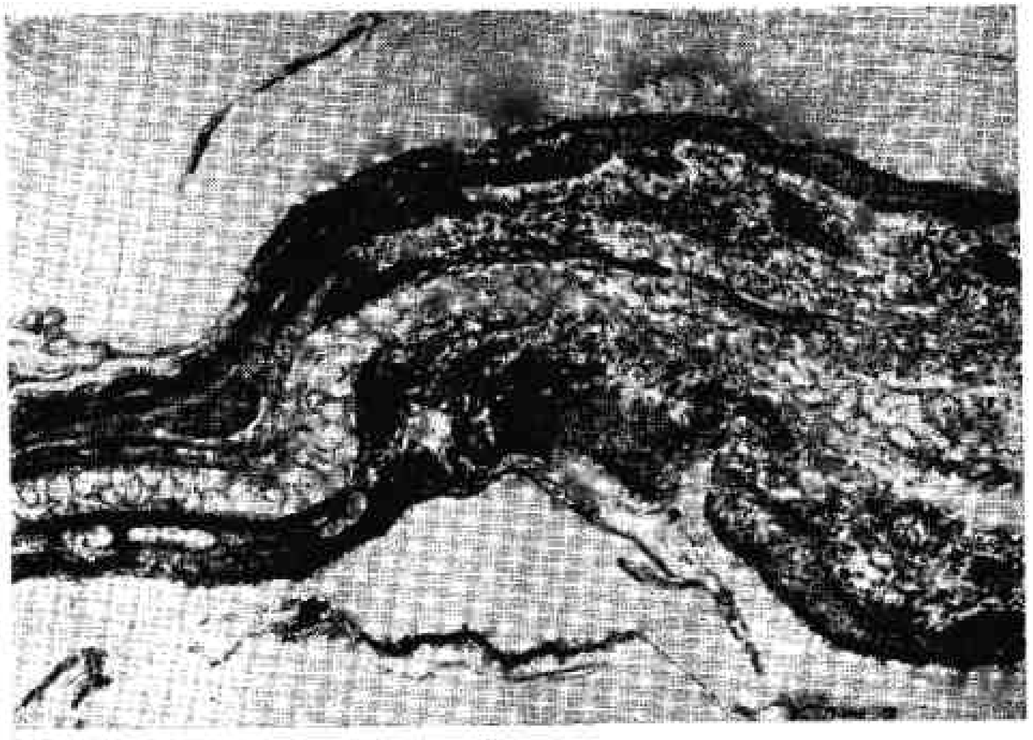


Фото 33. Центральная часть ушной раковины через 7 дней после деформации в замороженном состоянии. ×75.

Продольный срез. Видна линия, отделяющая мумифицированную дистальную часть от распухшей проксимальной части. (Smith A. U., Lancet, II, 1255—1259, 1954.)

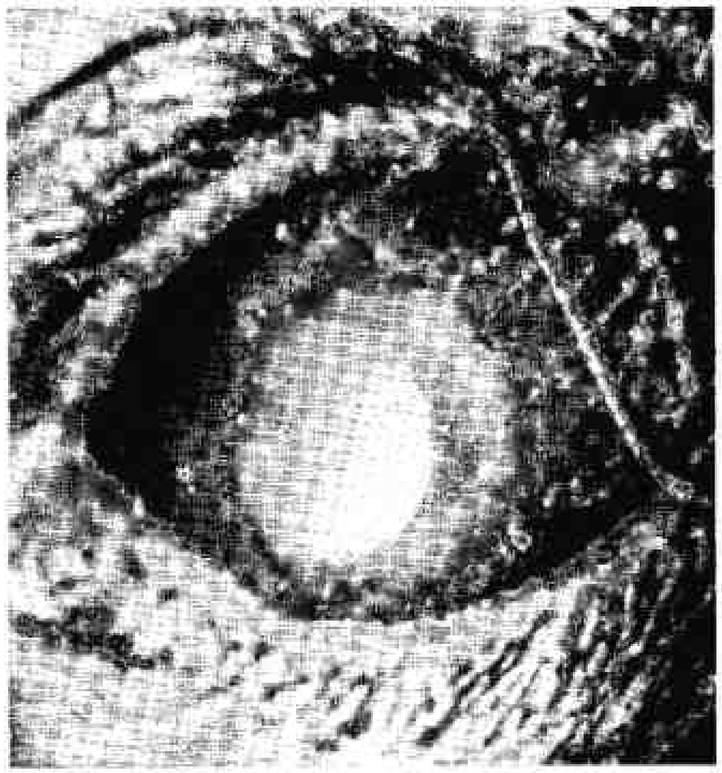


Фото 34. Помутнение роговицы при +5°. ×12.

Хрусталик, видимый через полурасширенный зрачок, стал уже мутным. (Trevor-Roper P. D., Trans. ophthal. Soc., 77, 401—414, 1957.)

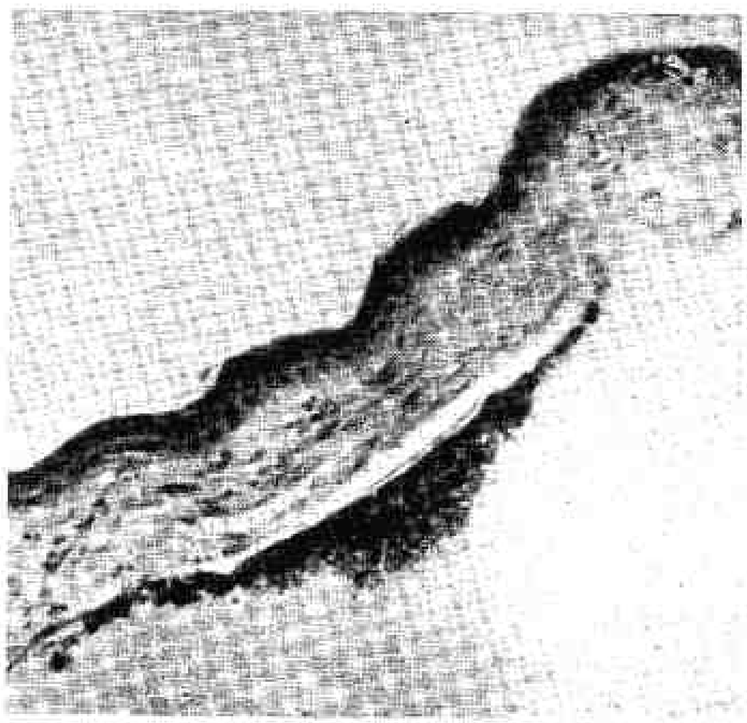
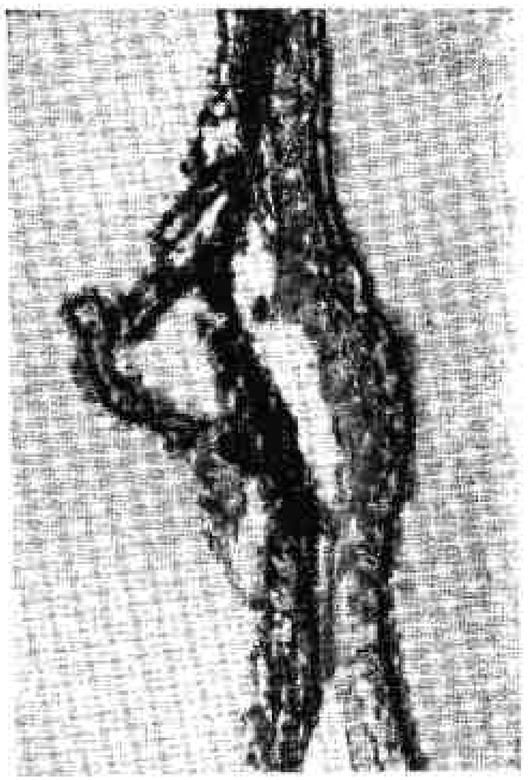


Фото 35. Гистологическое строение восстановленной после замораживания роговицы.

На задней поверхности роговицы хорошо видны отложения пигмента радужной оболочки с кровью. (Trevor-Roper P. D., Trans. ophthal. Soc., 77, 401—414, 1957.)

Фото 36. Гистологическое строение восстановленного после замораживания цилиарного тела.

Видны множественные кровоизлияния. (Trevor-Roper P. D., Trans. ophthal. Soc., 77, 401—414, 1957.)



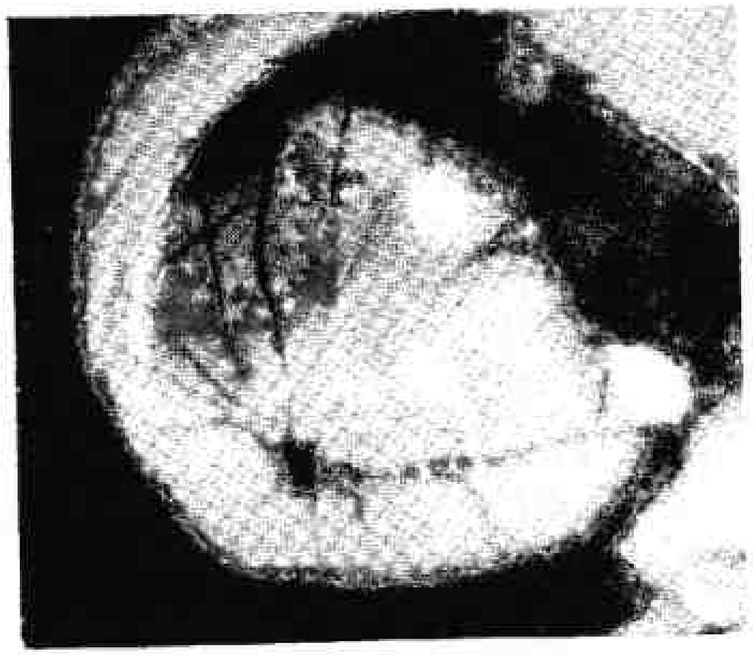


Фото 37. Вид сетчатки после удаления роговицы, радужной оболочки и хрусталика и введения в стекловидное тело пластмассовой втулки.

