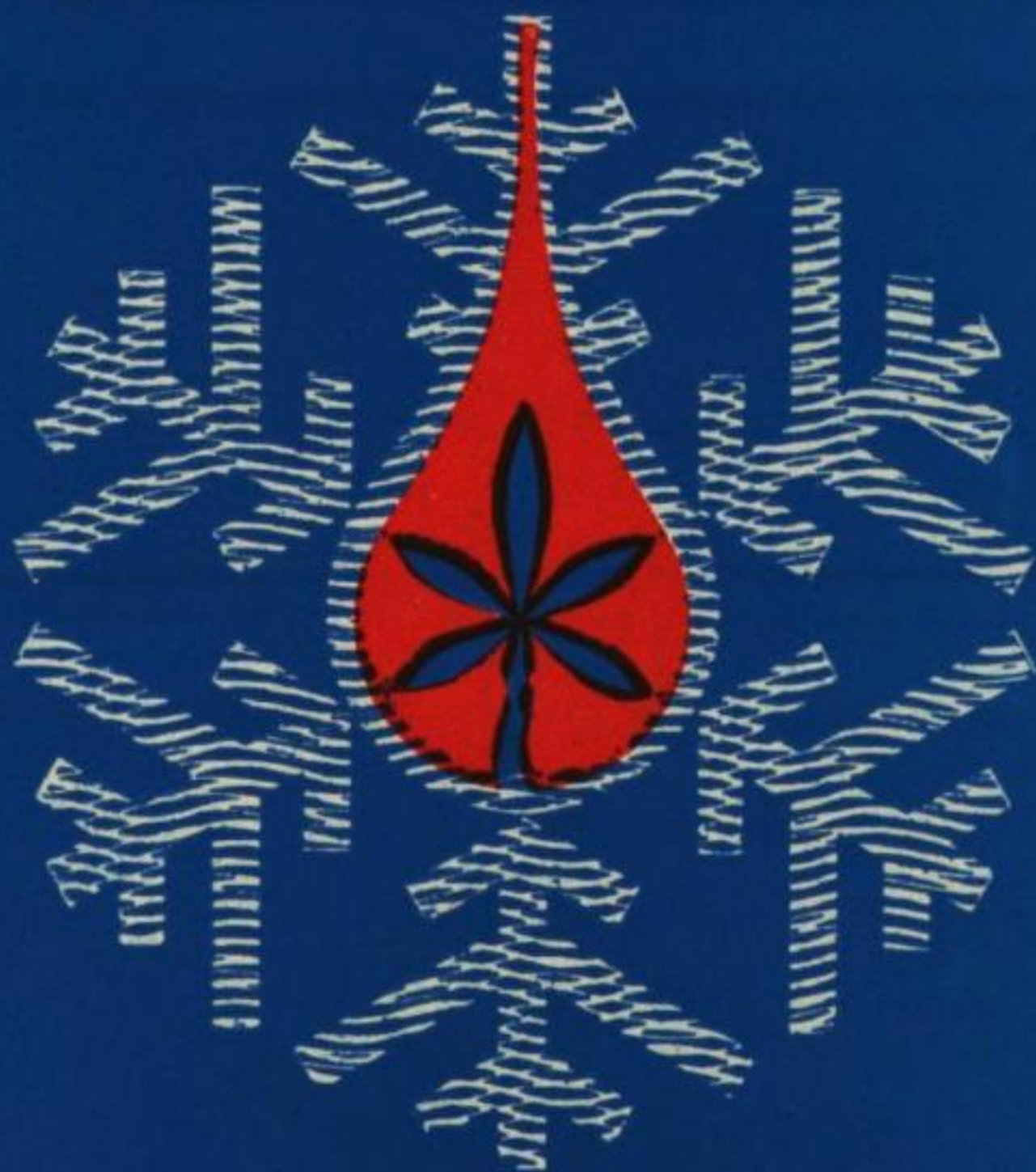


КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА

ISSN 0130-2663



10

1982

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ

КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА

РЕСПУБЛИКАНСКИЙ МЕЖВЕДОМСТВЕННЫЙ СБОРНИК

Основан в 1975 г.

ВЫПУСК

10

КИЕВ НАУКОВА ДУМКА 1982

В сборнике приведены результаты исследований реакции макромолекул, кинетических свойств мембрановстроенных ферментов и механизма индуцированного кристаллообразования при замораживании; описано состояние клеток и микроорганизмов после их замораживания — отогрева и комбинированного воздействия различных физиологических факторов; изложены теоретические и практические вопросы криохирургии и гипотермии, а также технико-экспериментальные данные в области криогенной техники.

Для широкого круга биологов и медиков, а также специалистов, разрабатывающих теоретические и прикладные аспекты низкотемпературного консервирования биологических объектов.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Н. С. Пушкарь (*ответственный редактор*), А. М. Белоус (*зам. ответственного редактора*), Г. С. Лобынцева (*ответственный секретарь*), В. И. Луговой, В. А. Монсеев, Б. П. Сандомирский, А. А. Цуцаева, М. Г. Шенберг, М. И. Шраго (*зам. ответственного редактора*), Т. Н. Юрченко

Редакция межведомственных сборников

КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА

Выпуск 10

Утверждено к печати ученым советом Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР

Редактор А. Н. Шадрина. Художественный редактор И. Т. Лагутин.
Технический редактор С. Г. Максимова. Корректоры М. Т. Кравчук,
Э. М. Киянская, Л. Н. Регета.

Информ. бланк № 4944.

Сдано в набор 20.10.81. Подп. в печ. 26.05.82. БФ 01680. Формат 70×108/16. Бум. тип. № 1.
Лит. гарн. Выс. печ. Усл. печ. л. 9,1. Усл. кр.-отт. 9,62. Уч.-изд. л. 9,61. Тираж 1000 экз.
Заказ 3818. Цена 1 руб. 50 коп.

Издательство «Наукова думка». 252601. Киев, ГСП, Репина, 3.

Львовская областная книжная типография. 290000, Львов, ул. Стефаника, 11.

І. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

УДК 57.043

А. М. Белоус, Г. Ф. Жегунов

ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА ТРАНСПОРТ Ca^{2+} ЧЕРЕЗ МЕМБРАНЫ САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА

Работами последних лет показано, что замораживание — отогрев биообъектов приводит к значительным нарушениям структуры различных клеточных мембран [1, 6, 8, 13]. Это отражается на функции различных мембрановстроенных ферментов плазматических мембран, митохондрий, микросом [5, 7].

Большое значение в жизнедеятельности клетки среди мембранно-связанных ферментов имеют транспортные АТФазы [10, 16], которые являются интегральной частью и важным белковым компонентом мембран клетки [2, 10]. Изменение активности этого фермента под влиянием экстремальных факторов может нарушать проницаемость биомембран и солевой состав клетки [12].

Известно, что охлаждение транспортных АТФаз, локализованных в клетке, до 0°C сопровождается значительной потерей активности [22, 29]. Кинетические исследования работы Са-АТФазы саркоплазматического ретикулума (СР) в зоне пониженных температур (от $+20$ до 0°C) показали, что при охлаждении мембран до 0°C нарушаются процессы фосфорилирования, а также дефосфорилирования фермента и присоединения фосфата к АТФ при «обращении» Са-наноса. В результате этого нарушается транспорт Ca^{2+} вовнутрь клетки.

Вместе с тем известно, что ингибирование Са-АТФазы при гипотермических условиях вполне обратимо, так как после повышения температуры от 0 до $+32^\circ\text{C}$ фермент полностью восстанавливает свою активность [35]. В работе [36] показано, что ингибирование мембранных АТФаз при охлаждении связано с фазовыми переходами липидов, окружающих фермент. Однако при охлаждении клеток до субнулевых температур характер повреждения транспортных АТФаз изменяется. При этом наблюдается увеличение активности указанного фермента [30, 39, 41].

Такехара с соавт. [30, 40] показал, что максимальная активация $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -зависимой АТФазы из мембран эритроцитов человека происходит после охлаждения мембран до -196°C . Однако замораживание мембран этих клеток до -5° в течение 1 ч приводило к незначительной активации фермента. Замороженный до -5° препарат выдерживали в течение 1 ч. Затем, после погружения его в жидкий азот, степень активации была такой же, как при замораживании до -5° . Замораживание мембран эритроцитов до различных температур с постоянной скоростью и последующий отогрев не выявляли значительных различий в активации АТФазы в диапазоне от -25 до -196° . Исходя из полученных результатов, авторы полагают, что активация транспортных АТФаз после глубокого замораживания может быть связана с увеличением доступности АТФ для АТФазы, происходящим в результате повреждения мембран. В частности, такая возможность допускается в работах [4, 11], в которых увеличение АТФазной активности

эритроцитарных мембран после замораживания связывается с повышением доступности АТФ для активных центров АТФазной системы. Изучение действия низких температур на Mg^{2+} -АТФазу и $Na^+—K^+$ -АТФазу мембран эритроцитов человека показало, что замораживание—отогрев приводит к повышению АТФазной активности, степень которой зависит от режима замораживания [11]. Так, если активность Mg^{2+} -АТФазы увеличивалась при быстрых, медленных либо многоэтапных режимах замораживания, то повышение активности $Na^+—K^+$ -АТФазы наблюдалось только при быстром замораживании до $-135^{\circ}C$.

Аналогичные данные были получены в работе [41], в которой повышение активности АТФазы эритроцитарной мембраны было наиболее выражено при медленном замораживании, причем скорость отогрева не влияла на этот процесс.

Лепок с соавт. [30] при изучении влияния низких температур на Са-АТФазу мембран СР из мышц омара установил, что как медленное, так и быстрое замораживание препарата ретикулума активировало АТФазу, что приводило к уменьшению величины отношения Са/АТФ. Медленное замораживание вызывало меньшую степень повреждения, чем охлаждение с большей скоростью, причем степень повреждения повышалась при увеличении концентрации NaCl в среде замораживания. Длительное хранение препаратов мембран СР при $-80^{\circ}C$ сохраняло высокую активность АТФазы, которая была выше на 50% по сравнению с контролем. Однако после медленного замораживания и хранения мембран СР при -20° происходила инактивация фермента уже в течение 10 дней. Считают, что медленное замораживание вызывает более глубокие нарушения целостности мембран за счет влияния эффекта концентрированного раствора ледяной микрофазы. При быстром замораживании уровень влияния этого фактора на мембрану снижается.

Вместе с тем имеются единичные работы, в которых показано ингибирующее действие замораживания — отогрева на транспортные АТФазы. Например, Филлипонт с соавт. [37] сообщает, что активность АТФазы препарата мембран эритроцитов человека одинаково уменьшалась как после хранения мембран при $+4^{\circ}$, так и после замораживания до -20° .

Таким образом, большинство исследователей считают, что замораживание — отогрев биообъектов приводит к изменению функционирования мембранных АТФаз. Предполагают, что это нарушение связано с изменением ионной проводимости клеточных мембран [7, 13] под действием таких факторов замораживания как изменение ионной силы и рН раствора, концентрации солей и метаболитов, кристаллизации и т. д. [1]. Согласно данным работ [13, 14], быстрое замораживание и отогрев эритроцитов вызывают повышенный выход ионов K^+ и проникновение в клетки Na^+ . Эти изменения наступают в мембранах клеток даже при замораживании их под защитой криопротекторов.

Считают, что криповреждения мембран при замораживании — отогреве обусловлены главным образом изменением фосфолипидного компонента под действием различных физико-химических факторов, формирующихся в зоне низких температур при замерзании окружающего раствора [1, 15].

В работе [1] полагают, что фазовые переходы и образование кластеров в мембранах клеток при замораживании влияет на белок-липидные взаимодействия и может изменять активность ферментов. Причем образование кластеров и латеральная сепарация фосфолипидов более выражены в процессе медленного замораживания, что приводит к образованию дефектов структуры мембран из-за существования в ней различных по плотности участков. В местах разделения липидных фаз могут появляться дополнительные каналы для утечки ионов.

Функционирование мембранно-связанных ферментов может нарушиться не только в результате фазовых переходов липидов и их кластеризации, но и в результате потери основных классов липидов при замораживании и последующем отогреве биообъектов [3], что особенно выражено при медленном замораживании [1]. При этом в мембранах митохондрий накапливаются свободные жирные кислоты и лизофосфатиды. Этот факт рассматривается авторами как следствие возможного низкотемпературного активирования мембранных фосфолипаз, которое происходит в результате повышения проницаемости мембран для ионов кальция, а также развития процессов перекисного окисления липидов. Так, после холодной обработки митохондрий печени крыс повышается их способность накапливать в мембранах конечный продукт перекисного окисления — малоновый диальдегид [38].

Необходимо учитывать тот факт, что в процессе охлаждения может происходить вымораживание мембранных белков из липидного матрикса с последующей их агрегацией в белковые домены. Эти процессы также могут изменить функциональные характеристики ферментов [6, 16].

Однако вопрос о механизме нарушения функционирования ионных насосов биомембран оставался нерешенным. Для выяснения этого вопроса мы использовали замкнутые везикулы мембран саркоплазматического ретикулума.

Было выяснено, что скорость выхода ионов кальция через систему активного транспорта в момент работы фермента, а также скорость пассивной диффузии запасенного Ca^{2+} из пузырьков СР во внешнюю среду существенно увеличиваются. В связи с этим аккумулятивные способности везикул значительно снижаются (табл. 1).

Проведенные нами [6, 7, 12] исследования по изучению действия замораживания — отогрева на структурно-функциональное состояние Са-АТФазы мембран саркоплазматического ретикулума показали, что после быстрого замораживания — отогрева мембран СР до -196° наблюдается достоверное увеличение активности Са-АТФазы микросом. При этом скорость аккумуляции Ca^{2+} снижалась также, как и коэффициент эффективности аккумуляции Ca^{2+} —Са-АТФ (см. табл. 1).

Видно, что низкие температуры в значительной степени изменяют основные функциональные характеристики системы транспорта кальция мембран ретикулума, причем замораживание и последующий отогрев необратимо изменяют функцию Са-насоса. При этом размораживание препаратов и хранение их при температурах выше и ниже температуры фазового перехода мембранных липидов от 1 до 6 ч не позволяли восстановить функцию фермента до уровня контроля (табл. 2).

При медленном замораживании наиболее выраженные повреждения мембран наблюдались после их размораживания от температуры -196°C (табл. 3). Видно, что повреждающий эффект низких температур проявляется уже на первых этапах замораживания. Наиболее резкие изменения функциональной активности мембран СР при медленном замораживании и последующем отогреве происходили в температурном интервале, охватывающем конец температурной зоны кристаллизации замораживаемого раствора и зону эвтектики раствора KCl (-11°C). В этом случае активность Са-АТФазы возрастала на 37%, а скорость аккумуляции Ca^{2+} снижалась на 59%. Размораживание мембран СР из температурных зон -75 и -125° существенного вклада в степень повреждения Са-насоса мембран СР уже не вносило. Наблюдаемые повреждения системы транспорта ионов кальция в зоне эвтектики являются наиболее выраженными, очевидно, в связи с тем, что в этих условиях на мембрану воздействует целый ряд неблагоприятных факторов замораживания одновременно [15].

Таблица 1. Основные характеристики Са-транспортирующей системы мембран СР в контроле и после быстрого замораживания и отогрева

Исследуемая характеристика	Контроль	Статистический показатель	После быстрого замораживания и отогрева
V_{ATF} в среде без оксалата, мкмоль P_H /мг белка в 1 мин	$1,06 \pm 0,08$	$p < 0,01$	$1,65 \pm 0,08$
V_{ATF} в присутствии оксалата, мкмоль P_H /мг белка в 1 мин	$1,90 \pm 0,18$	$p < 0,02$	$2,60 \pm 0,21$
Скорость аккумуляции Ca^{2+} , мкмоль Ca^{2+} /мг белка в 1 мин	$3,28 \pm 0,20$	$p < 0,05$	$2,14 \pm 0,19$
Са-АТФ	1,73		0,82
Емкость везикул, нмоль $V_{вх}$, мкмоль Ca^{2+} /мг белка в 1 мин	3000		2800
$V_{вых}$, мкмоль Ca^{2+} /мг белка в 1 мин	$4,35 \pm 0,28$	$p > 0,05$	$4,57 \pm 0,28$
$V_{пас. диф}$, нмоль Ca^{2+} /мг белка в 1 мин	$1,23 \pm 0,19$	$p < 0,01$	$2,9 \pm 0,5$
	37 ± 1	$p < 0,002$	60 ± 2

Измерение константы Михаэлиса (K_m) фермента для АТФ показало, что после отогрева замороженных образцов СР сродство Са-АТФазы к субстрату практически не изменяется и составляет для больших концентраций АТФ (выше 10 мкМ) 70 мкМ, а для малых (ниже 10 мкМ) — 1,2 мкМ. Это свидетельствует о том, что причиной активации Са-АТФазы после замораживания — отогрева не является изменение ее сродства к субстрату.

Таблица 2. Влияние температур и времени хранения на основные параметры Са-насоса мембран СР

Условия хранения	Время хранения, ч	Скорость		Ca-АТФ
		гидролиза АТФ, мкмоль P_n^2 /мг белка в 1 мин	аккумуляции Ca^{2+} , мкмоль Ca^{2+} /мг белка в 1 мин	
Незамороженные				
Сразу после выделения СР (контроль)	—	$1,77 \pm 0,05$	$3,13 \pm 0,06$	1,77
0°	1	$1,76 \pm 0,01$	$3,2 \pm 0,02$	1,82
0°	5	$p > 0,1$ $1,86 \pm 0,05$	$p > 0,05$ $3,1 \pm 0,06$	1,67
30°	2	$p < 0,05$ $1,8 \pm 0,2$	$p > 0,1$ $3,2 \pm 0,045$	1,78
30°	6	$p < 0,05$ $1,85 \pm 0,03$	$p > 0,05$ $2,94 \pm 0,04$	1,58
		$p < 0,05$	$p < 0,05$	
Быстрое замораживание до $-196^\circ C$				
Сразу после размораживания СР	—	$2,71 \pm 0,04$	$2,16 \pm 0,04$	0,80
0°	1	$p < 0,01$ $2,74 \pm 0,03$	$p < 0,01$ $2,0 \pm 0,012$	0,73
0°	5	$p < 0,01$ $2,94 \pm 0,08$	$p < 0,01$ $1,95 \pm 0,07$	0,66
30°	2	$p < 0,01$ $2,80 \pm 0,07$	$p < 0,002$ $2,00 \pm 0,01$	0,71
30°	6	$p < 0,01$ $3,20 \pm 0,065$	$p < 0,002$ $1,86 \pm 0,04$	0,60
		$p < 0,002$	$p < 0,002$	

Примечание. Достоверность результата оценивалась относительно контроля.

Построение графика зависимости скорости гидролиза АТФ Са-АТФазой в составе мембран СР в координатах Аррениуса обнаруживает излом кривой в области $+22^\circ C$ (рис. 1 а, б), что обусловлено резким изменением активности фермента в связи с фазовым переходом липидов мембран ретикулума при этой температуре [2, 16]. Вычис-

Таблица 3. Влияние медленного замораживания на функциональную активность Са-транспортирующей системы мембран СР

Температурная зона	Температура, °С	Скорость гидролиза АТФ мкмоль/мг	Скорость аккумуляции Са ²⁺ , белка в мин	Са/АТФ
Контроль	4	1,46 ± 0,12	2,65 ± 0,19	1,80
Начало кристаллизации	— 5	1,63 ± 0,18 $p > 0,05$	2,20 ± 0,17 $p > 0,05$	1,35
Конец кристаллизации	— 8	1,68 ± 0,15 $p > 0,05$	2,10 ± 0,16 $p < 0,05$	1,25
Температурная зона замораживания, включающая эвтектическую точку для раствора КСl	— 25	2,00 ± 0,09 $p < 0,05$	1,56 ± 0,18 $p < 0,05$	0,78
Зона рекристаллизационных процессов твердой фазы льда	— 75	2,10 ± 0,18 $p < 0,05$	1,54 ± 0,13 $p < 0,02$	0,78
	— 125	1,98 ± 0,09 $p < 0,05$	1,49 ± 0,14 $p < 0,02$	0,75
	— 196	2,10 ± 0,14	1,42 ± 0,12	0,68
Быстрое замораживание	— 196	2,12 ± 0,10 $p < 0,05$	1,35 ± 0,12 $p < 0,01$	0,64

ленная с помощью графика на рис. 1 энергия активации (E_a) гидролиза АТФ Са-АТФазой в области выше точки перегиба в контроле равнялась 9,3 ккал/моль, а после замораживания и отогрева увеличивалась и достигала 16,4 ккал/моль. Такое увеличение E_a может быть связано прежде всего с изменением физико-химического состояния липидного окружения фермента и характера белок-липидных взаимодействий.