До замораживания. (Trevor-Roper P. D., Trans. ophthal. Soc., 77, 401—414, 1957.)

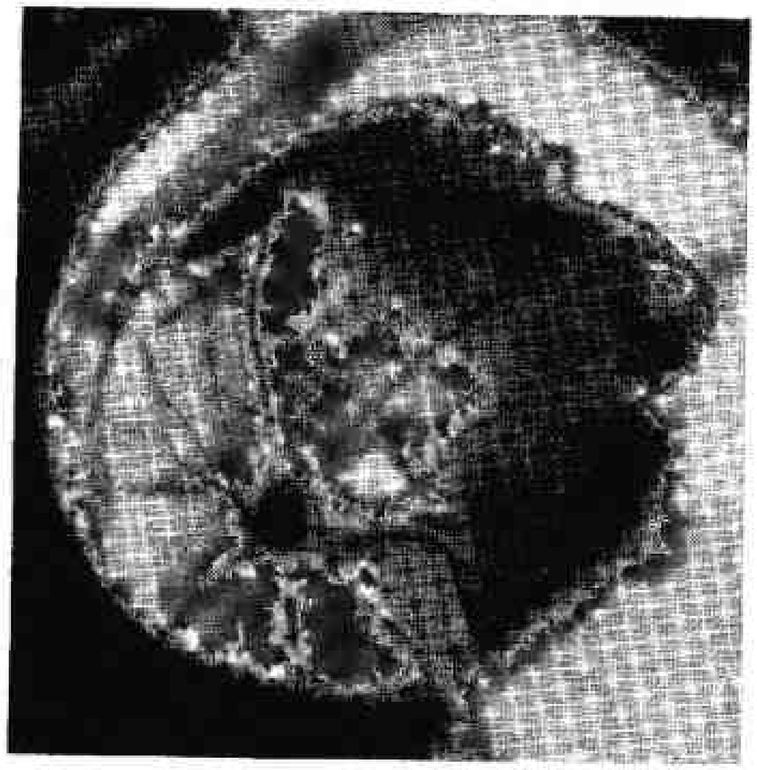


Фото 38. Вид сетчатки после удаления роговицы, радужной оболочки и хрусталика и введения в стекловидное тело пластмассовой втулки.

После оттаивания при температуре +4°. (Trevor-Roper P. D., Trans. ophthal. Soc., 77, 401—414, 1957.)

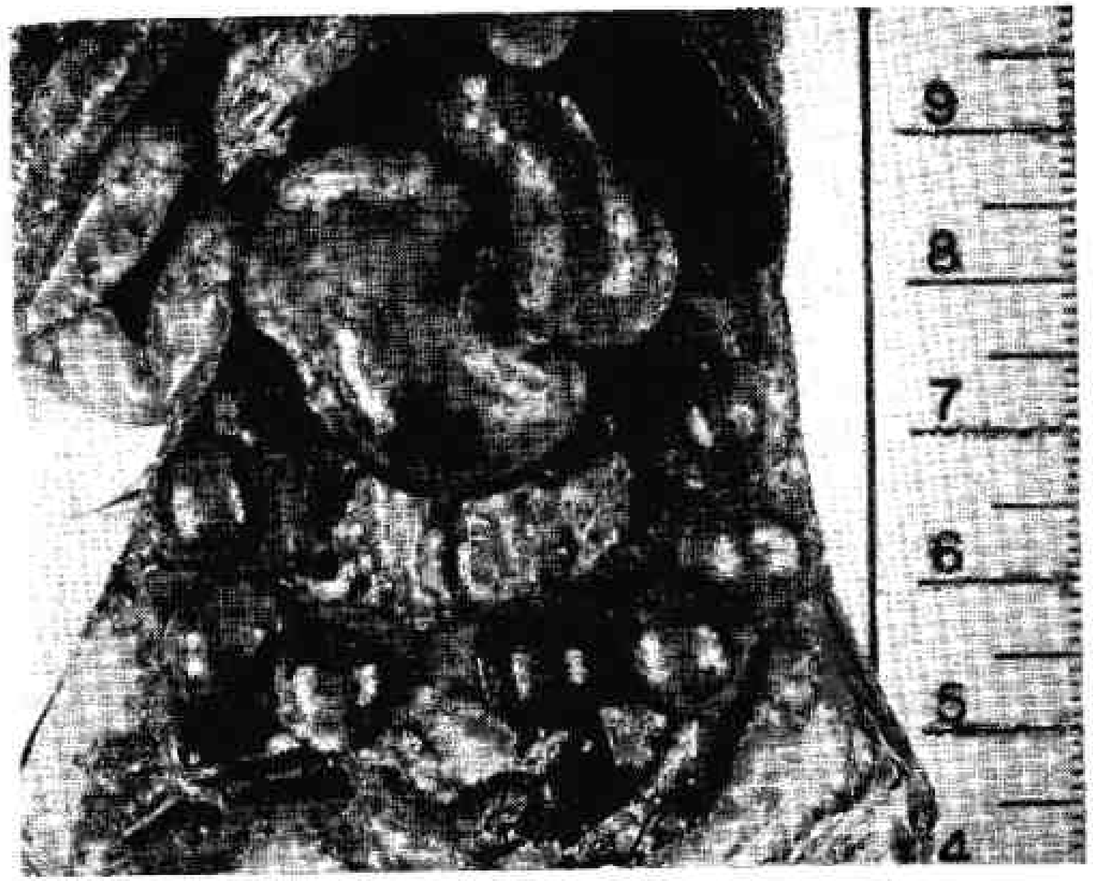


Фото 39. Желудок и матка хомячихи, замороженной на 30 *мин* на 10-й день беременности, спустя 2 *час* после оживления. ×1,0.

Темные пятна на нижнем отделе желудка и на матке соответствуют геморрагическим участкам внутри органов. Шкала дана в *см*. (Smith, A. V., Proc. Roy. Soc., B, 147, 533—544, 1957.)



Фото 40. Хорио-аллантоидная плацента хомячихи, замороженной на 30 *мин* на 11-й день беременности. $\times \sim 75$.

Забита спустя 3 *час* после оживления. Синусы матки заполнены кровью. Рейхертовские оболочки разорваны, под током крови ворсинки отделяются. (Smith A. U., Proc. Roy. Soc., B, 147, 533—544, 1957.)



Фото 41. Хорио-аллантоидная плацента хомячихи на 11-й день беременности. $\times \sim 75$.

Виден небольшой кусочек ткани плода. (Smith A. U., Proc. Roy. Soc., B, 147, 533—544, 1957.)



Фото 42. Уродливые плоды, извлеченные через 13,5 дня беременности у хомячихи, замороженной на 45 *мин* спустя 2,5 дня после начала беременности. $\times \sim 1{,}6$.

(Smith A. U., J. Embryol. exp. Morph., 5, 311—323, 1957.)

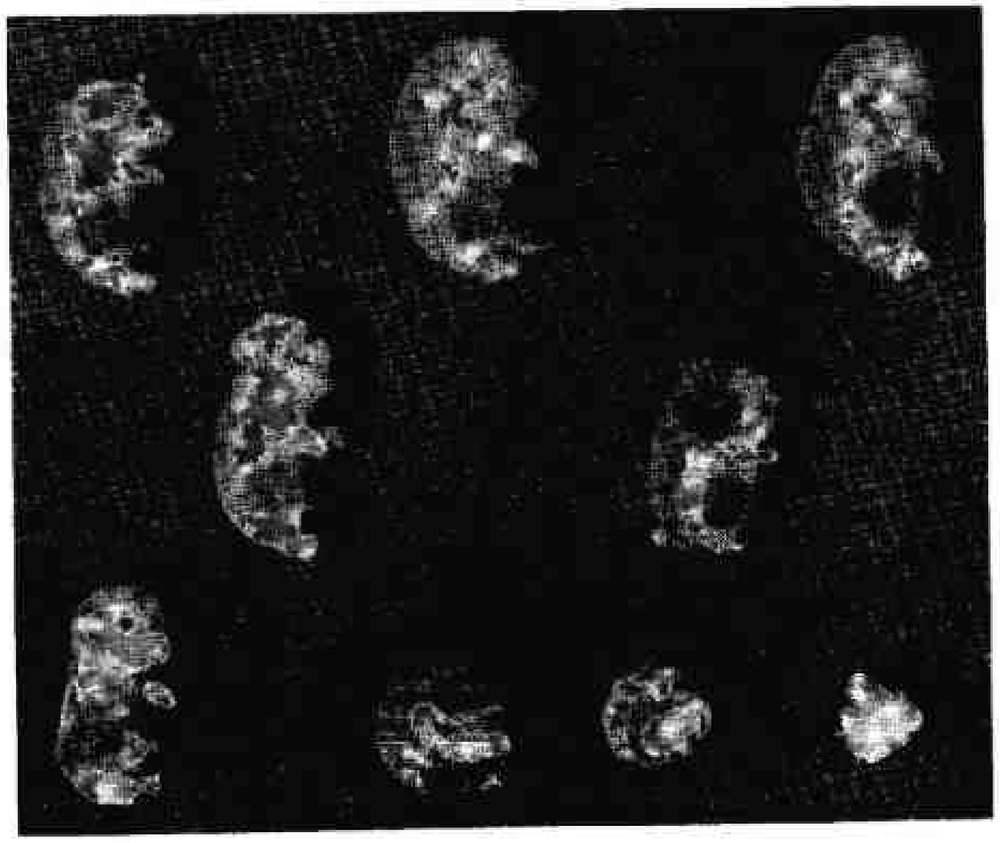


Фото 43. Ненормальные и рассасывающиеся плоды, извлеченные через 13,5 дня беременности у хомячихи, замороженной на 45 *мин* спустя 7,5 дня после начала беременности. $\times \sim 0{,}95$.

(Smith A. U., J. Embryol. exp. Morph., 5, 311—323, 1957.)

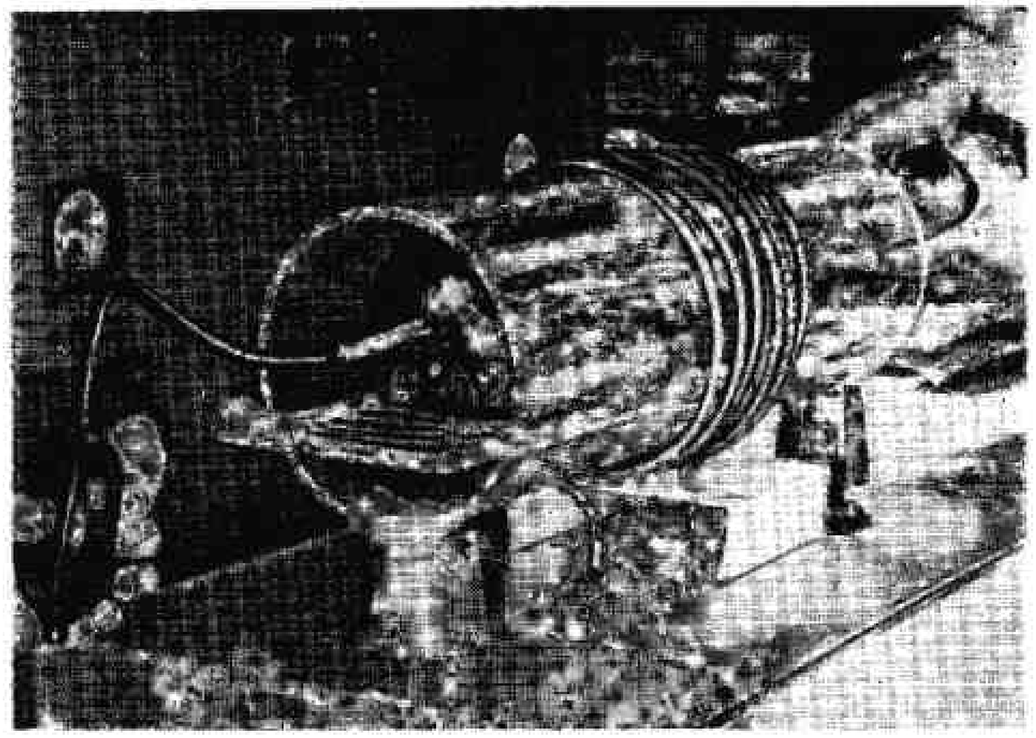


Фото 44. Согревание замороженного галаго с помощью диатермии.

Животное помещают в трубу из перспекса, на которую намотан змеевик прибора для диатермии. Искусственное дыхание осуществляют путем вдувания воздуха через канюлю, вставленную в трахею. (Smith A. U., Proc. Roy. Soc., B. **147**, 533—544, 1957.)

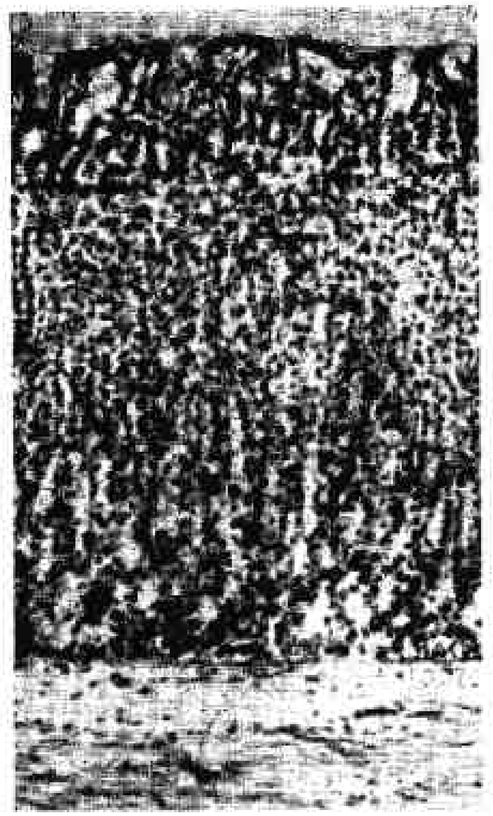


Фото 45. Дно желудка нормального кролика. ×~165.

(Smith A. U., Proc. Roy. Soc., B, **147**, 533—544, 1957.)



Фото 46. Дно желудка кролика, замороженного на 40 *мин* и затем оживленного, но погибшего спустя 2 *час* после оживления. × ~165.
(Smith A. U., Proc. Roy. Soc., B, 147, 533—544, 1957.)

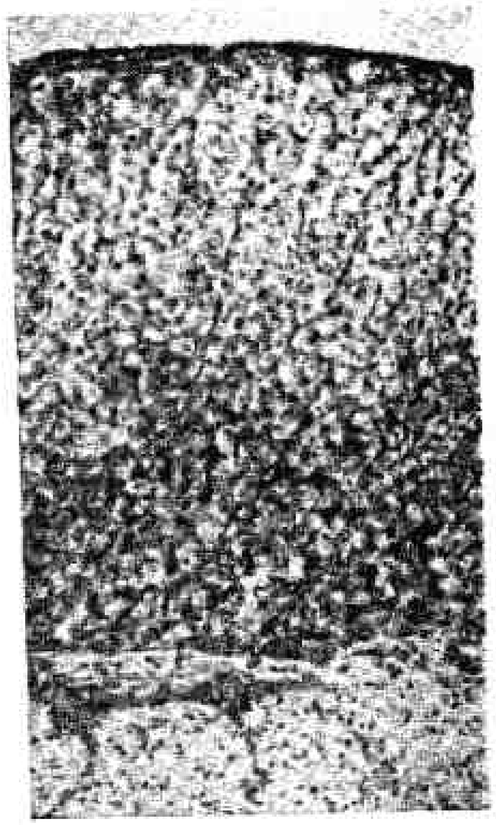


Фото 47. Дно желудка кролика, которому до замораживания ввели в желудок 10 *мл* 4-процентного раствора $NaHCO_3$. × ~165.
Кролик был заморожен на 40 *мин*, оживлен и забит спустя 2 *час*. (Smith A. U., Proc. Roy. Soc., B, 147, 533—544, 1957.)