С целью дальнейшего исследования причин повреждения системы транспорта Са²⁺ после воздействия низких температур изучали чувствительность Са-АТФазы к иону-активатору. На рис. 2 (кривые а, б) показано, что после замораживания СР чувствительность фермента к внешнему кальцию возрастает. Точка, соответствующая оптимальной концентрации ионов Са²⁺ для функционирования фермента, смещается в область меньших концентраций.

При этом чувствительность Са-АТФазы к аккумулярованному кальцию также увеличивается (рис. 3). Известно [2], что скорость аккумуляции Са²⁺ представляет собой алгебраическую сумму транспорта ионов вовнутрь везикул ($V_{вх}$) и выхода их через ту же систему ($V_{вых}$). Зная скорость аккумуляции кальция и коэффициент эффективности Са/АТФ, можно вычислить величины $V_{вх}$ и $V_{вых}$. При построении графика зависимости $V_{вх}/V_{вых}$ от величины, обратной концентрации ионизированного кальция в везикулах, точка пересечения прямой с осью абсцисс дает величину, обратную константе для выхода Са²⁺ [2]. После замораживания — отогрева эта величина уменьшается от $3,3 \cdot 10^{-5}$ до $5 \cdot 10^{-6}$ М, что свидетельствует об увеличении сродства переносчика к ионам аккумулярованного кальция. Этим фактом можно объяснить увеличение скорости выхода запасаемого иона через систему активного транспорта в момент работы Са-АТФазы после замораживания. Так как чувствительность фермента к ионам кальция зависит от состояния фосфолипидов мембран, особенно фосфатидилхолина [33], можно предположить, что при замораживании — отогреве скорее всего нарушается липидное окружение Са-АТФазы. Увеличение чувствительности АТФазы к иону-активатору наряду с изменением липидного окружения переносчика и реактивацией его выходящим из везикул кальцием может быть одной из причин активации фермента после замораживания.

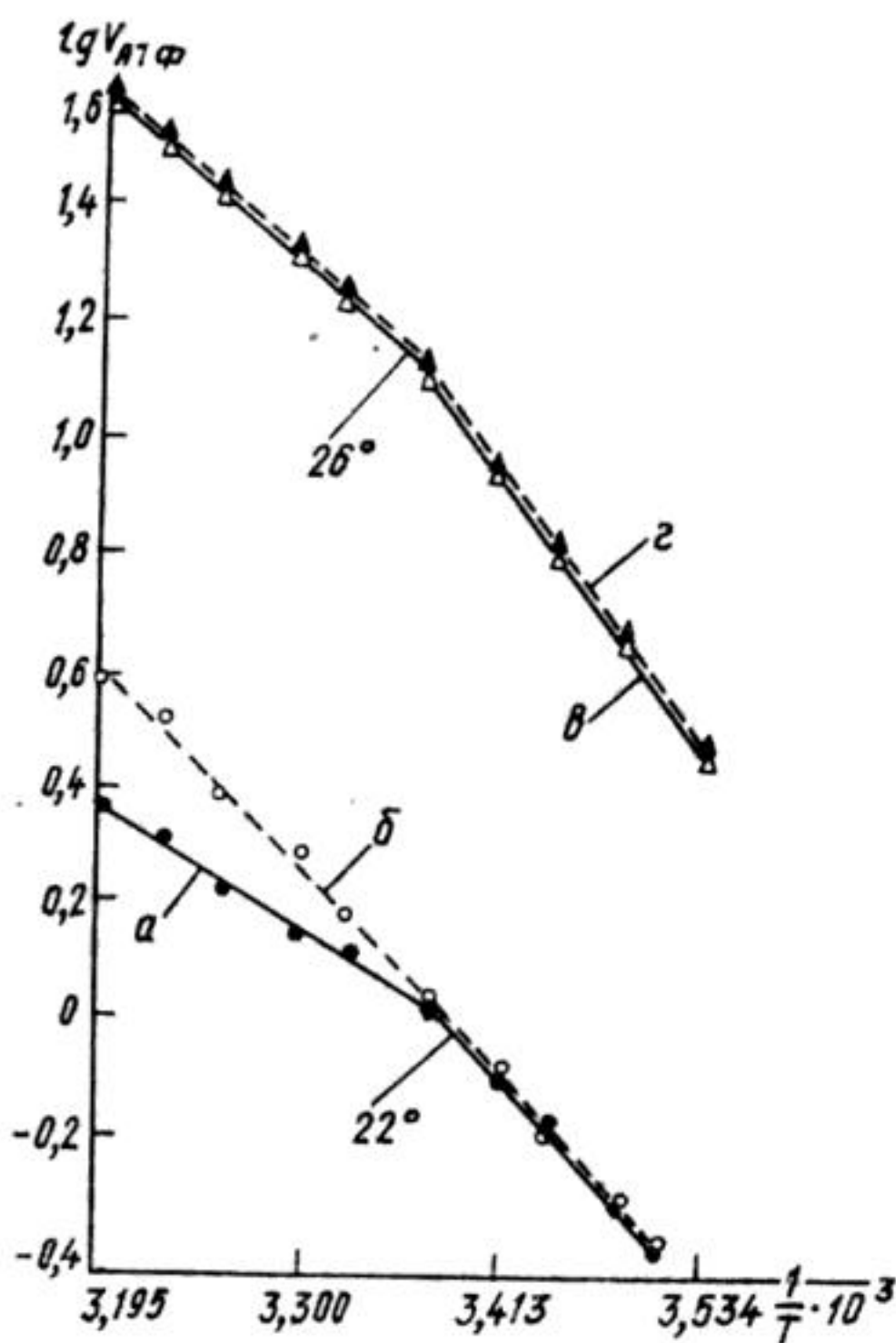


Рис. 1. Зависимость скорости гидролиза АТФ Са-АТФазой от температуры в координатах Аррениуса:

а — контрольные мембраны СР; б — мембраны СР после замораживания — отогрева; в — нативная изолированная Са-АТФаза; г — изолированная Са-АТФаза после замораживания — отогрева.

Исследование структуры везикул СР под электронным микроскопом показало, что после замораживания — отогрева целостность их сохраняется, хотя мембрана везикул имеет не очень четкие очертания. При рассмотрении структуры размороженных везикул при большом увеличении заметно, что мембрана ретикулума несколько истончается и на ней появляются электронно-плотные глобулы, по-видимому, агрегированные липопротеиновые комплексы Са-АТФазы (рис. 4). Эти данные свидетельствуют о значительных нарушениях в мембранах СР после замораживания.

С целью выяснения изменений структуры Са-транспортирующей системы СР при охлаждении препарата мембран ретикулума исследовали методом ЭПР — спиновых меток и зондов.

Оказалось, что после замораживания — отогрева мембран СР, меченных ковалентной йодацетамидной меткой, увеличивается доля подвижных спиновых меток на белке, по-видимому, в результате изменений структуры Са-АТФазы или, что более вероятно, изменений ее липидного окружения и увеличения доступности

поверхностных SH-групп фермента для метки.

Одним из параметров, характеризующих состояние липидов мембран, является фактор S , который отражает степень упорядоченности жирнокислотных цепей фосфолипидов [9]. Температурная зависимость параметра S мембран СР в Аррениусовых координатах представлена на рис. 5 а, б. Как видно, после замораживания — отогрева степень упорядоченности жирнокислотных цепей фосфолипидов безбелковых областей мембран СР уменьшается. Кроме того, температурная зона, в которой происходит изменение фазового состояния липидов, сдвигается в сторону более низких температур. Положение точки излома на Аррениусовом графике зависит от упорядоченности жирнокислотных цепей фосфолипидов, а также определяется степенью белок-липидных взаимодействий [2, 16]. Таким образом, из полученных данных следует, что при воздействии низких температур происходит существенное нарушение структуры мембранного бислоя. При этом изменяются физическое состояние липидов, степень белок-липидных взаимодействий, что отражается на функционировании Са-насоса мембран СР.

Для более детального выяснения механизмов нарушения функционирования Са-транспортирующей системы ретикулума при замораживании и отогреве исследовали структуру и функцию Са-АТФазы, выделенной из мембран саркоплазматического ретикулума.

Изолированный препарат Са-АТФазы представляет собой везикулы диаметром 0,2 мкм, морфологически подобные везикулам СР, но характеризующиеся более высоким содержанием фермента и меньшим

содержанием липида [24]. Кроме того, везикулы выделенной АТФазы характеризуются практически полным отсутствием асимметрии в распределении фермента в бислое, что обусловлено перемешиванием фосфолипидного состава внутренней и наружной поверхностей бислоя мембраны под действием детергента при выделении, в связи с чем эти везикулы практически теряют способность накапливать ионы кальция во время гидролиза АТФ.

Проведенные исследования показали, что замораживание — отогрев изолированного фермента не приводит к нарушению его функционирования. При этом скорость гидролиза АТФ остается на уровне контроля и составляет при $+26^{\circ}\text{C}$ и концентрации

Ca^{2+} в ячейке $6 \cdot 10^{-5}$ в контроле $8,9 \pm 0,11$ мкмоль $P_{\text{H}}/\text{мг}$ белка в 1 мин, а после замораживания — $9,06 \pm 0,23$ мкмоль $P_{\text{H}}/\text{мг}$ белка в 1 мин. Такая высокая скорость расщепления АТФ до АДФ и неорганического фосфата объясняется, видимо, активирующим влиянием кальция как снаружи, так и внутри везикул препарата изолированной Са-АТФазы. При построении графика активности фермента в координатах Аррениуса (рис. 1, в, г) точка скачкообразного повышения активности энзима как в контроле, так и после замораживания выявляется при температуре 26°C . Энергия активации этого процесса одинакова для обоих случаев и составляет в температурной зоне $26-37^{\circ}\text{C}$ 21 ккал/моль.

Для выделенного препарата Са-АТФазы характерна другая концентрация ионов Ca^{2+} , необходимая для ее максимальной активности. АТФаза в системе мембран СР проявляет максимум активности при концентрации Ca^{2+} в ячейке $5 \cdot 10^{-5}$ М, а изолированный фермент сильнее активируется меньшими концентрациями кальция $1 \cdot 10^{-6}$ М (рис. 2, а, в). Чувствительность переносчика к иону-активатору, а также K_{M} для АТФ после замораживания и отогрева изолированного фермента не изменяется.

Исследование липидного окружения изолированного фермента методом ЭПР с помощью жирнокислотного зонда показало, что после выделения фермента из мембран СР упорядоченность его липидного окружения увеличивается по сравнению с таковой в системе мембран ретикулума (рис. 5, а, в). При этом точка, соответствующая структурному переходу липидов в препарате выделенной Са-АТФазы, определяется при $+26^{\circ}\text{C}$. Это показывает, что процесс выделения фермента вызывает существенные изменения в структуре Са-насоса, что в первую очередь проявляется в изменении упорядоченности жирнокислотных цепей фосфолипидов в препарате, а также белок-липидных и липид-липидных взаимодействий липопротенинового комплекса Са-насоса.

Замораживание препарата изолированного фермента до -196° и последующий отогрев не приводят к изменению указанных выше структурных характеристик препарата по сравнению с незамороженными. Таким образом, выделенная из СР Са-АТФаза оказывается довольно устойчивой к действию низких температур. Устойчивость ее может объясняться тем, что при выделении фермента детергент, временно при-

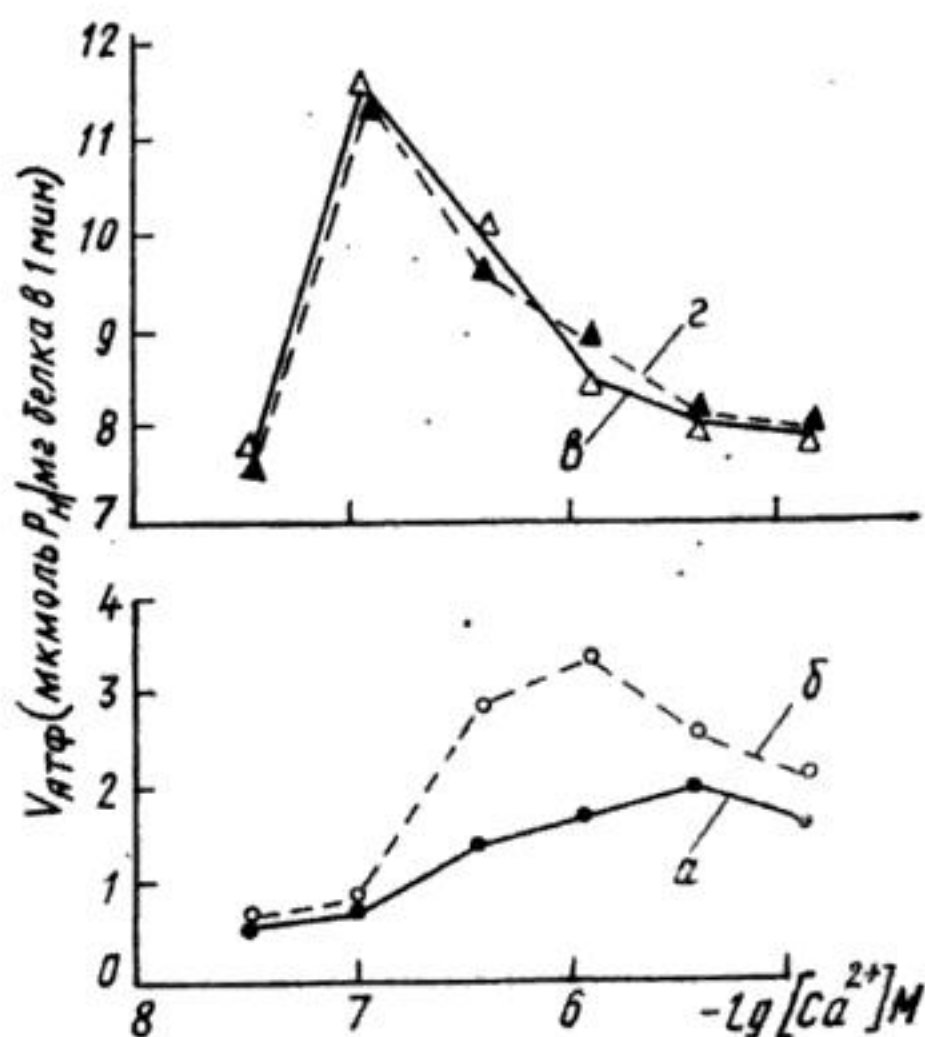


Рис. 2. Чувствительность Са-АТФазы к ионам Ca^{2+} внешней среды.

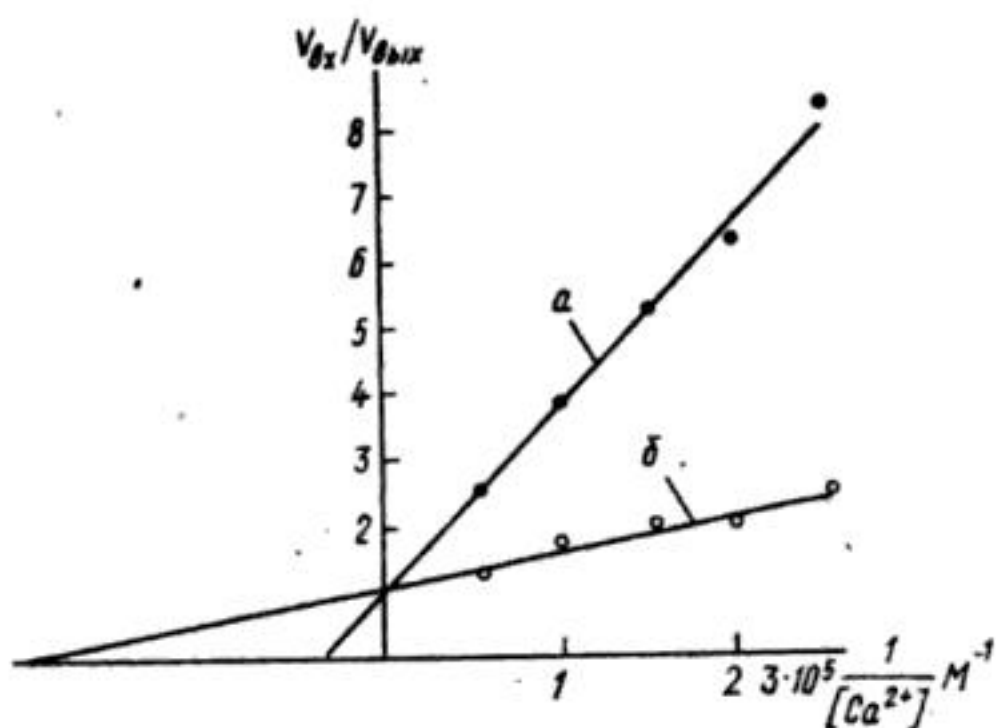


Рис. 3. Чувствительность Са-АТФазы к аккумулярованному Ca^{2+} .

ных цепей фосфолипидов и асимметрия распределения липидного и белкового составов внутреннего и наружного слоев мембраны, нарушается степень гидрофобных взаимодействий. Такие изменения в структуре Са-транспортирующей системы СР под действием холода вызывают нарушения ее функционирования.

Механизм разобщения гидролиза АТФ ферментом и процесса транспорта кальция вовнутрь везикул СР после действия на них низких температур можно представить следующим образом (рис. 6). В результате нарушения структуры липидного бислоя мембраны и изменения физического состояния фосфолипидов комплекса Са-АТФазы происходит утечка транспортируемого кальция из везикул СР как через систему активного транспорта, так и посредством пассивной диффузии. Выходящий из микросом Ca^{2+} реактивирует Са-АТФазу и благодаря высокой чувствительности переносчика к иону-активатору в значительной степени повышает активность фермента. Несмотря на это, скорость аккумуляции ионов кальция все же уменьшается довольно значительно за счет быстрого выхода запасаемого Ca^{2+} из везикул из-за нарушения структурных параметров мембран. Проведенные исследования показали, что после замораживания и отогрева скорость выхода запасенного Ca^{2+} через систему активного транспорта в момент работы Са-АТФазы увеличивается, что связано с повышением сродства аккумулярованного Ca^{2+} к ферменту (см. рис. 2 и 3). Это приводит к тому, что вероятность выброса аккумулярованных ионов из микросом СР значительно увеличивается.

После воздействия низких температур скорость пассивной диффузии ионов Ca^{2+} из пузырьков СР увеличивается в два раза. Такое повышение скорости этого процесса может происходить в результате нарушения упорядоченности жирнокислотных цепей фосфолипидов. Чем выше молекулярная подвижность жирнокислотных цепей, тем легче Ca^{2+} преодолевать этот гидрофобный барьер. Утечка аккумулярованного Ca^{2+} после замораживания может происходить в местах контакта кластеров липидов, различных по упорядоченности жирнокислотных цепей. Их количество, очевидно, увеличивается, так как известно, что охлаждение способствует фазовой сепарации липидов в мембране [1]. Не исключено, что формирование каналов для пассивной диффузии Ca^{2+} осуществляется также в области контакта липопротеиновых комплексов Са-АТФазы с безбелковыми жирнокислотными областями мембраны. Известно, что липиды вокруг белковой молекулы фермента находятся в более упорядоченном состоянии [1]. После замораживания—отогрева липидное окружение Са-АТФазы изменяется, о чем, в частности, свидетельствует увеличение энергии активации (E_a) процесса гид-

существующий в среде выделения, настолько существенно изменяет структуру белок-липидного комплекса Са-насоса, что последующее замораживание уже не оказывает дополнительного влияния на его структурно-функциональное состояние.