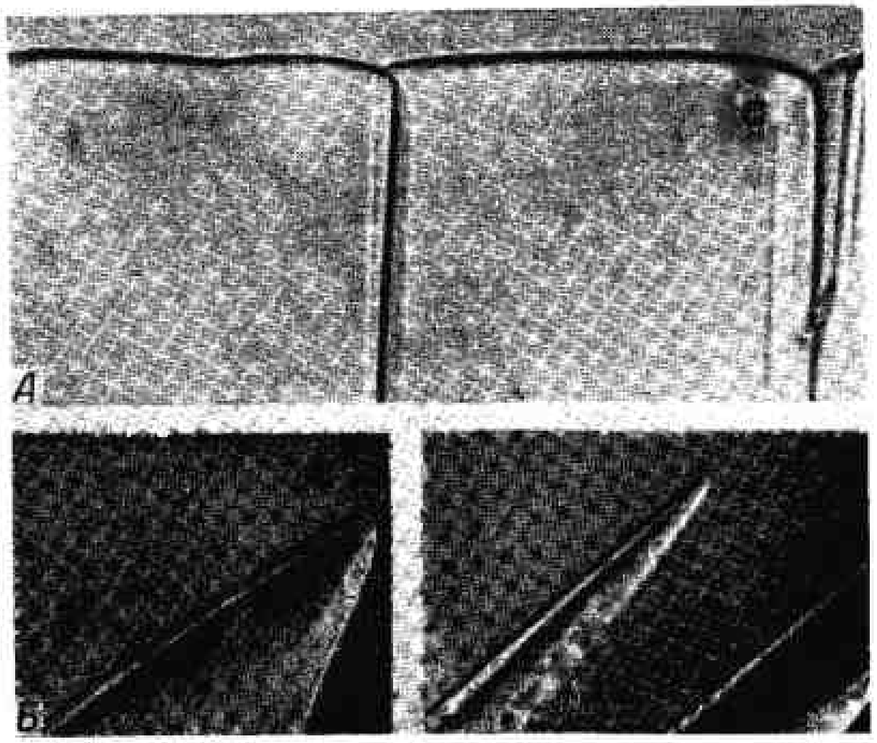
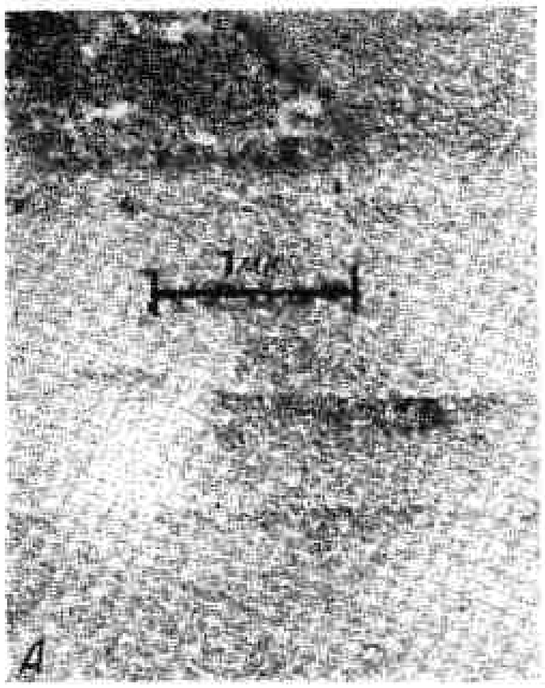
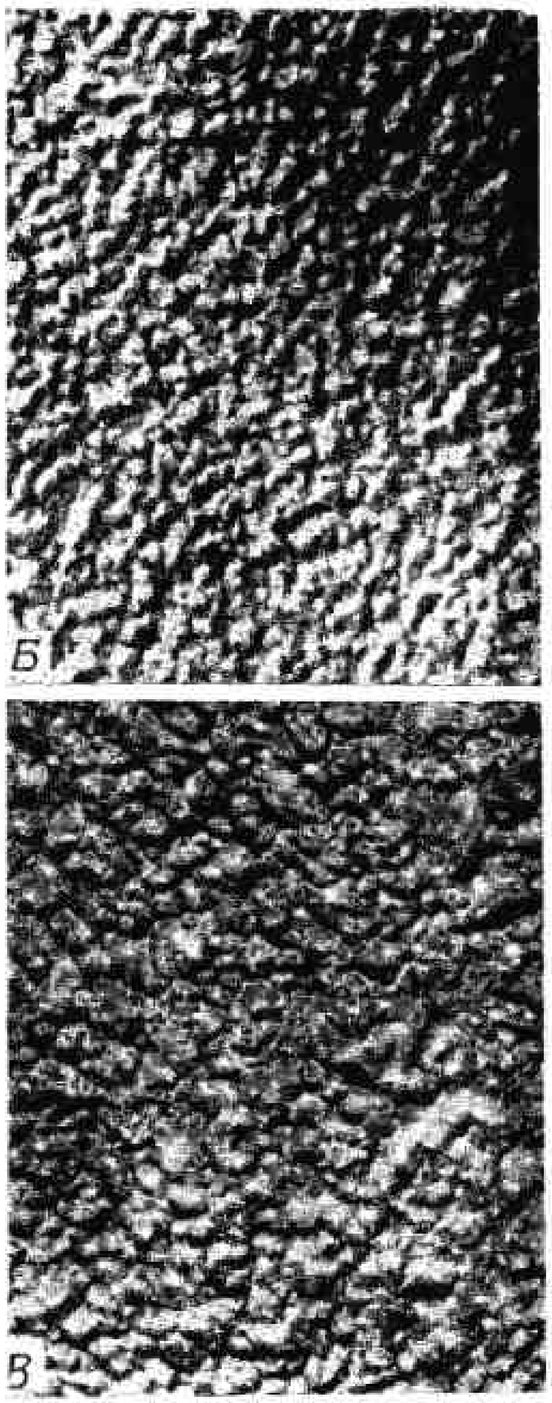
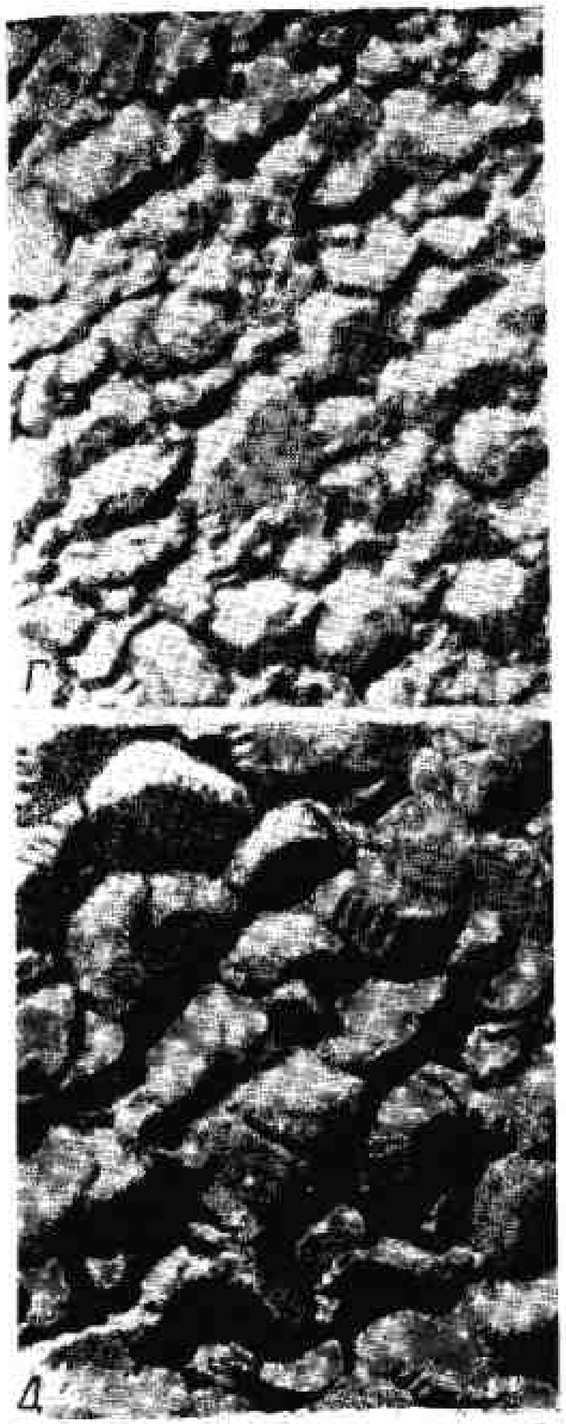


Фото 48. Кристаллы льда, образовавшиеся в чистой воде при 0°.
А — ледяные пластинки (tabular habit); *Б* — копьевидные кристаллы (acicular habit). (Luyet B. J., Proc. Roy. Soc., B, 147, 434—451, 1957.)







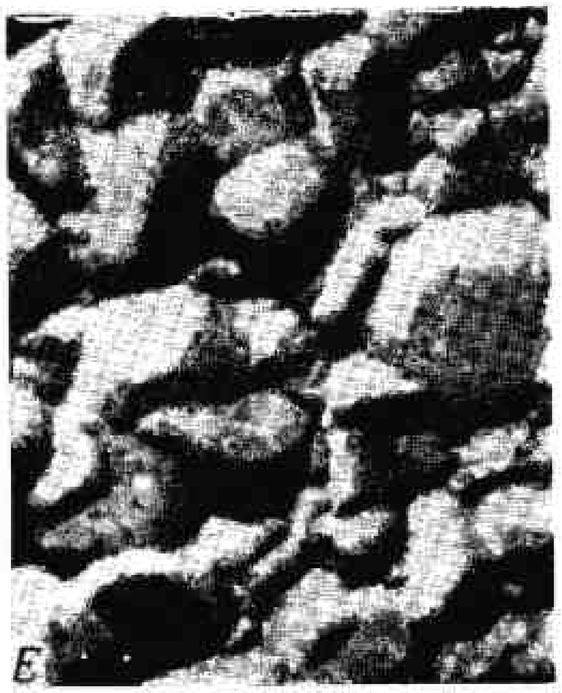


Фото 49. Перекристаллизация льда при низкой температуре.

Электронная микроскопия реплик пленок льда, полученных в высоком вакууме. Быстрый рост крупных кристаллов в пленках, которые в основном не кристаллизовались, происходит при очень низкой температуре. *А* — контроль; *Б* — при —96° в течение 3 *мин*; *В* — при —85° в течение 0,5 *мин*; *Г* — при —77° в течение 1,5 *мин*; *Д* — при —80° в течение 5,5 *мин*; *Е* — при —70° в течение 0,5 *мин*. (Мегутап Н. Т., Proc. Roy. Soc., 1B, 147, 452—459, 1957.)

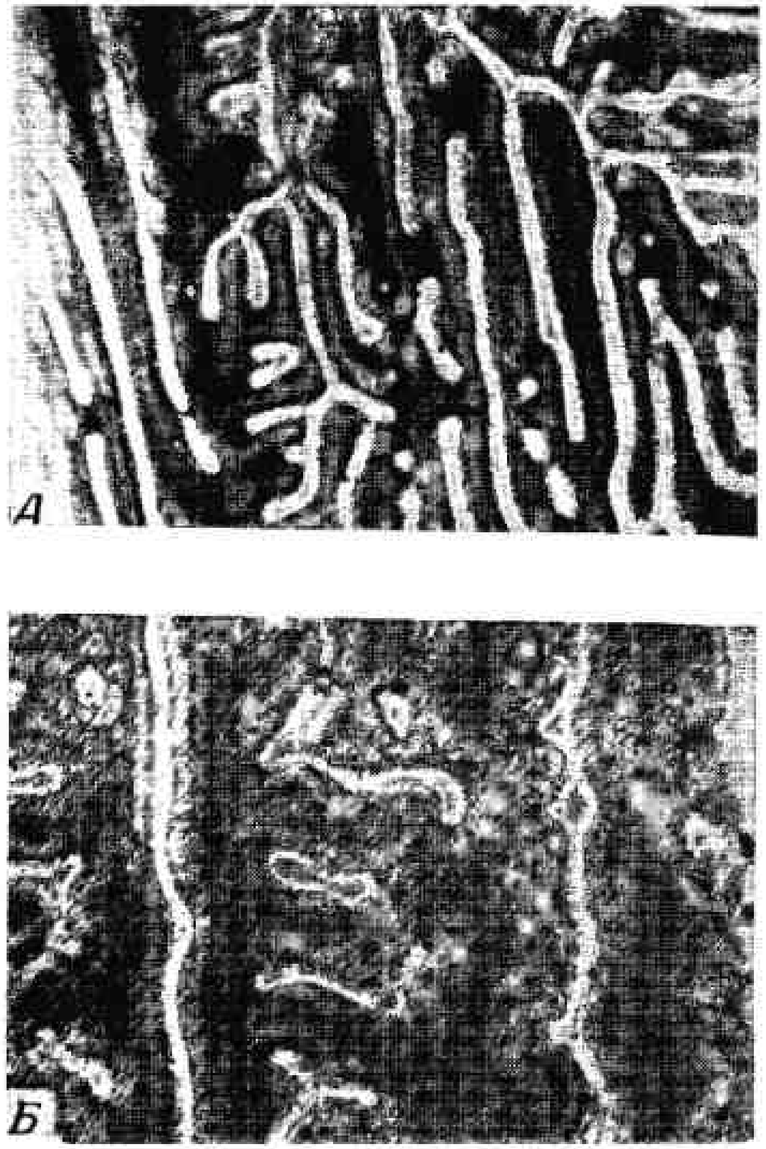


Фото 50. Кристаллизация эвтектической смеси под микроскопом. Подробности см. в тексте. (Rey L. R., In «Recent Research in Freezing and Drying», 1960.)

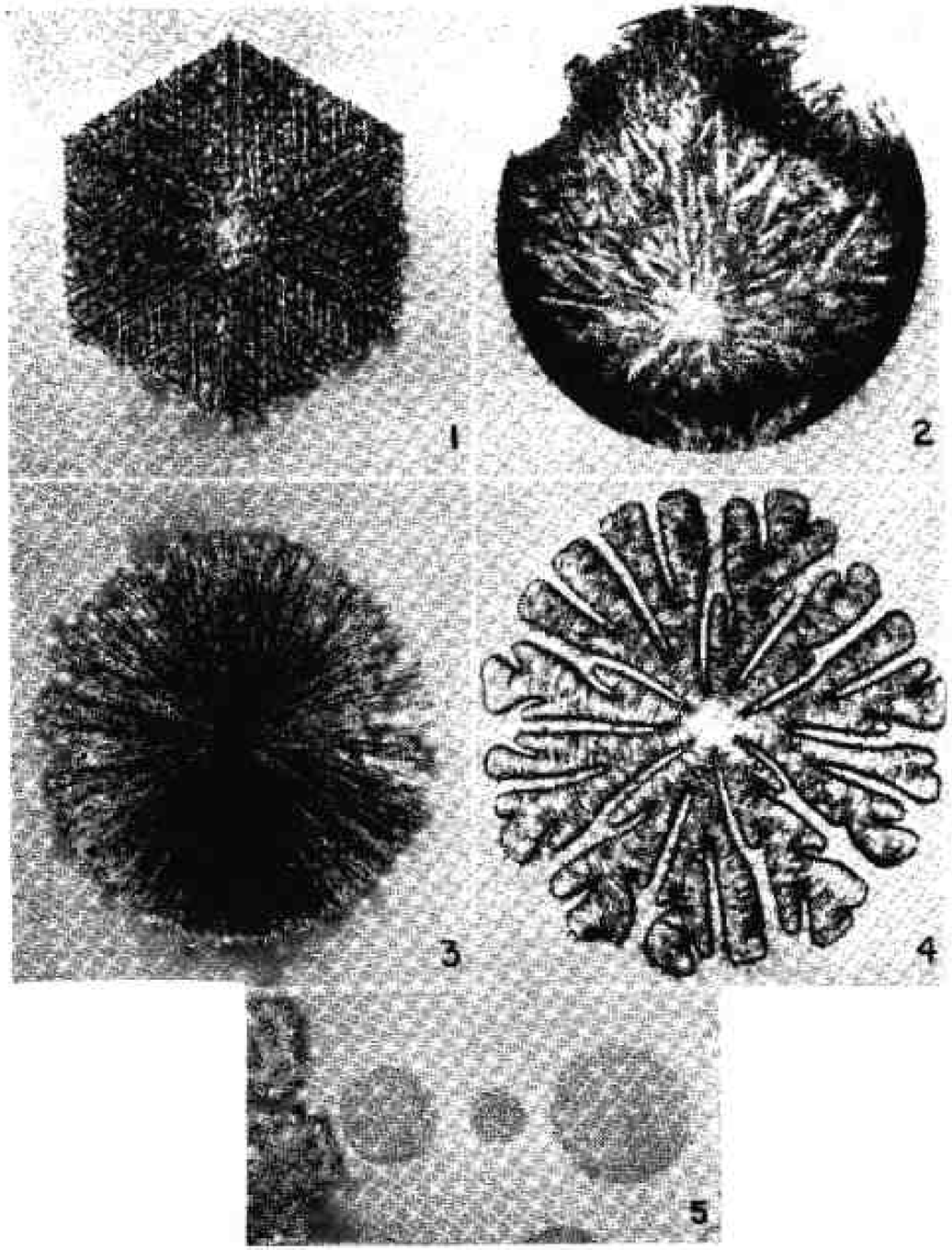


Фото. 51. Формы кристаллов льда. ×107.

1 — гексагональная форма, полученная при очень медленном замораживании; *2* — неправильные дендриты, образовавшиеся при более высокой скорости замораживания; число осей, возникающих в центре кристаллизации неравномерно, но ответвления образуются под таким же углом к осям (примерно 60°), как в гексагональной форме; *3* — шарики, образующиеся при еще более высоких скоростях замораживания; число осей очень велико, и ответвления отсутствуют; *4* — неправильная розетка — измененная форма неправильного дендрита, полученная в присутствии крупных удлиненных молекул (например, желатины); острые окончания заменяются дольками; *5* — быстроисчезающие шарики, образующиеся при очень быстром замораживании; оси в обычном свете не видны; в поляризованном свете с помощью скрещенных николей видны характерные для шариков мальтийские кресты; рентгенограммы указывают на неполную кристаллизацию. (Luyet B. J., Rapatz G., Biodynamica, 8, 1—68, 1958.)

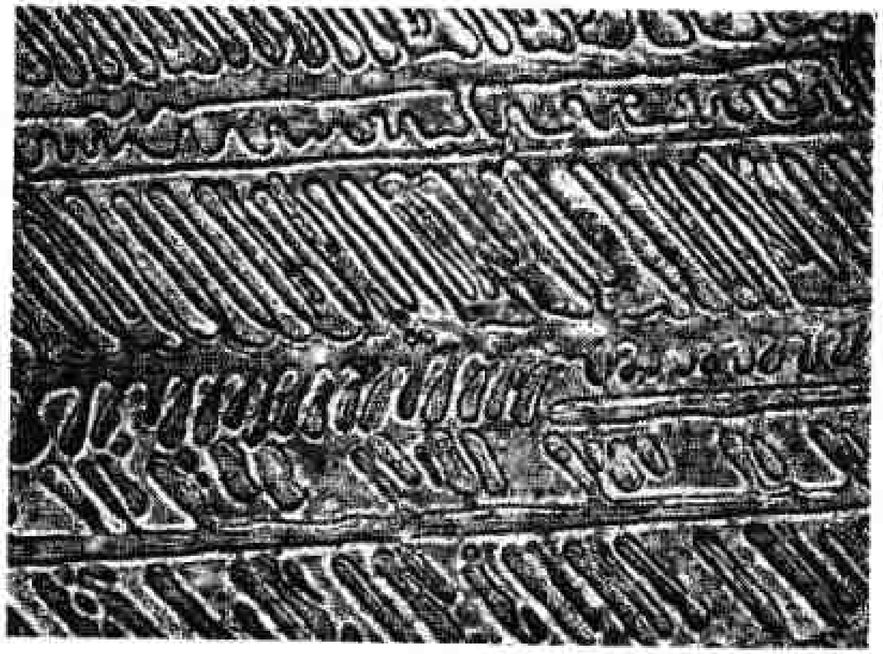


Фото 52. Ветвящиеся кристаллы льда с тупыми концами, образовавшиеся в 3 *М* растворе глицерина при —15°.
(Luyet B. J., Proc. Roy. Soc., B. 147, 434—451, 1957.)