На основании этого можно предположить, что замораживание и последующий отогрев нарушают структуру системы транспорта Ca^{2+} мембран СР подобно действию детергента. При этом изменяются упорядоченность жирнокислот-

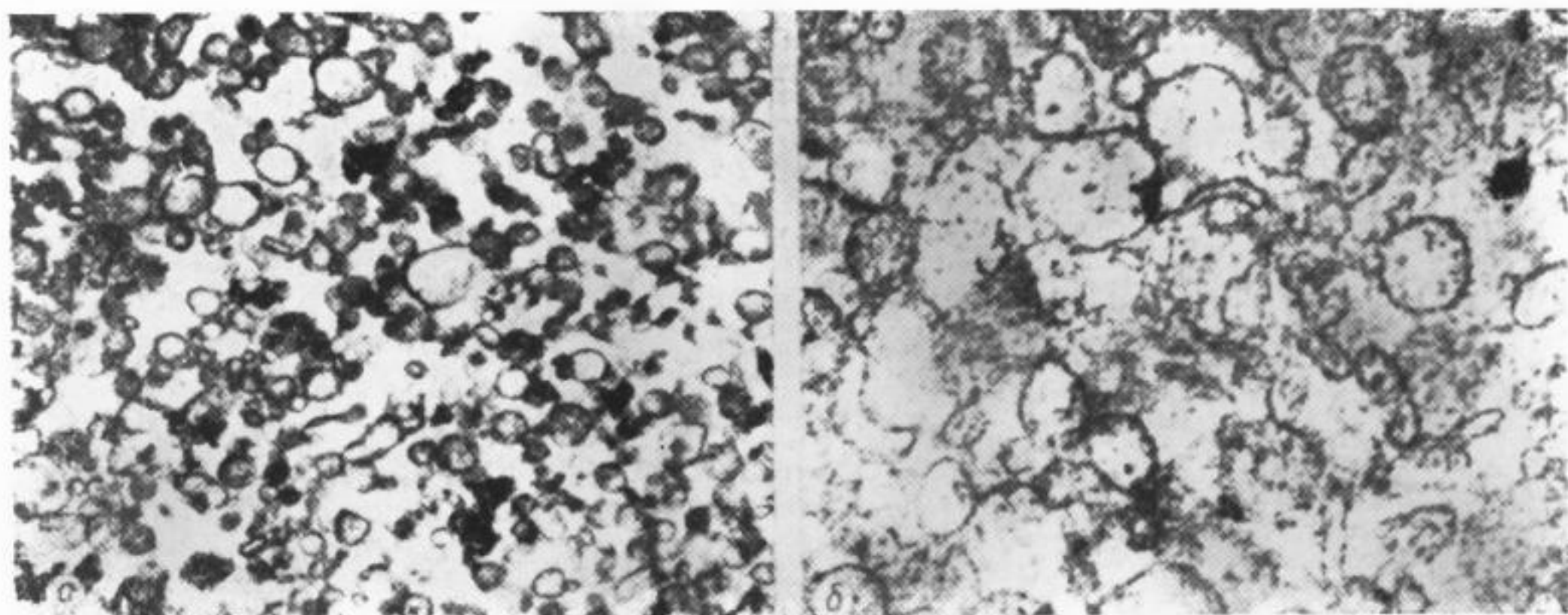


Рис. 4. Электронно-микроскопические снимки фрагментированного саркоплазматического ретикулума:

а — контрольные везикулы СР; *б* — везикулы СР после замораживания — отогрева.

ролиза АТФ. Считается, что увеличение E_a этого процесса связано с усилением белок-липидных взаимодействий [16]. Поскольку после замораживания — отогрева СР энергия активации работы Са-АТФазы увеличивается, это может означать, что прочность связи фермента и липида повышается.

Электронно-микроскопически мы выявили на мембранах СР электронно-плотные глобулы диаметром 200—300 Å, которые появлялись только после замораживания. Поскольку диаметр белковой молекулы Са-АТФазы равен примерно 35 Å [34], а изолированная АТФаза представляет собой липопротеид диаметром 90 Å [31], можно считать, что обнаруженные нами глобулы являются скорее агрегатами нескольких липопротеиновых комплексов. Такое фазовое разделение и модификация липидного бислоя мембран приводит к утечке ионов кальция из везикул по механизму пассивной диффузии.

После замораживания — отогрева изменяется характер белок-липидных взаимодействий, о чем свидетельствуют не только факт разупорядочивания мембранных фосфолипидов, но и сдвиг точки излома кривой зависимости фактора S от температуры (см. рис. 5), а также увеличение E_a процесса гидролиза АТФ ферментом после замораживания. Смещение точки излома на Аррениусовом графике упорядоченности жирнокислотных цепей фосфолипидов происходит прежде всего в связи с изменением физического состояния липидного бислоя мембран после замораживания.

Согласно нашим экспериментам и существующим данным [4, 5, 40], после замораживания и отогрева клеток наблюдается повышение активности транспортных АТФаз. Другие мембранно-связанные ферменты в составе клеток и субклеточных органелл после воздействия низких температур обычно ингибируются [19, 37] либо не изменяют своих характеристик [23, 28], а ферменты, входящие в состав мембран клеток низших организмов и растительных клеток, оказываются стойкими к глубокому замораживанию [20, 21].

Причина ингибирования мембранно-связанных ферментов в указанных выше объектах связана прежде всего с изменениями физико-химического состояния липидного компонента мембраны, усилением белок-липидных взаимодействий ферментов с окружающими липидами и повышением за счет этого E_a их реакций.

Активация Са-АТФазы после замораживания мембран СР может быть результатом нарушения не только ее липидного микроокружения, но и параметров самого фермента. Мы предполагаем, что активация энзима после замораживания — отогрева связана с нарушением тран-

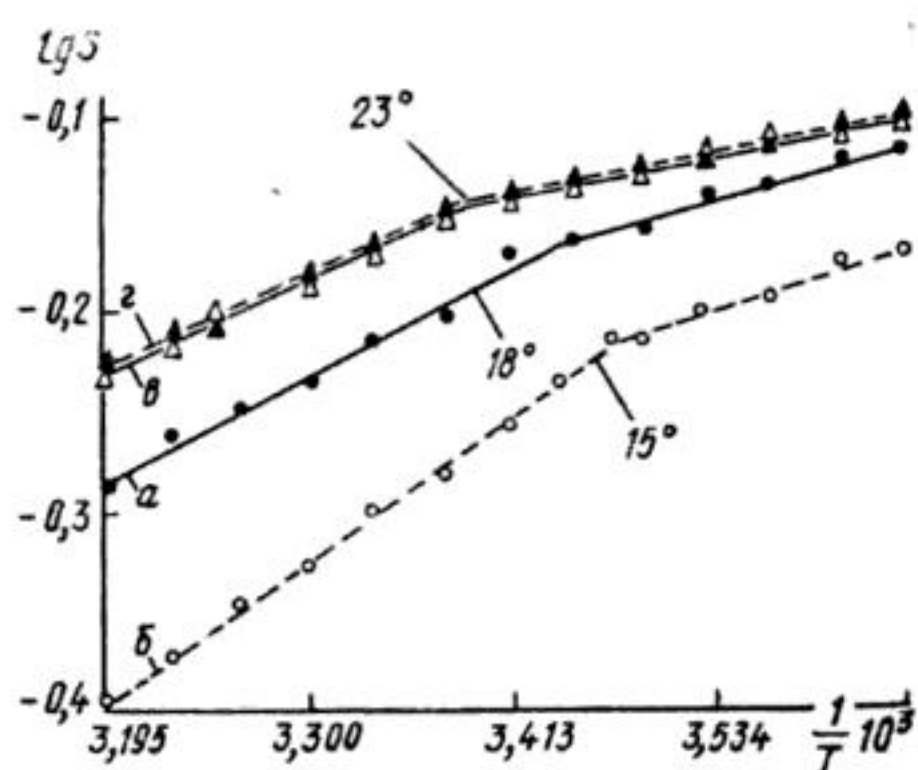


Рис. 5. Температурная зависимость упорядоченности жирнокислотных цепей фосфолипидов (S) СР в координатах Аррениуса.

реносчика), реактивирует Са-АТФазу и благодаря более высокой чувствительности переносчика к иону-активатору повышает активность фермента. Кроме того, за счет быстрого выхода Ca^{2+} из везикул концентрация его внутри пузырьков СР (где он является ингибитором переносчика) повышается медленно, что снижает ингибирующий эффект ионов кальция внутри везикул.

Следовательно, факт активации Са-АТФазы после воздействия низких температур на СР можно рассматривать скорее всего как результат комплексного нарушения Са-транспортируемой системы. Если нарушение липидного окружения переносчика снижает его активность, то выходящий из везикул Ca^{2+} настолько сильно активирует Са-АТФазу, что в результате происходит увеличение активности фермента после замораживания. Причиной увеличения сродства фермента к аккумулированным ионам Ca^{2+} может явиться нарушение липидного окружения энзима, так как известно [33], что в процессе связывания кальция Са-АТФазой активное участие принимают фосфолипиды.

Вместе с тем из результатов исследований следует, что изолированная Са-АТФаза оказывается стойкой к действию низких температур и ее структурно-функциональные параметры не изменяются. По данным ЭПР такой изолированный препарат характеризуется большей упорядоченностью жирнокислотных цепей фосфолипидов по сравнению с нативными мембранами СР, что связано с большим количеством белка в препарате выделенной АТФазы и меньшим содержанием в нем липидов. Высокая упорядоченность фосфолипидов подтверждается обнаружением точки структурно-фазового перехода мембранных липидов препарата изолированной Са-АТФазы при $+23^\circ\text{C}$ (см. рис. 4). Действительно, для менее упорядоченных областей липидов мембран характерна более низкая температура фазового перехода, следовательно, если в препарате изолированного фермента зона структурного перехода липидов смещена в сторону более высоких температур, то это свидетельствует о более жесткой упорядоченной структуре. При отмывке детергента (в процессе выделения) происходит агрегация липопротеиновых комплексов с образованием везикул, которые обеднены липидами, поскольку часть их удаляется из мембраны в процессе ее солюбилизации.

Это свидетельствует о том, что сила гидрофобных взаимодействий жидкокристаллических областей мембран СР значительно слабее тех же взаимодействий белка с окружающим его липидом. Поэтому жидкокристаллические области мембран СР более уязвимы к действию низких температур.

спорта Ca^{2+} в результате повреждения бислоя мембраны СР и структуры липопротеинового комплекса Са-насоса. Это приводит к утечке транспортируемого Ca^{2+} из везикул ретикулума как через систему активного транспорта за счет увеличения сродства переносчика к аккумулированным ионам, так и путем пассивной диффузии из-за ослабления гидрофобных связей — жидкокристаллического бислоя и фазового разделения компонентов мембраны. Выходящий из везикул кальций, поддерживая свою концентрацию во внешней среде (где он является активатором переносчика), реактивирует Са-АТФазу и благодаря более высокой чувствительности переносчика к иону-активатору повышает активность фермента. Кроме того, за счет быстрого выхода Ca^{2+} из везикул концентрация его внутри пузырьков СР (где он является ингибитором переносчика) повышается медленно, что снижает ингибирующий эффект ионов кальция внутри везикул.

Фазовому разделению мембранных липидов может способствовать также вымораживание воды из мембран. Известно, что до 50% веса биомембран составляет связанная вода [17], которая определяет их физическое состояние. При снижении количества связанной воды до 20%, наступающем при замораживании мембран, наблюдается разделение их липидной фазы [17], а при достижении критической концентрации воды при дегидратации мембран фосфолипиды кристаллизуются [18]. В работах [17, 26] указывается, что при удалении воды из мембран их толщина может уменьшаться на 30%, при этом нарушаются гидрофобные связи молекул липидов между собой, а также с белками.

Следует еще отметить, что для нормального функционирования Са-транспортирующей системы СР необходима асимметрия [24, 32]. После выделения препарата Са-АТФазы асимметрия в распределении белкового и липидного компонентов мембран исчезает за счет усреднения белкового и фосфолипидного составов внутреннего и наружного слоев мембраны в процессе выделения под действием детергента. В связи с этим можно предположить, что в процессе замораживания — отогрева мембран СР также происходит некоторое перемешивание мембранных компонентов, что может привести к нарушению функционирования Са-насоса по механизму, характерному для действия детергента.

Таким образом, структура Са-АТФазы уже в процессе ее выделения претерпевает ряд существенных изменений. Возникшие при этом перестройки уже более не усугубляются под действием низких температур, так как замораживание — отогрев, по-видимому, действует на те же параметры, что и детергент, только в значительно меньшей степени. Это подтверждает наши предположения о том, что холод в первую очередь влияет на гидрофобные связи в мембране, разрыхляет бислой и усредняет липидный и белковый составы СР внутреннего и наружного слоев мембраны.

Существенные изменения в нарушении структурно-функционального состояния Са-транспортирующей системы в процессе замораживания — отогрева могут произойти и при биохимической модификации липидов. Как показано в работах [1, 3], медленное замораживание митохондрий вызывает снижение уровня содержания основных классов фосфолипидов и их деградацию до моно- и диглицеридов и лизофосфатидов. Предполагается, что это происходит в результате низкотемпературной активации мембранных фосфолипаз, а также развития перекисного окисления. Однако, по данным работы [27], действие фосфолипаз и перекисного окисления на мембраны СР вызывает снижение активности Са-АТФазы, тогда как действие низких температур активирует фермент. Следовательно, роль этих процессов в нарушении Са-АТФазы СР в процессе замораживания и отогрева не очень велика.

Остается не вполне ясным вопрос о возможности вымораживания и агрегации белкового компонента мембран СР в процессе замораживания — отогрева. Учитывая, что на электронно-микроскопических фотографиях СР после воздействия низких температур на мембраны обнаруживаются электронно-плотные глобулы и мембрана при этом теря-

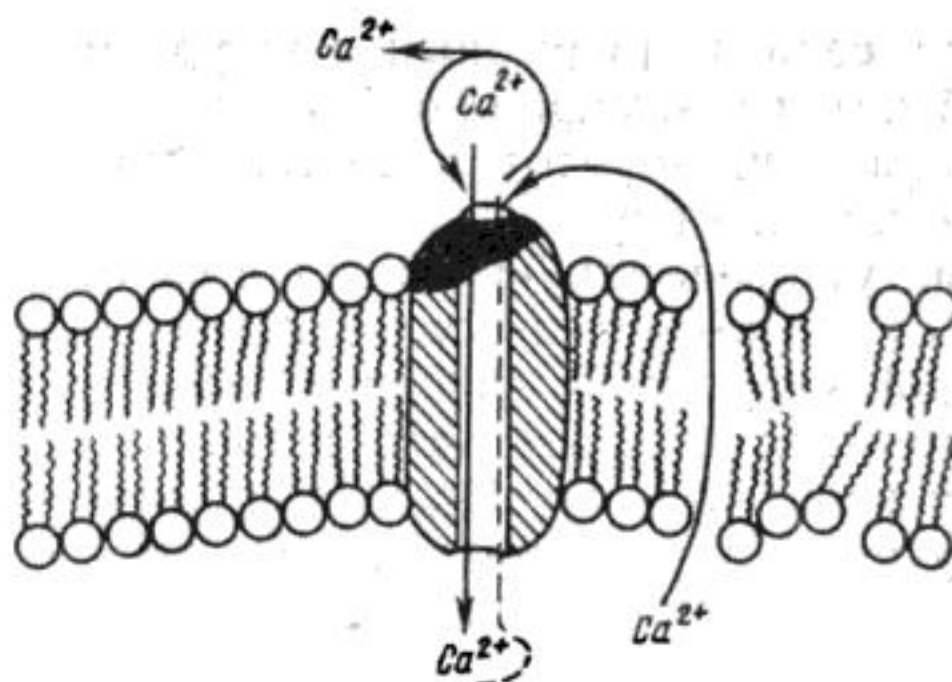


Рис. 6. Возможный механизм нарушения функционирования Са-насоса мембран СР после замораживания — отогрева.

ет свой непрерывный контур, можно предположить, что в процессе быстрого замораживания происходит некоторое вытеснение белка из мембран, но этот процесс, видимо, обратим, и после отогрева белок возвращается в исходное положение в мембране. Однако при этом могут быть нарушены связи фермента с окружающим его липидом.

Неопределенным остается также вопрос о нарушении молекулярной структуры АТФазы после замораживания — отогрева, так как прямых доказательств изменения конформации в наших экспериментах не получено. Об этом можно лишь косвенно судить по нарушению функционирования Са-транспортирующей системы и изменению некоторых кинетических параметров работы фермента, а также по данным ЭПР — увеличению количества подвижных SH-групп. Эти данные не указывают непосредственно на нарушение структуры АТФазы после воздействия низких температур. Они могут скорее всего свидетельствовать о нарушении липидного компонента мембраны или частичном вымораживании молекулы белка из бислоя, в связи с чем на поверхности мембраны появляется дополнительная доля подвижных SH-групп белка, способных реагировать со спиновой меткой. Конформация самой молекулы Са-АТФазы скорее всего не претерпевает изменений, так как, по нашим данным, спектр флуоресценции триптофановых остатков этого белка после замораживания — отогрева не изменялся.

В результате анализа литературы и на основании собственных данных можно сделать вывод о том, что нарушение функционирования ионных насосов после замораживания — отогрева происходит по единому принципу: в результате изменения физического состояния липидов мембран. АТФазы увеличивают свою активность в связи с повышенной проницаемостью мембран для ионов, компенсируя тем самым их утечку из везикул.

1. Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П. Молекулярные механизмы криповреждений мембран. — Итоги науки и техники. Сер. Биофизика, 1978, 9, с. 80—113.
2. Болдырев А. А. Биохимические аспекты электромеханического сопряжения. — Изд-во Моск. ун-та, 1977. — 208 с.
3. Бондаренко В. А., Белоус А. М., Бондаренко Т. П. Биохимические изменения фосфолипидного состава биомембран под действием низких температур. — Вест. АН УССР, 1977, № 9, с. 54—56.
4. Грек А. М., Луговой В. И., Белоус А. М., Гусева Н. Р. Изменение структурных характеристик и АТФазной активности мембран эритроцитов при действии низких температур. — В кн.: Современные проблемы криобиологии и криомедицины. М.: Внешторгиздат, 1975, с. 24—28.
5. Гусева Н. Р. Изменение АТФазной активности мембран эритроцитов при действии низких температур. — В кн.: Современные вопросы криобиологии. Киев: Наук. думка, 1976, с. 61—63.
6. Жегунов Г. Ф., Максина А. Г., Артемова Л. Г. и др. Изменение структуры мембран саркоплазматического ретикулума после воздействия на них низких температур. — Докл. АН УССР. Сер. Б, 1978, № 10, с. 924—926.
7. Жегунов Г. Ф., Белоус А. М. Структурно-функциональное состояние Са-транспортирующей системы мембран саркоплазматического ретикулума после замораживания. — Биохимия, 1980, 45, вып. 4, с. 687—695.
8. Иванов Л. В., Гаврилова Н. И., Моисеев В. А. Исследование действия низких температур и криопротекторов на структуру мембран эритроцитов методом спиновых меток. — В кн.: Механизмы криповреждения и криозащиты биологических структур. Киев: Наук. думка, 1977, с. 33—36.
9. Кузнецов А. Н. Метод спинового зонда. — М.: Наука, 1976. — 178 с.
10. Лишко В. К. Натриевый насос биологических мембран. — Итоги науки и техники. Сер. Биохимия, 1977, 11, с. 5—77.
11. Луговой В. И., Грек А. М., Гусева Н. Р. Изменение АТФазной активности мембран эритроцитов при действии низких температур. — В кн.: Современные вопросы криобиологии. Киев: Наук. думка, 1976, с. 73—77.
12. Осипенко А. П., Жегунов Г. Ф. Изменение транспорта некоторых ионов через биологические мембраны при воздействии низких температур и криопротекторов. — В кн.: Механизмы криповреждения и криозащиты биологических структур. Киев: Наук. думка, 1977, с. 39—40.

13. Осипенко А. П. Исследование проницаемости ^{22}Na и фосфолипидного состава мембран эритроцитов человека, подвергнутых ионизирующей радиации в замороженном состоянии. — Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 20—24.
14. Осипенко А. П., Белоус А. М., Лишко В. К. Измерение проницаемости мембран эритроцитов после замораживания в присутствии полиэтиленоксида и глицерина. — Укр. биохим. журн., 1978, 50, № 3, с. 364—367.
15. Пушкарь Н. С., Белоус А. М. Введение в криобиологию. — Киев: Наук. думка, 1975. — 344 с.
16. Ритов В. Б. Молекулярная организация и механизм функционирования Ca^{2+} -зависимой АТФазы саркоплазматического ретикулума. — Итоги науки и техники. Сер. Биохимия, 1977, 11, с. 5—77.
17. Сорокина З. А. Состояние натрия, калия и воды в цитоплазме клеток. — М.: Наука, 1978. — 230 с.
18. Финеан Д. Биологические ультраструктуры. — М.: Мир, 1970. — 315 с.
19. Araki T. Disruption of mitochondrial membrane on freezing. III. Factors influencing inactivation of mitochondrial 2-ketoglutarate dehydrogenase complex on freezing and thawing. — Low Temperat. Sci. Biol., 1975, 33, p. 1—2.
20. Balcavage B. X., Beck J. C., Burk D. P., Greenwalt J. W. Cryobiological studies of yeast mitochondria. — Cryobiology, 1970, 6, N 2, p. 385—393.
21. Balny C., Debey P., Douzon P. Reversible suspension of metabolism in subcellular organelles in "outfreeze" media at subzero temperatures. — Ibid., 1972, 9, N 4, p. 465—472.
22. Bocker J. H., Willis J. S. Absence of cold resistance in sarcoplasmic Ca-ATPase in a hibernating mammal. — Comp. Biochem. and Physiol., 1975, 528, N 3, p. 533—537.
23. Borton P., Carson R., Reed D. J. Stability of suspension of rat liver microsomes quick-frozen with liquid nitrogen and stored at -80°C — Biochem. Pharmacol., 1974, 23, N 12, p. 2332—2339.
24. Chevallier J., Bonnet J. P., Galante M. et al. Functional and structural heterogeneity of sarcoplasmic reticulum preparations. — Cell. Biol., 1977, 3, N 1, p. 103—108.
25. Duppel W., Dehl G. Effect of phase transition on the distribution of membrane associated particles in microsomes — Biochim. biophys. acta, 1976, 426, N 3, p. 408—412.
26. Elfin L. Biological membrane ultrastructure. — J. Ultrastruct. Res., 1963, 8, N 3, p. 283—294.
27. Fiehu W., Hasselbach W. The effect of phospholipase A on the calcium transport and role of unsaturated fatty acids in ATPase activity of sarcoplasmic reticulum. — Europ. J. Biochem., 1970, 13, N 6, p. 510—518.
28. Heller R. A., Gould R. C. Reversible cold inactivation of microsomal 3-hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase from rat liver. — J. Biol. Chem., 1974, 249, N 4, p. 5254—5264.
29. Kononen J., Tierri R. Temperature dependence of the ATPase activities in brain homogenates from a cold-water fish and a warm water fish. — Comp. Biochem. and Physiol., 1973, 44, N 6, p. 819—825.
30. Lepock J. R., Morse P. D., Kruuv J., Koith A. D. A model system approach to freezing injury using lobster sarcoplasmic reticulum. — Biophys. J., 1975, 15, N 1, p. 15.
31. MacLennan D. H. Purification and properties of adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum. — J. Biol. Chem., 1970, 245, N 3, p. 4500—4508.
32. Madeira V. M. C., Antunes-Madeira M. C., Carvalho C. M. Molecular components of sarcoplasmic reticulum and their possible localization in the membranes. — Cell. Biol., 1974, 2, N 1, p. 149—156.
33. Martonosi A., Donley J., Haplin R. A. Sarcoplasmic reticulum III. The role of phospholipids in the adenosine triphosphatase activity and Ca^{2+} transport — J. Biol. Chem., 1968, 243, N 1, p. 71—80.
34. Martonosi A. Sarcoplasmic reticulum. IV. Solubilisation of microsomal adenosine triphosphatase. — Ibid.
35. Masuda H., Meis L. Effect of temperature on the Ca^{2+} transport ATPase of sarcoplasmic reticulum. — Ibid., 1977, 252, N 6, p. 8567—8571.
36. McMurchie E. J., Reison K., Cairerose K. D. Temperature induce phase changes in membranes of heart: contrast between the thermal response of poikilotherms and homeotherms. — Comp. Biochem. and Physiol., 1973, 448, N 10, p. 1017—1024.
37. Phillipont J., Authier M. H. Study of human red blood cells membrane using sodium deoxycholate. II. Effects of cold storage, EDTA and small deoxycholate concentrations on ATPase activities. — Biochim. biophys. acta, 1973, 298, N 6, p. 887—893.
38. Romeo D. Formazione di lipiperossidi nei mitochondri di cuoredifui. — Giory. biochim., 1965, 14, N 2, p. 203—208.
39. Takehara J. The effect of freezing on ATPase of rabbit erythrocyte membranes. — Low Temperat. Sci. Biol., 1969, 29, p. 116—126.
40. Takehara J., Rowe A. W. The freezing of human red cells membranes with refe-

- rence to adenosine triphosphatase activity. — *Cryobiology*, 1968, 3, N 2, p. 256—262.
41. *Takehara J., Rowe A. W.* Increase in ATPase activity in red cell membranes as a function of freezing regimen. — *Ibid.*, 1971, 8, N 3, p. 559—567.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
10. 09. 80

УДК 57.043.611.651.1

А. Н. Новиков, С. Т. Олейник, Э. Н. Левченко

ИНИЦИИРОВАНИЕ ЛЬДООБРАЗОВАНИЯ ПРИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ЭМБРИОНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Предшествующими исследованиями установлено, что для успешного криоконсервирования эмбрионов млекопитающих необходим режим замораживания, характеризуемый малыми скоростями охлаждения, особенно на начальных этапах, до -10°C ($0,3-0,8^{\circ}\text{C}$ в 1 мин) [2, 5, 7], а также инициированием процесса льдообразования с целью уменьшения переохлаждения защитной среды до минимальных значений [5, 6, 7, 8].

Качественное объяснение механизма влияния переохлаждения защитной среды на сохранность эмбрионов нам представляется следующим. Быстро растущие кристаллы льда после значительного начального переохлаждения среды, порядка 5°C и более, подходят к недостаточно обезвоженной и насыщенной криопротектором клетке. Плазматические мембраны, хотя и являются барьером для проникновения льда внутрь клетки, в таких условиях не могут предотвратить внутриклеточное льдообразование и, как следствие, клетка гибнет. Необходимым обезвоживанию и насыщению клетки криопротектором в данном случае препятствуют малое время и мелкокристаллическая структура образующегося льда с весьма узкими каналами концентрированной жидкой фазы.

При отсутствии начального переохлаждения или небольшой его величины ($1-3^{\circ}\text{C}$), медленно растущие кристаллы льда, даже находящиеся в непосредственной близости от клеток, не вызывают их внутриклеточной кристаллизации, так как плазматические мембраны в этих условиях способны предотвратить этот процесс. Небольшая скорость роста кристаллов льда, значительный их размер, широкие каналы концентрированной жидкости способствуют в данном случае достаточному обезвоживанию и донасыщению криопротектором клеток.

До настоящего времени используются следующие способы устранения начального переохлаждения защитной среды: 1) введение иглы, охлажденной в жидком азоте, в суспензию клеток [4]; 2) внесение мелких и в небольшом количестве кусочков льда; 3) прикосновение охлажденного бранш-пинцета к наружной стенке контейнера [9].

Перечисленные воздействия для снятия переохлаждения должны реализоваться в узком диапазоне температур: от температуры замерзания среды и ниже на $3-5^{\circ}\text{C}$. Вне этого диапазона либо не будет достигнуто инициирование льдообразования, либо величина переохлаждения среды достигнет опасной для клеток величины. К недостаткам первых двух описанных способов устранения начального переохлаждения можно отнести необходимость раскрытия контейнера, третьего — возможность сильного переохлаждения среды из-за небольших размеров контейнера. При замораживании большого количества контейнеров на промышленных замораживающих установках описанные способы устранения переохлаждения вообще могут оказаться неприемлемыми

из-за трудности обработки этих контейнеров в короткий период времени и неизбежных нарушений режима охлаждения при обеспечении доступа в замораживающую камеру. Между тем в ряде областей науки и промышленности для инициирования кристаллизации широко применяется другой метод — инициирование начала кристаллизации твердыми примесями. В химической промышленности — это ввод в кристаллизаторы тонкодисперсных веществ, обладающих высококристаллизационной активностью, для регулирования размеров кристаллов получаемого продукта, в службе метеорологии — внесение в облака «льдообразующих агентов» с целью или искусственного дождеобразования, или предотвращения градовыделения.

Наиболее активными инициаторами льдообразования являются йодистое серебро, йодистый свинец, сернистая медь, некоторые виды кремнеземов [1]. Очевидно, что применение инородных, достаточно активных инициаторов льдообразования при криоконсервировании эмбрионов исключает все недостатки инициирования охлажденной иглой и бранш-пинцетом, кусочками льда.

В настоящее время полной теории инициирования процесса образования кристаллов (в частности, кристалла льда) твердыми активными примесями нет. Имеются лишь отдельные исследования, результаты которых свидетельствуют о том, что активность частицы примеси обуславливается следующим: 1) подобием ее кристаллической структуры кристаллизуемому веществу [3]; 2) возможно, характером расположения зарядов и химическими неоднородностями на поверхности примеси [9]; 3) адсорбцией молекул кристаллизуемого вещества на примеси [4].

Существующее положение в теории данного вопроса побудило нас провести ряд экспериментов с целью оценки льдообразующей активности некоторых веществ в системах, моделирующих криозащитные среды.

Методика эксперимента. Для исследования были использованы только малорастворимые вещества, гексагональной сингонии в дисперсном состоянии (0,1—5 мкм). Льдообразующая активность вещества оценивалась по величине среднего переохлаждения замораживаемой модельной криозащитной среды, наблюдаемого в их присутствии. Это осуществлялось путем замораживания и фиксации температуры замерзания 45—50 капель исследуемого раствора на охлаждаемой медной пластине, поверхность которой была гидрофобизована кремнийорганическим покрытием. Для предотвращения попадания в переохлажденные капли частиц инея последние изолировались от окружающей атмосферы слоем гептана. Среднее переохлаждение капель исследуемой среды без присутствия твердых примесей составляло 11,6°C.

Результаты и обсуждение. Кристаллографические характеристики веществ по справочным данным и полученные нами характеристики их льдообразующей активности приведены в табл. 1. Льдообразующая активность веществ в модельной криозащитной среде определяется прежде всего кристаллическим несоответствием параметров кристаллической решетки примеси и льда и тождественностью их типов решетки. Оценка зависимости льдообразующей активности от размера частиц для наиболее перспективного — йодистого серебра — показала, что активность его возрастает с увеличением размера частиц до 4 мкм, затем практически постоянна. Экспериментальные трудности получения частиц йодистого серебра с размером более 4 мкм в растворе методом реакции обмена йодистого калия и азотнокислого серебра вызвали необходимость плавления полученного в растворе, очищенного промывкой и высушенного осадка с последующей диспергацией слитка и рассева. Оценка льдообразующей активности и результатов действия полученного таким образом препарата йодистого серебра с размером

**Таблица 1. Кристаллографические характеристики
и льдообразующая активность веществ**

Вещество	Параметр кристаллической решетки, Å		Кристаллографическое несоответствие по параметру %		Структурный тип	Льдообразующая активность, °C
	a	c	a	c		
Лед	4,51	7,34	0	0	H	—
Йодистое серебро	4,59	7,52	1,77	2,45	H3	5,0
Йодистый свинец	4,54	6,89	0,66	6,13	H2	5,1
Сернистая медь	3,79	16,36	17,51	122,88	H	5,2
Оксид алюминия	8,40	13,65	86,25	85,96	H	5,7
Оксид цинка	3,26	5,21	27,71	29,01	H3	6,0
Сернистый цинк	3,82	6,25	55,65	14,85	H3	7,0
Сернистый молибден	3,16	12,32	29,93	67,84	H	7,2
Оксид лантана	3,94	6,13	12,63	16,48	H16	7,0
Сернистое железо	3,45	5,81	23,50	20,84	H4	7,2
Гидроксид магния	3,13	4,74	30,59	35,42	H2	9,5
Углекислый кальций	4,99	17,06	10,64	132,62	H8	8,6
Сернистый марганец	3,98	6,44	11,75	12,26	H3	8,5
Оксид бериллия	2,70	4,38	40,13	40,32	H3	11,1
Углекислый кобальт	4,66	15,08	3,32	105,44	H8	11,0

частиц менее 100 мкм была осуществлена при криоконсервировании эмбрионов линейных мышей (C57Bl и Balb/c), которые вымывали на различных стадиях развития из яйцеводов или рогов матки после индуцирования у животных адпервуляции. Введение криопротектора ДМСО до конечной концентрации 1,2 М осуществлялось в три приема равными порциями: при +2°, 0 и -2°C. Замораживание проводилось по следующей программе: до -8°C со скоростью 0,3—0,8°C/мин; при температуре от 8 до 60°C со скоростью 0,2—0,6°C/мин; от 60 до -105°C — 0,6—1,4°C/мин, затем замораживаемые объекты переносились непосредственно в жидкий азот. Иницирование льдообразования для сравнения осуществлялось двумя способами: погружением в среду иглы, охлажденной в жидком азоте, на глубину 1—2 мм при температуре -4 — -5°C и внесением в контейнер сразу же после заливки суспензии клеток небольшого количества частиц йодистого серебра (1—5 мг). Размораживание проводилось со скоростью порядка 15°C в 1 мин. Отмывка эмбрионов от криопротектора осуществлялась в 6 этапов. Сохранность консервированных эмбрионов оценивали визуально. Критерием нормально сохранившихся эмбрионов служили их правильная форма, целостность, отсутствие выпячивания и сморщивания, четкая граница между бластомерами, прозрачность протоплазмы и отсутствие грануляции в ней. Окон-

**Таблица 2. Влияние вида иницирования
льдообразования на сохранность
деконсервированных эмбрионов**

Вид иницирования	Количество эмбрионов		
	замороженных, шт.	сохранившихся структур., %	развившихся в культуре, %
Иглой, охлажденной в жидком азоте	229	73,3	36,0
Йодистым серебром	196	66,3	57,1

чательная оценка жизнеспособности деконсервированных эмбрионов осуществлялась по развитию их в культуре. Культивирование in vitro проводилось в эмбриологическом стекле под слоем вазелинового масла при температуре +37°C с подачей углекислого газа в среду Бринстера.

Таким образом, результаты криоконсервирования показали, что использование йодистого серебра в качестве льдообразования дает хорошо воспроизводимые значения переохлаждений, практически равные таковым при иницировании охлажденной иглой.

Сохранность деконсервированных эмбрионов (табл. 2), замороженных при иницировании льдообразования йодистым серебром, не хуже, чем при иницировании охлажденной иглой.

1. Безруков О. Ф., Дубрович Н. А., Потанин А. Н. и др. О льдообразующей активности веществ. — В кн.: Молекулярная физика и биофизика водных систем. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1973, вып. 1, с. 48—59.
2. Bank H., Manrer R. Survival of frozen rabbit embryos. — Exp. Cell. Res., 1974, 89, N 1, p. 188—196.
3. Fletcher N. Physics of rainclods. — Cambridge: Univ. press, 1962. — 340 p. — Приведено по: Безруков О. Ф., Дубрович Н. А., Потанин А. Н. и др. О льдообразующей активности веществ. — В кн.: Молекулярная физика и биофизика водных систем. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1973, вып. 1, с. 48—59.
4. Fukuta N. Review of physics of ice nucleation and its application to weather modification. — Denver, 1967. — 100 p.
5. Ogawa S., Tomoda S. Survival of 16-celled and morula stage rabbit embryos frozen to -196°C . — Exp. anim., 1976, 25, N 4, p. 275—282.
6. Parkening T., Tsunoda J., Chang M. Effects of various low temperatures cryoprotective agents and cooling rates on the survival fertilizability and development of frozen-thawed mouse eggs. — J. Exp. Zool., 1976, 197, N 3, p. 369—374.
7. Sherman J. K., Lin T. P. Survival of intertilized mouse eggs during freezing and thawing. — Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1958, 98, p. 902.
8. Whittigham D. General aspects of egg culture and preservation. — In: Simp. Eggs transfer in the cattle. 1976, p. 101—111.
9. Zehn-Jensen H., Greve T. Low temperature preservation of Cattle Blastocysts. — Theriogenology, 1978, 9, N 4, p. 313—321.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
03.03.80

УДК 57.043:548.52;577.44

А. Н. Новиков, В. И. Вишнеvский, А. Г. Душейко

ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАЗВУКОВЫХ КОЛЕБАНИЙ НА ПЕРВИЧНОЕ ЗАРОДЫШЕОБРАЗОВАНИЕ ЛЬДА В БИОЛОГИЧЕСКИХ РАСТВОРАХ

В последние годы обнаружен эффект положительного влияния ультразвука на биологические объекты при их замораживании [1, 3, 5], однако механизм этого явления остается пока не раскрытым. Так как основное влияние ультразвуковых колебаний происходит на этапе перехода основной массы жидкой фазы в кристаллическую, представляет интерес изучение влияния ультразвука на кинетику фазового превращения в этих системах.

В настоящей статье приведены экспериментальные результаты исследований влияния ультразвуковых колебаний частотного диапазона 15—35 кГц на первичное зародышеобразование льда в чистой воде и растворах плазмы костного мозга с криопротектором.

Методика исследования. Методика определения количества возникающих центров кристаллизации в сплошной среде наталкивается на ряд трудностей. Образовавшиеся центры кристаллизации растут, объем незакристаллизовавшейся части образца уменьшается, тем самым уменьшается число возникающих центров кристаллизации в данной части. Для предотвращения этого исследуемые системы разбивали на большое количество малых, изолированных друг от друга частичек (капель). Для этой цели использовали генератор аэрозолей, аналогичный описанному в литературе [8]. Капли взвешивали в смеси вазелинового масла с гептаном (1 : 1) и охлаждали под микроскопом в специальной ячейке с излучателем ультразвука. Размер капель в экспериментах колебался в пределах 30—50 мкм. Замораживание исследуемых образцов и поддержание заданной температуры в процессе эксперимента производили парами жидкого азота. Температуру контролировали медь-

константановой термопарой, теплый спай которой находился при 0°C. Зародыши, превратившиеся в центры кристаллизации, закристаллизовывали те капли, в которых возникли. Закристаллизовавшуюся каплю в дальнейшем считали одним центром кристаллизации. Скорость охлаждения образцов была близкой к скорости охлаждения суспензий костного мозга на первом этапе замораживания — 2°C/мин. При достижении определенной температуры подсчитывали в поле зрения микроскопа количество закристаллизовавшихся капель. Сравнивая результаты определения количества закристаллизовавшихся капель без ультразвука и с ультразвуком, определяли увеличение Δn под действием данного физического фактора. При каждой температуре проводили 5—6 измерений. Точность результатов измерений, выраженная величиной стандартного отклонения, составляла $\pm 4,4\%$ в доверительном интервале 95%.

Результаты и их обсуждение. Зависимость количества закристаллизовавшихся капель воды для различных уровней переохлаждения при действии ультразвуковых колебаний различной мощности представлена в табл. 1, а для растворов плазмы костного мозга с полиэтиленоксидом — в табл. 2. Частота ультразвука 22 кГц.