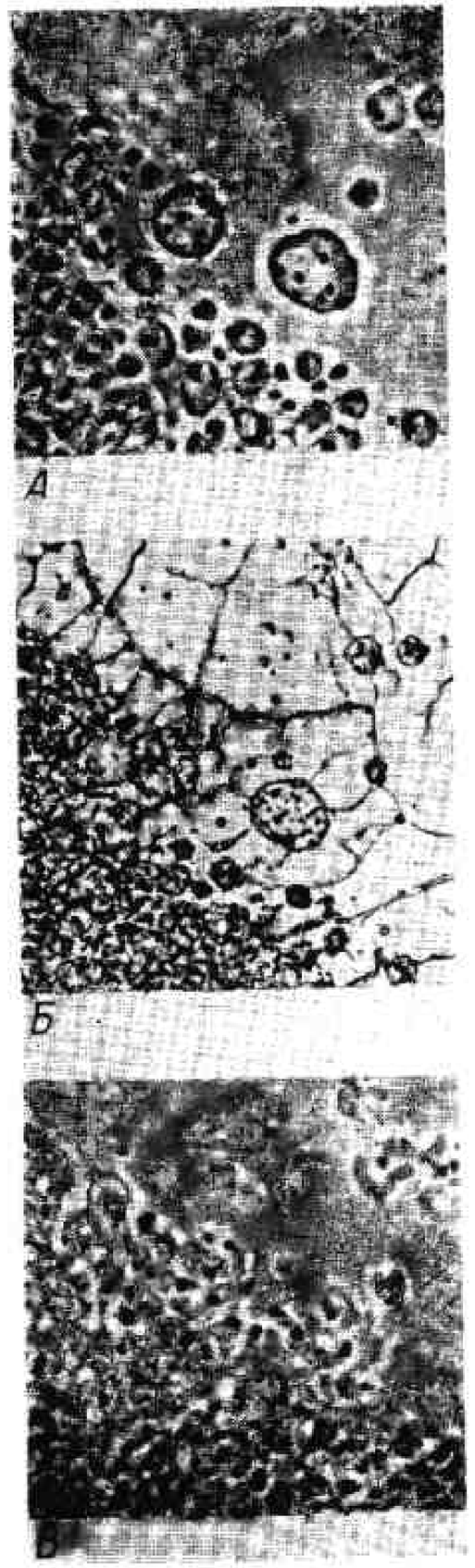


Фото 53. Ткань семенника морской свинки в растворе Рингера. × ~ 260.

А. До охлаждения, при +21,5°; фазовый контраст. *Б*. Тот же препарат при —78°; прямое освещение; видна внутри- и внеклеточная кристаллизация льда; все клетки замерзли изнутри. *В*. Тот же препарат после оттаивания; фазовый контраст; виден распад клеток. (Smith A. U., Smiles J., J. R. micr. Soc., 73, 134—139, 1953.)



Фото 54. Ткань семенника морской свинки в растворе Рингера, содержащем 15% глицерина. ×~260.

А. До охлаждения, при +20°; фазовый контраст; видны многоядерные сперматиды. *Б*. Тот же препарат при —75°; прямое освещение; в некоторых многоядерных сперматидах видна внутриклеточная кристаллизация льда. *В*. Тот же препарат после оттаивания; фазовый контраст; клетки и их внутренние структуры не повреждены и мало изменились. (Smith A. U., Smiles J., J. R. micr. Soc., 73, 124—139, 1953.)

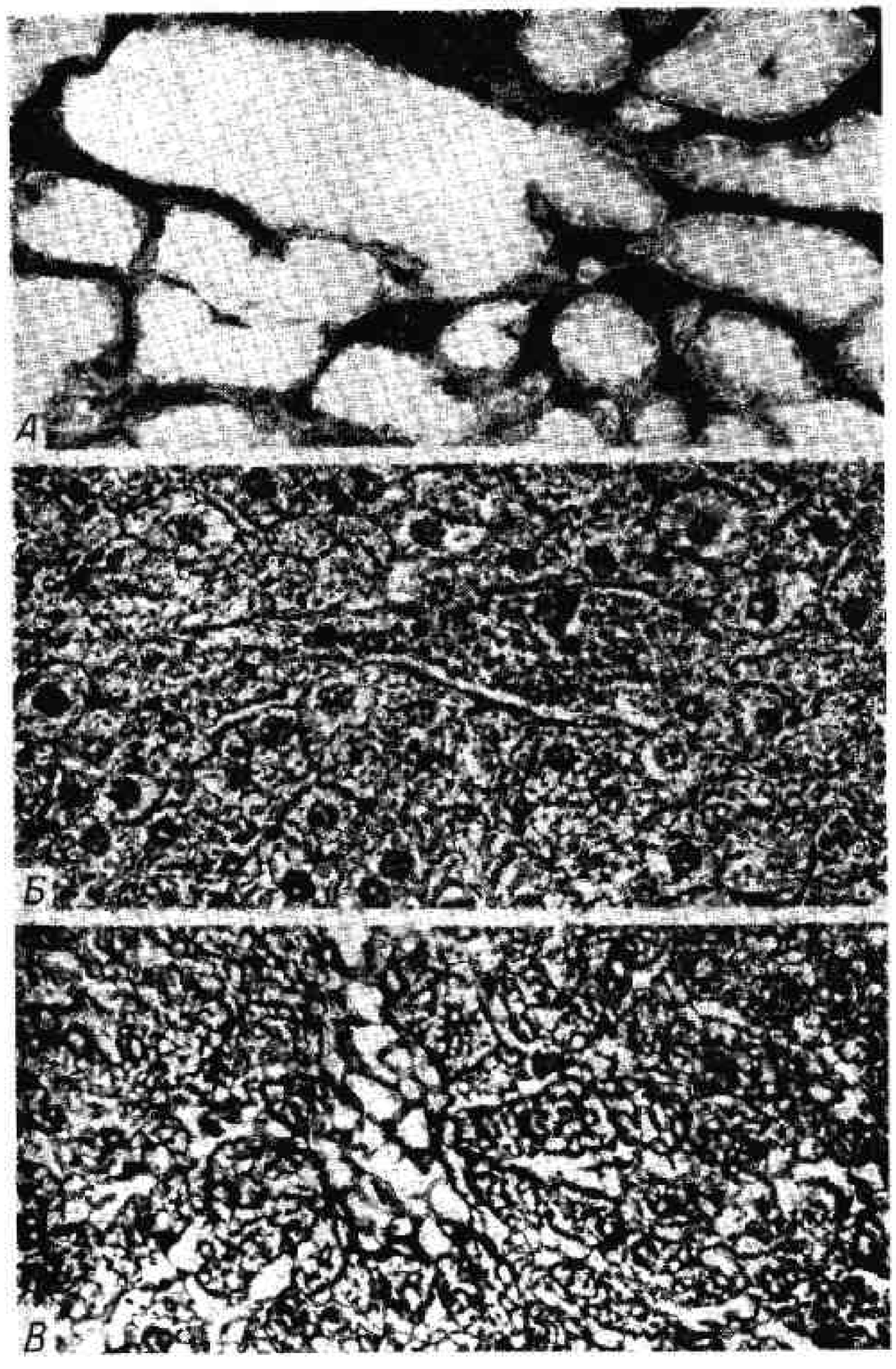
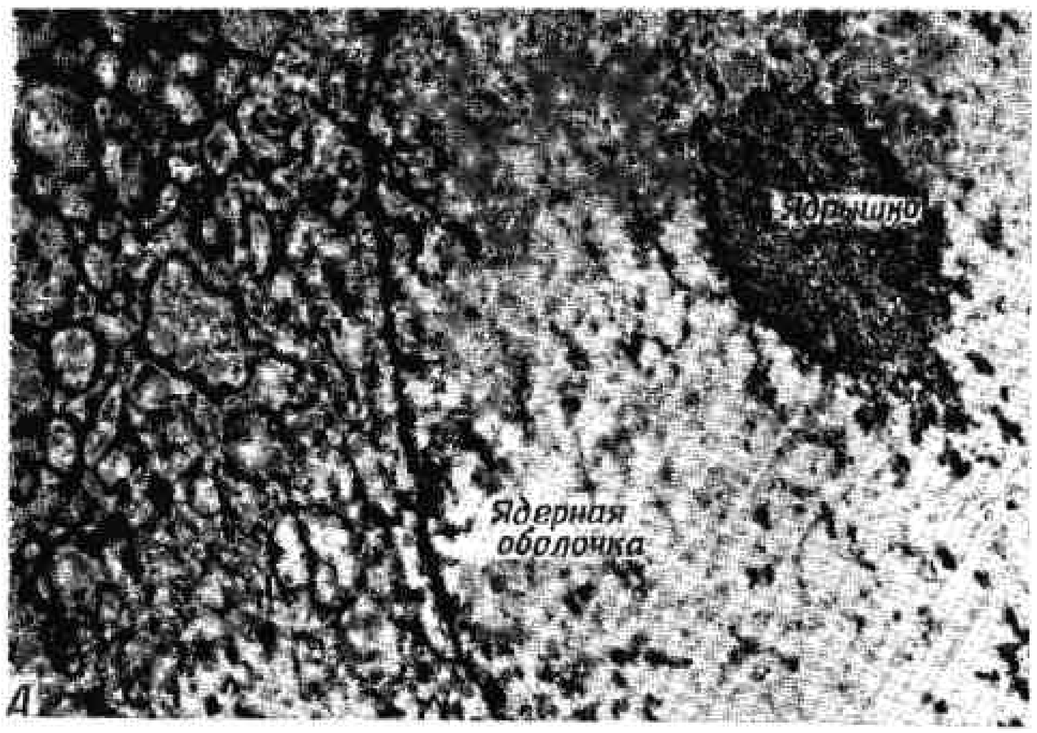


Фото 55. Печень кролика.