Таблица 1. Зависимость количества первичных зародышей льда в воде (в %) от мощности ультразвука

Температура охлаждения, °C	Мощность ультразвука, Вт					
	0	0,26	0,76	0,92	1,03	1,16
—15,0	0	0	0	0	0	0
—20,0	0	0	0	0	0	0
—22,5	4	4	5	5	5	5
—25,0	10	11	13	15	17	19
—27,5	36	40	42	42	44	46
—30,0	48	52	53	55	56	58

ных нашему (10^{-4} см³), начало гомогенного зародышеобразования возможно при более высоких температурах (—30°C — —34°C) [2]. В наших образцах зародышеобразование льда начиналось при значительно меньших переохлаждениях (—22,5°C). Это объясняется, по-видимому, наличием в образцах нерастворимых микропримесей, которые являются готовыми центрами кристаллизации (происходит гетерогенное зародышеобразование), и низкой скоростью охлаждения. Ультразвук при этих температурах лишь незначительно увеличивает количество закристаллизовавшихся капель. Чем выше мощность ультразвуковых колебаний, тем больше увеличивается количество зародышей. При температуре —30°C и мощности ультразвука 1,16 Вт Δn составляло уже 10%. Аналогичное действие ультразвука проявлялось и при озвучивании переохлажденных образцов плазмы костного мозга с 15% полиэтиленоксида. Однако степень первичного зародышеобразования льда при тех же температурах в плазме ниже, чем в воде. Это объясняется тем, что в растворе плазмы костного

Таблица 2. Зависимость количества первичных зародышей льда в растворе плазмы костного мозга с полиэтиленоксидом (в %) от мощности ультразвука

Температура охлаждения, °C	Мощность ультразвука, Вт					
	0	0,26	0,76	0,92	1,03	1,16
—15,0	0	0	0	0	0	0
—20,0	0	0	0	0	0	0
—22,5	1	1	1	1	1	1
—25,0	2	2	2	2,5	2,5	2,5
—27,5	6	6	6	6,0	6,5	6,5
—30,0	12,5	12,5	14,5	15,5	16,5	16,5
—32,5	20,0	20,5	23,5	23,5	26,0	28,5
—35,0	41,5	43,0	45,0	47,0	49,0	53,0

мозга, кроме нерастворимых примесей, которые могут быть готовыми центрами кристаллизации, присутствуют растворимые (биомакромолекулы, молекулы криопротектора), поверхностная активность которых как модификаторов процесса кристаллизации отрицательна [6]. Так как рост зародыша льда в растворе сопровождается вытеснением молекул примеси в жидкую фазу, то у границ льда образуется слой с повышенной концентрацией примесей. Этот слой затрудняет поступление молекул воды из

раствора в зародыш, и судьба такого зародыша будет зависеть от соотношения между скоростью отвода растворимых молекул и скоростью пополнения вследствие роста зародыша. При определенных значениях коэффициента диффузии и скорости роста зародыша размеры последнего не смогут достигнуть критического размера при данном теплоотводе.

Наложение ультразвукового поля в этом случае приводит к кристаллическим новообразованиям в поступательное движение. В каждом микрообъеме метастабильной системы это движение можно рассматривать как эквивалент перемешивания, которое в конечном счете приводит к увеличению скорости зарождения центров кристаллизации. В пользу этого свидетельствуют и исследования Ф. К. Горского [4], который показал, что все физические факторы, переменные во времени, при воздействии на метастабильные системы уменьшают энергию активации зародышеобразования и приводят к увеличению скорости зарождения центров кристаллизации.

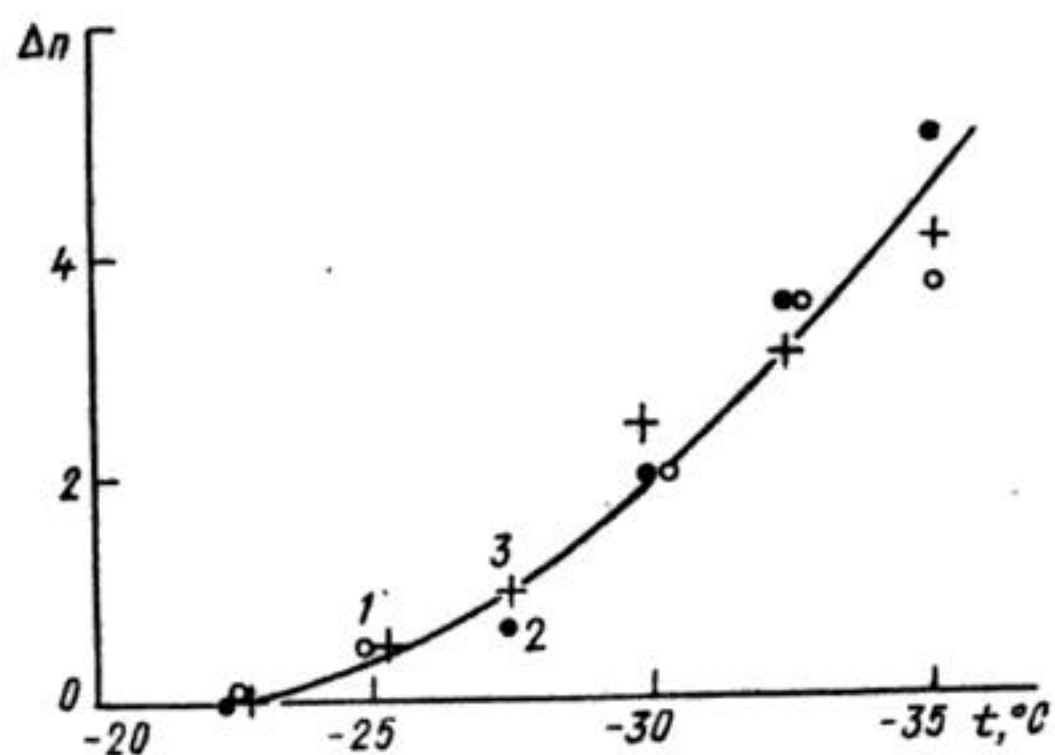
На рисунке приведено увеличение количества закристаллизовавшихся капель плазмы костного мозга при различных отрицательных температурах в ультразвуковом поле различной частоты. Мощность ультразвука при этом была 1,03 Вт. На оси абсцисс отложена температура образца $t^{\circ}\text{C}$, на оси ординат — Δn . Анализ полученных экспериментальных данных показывает, что при одинаковой мощности ультразвука увеличение количества закристаллизовавшихся капель в пределах ошибки эксперимента одинаково во всем изученном частотном диапазоне.

Таким образом, можно сделать следующие выводы.

1. Ультразвуковые колебания в диапазоне используемых при замораживании клеточных суспензий средних мощностей увеличивают количество зародышей льда в биологических растворах.

2. Увеличение количества центров кристаллизации в биологических системах пропорционально увеличению средней удельной мощности ультразвука.

3. Изменение частоты ультразвуковых колебаний в диапазоне 15—35 кГц не оказывает влияния на процесс зародышеобразования льда в биологических растворах.



Увеличение количества закристаллизовавшихся капель плазмы костного мозга в ультразвуковом поле различной частоты, кГц:
1 — 15; 2 — 22; 3 — 35.

1. Антонов С. Ф., Лебедев В. Ф., Хасилев В. Я., Щемякин Ю. А. А. с. 618096 (СССР). Способ замораживания пищевых продуктов. — Оpubл. в Б. И., 1978, № 29.
2. Буторин Г. Т., Скрипков В. П. Кристаллизация переохлажденной воды. — Кристаллография, 1972, 17, № 2, с. 379—384.

3. Вишнеvский В. И., Марющенко А. В. А. с. 494163 (СССР). Способ консервирования биологических жидкостей. — Оpubл. в Б. И., 1975, № 45.
4. Горский Ф. К. Влияние различных физических факторов на кристаллизационные параметры вещества. Сб. науч. работ Мин. мед. ин-та, 1955, 15, с. 51—57.
5. Илюхин В. В., Цюпа В. И., Титов Е. И., Ермаков Ю. П. А. с. 395060 (СССР). Способ замораживания пищевых продуктов и биопрепаратов. — Оpubл. в Б. И., 1973, № 35.
6. Кулешова Л. Г., Моисеев В. А., Иткин Ю. А. Кристаллизация водных растворов некоторых криопротекторов. — Криобиология и криомедицина, 1976, вып. 2, с. 27—31.
7. Самыгин Г. А. Причины вымерзания растений. — М.: Наука, 1974. — 191 с.
8. Цедрик М. С. Изучение кристаллизации бензола и азобензола методом малых капель. — В кн.: Кристаллизация и фазовые переходы. Минск: Изд-во АН БССР, 1974, с. 71—73.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
15.09.80

УДК 57.043.547.962.3

*Т. Ф. Морозова, А. М. Грек, В. А. Контелов,
В. А. Моисеев, В. И. Луговой*

ИЗМЕНЕНИЕ СПЕКТРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА В КОНЦЕНТРИРОВАННЫХ РАСТВОРАХ ХЛОРИСТОГО НАТРИЯ

Известно, что степень повреждения биологических объектов при их криоконсервировании зависит от ряда физико-химических факторов, среди которых существенное значение имеет увеличение концентрации электролитов, возникающее в результате вымораживания из системы свободной воды [8].

Влиянию различных солей, в том числе хлористого натрия, на структурные характеристики белков посвящено значительное количество работ [12, 13]. Однако их авторы не обнаружили изменения конформации белков, в частности бычьего сывороточного альбумина (БСА), при относительно малых концентрациях этой соли [13].

В настоящей работе изучали влияние различных концентраций NaCl на конформацию БСА, используя для этой цели регистрацию спектров поглощения и флуоресценции белка.

Методика исследования. Исследовали бычий сывороточный альбумин фирмы «Реанал» в 0,1%-ной конечной концентрации. Образцы белка готовили на растворах хлористого натрия разной концентрации: 0,15; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,6; 2,6; 4,6 М. Спектры флуоресценции белка регистрировали на спектрофлуориметре МПФ-2А фирмы «Хитахи». Вклад тирозиновых остатков белка в общий спектр белковой флуоресценции рассчитывали по методу [10]. О расположении триптофановых остатков в белковой глобуле судили, используя метод, предложенный в работе Бурштейна [1].

Спектры поглощения БСА с NaCl регистрировали на спектрофотометре «Пай Уникам СП-8000» относительно растворов NaCl той же концентрации, что и в образце. Дифференциальные спектры БСА с NaCl снимали по методу Гершковича с использованием тандема двойных кювет [4]. В канале образца находились кювета с водой и БСА в солевом растворе, в канале эталона были расположены кювета с раствором NaCl и кювета с БСА, растворенных в тех же концентрациях, что и в образце.

Используя приставку СП-875, следили за термическим плавлением белка. Точность измерения температуры в образце была $\pm 1^\circ\text{C}$.

Результаты и их обсуждение. Как видно, взаимодействие БСА с солями имеет сложный характер и зависит от концентрации возмуща-

ющего агента. Характер изменений оптической плотности различен при концентрациях соли менее и более 0,8—1,0 М. При концентрации соли 2,6 М происходит увеличение оптической плотности растворов при λ_{325} нм (рис. 1), что является, по-видимому, следствием агрегации белка. Особенно значительно A_{325} увеличивается при концентрации соли более 4 М. В дифференциальных спектрах белка с солью относительно контрольных образцов белка при концентрациях соли до 1 М появляется слабо выраженный пик при 293 нм, обусловленный в основном поглощением триптофановых остатков белка. Интенсивности пика при 293 нм линейно зависят от концентрации соли в растворе до 1,6 М. Учитывая, что подобный пик наблюдается и в солевых растворах свободной аминокислоты [4], а также, что все триптофановые остатки в БСА доступны растворителю [1], можно полагать, что отмеченные спектральные сдвиги вызваны не конформационными изменениями белка, а являются результатом повышения концентрации NaCl в растворе.

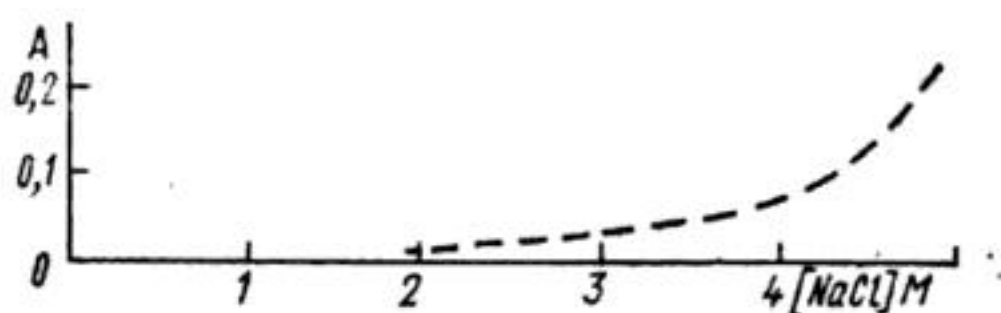


Рис. 1. Зависимость оптической плотности растворов БСА (0,1%) от концентрации хлористого натрия ($\lambda_{из}=325$ нм).

При концентрации соли в растворе 1,6—2,6 М в дифференциальных спектрах появляются характерные отрицательные пики с максимумом при 274—275, 282—284 нм, которые становятся более выраженными по мере увеличения концентрации хлорида натрия. Эти пики обусловлены изменением вклада прежде всего тирозиновых, а также триптофановых остатков в спектр поглощения.

По мере увеличения концентрации соли появляется и усиливается слабо выраженный пик при 305—308 нм, который, согласно литературным данным, свидетельствует об изменении электростатического окружения остатков триптофана [4]. Появляются хорошо выраженные отрицательные пики и в области 240—270 нм. Они обусловлены фенилаланиновыми остатками белка [7].

Таким образом, при концентрациях соли более 1,6—2,6 М по данным спектрофотометрии изменяется состояние не только триптофановых, но и тирозиновых и фенилаланиновых остатков. По-видимому, в этих экспериментальных условиях происходят внутримолекулярные конформационные изменения белка.

При концентрации соли более 2,6 М вид дифференциальных спектров также изменяется, однако из-за увеличения светорассеяния эти спектры плохо разрешены и о положении пиков судить сложно.

Известно, что флуоресценция БСА определяется в основном триптофановыми остатками с максимумом флуоресценции белка при $\lambda_{макс}=340—342$ нм, тогда как тирозин находится в нефлуоресцирующем или слабофлуоресцирующем состоянии [1].

Анализ состояния триптофановых остатков в белке по их флуоресценции (табл. 1) свидетельствует о том, что доступность их растворителю при концентрации NaCl 0—1,6 М остается практически постоянной. Небольшое увеличение интенсивности флуоресценции при возбуждении свечением светом с $\lambda_{воз.флюор}=296$ нм хорошо объясняется тем, что триптофановые остатки БСА доступны растворителю, а для индола и его производных в концентрированных солевых растворах наблюдается увеличение интенсивности флуоресценции [2].

В указанных экспериментальных условиях наблюдалось также некоторое изменение флуоресцентных характеристик остатков тирозина, что проявлялось в увеличении вклада тирозиновых остатков в свечение белка (рис. 2). Отмеченные изменения могут быть результатом разрыва тирозил-карбоксилатных водородных связей, что, вероятно, обуслов-

лено некоторыми изменениями во взаимном расположении аминокислотных остатков белка. Ранее было показано, что водородные связи тирозина, по-видимому, несущественны для поддержания конформации этого белка [2]. Следовательно, можно предположить, что, хотя тирозиновая составляющая спектров флюоресценции и поглощения свидетельствует об изменении состояния тирозиновых остатков и связаны эти

Таблица 1. Положение триптофановых остатков в бычьем сывороточном альбумине при различных концентрациях хлористого натрия

Концентрация NaCl, М	Доля остатков триптофана		
	внутренних	частично доступных растворителю	поверхностных
0,2	0,0—0,1	0,75—0,85	0,15
0,6	0,0—0,1	0,5	0,5
1,0	0,1	0,4	0,5
1,6	0,0	0,4	0,6
2,6	0,25	0,0	0,75

изменения, вероятно, прежде всего с удалением тушащих флюоресценцию групп от остатков тирозина, вся макромолекула белка все же не претерпевает значительных конформационных изменений. Наши данные согласуются с данными других авторов [12, 13]. Низкие концентрации соли оказывают, вероятно, возмущающее действие на систему «вода+белок», оказывая при этом лишь общий электростатический эффект и не вызывая существенного изменения кон-

формационного состояния белковой глобулы. Судя по спектрам флюоресценций, изменения состояния триптофановых и тирозиновых остатков белка при концентрациях соли от 1,6 до 2,6 М более значительны, чем при концентрациях до 1,6 М.

Анализ состояния триптофановых остатков белка по положению $\lambda_{\text{макс}}$, $\Delta\lambda_{1/2}$ [1] свидетельствует, вероятно, о небольшом погружении триптофана в белковую глобулу (см. табл. 1), при этом уменьшается вклад тирозиновой компоненты в спектры флюоресценции (см. рис. 2).

По данным спектрофотометрии и спектрофлюориметрии увеличивается светорассеяние растворов, что может быть обусловлено не только внутримолекулярными изменениями, но и прежде всего агрегацией белковых молекул. В случае агрегации хромофорные группы могут оказаться в гидрофобном окружении, это объясняет коротковолновое положение $\lambda_{\text{макс}}$ флюоресценции хромофоров. В этом случае близость тушащих групп может являться причиной резкого уменьшения вклада тирозиновых остатков в свечение белка.

При концентрации NaCl 4,6 М резко увеличивается светорассеяние растворов, что свидетельствует о нарастающей агрегации белка.

Таким образом, можно предположить, что денатурация БСА в растворах NaCl наступает при концентрации более 4,6 М. Однако ей предшествуют предденатурационные изменения белка при концентрации соли примерно от 1,6 до 2,6 М и более.

С целью более детальной характеристики конформационных изменений БСА в условиях действия различных концентраций хлористого натрия на белок было исследовано плавление БСА в диапазоне температур от 40 до 90°C. Вычисляли производные от зависимостей изменения оптической плотности растворов по температуре ($T_{\text{пл}}$). Полученные данные приведены в табл. 2.

Экспериментальные результаты для контрольных образцов белка свидетельствуют о хорошем совпадении полученных результатов с известными литературными данными по плавлению БСА. В частности, наблюдаемая зависимость $T_{\text{пл}}$ от концентрации белка указывает на существенную роль межмолекулярных процессов в растворах БСА при повышении температуры более 70°C, что согласуется с известными литературными данными для альбуминов [11]. При концентрации белка приблизительно 0,5 мг/мл и меньше, когда агрегация затруднена, в

плавлении должны преобладать процессы, связанные с внутримолекулярными изменениями структуры. Сравнивая полученные данные для БСА в концентрации 0,5 мг/мл с результатами, полученными методами ДОВ и флюоресцентных меток, можно предположить, что наблюдаемые нами до 70°C изменения связаны в основном с внутримолекулярными процессами, т. е. с «подплавлением» гидрофобных областей, различающихся по своей термической устойчивости, и разрушением вторичной структуры БСА при температурах около 60°C [3, 5, 6, 9].

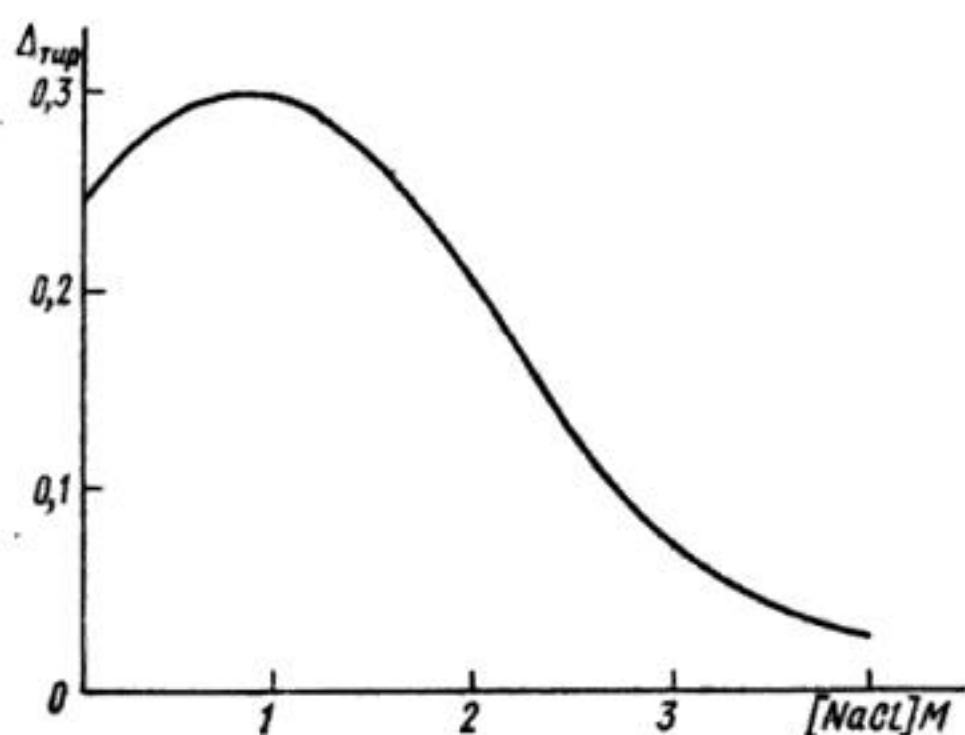


Рис. 2. Вклад тирозиновых остатков в спектры флюоресценции БСА (0,1%) в растворах хлористого натрия различной концентрации.

При плавлении белка в концентрации 1 мг/мл в 1,6 М NaCl $T_{пл}$ в пределах точности измерений совпадает с таковым для нативного белка, хотя, возможно, и уменьшается на 1—2°C.

При помещении БСА в 2,6 М NaCl плавление белка отличается от нативного, термостабильность БСА уменьшается.

Это свидетельствует о незначительных изменениях внутримолекулярной структуры белка при концентрации соли 1,6 М и гораздо большем изменении его конформации в 2,6 М NaCl, что в данном случае обусловлено, вероятно, разрыхлением белковой глобулы. Однако сложность установления относительного вклада в плавление белка внутри- и межмолекулярных процессов оставляет открытым вопрос о том, связано ли понижение термостабильности белка только с внутримолекулярными изменениями или в данном процессе значительную роль играют также особенности агрегации его при использованных концентрациях NaCl.

Результаты, изложенные выше, свидетельствуют о том, что NaCl при концентрациях в растворе 1—1,6 М оказывает, по-видимому, лишь общее электростатическое влияние на конформацию БСА, не вызывая значительного изменения его внутренней конформации.

Изменения БСА в растворах NaCl от 1,6 до 4—4,6 М более выражены и сопровождаются агрегацией белка, а при концентрациях соли более 4,6 М агрегация белка становится весьма значительной.

Действие Na^+ на БСА, по-видимому, сходно с действием Li^+ , подробно рассмотренном в статьях Суна и Чанга с соавторами [12, 13]. Na^+ , как и Li^+ , известен как «порядкообразующий» ион, образующий поликристаллическую структуру с молекулами воды.

Большая плотность заряда способствует высокой сольватированности ионов Na^+ молекулами воды. Очевидно, взаимодействия молекул воды и боковых радикалов пептидных цепей могут изменяться при связывании ионами натрия достаточно большого количества молекул воды. Это должно влиять на степень диссоциации ионизируемых групп белка, что, в свою очередь, может привести к изменению заряда боковой цепи индольного кольца триптофановых остатков и скажется на спектральных свойствах образца.

Кроме того, нельзя исключить, что ион Na^+ может непосредственно взаимодействовать с $-COO^-$ -группами в боковых цепях белка, что может привести к образованию ионных пар и к изменению электростатического баланса зарядов, а следовательно, к расширению белковой молекулы.

Существенное значение могут иметь и ион-дипольные взаимодействия. В результате таких взаимодействий внутренние водородные связи между пептидными карбоксилами и фенильными группами тирозиновых остатков, а также карбоксильными группами других аминокислотных остатков, ослабляются, что может дестабилизировать спиральные участки в белковой молекуле. Благодаря небольшим размерам ион

Na^+ может проникать и в гидрофобные области белка.

В результате указанных выше механизмов, вторичная и третичная структуры БСА могут локально изменяться, что приводит в случае БСА, белка с большим числом дисульфидных связей, прежде всего к агрегатообразованию.

Агрегация БСА может происходить не только вследствие разворачивания спиральных участков и возмущения гидрофобных участков белка ионами Na^+ , но и в результате того, что сами ионы могут служить местами «сшивки» молекул белка.

Таблица 2. Плавление бычьего сывороточного альбумина при различных концентрациях хлористого натрия в растворе

Концентрация*	$T_{пл}$ ($^{\circ}\text{C}$)**	Температура помутнения растворов, $^{\circ}\text{C}$
0,5 мг/мл	49—51 (53—55,66)	Более 67
1 мг/мл	66,74—76,81	Более 85
2 мг/мл	66,72—78,82—85	Более 90
1 мг/мл в 1,6 М NaCl	65,73—74,81	Более 82
1 мг/мл в 2,6 М NaCl	60—61, 67—68	Более 76 $^{\circ}\text{C}$

* Все образцы, кроме первого, исследовались при температурах более 55 $^{\circ}\text{C}$.

** $T_{пл}$ — температура, соответствующая положению максимума производной зависимостей изменения оптической плотности белка от температуры.

Полученные нами спектральные данные свидетельствуют в пользу осуществления по крайней мере некоторых механизмов из перечисленных выше.

В частности, при концентрации NaCl до 1—1,6 М, возможно, происходят разрыв или ослабление некоторых тирозил-карбоксилатных связей, а также изменение спектральных свойств триптофана вследствие увеличения концентрации NaCl в растворах, в которые погружены триптофановые остатки БСА.

При концентрациях NaCl более 1,6—2,6 М начинается агрегатообразование, происходящее, по-видимому, в результате некоторых внутримолекулярных изменений белка. При этом спектральный анализ свидетельствует об образовании тирозинами новых связей, тушащих их флуоресценцию, и о возмущении электронной оболочки фенилаланиновых остатков, триптофановые остатки, по-видимому, несколько погружаются в гидрофобные области белковых агрегатов. При повышении концентрации соли до 4—4,6 М агрегация становится ведущим процессом.

Таким образом, NaCl при концентрации в растворе до 1—1,6 М оказывает лишь общее электростатическое влияние на конформацию БСА. При концентрации хлористого натрия от 1,6 до 4,6 М происходят изменения структуры белка, которые приводят к его агрегации. Изучение природы внутримолекулярных изменений БСА в растворах требует привлечения методов, дополняющих спектральные.

1. Бурштейн Э. А. Люминесценция белка. Природа и применение. — Итоги науки и техники. Сер. Молекуляр. биология, 1973, 3, с. 127—215.
2. Бусел Е. П. Люминесцентные свойства основных хромофоров белка. — Там же, с. 85—126.
3. Добрецов Г. Е. Исследование структуры белков методом флуоресцентных зондов. — Там же, 1975, 6, с. 34—93.
4. Коган Г. А. Применение метода дифференциальной спектроскопии для изучения структуры белков. — Там же, 1973, 3, с. 127—215.
5. Кузнецов А. Н., Эберт Б. Исследование конформационных изменений молекул сывороточного альбумина в предденатурационном интервале температур методом спинового зонда. — Молекуляр. биология, 1975, 9, вып. 3, с. 407—415.

6. Никушкин Е. В., Клебанов Г. И. Изучение температурно-зависимых конформационных переходов белков методом флуоресцентных зондов. — Биофизика, 1976, 21, вып. 4, с. 619—623.
7. Окулов В. И. Применение спектрофотометрии в ультрафиолете для исследования белков. — Успехи биол. химии, 1971, 12, с. 28—71.
8. Пушкарь Н. С., Белоус А. М. Введение в криобиологию. — Киев: Наук. думка, 1975. — 345 с.
9. Татарinov Б. А., Черенкевич С. Н., Комяков И. Изучение зависимых от температуры конформационных превращений сывороточного альбумина с помощью адсорбированного красителя. — Молекуляр. биология, 1978, 12, вып. 1, с. 83—91.
10. Туроверов К. К., Щелчков Б. В. Исследование тепловой денатурации белков с помощью двухволнового метода регистрации изменений спектра их ультрафиолетовой флуоресценции. — Биофизика, 1970, 15, вып. 6, с. 965—972.
11. Krumbiegel I., Wendel I., Behlke I. Aggregation und B-struktur-bildung bei der hitzedenaturierung des human serum albumins. — Stud. biophys., 1977, 66, H. 3, S. 179—187.
12. Sun S. F., Chang T. S. O. del Rosario. Bovine serum albumin in lithium chloride solutions. — Int. J. Peptide Protein, 1974, res. 6, p. 87—94.
13. Sun S. F., Chang T. S. Bovine serum albumin in lithium chloride solutions. — Ibid., 1975, res. 7, p. 103—110.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
22.08.80

УДК 57.043.547.962.4

Т. Ф. Морозова, В. А. Моисеев

ВЛИЯНИЕ СОЛЕЙ НА СТАБИЛЬНОСТЬ ИММУНОГЛОБУЛИНА ЛОШАДИ

Устойчивость белков к действию различных концентраций солей изменяется в зависимости от температуры [1, 3]. Механизмы этого процесса в литературе описаны недостаточно. В предыдущих работах было выяснено, что определенные концентрации хлористых калия и натрия влияют на конформацию иммуноглобулинов [3, 6]. Целью настоящей работы явилось изучение влияния KCl и NaCl на конформацию иммуноглобулина G лошади (IgG) при температуре 36°C в зависимости от pH. Мы предприняли также попытку сравнить влияние KCl и NaCl на стабильность иммуноглобулина при различных температурах (18 и 36°C), используя результаты ранее опубликованной работы [4].

Методика исследования. Исследовали IgG лошади, выделенный по методу, использованному в работе [5]. Спектры поглощения снимали на спектрофотометре «Пай Уникам СП-8000» в термостатированной кювете. Концентрации KCl и NaCl в опытах составляли от 0 до 15—20% соли. Все измерения проводились в буферных растворах с молярностью от 0,05 до 0,2 М. Молярность буфера подбиралась таким образом, чтобы после добавления соли до требуемой концентрации pH белково-солевого раствора не отличался значительно от начальной величины pH.

Результаты и их обсуждение. На рис. 1 приведена зависимость изменения оптической плотности иммуноглобулина G в относительных единицах от концентрации KCl в растворе. Как видим, изменение оптической плотности растворов с увеличением концентрации хлористого калия носит довольно сложный характер.

Считают, что в концентрациях менее 1 М соли оказывают воздействие на доступные растворителю ароматические остатки белка, вызывая поэтому определенные изменения в спектрах поглощения [2]. Наблюдавшийся нами немонотонный характер изменения оптической плотности при концентрациях 0—6% KCl свидетельствовал, однако, о том, что хлористый калий оказывает воздействие не только на доступные растворителю ароматические остатки белка, но, возможно, изменяет и конформационное состояние IgG. При концентрациях KCl от 4—6 до

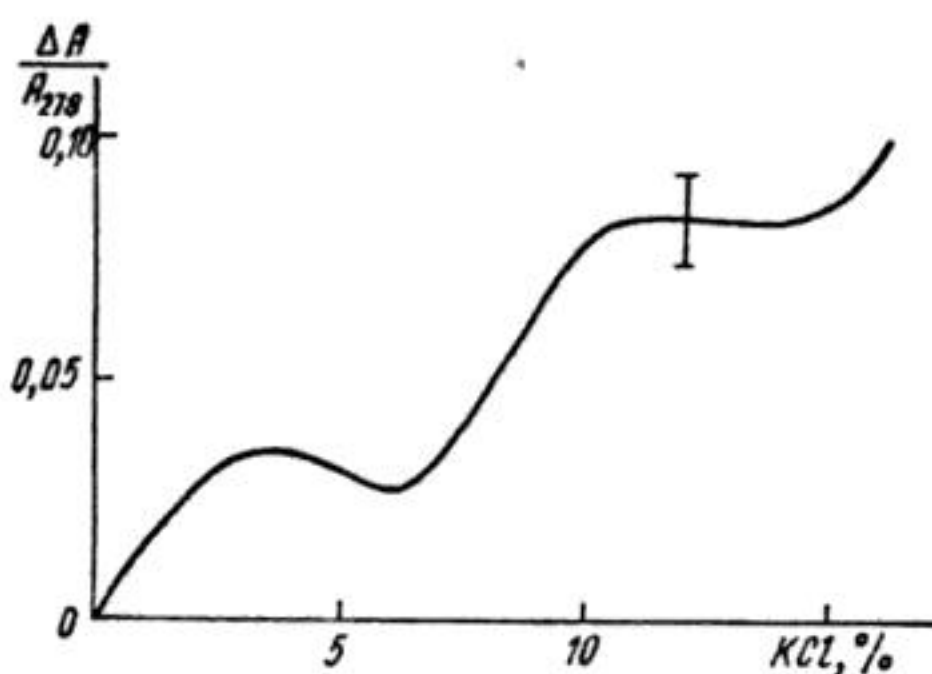


Рис. 1. Изменение оптической плотности иммуноглобулина в зависимости от концентрации KCl в растворе (трис-HCl, pH 8,8, $T=36^{\circ}\text{C}$).

Изучение спектров поглощения белка в растворах KCl при pH 8,8 показало наличие изменений оптической плотности белка с $U_{1/2}=7\pm 1\%$ и $\Delta U=4-5\%$. Необратимые изменения наступали при концентрации соли в растворе более 14—15%.

На рис. 2 приведена зависимость изменения оптической плотности иммуноглобулина G лошади от концентрации NaCl. При pH 8,7 $U_{1/2}=2,5\pm 0,8\%$, $\Delta U\approx 2-5\%$. При концентрации NaCl в растворе, превышающей 12—15% (pH 8,7), наступали необратимые изменения белка, в результате которых иммуноглобулин G становился непригодным для спектрофотометрического исследования из-за помутнения растворов.

Как видно из приведенных данных, спектральные характеристики иммуноглобулина зависят от используемой соли. В растворах KCl иммуноглобулин конформационно довольно устойчив к изменению pH в интервале 6—9. Результаты данной статьи свидетельствуют о том, что на стабильность белка в растворах KCl при 36°C изменение pH влияет незначительно, так как интервал концентраций солей, при которых происходят изменения спектральных характеристик белка, остается почти постоянным независимо от pH. Такой же результат был получен нами и для растворов IgG в KCl при 18°C [4]. В то же время в растворах NaCl величина pH существенна [4].

При изменении температуры (18 и 36°C) стабильность белка различна по отношению к действию гиперконцентраций KCl и NaCl. С по-

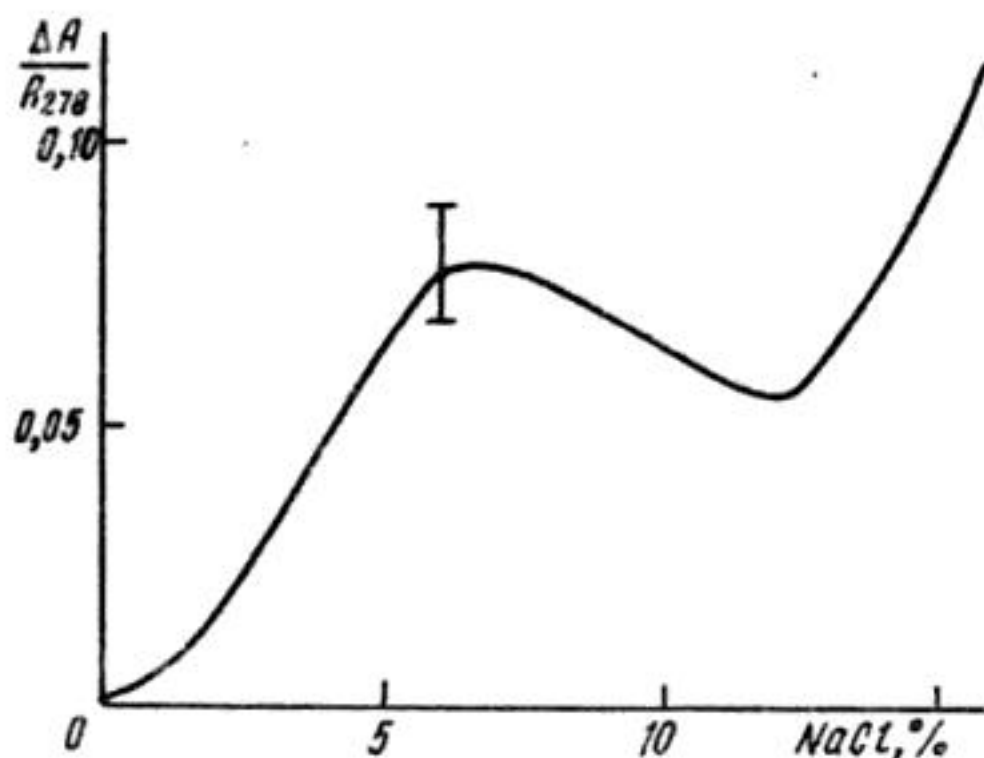


Рис. 2. Изменение оптической плотности (в отн. ед.) иммуноглобулина в зависимости от концентрации NaCl в растворе (трис-HCl, pH 8,7, $T=36^{\circ}\text{C}$).

вышением температуры белок становится менее устойчивым к действию повышенных концентраций KCl (pH 6—9), так как конформационные изменения белка наступают при меньших концентрациях соли. В гиперконцентрированных растворах NaCl при $\text{pH} > 7,5$ на конформационную устойчивость белка изменение температуры влияет мало. Таким образом, установлены значения концентраций KCl и NaCl, при которых происходят конформационные изменения IgG при 36°C . На стабильность белка в растворах KCl значительное влия-

10—14% наблюдалось довольно значительное изменение оптической плотности белка, что позволило сделать предположение о наличии конформационного перехода в иммуноглобулине лошади в данном интервале концентраций. Концентрация хлористого калия в точке полуперехода ($U_{1/2}$) составила $8\pm 1\%$, ширина перехода (ΔU) — приблизительно 6% соли (pH растворов был ниже 7,4). Необратимые структурные изменения при pH ниже 7,4 наблюдались при концентрации KCl более 15—16%.

яние оказывает изменение температуры. В растворах же NaCl изменение pH влияет на стабильность белка более значительно, чем повышение температуры от 18 до 36°C.

1. *Иванов Л. В., Моисеев В. А., Гаврилова И. И.* Исследование влияния гиперконцентрации солей на четвертичную структуру Hb методом спин-меток. — В кн.: Всесоюз. конф. по спектроскопии биополимеров. Тез. докл. Харьков, 1977, с. 82—83.
2. *Коган Г. А.* Применение метода дифференциальной спектроскопии для изучения структуры белков. — Итоги науки и техники. Сер. Молекуляр. биология, 1973, 3, с. 127—215.
3. *Моисеев В. А., Иванов Л. В., Гаврилова И. И.* Исследование действия криопротекторов и гиперконцентраций солей на структуру сывороточных белков методом спиновых меток. — В кн.: Всесоюз. конф. по спектроскопии биополимеров. Тез. докл. Харьков, 1977, с. 83—84.
4. *Моисеев В. А., Морозова Т. Ф., Микулинский Ю. Е.* Влияние гиперконцентраций солей на конформационное состояние иммуноглобулина лошади. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 51—52.
5. *Baumstark J. S., Laffin R. J., Bardawil W. A.* A preparative method for separation of 7S-gamma globulin from human plasma. — Arch. Biochem. and Bioph., 1964, 108, N 3, p. 514—517.
6. *Zav'yalov V. P., Tetin S. Yu., Abramov V. M., Troitsky G. V.* Effect of salt concentration on immunoglobulin G-structure. — Biochim. et biophys. acta, 1978, 533, N 2, p. 496—503.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
22.08.80

II. КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

УДК 57.043

А. Г. Федотенков

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПРОБЛЕМ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ КОСТНОГО МОЗГА

К настоящему времени решены многие вопросы проблемы криоконсервирования костного мозга: разработаны методы долгосрочного хранения его при низких и ультранизких температурах, создана аппаратура для замораживания и длительного хранения миелокариоцитов, организованы банки костного мозга, в эксперименте и клинике показана лечебная эффективность костного мозга. Однако существующие методы криоконсервирования костного мозга несовершенны — они сложны и обеспечивают при замораживании больших объемов костного мозга сохранение 50—65% родоначальных гемопоэтических клеток.

Успехи в лечении больных апластическими анемиями и лейкозами с применением иммунодепрессивной терапии и трансплантации гистосовместимого аллогенного костного мозга требуют разработки совершенных методов консервирования костного мозга.

По нашему мнению, основные исследования должны быть направлены на поиски более доступных для практики методов долгосрочного криоконсервирования, обеспечивающих сохранение 85—90% родоначальных гемопоэтических клеток и одновременно снижающих иммунологическую активность миелокариоцитов.

Это может быть достигнуто, с одной стороны, изысканием новых криозащитных растворов, а с другой — созданием оптимальных режимов замораживания, оттаивания и хранения костного мозга.

Дальнейшие успехи в разработке высокоэффективных методов криоконсервирования в значительной степени будут зависеть и от развития теоретических вопросов, раскрывающих механизмы криоповреждения и криозащиты клеток при замораживании и оттаивании, изыскания условий, предотвращающих криоповреждения.

В Центральном институте гематологии и переливания крови МЗ СССР за последние годы в плане дальнейшей разработки проблемы криоконсервирования костного мозга получен ряд важных научных данных.