А. Медленное замораживание; пустые пространства показывают локализацию крупных внеклеточных кристаллов льда. *Б*. Участок той же ткани после оттаивания; клетки впитали воду, выделенную тающими кристаллами льда, и имеют нормальный вид. *В*. Быстрое замораживание; маленькие отверстия, разбросанные по всем клеткам, показывают локализацию внутриклеточных кристаллов льда. (Мегушан Н. Т., Proc. Roy. Soc., B. 147, 452—459, 1957.)



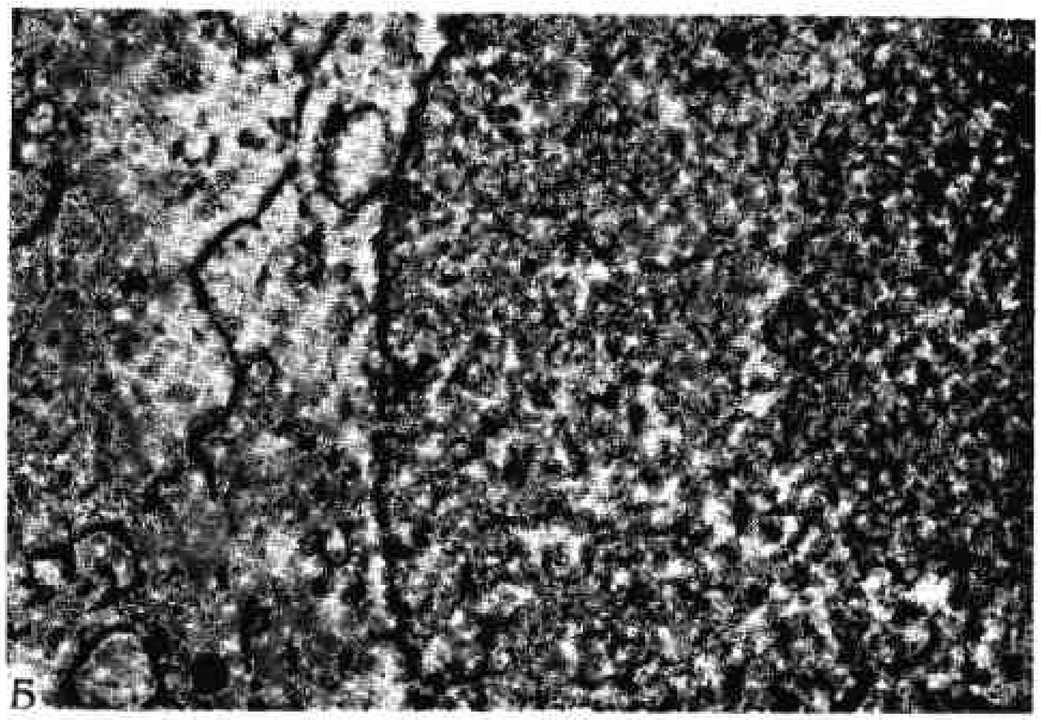


Фото 56. Электронная микрофотография клетки HeLa, охлажденной до —79° и затем оттаянной. × ~13500.

А. Часть ядра и цитоплазма клетки, охлажденной в питательной среде. *Б*. То же, но при охлаждении в питательной среде, содержащей 15% глицерина (Фиксация OsO_4.)

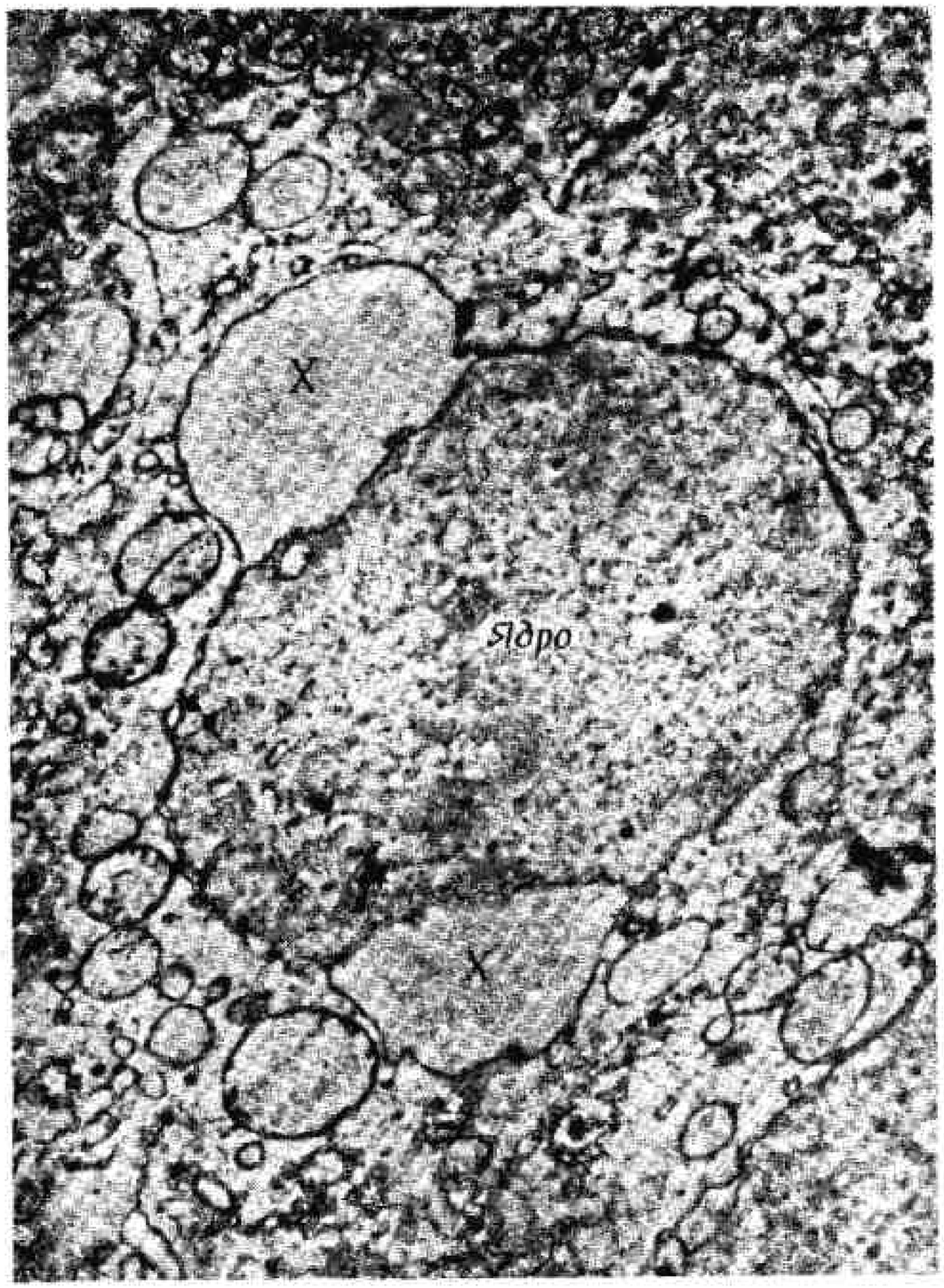


Фото 57. Электронная микрофотография клетки HeLa, охлажденной до —79° и оттаянной в отсутствие глицерина. × ~13500.

Видно образование пузырей (*X*) между двумя слоями ядерной оболочки. Фиксация $KMnO_4$. (Weiss L., Armstrong J. A., J. Biophys. Biochem. Cytology, 7, 673—678, 1960.)