Глицерина	6,6 мл
ПВП (поливинилпирролидона низкомолекулярного	7 г
ЭДТА Na ₂	0,1 г
Раствор желатины 10%-ный для инъекций	20 мл
Гемодеза	до 100 мл
Раствора едкого натра	до pH 7,0—7,2

Разработан метод замораживания костного мозга с новым ограждающим раствором Гемжел [6], не требующий отмывания размороженных миелокариоцитов перед трансплантацией. Криофилактические вещества (глицерин в конечной концентрации 3,3%, гемодез, желатина, низкомолекулярный ПВП), входящие в ограждающий раствор, вы-

Таблица 1. Морфологическая сохранность миелокариоцитов донорского костного мозга в процессе криоконсервирования с раствором Гемжел

Количество доноров костного мозга	Длительность криоконсервирования	Абсолютное количество морфологически сохранных клеток в 1 мл $\times 10^6$		Сохранность миелокариоцитов, %
		перед замораживанием $M \pm m$	после криоконсервирования $M \pm m$	
12	1—30 дней	$4,4 \pm 0,1$	$3,6 \pm 0,1$	84,0
4	1 год	$4,1 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,2$	84,1
5	2—3 года	$8,4 \pm 0,8$	$7,2 \pm 0,8$	84,7

пускаются промышленностью и используются в медицинской практике для внутривенного введения. Замораживание костно-мозговой взвеси после отделения эритроцитов осуществляется в стандартных алюминиевых контейнерах по двухэтапной программе: вначале до -9°C со скоростью $1^\circ\text{C}/\text{мин}$, а затем со скоростью $10^\circ\text{C}/\text{мин}$ до -198°C .

В экспериментах с применением метода клонирования кроветворной ткани [8] установлено, что при замораживании костного мозга линейных мышей $(\text{CBA} \times \text{C57Bl}_6)\text{F}_1$ с раствором Гемжел сохраняется в среднем 60% стволовых гемопоэтических клеток, способных к пролиферации и вызреванию в организме облученного реципиента.

В костном мозгу доноров, замороженном с раствором Гемжел, 84,3—4,1% миелокариоцитов остаются морфологически сохранными (табл. 1).

Достоинство ограждающего раствора Гемжел заключается и в том, что после размораживания костный мозг можно хранить при температуре $2-4^\circ$ до 12 ч (табл. 2), при этом сохраняется до 68% стволовых клеток (по сравнению с только что размороженным костным мозгом). Функция стволовых клеток в размороженном костном мозгу меняется незначительно: через 12 ч хранения количество зрелых колоний составляет 70%, а индифферентных — 30 (см. рисунок), т. е. соотношение колоний близко к результатам от введения свежезаготовленного костного мозга.

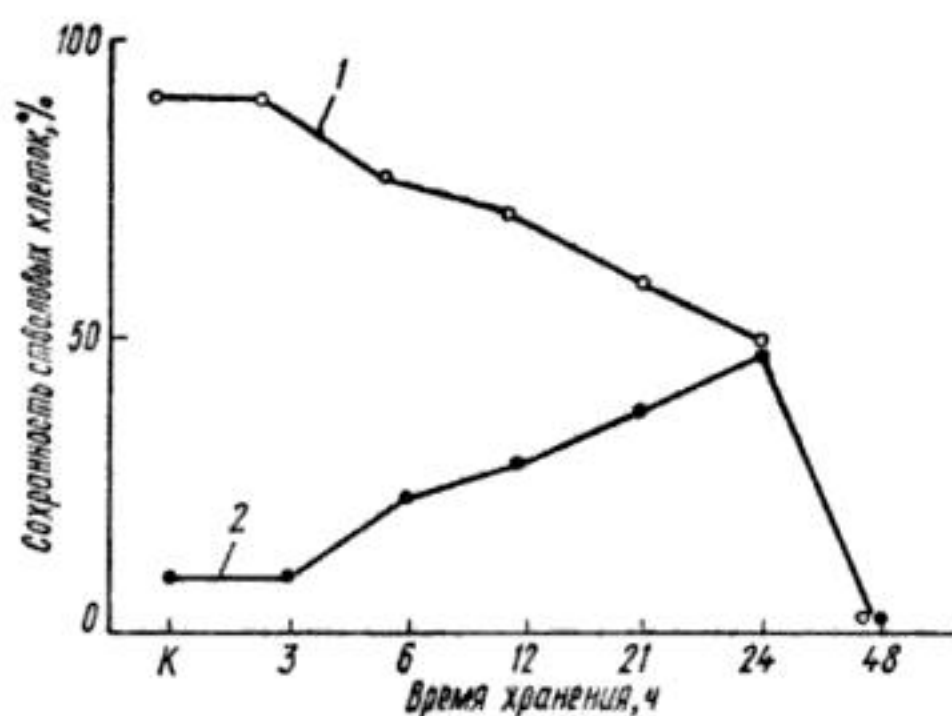
Направление дифференцировки стволовых клеток в эти сроки остается нормальным (соотношение эритроидных и миелоидных клонов 2:1). В настоящее время костный мозг, замороженный с раствором Гемжел, проходит клиническую апробацию.

Необходимо подчеркнуть, что удлинение сроков сохранения размороженного костного мозга до 1—2 дней является крайне актуальной задачей. В этой связи определенное внимание должно быть уделено изучению причин быстрого разрушения клеток размороженного костного мозга. Приобретают большой интерес исследования по изучению проницаемости мембран и ферментативной активности клеток размороженного костного мозга.

Кроме того, необходимо изыскивать условия, которые обеспечивали бы нормализацию пролиферативной активности клеток размороженного

Таблица 2. Количество КОЕ в селезенках смертельно облученных мышей после трансплантации размороженного костного мозга мышей $(\text{CBA} \times \text{C57Bl}_6)\text{F}_1$

Сроки хранения размороженного костного мозга при температуре $2-4^\circ\text{C}$, ч	Количество подопытных животных	Среднее количество колоний в селезенках облученных мышей, $M \pm m$	Сохраненные стволовые клетки в размороженном костном мозгу, %
0	108	$6,0 \pm 0,4$	100
3	40	$5,7 \pm 1,0$	95
6—8	40	$4,2 \pm 0,7$	70
10—12	20	$4,1 \pm 0,7$	68,3
21—24	50	$1,4 \pm 0,8$	23,3
Контроль облучения (без трансплантации)	105	0,3	—



Вызревание колоний размороженного костного мозга:

1 — зрелые; 2 — индифферентные.

ценность костного мозга длительное время. Ранее нами [4, 5] и некоторыми другими авторами [2] установлено, что при многолетнем хранении (8—10 лет) костного мозга в жидком азоте сохраняется 80—90% морфологически неповрежденных миелокариоцитов.

В настоящее время нами проводятся исследования влияния сроков хранения (до 8 лет) на сохранность стволовых гемопоэтических клеток. В литературе таких сведений нет.

Исследования показали, что после года хранения костного мозга в бункере с жидким азотом процент сохраненных стволовых клеток остается почти неизменным (62—61%). Однако через 8 лет хранения сохранность стволовых клеток снижается в среднем на 20% (табл. 3), при этом изменяются их функциональные свойства. Так, при хранении костного мозга в жидком азоте в течение 6 мес количество индифферентных колоний, по нашим данным, составляло 20%, а через год и 8 лет оно изменялось от 30 до 50%. Соотношение эритроидных и миелоидных колоний в костном мозгу при больших сроках хранения, как правило, изменялось в сторону увеличения эритроидных колоний (3:1; 4:1). Полученные данные подтверждают, что костный мозг, сохраняемый в бункерах с жидким азотом, имеет не беспредельные сроки хранения. В настоящее время выясняются причины, оказывающие отрицательное воздействие на стволовые клетки в процессе их длительного хранения. Как показали наши исследования, одной из причин является повышение температуры в костном мозгу (от -196 до $150-160^{\circ}\text{C}$) за счет периодического перекалывания контейнеров из одного бункера в другой.

Актуальным направлением исследований при криоконсервировании аллогенного костного мозга является изыскание методов криоконсервирования, которые «истощали» иммунокомпетентные клетки костного мозга при высокой сохранности стволовых гемопоэтических клеток.

При разработке таких методов криоконсервирования можно ослабить реакцию «трансплантат против хозяина». Если удастся с помощью замораживания снизить иммунологическую активность аллогенного костного мозга при высокой сохранности стволовых гемопоэтиче-

костного мозга. Как известно, после трансплантации замороженного костного мозга пролиферация, дифференцировка и созревание стволовых клеток в организме облученного реципиента наступают на 7—8 дней позднее, чем при введении свежезаготовленного костного мозга. Этот факт не безразличен для больного, получившего массивный курс химио-лучевой терапии.

Важным вопросом проблемы криоконсервирования костного мозга является создание условий криоконсервирования, обеспечивающих биологическую полно-

Таблица 3. Биологическая полноценность костного мозга после длительного хранения в жидком азоте

Срок хранения костного мозга	Морфологическая сохранность миелокариоцитов, %	Колониеобразующая способность клеток костного мозга, %
30 мин	$95,56 \pm 2,12$	$62,0 \pm 4,4$
6 мес	$91,39 \pm 2,91$	$58,7 \pm 2,4$
1 г	$81,91 \pm 3,96$	$61,57 \pm 8,26$
8 л	$90,64 \pm 5,68$	$40,00 \pm 11,61$

ских клеток, то криоконсервированный костный мозг будет иметь при трансплантации преимущество перед свежезаготовленным.

В литературе имеются единичные сообщения о влиянии холода на иммунологические свойства клеток костного мозга. Так Стронг и Селл [7] в эксперименте на смертельно облученных животных установили, что с помощью криоконсервирования возможна избирательная элиминация из костного мозга Т-лимфоцитов, что ведет к повышению эффективности аллогенной трансплантации и уменьшению риска вторичной болезни. Явление, описанное авторами под названием «феномена криогенного истощения иммунокомпетентных клеток», обусловлено различной чувствительностью Т- и В-лимфоцитов к замораживанию, оттаиванию и осмотическому шоку.

Нами влияние замораживания на иммунологические свойства лимфоцитов кроветворной ткани оценивалось по их способности взаимодействовать со стволовыми кроветворными клетками *in vivo*. Это явление получило название феномена инактивации несингенных стволовых клеток [3]. Суть его состоит в том, что при совместной трансплантации летально облученным реципиентам костного мозга генетически различающихся доноров-мышей происходит инактивация стволовых клеток-«мишеней» лимфоцитами более сильной линии — «киллерами». Выражается это уменьшением или исчезновением экзогенных колоний в селезенке реципиентов.

В нашей работе [1] была поставлена цель — изучить влияние замораживания лимфоцитов лимфоузлов и костного мозга, взятых от несингенных доноров, на инактивацию стволовых клеток смешанного трансплантата. Работа проводилась на смертельно облученных животных — реципиентах мышах-гибридах (CBA×C57Bl₆)F₁ первого поколения, которым трансплантировали размороженные лимфоциты лимфоузлов или костный мозг мышей линии CBA («киллеры») в смеси со свежезаготовленным костным мозгом мышей линии C57Bl₆ («мишени»). Замораживание клеток производилось с 15%-ным глицерином со скоростью 1°C/мин до —9°C, затем со скоростью 10°C до —196°C. Размороженные клетки отмывали от глицерина глюкозно-сахарозным раствором. Морфологическую сохранность миелокариоцитов и лимфоцитов определяли с помощью суправитальной окраски 1%-ным раствором эозина, которая после оттаивания составляла 90—95%. Сохранность стволовых гемопоэтических клеток определяли с помощью метода Тилла и Маккуллоха [8]. Результаты опыта представлены в табл. 4, откуда видно, что при введении смертельно облученным реципиентам свежего костного мозга мышей линии C57Bl₆ в смеси со свежими клетками лимфоцитов мышей CBA в дозе 5×10⁵ клеток получена 100%-ная инактивация стволовых клеток костного мозга мышей C57Bl₆ лимфоцитами CBA. Получены данные, аналогичные данным авторов «феномена инактивации» [3]. Совершенно иная картина получена при введении реципиенту смеси клеток свежего костного мозга мышей линии C57Bl₆ с клетками замороженных лимфоцитов мышей CBA. При дозе

Таблица 4. Влияние замораживания на взаимодействие лимфоцитов кроветворных тканей со стволовыми клетками

Количество введенных клеток мышей CBA в смеси с 5·10 ⁵ клеток костного мозга мышей C57Bl ₆	Соотношение взаимодействующих клеток	Индекс инактивации при введении клеточной смеси с клетками CBA, %	
		интактными	замороженными
Клетки лимфатических узлов			
5·10 ⁵	CBA 1:1 C57Bl ₆	100	9,5
1·10 ⁶	2:1	100	24,1
2·10 ⁶	4:1	—	61,7
4·10 ⁶	8:1	—	99,4
Клетки костного мозга			
2·10 ⁵	1:1	46	3,0
2·10 ⁶	4:1	—	21,0

замороженных клеток СВА, равной 5×10^5 , инактивация стволовых клеток мало выражена — 9,5%. И только при увеличении количества замороженных клеток лимфатических узлов мышей СВА в восемь раз (4×10^6) получен индекс инактивации, почти равный индексу от введения свежих лимфоцитов СВА в дозе 5×10^5 .

Из табл. 4 также видно, что при введении смертельно облученным мышам линии (СВА $\times$ С57В1₆ смеси свежего костного мозга мышей линии С57В1₆ в дозе 5×10^5 клеток и замороженного костного мозга мышей линии СВА в дозе 5×10^5 инактивация КОЕ наблюдается только в 3%, в то время как с применением свежезаготовленного костного мозга — в 46% случаев.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при трансплантации животному-реципиенту аллогенного костного мозга, криоконсервированного с 15%-ным глицерином, значительно снижается способность несингенных стволовых клеток к инактивации.

Как известно, в клинике часто бывает необходимость применять костный мозг от генетически различающихся доноров. Если исходить из полученных данных, то не исключено, что трансплантация консервированного костного мозга в клинике окажется более эффективной, чем трансплантация свежего аллогенного костного мозга. Очевидно также, что при трансплантации криоконсервированного костного мозга с 15%-ным глицерином может быть пересмотрен факт невозможности переливания свежего костного мозга от нескольких доноров.

Патогенез торможения активности лимфоцитов под влиянием криоконсервирования в настоящее время не ясен и является предметом наших дальнейших исследований.

Актуальное направление проблемы криоконсервирования костного мозга — разработка ряда научно-организационных вопросов по созданию современных крупных банков типированного аллогенного костного мозга с учетом достижений иммунологии, криоконсервирования, создания криогенной аппаратуры и электронно-вычислительной техники.

В настоящее время необходимо разработать научно обоснованные рекомендации по конструированию более эффективной криобиологической аппаратуры (программных замораживателей и размораживателей, бункеров для длительного хранения). Решение указанных выше задач будет способствовать более широкому применению в клинической практике метода миелотерапии для лечения больных с депрессиями кроветворения, в частности апластическими анемиями и лейкозами.

1. Данилова Л. С., Федотенков А. Г., Игнашева Л. П. и др. Влияние криоконсервирования на гомотрансплантационную активность лимфоцитов. — Пробл. гематологии, 1978, № 12, с. 21—25.
2. Лаврик С. С. Банк долгосрочного хранения костного мозга. — В кн.: Новое в гематологии и трансфузиологии. Ташкент, МЗ УзССР, 1975, с. 40—41.
3. Петров Р. В., Сеславина Л. С. Инактивация «стволовых» клеток при контакте генетически несовместимых клеточных взвесей из миелондных тканей. — Докл. АН СССР, 1967, 176, № 5, с. 1170—1173.
4. Федотенков А. Г. Консервирование костного мозга для клинических целей: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1967. — 31 с.
5. Федотенков А. Г., Шишкина И. Д., Данилова Л. А. Перспективы усовершенствования метода долгосрочного консервирования костного мозга. — В кн.: Материалы Всесоюз. симпозиума по вопросам консервирования, культивирования и типирования костного мозга. М., МЗ СССР, 1971, с. 9—15.
6. Шишкина И. Д., Федотенков А. Г., Данилова Л. А., Тимакова Л. А. Информационное письмо о применении ограждающего раствора Гемжел при низкотемпературной консервации. — М., 1978. — 8 с.
7. Strong D., Ahmed A., Sell K. Differential susceptibility of murine T and B lymphocytes to frozen-thaw and hypotonic shock. — Cryobiology, 1974, 2, N 1, p. 127—138.
8. Till J. E., McCulloch E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. — Radiat. Res., 1961, 14, N 12, p. 213—233.

Центральный институт гематологии
и переливания крови МЗ СССР

Поступила в редколлегию
09.09.80

А. А. Цуцаева, Н. Н. Попов

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ИММУНОРЕАКТИВНОСТИ ОБЛУЧЕННЫХ В СРЕДНЕЛЕТАЛЬНОЙ ДОЗЕ ЖИВОТНЫХ ПОД ВЛИЯНИЕМ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ЛИМФОЦИТОВ

В данной статье изучалась эффективность применения различных типов криоконсервированных лимфоидных клеток для восстановления гуморальных и клеточных иммунных реакций у облученных животных.

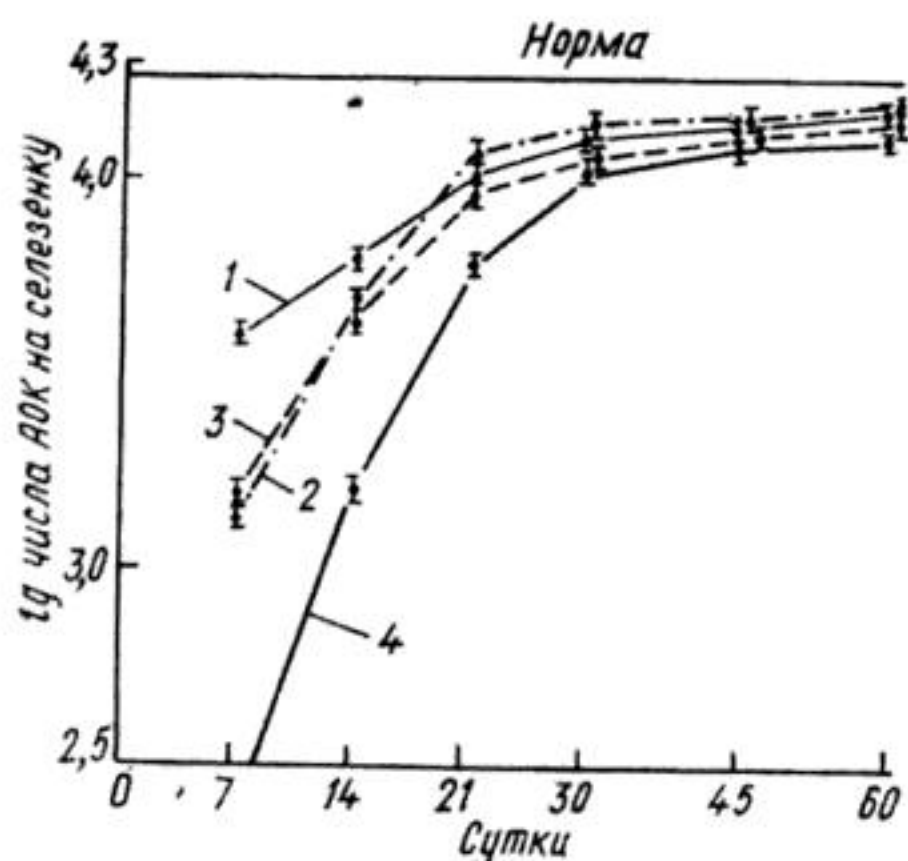
Методика исследования. Эксперименты проводились на мышах-гибридах (CBA×C57Bl)F₁, которых облучали на установке РУМ-11 в дозе 650 Р (ЛД 50/30) при мощности дозы 90 Р/мин. Животным через шесть—восемь часов после облучения трансплантировали сингенные криоконсервированные клетки лимфатических узлов (первая группа), спленоциты (вторая группа), тимоциты (третья группа) в дозах 3×10^7 . Контролем служили облученные животные.

О влиянии трансплантации криоконсервированных лимфоцитов на восстановление иммунных реакций организма судили по уровню накопления в различные сроки после облучения антителообразующих клеток (АОК) в ответ на введение эритроцитов барана и по скорости отторжения пересаженных аллогенных лоскутов кожи (мышей линии А). Введение эритроцитов барана и трансплантацию кожи облученным животным производили на 1, 7, 14, 21, 30, 45, 60-е пострадиационные сутки. Количество антителообразующих клеток определяли в селезенке по Ерне на пятые сутки с момента иммунизации [3]. Лоскуты кожи пересаживали по методу Биллинхам, Медавара [2].