Б

Фото

А. Ча
же. ш

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие к русскому изданию 5
Предисловие к английскому изданию 9
Глава 1. Введение 13
Современные направления в исследовании влияния низких температур 13
ЛИТЕРАТУРА 20

Глава 2. Жизнеспособность замороженных сперматозоидов 22
Устойчивость сперматозоидов человека к замораживанию 22
Витрификация („остекленение") сперматозоидов 23
Открытие защитного действия глицерина на птичьи сперматозоиды при низких температурах 25
Оплодотворяющая способность замороженных сперматозоидов петуха 27
Действие глицерина на сперматозоиды млекопитающих 29
Предотвращение температурного шока посредством медленного охлаждения 30
Оплодотворяющая способность замороженной спермы быка 31
Ранние опыты по замораживанию бычьей спермы 33
Потенциальные преимущества хранения спермы при —79° 36
Использование замороженной спермы в скотоводстве . . 37
Изменение и усовершенствование методики 38
Метод разбавления и состав разбавителей 39
Уравновешивание спермы со средой, содержащей глицерин 40
Скорость охлаждения и критическая температурная зона 42
Условия, обеспечивающие продолжительное хранение спермы 44
Скорость оттаивания 45
Различная степень устойчивости к замораживанию у отдельных проб бычьей спермы 47

Действие глицерина и замораживания на патогенные микроорганизмы, присутствующие в бычьей сперме 48
Сперматозоиды других животных 49
Лиофилизация сперматозоидов 54
ЛИТЕРАТУРА 56

Глава 3. Эритроциты 65
Развитие метода переливания крови 65
Историческая справка 65
Организация банков крови 66
Замораживание и лиофилизация плазмы 67
Замораживание, оттаивание и витрификация эритроцитов 67
Действие глицерина на эритроциты при нормальной температуре, а также во время замораживания и оттаивания 68
Предварительные опыты по переливанию замороженных эритроцитов 70
Оптимальная концентрация глицерина для защиты эритроцитов при —79° 75
Хранение обработанных глицерином эритроцитов при температуре —15, —20 и —45° 79
Методы удаления глицерина из эритроцитов 83
Биохимические изменения в эритроцитах при воздействии глицерина и во время хранения на холоду 87
Гликолиз 87
Аденозинтрифосфат и другие органические фосфаты 83
Исчезновение калия во время хранения 89
Биофизические изменения в эритроцитах во время хранения при низких температурах 90
Сохранение эритроцитов при помощи быстрого замораживания или быстрой лиофилизации без глицерина . . . 92
ЛИТЕРАТУРА 95

Глава 4. Влияние замораживания и оттаивания на микроорганизмы 99
БАКТЕРИИ 99
Ранние исследования по замораживанию бактерий . . . 99
Современные исследования по влиянию замораживания и оттаивания на бактерии 105

ДРОЖЖИ 122
Ранние исследования по замораживанию дрожжей . . . 122
Современные исследования по замораживанию дрожжей 126
Облучение дрожжей при низких температурах 131
Замораживание и высушивание спор *Aspergillus flavus* 138
Теоретическое и практическое значение исследований на дрожжах 139
ПРОСТЕЙШИЕ 140
Ранние исследования по замораживанию простейших . . 140
Современные исследования по замораживанию простейших 142
Применение глицерина для защиты простейших от действия низких температур 146
Амебы и амебоидные формы 147
Трихомонады 149
Трипаносомы 157
Другие простейшие 162
Хранение простейших в высушенном состоянии . . 164
ЛИТЕРАТУРА 165

Глава 5. Яйца, эмбрионы и тканевые культуры . . 174
Действие низких температур на яйца 174
Ранние исследования 174
Современные исследования 176
Эмбриональные ткани 182
Ранние исследования 182
Сердце куриного эмбриона 184
Замораживание других тканей куриного эмбриона 189
Ткани эмбрионов млекопитающих 192
Эндокринная ткань млекопитающих 193
Кожа, роговица, и другие ткани млекопитающих 194
ЛИТЕРАТУРА 198

Глава 6. Жизнеспособность замороженной ткани яичника 205
Эндокринная активность трансплантатов яичника 208
Аутотрансплантаты свежей ткани крысы 208
Гомотрансплантаты незамороженной ткани крысы 209
Аутотрансплантаты замороженной ткани крысы . . . 211

Аутотрансплантаты замороженной ткани мыши . . . 226
Гомотрансплантаты замороженной ткани крысы . . . 226
Гистологическое развитие трансплантатов яичников и дальнейшая судьба яиц 228
Ткань яичника взрослой крысы 228
Ткань яичника неполовозрелой крысы 231
Оплодотворяемость замороженной ткани яичника 234
ЛИТЕРАТУРА 236

Глава 7. Жизнеспособность замороженных тканей различных органов и систем млекопитающих 240
Женские половые пути 240
Семенники 241
Эпидидимис и добавочные железы мужских половых путей 244
Кора надпочечника 245
Щитовидная железа и паращитовидные железы 247
Селезенка и костный мозг 250
Кожа 259
Роговица 270
Нервные волокна и ганглии 280
ЛИТЕРАТУРА 285

Глава 8. Действие глицерина и замораживания на органы млекопитающих 293
Исторические этапы в исследовании изолированных органов 293
Матка 296
Сердце 302
Методы 302
Замораживание сердца без глицерина 305
Действие глицерина на сердце и на его устойчивость к замораживанию 311
Другие органы 315
ЛИТЕРАТУРА 316

Глава 9. Действие низких температур на пойкилотермных животных 320
Ранние работы 320
Успехи, достигнутые в начале XX века 324

Последние открытия в области оживления пойкилотермных животных, охлажденных до низких температур . . 329
Насекомые 329
Моллюски и ракообразные 342
Рыбы 347
ЛИТЕРАТУРА 352

Глава 10. Оживление млекопитающих после охлаждения их до температуры тела ниже нуля 356
Ранние исследования 356
Основные исследования впадающих в спячку млекопитающих 359
Жизнеспособность новорожденных млекопитающих 361
Летальная температура тела у взрослых млекопитающих. Некоторые классические наблюдения 363
Оживление млекопитающих после вызванной охлаждением остановки сердца и дыхания 365
Оживление взрослых млекопитающих, охлажденных до температур ниже нуля 377
Опыты по замораживанию хомячков 377
Оживление частично замороженных хомячков 385
Отморожения у хомячков, оживленных после замораживания 390
Повреждения глаз у хомячков, оживленных после замораживания 391
Повреждения желудка у хомячков, оживленных после замораживания 393
Исследование хомячков, которых не удалось полностью оживить после замораживания 394
Влияние замораживания беременных хомячих на плаценту и развитие плода 394
Исследования на переохлажденных хомячках 398
Оживление переохлажденных хомячков 402
Оживление хомячков, у которых после переохлаждения наступила самопроизвольная кристаллизация льда 403
Влияние переохлаждения на развитие плода 405
Применение метода переохлаждения вместо замораживания 405

Проблемы, связанные с замораживанием и оживлением более крупных млекопитающих 408
ЛИТЕРАТУРА 416

Глава 11. Действие низких температур на воду и на физиологические среды 424

Вода 425
Замораживание воды 425
Переохлаждение воды 431
Таяние чистой воды 432
Физиологические растворы и другие среды 433
Физиологический раствор 434
Эвтектические точки и пересыщение 435
Уравновешенные солевые растворы 437
Фосфатные буферные системы 438
Электропроводность среды во время замораживания 441
Кристаллизация льда при замораживании среды . . 442
Среды, содержащие белки 443
Среды, содержащие глицерин или другие многоатомные спирты, сахара и прочие нейтральные растворимые вещества 448
ЛИТЕРАТУРА 457

Глава 12. Действие низких температур на животные клетки и ткани 460
Данные микроскопического исследования 463
Наблюдение живых клеток непосредственно под микроскопом 463
Гистологические исследования 469
Данные электронной микроскопии 471
Данные физико-химических исследований 477
Ранние наблюдения 477
Гемолиз эритроцитов во время замораживания и оттаивания 478
Защитное действие глицерина при охлаждении эритроцитов до низких температур 483
Предотвращение разрушения клеток во время хранения их при низких температурах 488

Защитное действие других нейтральных растворенных веществ на эритроциты во время замораживания и оттаивания 489
Утрата сперматозоидами подвижности во время медленного и быстрого замораживания и оттаивания; защитное действие глицерина и других нейтральных растворенных веществ 492
Действие концентрированных растворов солей, а также повреждающее действие замораживания и оттаивания на клетки других типов 496
ЛИТЕРАТУРА 499

Фотографии 505

О. Смит

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ
ЗАМОРАЖИВАНИЯ И ПЕРЕОХЛАЖДЕНИЯ

Редактор *Д. А. Сонкин*
Художник *И. А. Литвишко*
Художественный редактор *Н. В. Зотова*
Технический редактор *А. Г. Режухова*

Сдано в производство 30/VIII 1963 г.
Подписано к печати 23/X 1963 г.
Бумага 84×108$^{1}/_{32}$=8,9 бум. л.
29,1 печ. л., в т. ч. вкл. 28
Уч.-изд. л. 28,3. Изд. № 4/1603.
Цена 2 р. 18 к. Заказ 823

ИЗДАТЕЛЬСТВО
ИНОСТРАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ
Москва, 1-й Рижский пер., 2

Первая Образцовая типография
имени А. А. Жданова
Московского городского совнархоза
Москва, Ж-54, Валовая, 28

Отпечатано во 2-ой типографии
Издательства АН СССР

ОПЕЧАТКИ

Страница	Строка	Напечатано	Следует читать
369	14 св.	остановки сердца, продолжавшейся 35—44 *мин.*	остановки сердца на 1 *час* при температуре тела от 0 до
401	3—6 сн.	Особого доля образо- $6/80 \times$ $\times 100 = 7{,}5\%$. Если ткане-вавшегося льда составляет вые жидкости	доля образовавшегося льда составляет $6/80 \cdot 100 = 7{,}5\%$. Если тканевые жидкости
485	4 сн.	Клетки суспендировали в 1,5 м 2,5 *М* растворе	Клетки суспендировали в 1,5 и 2,5 *М* растворе

О. Смит. Биологическое действие замораживания и переохлажд-е ния.