Клетки лимфатических узлов, селезенки, тимуса получали путем гомогенизации органов в *трис*-НСI-буфере (рН 7,1). Лимфоидные клетки селезенки в суспензии концентрировали по описанному методу [1].

Замораживание лимфоидных клеток проводили под защитой ПЭО-400 по следующей программе: I этап — 1°C/мин до —28°C с 30-минутной экспозицией клеток при этой температуре; II этап — 400°C/мин до —196°C. Деконсервировали при температуре 41°C.

Результаты и обсуждение. В экспериментах было установлено, что трансплантация облученным животным криоконсервированных тимоцитов, спленоцитов и клеток лимфатических узлов приводит к значительному повышению гуморальных и клеточных иммунных реакций организма, способствует их быстрому восстановлению. Наибольшее повышение антителогенеза происходило после введения спленоцитов; введение тимоцитов и клеток лимфатических узлов оказывало несколько меньшее влияние на этот процесс. Особенно значительно повышался антителогенез в первые две недели после облучения. В этот период после введения спленоцитов в селезенке животных в ответ на иммунизацию эритроцитами барана генерировалось от 4 до 18 раз больше антителообразующих клеток, чем у контрольных животных; при введении тимоцитов и клеток лимфатических узлов иммунный ответ повышался от 3 до 7 раз (см. рисунок). По мере увеличения периода после облучения различия в антителообразующей активности животных, получивших лимфоидные клетки, и контрольных животных сглаживались. К 60-м суткам количество антителообразующих клеток у животных, которым трансплантировали криоконсервированные спленоциты, составляло 85%; при трансплантации криоконсервированных тимоцитов — 89%, криоконсервированных клеток лимфатических узлов — 79%, у контрольных животных количество антителообразующих клеток равнялось 73%.



Восстановление антителообразующей активности облученных в среднелетальной дозе животных при трансплантации криоконсервированных клеток лимфатических узлов (3), спленоцитов (1), тимоцитов (2) (4 — контроль).

большой степени повышение трансплантационных реакций происходило при введении клеток лимфатических узлов. Аллотрансплантаты кожи, пересаженные на 7-е и 14-е сут таким животным, отторгались в более короткие сроки, чем животными, получившими спленоциты и тимоциты. С 21 сут эти различия нивелировались. Восстановление трансплантационной активности при введении криоконсервированных клеток лимфатических узлов, спленоцитов, тимоцитов происходило к 30-м сут, у контрольных животных — к 45 сут. Скорость отторжения аллотрансплантатов кожи, пересаженных в различные сроки после облучения, живот-

Значительное повышение антителообразующей активности в первые две недели после облучения при трансплантации спленоцитов, очевидно, обусловлено внесением в организм наряду с Т-клетками зрелых В-клеток и их предшественников; более интенсивный рост антителогенеза под влиянием тимоцитов, чем спленоцитов и клеток лимфатических узлов, по-видимому, объясняется их большей активностью в стимуляции лимфопоэза.

Скорость отторжения чужеродных лоскутов кожи при введении криоконсервированных клеток лимфатических узлов, спленоцитов, тимоцитов повышалась с 7-х пострадиационных суток и во все последующие сроки изучения оставалась достоверно выше таковой у контрольных животных. В несколько

Скорость отторжения аллотрансплантатов кожи облученными животными*, получившими криоконсервированные лимфоциты, дни

Трансплантируемые клетки**	Трансплантация кожи с момента облучения, дни				
	7	14	21	30	45
Клетки лимфоузлов	22,1 ± 0,7	16,5 ± 0,6	14,1 ± 0,5	12,5 ± 0,8	—
Спленоциты	24,6 ± 0,8	18,4 ± 0,6	14,8 ± 0,4	12,0 ± 0,7	—
Тимоциты	24,9 ± 0,8	19,1 ± 0,7	14,2 ± 0,8	12,2 ± 0,9	—
Контроль (клетки не вводили)	25***	25***	21,7 ± 0,4	14,4 ± 0,4	11,9 ± 0,5

* Скорость отторжения аллотрансплантатов кожи необлученными животными составляла 11,2 ± 0,4 дня.

** Клетки трансплантировали в первые 24 ч после облучения.

*** Срок наблюдения за трансплантатами кожи составлял 25 дней.

ными, получившими криоконсервированные лимфоидные клетки, приведена в таблице.

Полученные данные свидетельствуют о том, что криоконсервированные лимфоидные клетки могут с успехом применяться для повышения иммунореактивности облученных животных. В экспериментах установлено, что наибольшую активность в восстановлении реакций гуморального иммунитета выявляют спленоциты и тимоциты, реакций клеточного иммунитета — клетки лимфатических узлов.

1. Пушкарь Н. С., Полякова А. И., Цуцаева А. А., Иткин Ю. А. Низкотемпературная консервация лимфоцитов. — Пробл. гематологии и переливания крови, 1974, № 7, с. 23—26.

2. Billingham R. E., Medawar P. B. The technique of free skin grafting in mammals. — J. Exp. Biol., 1951, 28, N 3, p. 385—402.
3. Jerne N. K., Nordin A. A. Plaque-formation in agar by single antibody producing cells. — Science, 1963, 140, p. 405—406.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
29.09.80

УДК 57.043.48.047:616.419—089.843:612.119

О. А. Дроздова, А. А. Цуцаева,
Н. Н. Попов, Т. Н. Воскобойникова

ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИИ НА СВОЙСТВА КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ КЛЕТОК ДОНОРСКОГО И ТРУПНОГО КОСТНОГО МОЗГА

Применение криоконсервированного костного мозга в клинической практике предъявляет высокие требования к качеству трансплантируемого материала. Предпосылкой проведения настоящих исследований послужили данные, свидетельствующие о том, что в процессе замораживания — оттаивания наблюдаются повреждение и гибель клеток, перераспределение соотношения отдельных клеточных элементов, а также снижается функциональная активность клеток. В данной статье мы изучали эффективность и целесообразность применения ультрафильтрации с целью улучшения свойств криоконсервированного трупного и донорского костного мозга.

Методика исследования. Объектом исследования служил трупный и донорский костный мозг 675 мышей линии СВА. Трупный костный мозг получали от мышей через 6 и 12 ч после забоя (тушки животных хранили на холоду при $+4^{\circ}\text{C}$). Костный мозг, взятый сразу после забоя животных, принимали за донорский материал. Костный мозг трупный и донорский вымывали раствором ЦОЛИПК-3 из бедренных костей. Замораживание клеток проводили под защитой ПЭО-400 по ранее разработанной программе [1]. Оттаивание костного мозга проводили на водяной бане при 41°C . Размороженные клетки костного мозга смешивали в отношении 1 : 1 с раствором ЦОЛИПК-3, при содержании 30% нативной сингенной сыворотки, после чего пропускали последовательно через фильтры с диаметром пор 40 μ (фракция 1), 12 μ (фракция 2) и 5 μ (фракция 3).

Оценку качества криоконсервированного трупного и донорского костного мозга до и после ультрафильтрации проводили по количеству ядерных и жизнеспособных клеток в образцах методом суправитального окрашивания 0,2%-ным раствором трипановой сини, морфологической сохранности клеточного состава, изученного в мазках, окрашенных азур-2-эозином, электронной и растровой микроскопии, а также колониеобразующей активности по методу Тилла и Маккуллоха [2]. Размеры клеток (диаметры) до и после фильтрации измерялись в мазках с помощью окуляр-микрометра.

Результаты и обсуждение. Результаты исследования показали, что фильтрация криоконсервированных клеток трупного и донорского костного мозга через фильтры с величиной пор 40 μ не вызывала снижения количества ядерных клеток и их жизнеспособности. Фильтрация клеток через поры диаметром 12 μ и 5 μ снижала количество клеток в изучаемых пробах соответственно в 1,5—1,7 раза и 5—6 раз. При этом содержание жизнеспособных клеток достоверно не изменялось (табл. 1).

При изучении мазков клеток в световом микроскопе было обнаружено, что после фильтрации трупного и донорского костного мозга через поры диаметром 12 μ происходит изменение количественного со-

Таблица 1. Жизнеспособность и число ядерных клеток в суспензии криоконсервированного костного мозга до и после ультрафильтрации ($n=10$)

Фракция	Жизнеспособных клеток, %			Число ядерных клеток в 1 мл, абсолютные единицы		
	донорский костный мозг	трупный костный мозг **		донорский костный мозг	трупный костный мозг**	
		6 ч	12 ч		6 ч	12 ч
	$X \pm Sx$	$X \pm Sx$	$X \pm Sx$	$X \pm Sx(\times 10^7)$	$X \pm Sx(\times 10^7)$	$X \pm Sx(\times 10^7)$
Исходная суспензия клеток *	$88,2 \pm 4,2$	$83,7 \pm 4,0$	$77,3 \pm 3,8$	$1,00 \pm 0,06$	$1,00 \pm 0,07$	$1,00 \pm 0,08$
1,40 μ	$87,2 \pm 4,1$	$81,9 \pm 3,8$	$76,7 \pm 3,6$	$1,00 \pm 0,07$	$1,00 \pm 0,08$	$1,00 \pm 0,07$
2,12 μ	$84,7 \pm 3,9$	$82,5 \pm 4,1$	$73,2 \pm 4,0$	$0,66 \pm 0,03$	$0,70 \pm 0,04$	$0,61 \pm 0,03$
3,5 μ	$85,3 \pm 4,2$	$83,1 \pm 3,7$	$71,9 \pm 4,1$	$0,21 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,02$	$0,20 \pm 0,01$

* Здесь и в табл. 2, 3 исходная суспензия клеток — криоконсервированный костный мозг до ультрафильтрации.

** Трупный костный мозг.

отношения клеточных элементов различного диаметра: увеличивается количество клеток малых размеров (6—12 μ) и снижается количество клеток больших размеров (13—20 μ) (табл. 2). Фильтрация клеток через поры диаметром 5 μ значительно увеличивает количество клеток размером 5 μ и снижает процент клеток диаметром 6—8 μ . Фильтрация клеток через поры 40 μ не изменяет состав трупного и донорского костного мозга. При этом происходит лишь удаление конгломератов разрушенных клеток, образовавшихся в процессе криоконсервирования.

Клеточный состав криоконсервированного трупного и донорского костного мозга после фильтрации через поры диаметром 40 μ был таким же, как и исходная клеточная суспензия; после фильтрации через поры диаметром 12 μ возрастало число лимфоцитов, нормоцитов и снижалось число бластов, ретикулярных клеток; после фильтрации через поры диаметром 5 μ суспензия клеток была в основном представлена

Таблица 2. Соотношение клеток (в %) различных размеров в костном мозгу до и после ультрафильтрации ($n=10$)

Фракция	Диаметр клеток, μ											
	донорский костный мозг				трупный мозг							
					6 ч				12 ч			
	5	6—8	9—12	13—20	5	6—8	9—12	13—20	5	6—8	9—12	13—20
Исходная суспензия клеток *	2,0	39,5	36,7	13,9	1,5	38,3	40,4	12,6	1,7	43,3	38,1	9,9
1,40 μ	2,1	41,2	37,4	12,7	1,7	39,7	41,4	10,9	1,6	42,6	42,3	9,2
2,12 μ	2,9	56,7	38,3	2,1	3,7	57,2	36,9	2,2	3,8	57,1	37,2	1,9
3,5 μ	72,9	27,1	—	—	79,4	20,6	—	—	75,6	24,4	—	—

лимфоцитами, которые в среднем составляли 25—30%, остальные — были голые ядра клеток.

В этой фракции был значительный процент клеток с измененной формой ядра, и клеток, ядро которых либо вытягивалось, либо имело перетяжку, расположенную в центре или асимметрично. У части клеток отмечался кариорексис, в результате чего в препаратах на фоне голубой цитоплазмы отмечалось вкрапление ядерного вещества фиолетово-

Таблица 3. Количество экзоколоний в селезенке облученных реципиентов на двенадцатые сутки после трансплантации криоконсервированных нефракционированных и фракционированных клеток трупного и донорского костного мозга ($n=10$)

Фракция	Донорский костный мозг	Трупный костный мозг	
	$X \pm Sx$	6 ч	12 ч
		$X \pm Sx$	$X \pm Sx$
Исходная суспензия клеток	$14,8 \pm 0,8$	$14,1 \pm 0,7$	$11,2 \pm 0,5$
1,40 μ	$13,2 \pm 1,1$	$12,9 \pm 0,8$	$10,1 \pm 0,4$
2,12 μ	$21,7 \pm 0,9$	$20,4 \pm 0,9$	$17,3 \pm 0,8$
3,5 μ	$3,8 \pm 0,4$	$2,7 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,4$

красного цвета, при этом само ядро контурировано нечетко. Отмечались голубые ядра клеток. Наблюдавшиеся изменения в ряде случаев также имели место в клетках фильтрата с порами диаметром 12 μ , однако были выражены в незначительной степени.

Электронно-микроскопическое изучение показало, что клетки фильтрата через поры диаметром 12 μ представлены в основном двумя типами, имеющими размеры 6—10 μ : одни клетки имели большое ядро с хаотично расположенным хроматином в виде мелких, грубых осмифильных глыбок, узким ободком цитоплазмы, в которой отмечались единичные митохондрии и рибосомы. Вторая группа клеток характеризовалась равномерно расположенным вдоль ядерной мембраны хроматином и в виде единичных скоплений средних размеров в центре ядра; в этих клетках определялись ядрышки. Относительная площадь цитоплазмы клеток этой группы была больше, чем клеток первой группы. Среди этих клеток также встречались единичные гранулоциты, клетки эритроидного и миелоидного ряда, имевшие характерную для них ультраструктурную организацию.

У большинства клеток этой фракции не отмечалось видимых изменений после криоконсервирования. Изменения встречались лишь у части клеток после криоконсервирования, которые заключались в образовании в цитоплазме полостей, деформации и нарушения целостности ядерной и цитоплазматической мембран, расширении перинуклеарной зоны.

В растровом микроскопе были клетки круглой формы, выпуклые и больших размеров со слегка складчатой цитоплазмой.

При введении клеток фракции 2 летально облученным мышам (850 P) линии (CBA $\times$ C₅₇Bl₆)F₁ было обнаружено достоверно большее количество экзогенных селезеночных колоний, чем у животных, которым пересаживали нефракционированный деконсервированный костный мозг ($p < 0,05$) (табл. 3). При этом колониеобразующая активность клеток костного мозга после фильтрации через поры диаметром 40 μ не отличалась от таковой криоконсервированных клеток в исходной суспензии ($p > 0,05$).

Количество колониеобразующих единиц у клеток фракции 3 было более низким, чем у клеток исходной криоконсервированной суспензии.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что с помощью метода последовательной ультрафильтрации можно значительно повысить качество криоконсервированного костного мозга, обогатив его колониеобразующими единицами.

Наряду с этим приведенные данные показывают, что количество колоний, формируемых при введении фракции 2 двенадцатичасового

трупного костного мозга, достоверно было больше, чем при трансплантации нефракционированного донорского костного мозга, что особенно важно при его клиническом использовании, так как известно, что лечебные свойства костномозгового трансплантата определяются его способностью формировать гемопоэтические колонии и скоростью этого процесса.

1. Пушкарь Н. С., Доценко Б. М., Иткин Ю. А., Щелокова А. В. Глубокое охлаждение как метод консервирования и длительного хранения костного мозга. — Клин. хирургия, 1967, № 12, с. 52—56.
2. Till J. E., McCulloch E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. — Rad. Res., 1961, 14, N 12, p. 213—233.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
08.09.80

УДК 57.043,611.0,18,46:615,014,4:536,48

Э. И. Обозная, В. И. Вишневский, Б. А. Скорняков,
Л. К. Стусь, Э. П. Обозный

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА

В настоящее время накоплено достаточно фактов, свидетельствующих о стимулирующем действии постоянного магнитного поля (ПМП) на различные обменные процессы, происходящие в клетках [1, 5]. Известно также повреждающее действие низких температур на жизненно важные функции клеток, в первую очередь на состояние клеточных мембран и активность ферментов [2, 6, 9, 10].

Предполагаем, что применение ПМП при замораживании биологических объектов может оказать влияние на этот процесс.

Поэтому цель настоящей статьи — изучение действия магнитного поля на внутриклеточный обмен лейкоцитов при низкотемпературном консервировании.

Методика исследования. Исследовали десять образцов лейкоконцентрата крови доноров. Каждый образец исследовали шесть раз: в исходном состоянии (взвесь ядерных клеток в растворе ЦОЛИПК-76, 1:4); после добавления 30%-ного водного раствора полиэтиленоксида с молекулярной массой 400 (ПЭО-400) в соотношении 1:1 к лейкоконцентрату крови и последующей тридцатиминутной эквilibрации в магнитном поле напряженностью Н-2000 Э; после замораживания до -196°C погружением в жидкий азот под защитой ПЭО-400; после замораживания под защитой ПЭО-400 в магнитном поле и после замораживания под защитой ПЭО-400 в ПМП с предварительной эквilibрацией в ПМП.

Цитохимически исследованы активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) по Нахлас и др. [6], цитохромоксидазы (ЦХО) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) по Берстону [3], а также содержание реакционно-способных SH-групп по Барнетту и Зелигману [13]. Выраженность цитохимических реакций оценивали путем вычисления среднего гистохимического коэффициента (СГК) по Астальди и Верга [12].

Статистическую оценку данных производили путем вычисления средней арифметической $\bar{x}$, ошибки средней $\delta\bar{x}$ и коэффициента вариации V [11].

Результаты исследований. Установлено, что в исходных лейкоцитах активность СДГ составляет $1,43 \pm 0,08$ (см. таблицу). После экс-

Средние показатели активности СДГ, ЦХО, Г-6-ФДГ и содержания SH-групп в лейкоцитах крови доноров до и после воздействия ПМП и низких температур

Вариант опыта	Статистические параметры	СДГ	ЦХО	Г-6-ФДГ	SH-группы
Исходные лейкоциты	$\bar{x} \pm \delta \bar{x}$ V	$1,43 \pm 0,08$ 5,59	$1,67 \pm 0,04$ 2,57	$1,09 \pm 0,03$ 2,70	$1,20 \pm 0,05$ 4,20
Экспозиция с ПЭО-400	$\bar{x} \pm \delta \bar{x}$ p V	$1,31 \pm 0,05$ >0,05 4,1	$1,00 \pm 0,01$ <0,01 1,0	$0,96 \pm 0,21$ >0,05 2,1	$1,15 \pm 0,11$ >0,05 9,5
Экспозиция с ПЭО-400 в ПМП 30 мин	$\bar{x} \pm \delta \bar{x}$ p V	$1,26 \pm 0,09$ >0,05 7,3	$1,60 \pm 0,07$ >0,05 4,4	$0,96 \pm 0,05$ >0,05 5,5	$1,21 \pm 0,11$ >0,05 8,3
После замораживания с ПЭО-400	$\bar{x} \pm \delta \bar{x}$ p V	$0,96 \pm 0,02$ <0,01 2,08	$1,06 \pm 0,08$ <0,001 7,5	$0,80 \pm 0,05$ <0,01 6,2	$0,70 \pm 0,095$ <0,02 13,6
После замораживания в ПМП с ПЭО-400	$\bar{x} \pm \delta \bar{x}$ p V	$1,00 \pm 0,02$ <0,01 2,4	$1,08 \pm 0,05$ <0,001 4,6	$0,80 \pm 0,08$ <0,05 9,6	$0,84 \pm 0,10$ <0,05 12,5
После замораживания с предварительной тридцатиминутной эквilibрацией в ПМП	$\bar{x} \pm \delta \bar{x}$ p V	$1,04 \pm 0,02$ <0,01 1,90	$1,28 \pm 0,03$ <0,01 5,12	$0,88 \pm 0,04$ <0,05 4,50	$1,10 \pm 0,08$ >0,05 7,20

позиции с ПЭО-400 активность фермента существенно не изменяется. Пребывание лейкоцитов в ПМП не оказало стимулирующего действия на активность СДГ. Однако выявлено незначительное, но достоверное увеличение ферментативной активности при замораживании лейкоцитов в ПМП с предварительной эквilibрацией в ПМП по сравнению с замораживанием их без ПМП.

Активность ЦХО в исходных лейкоцитах составляет $1,67 \pm 0,04$. После экспозиции лейкоцитов с ПЭО-400 активность ЦХО, в отличие от СДГ, достоверно снизилась до $1,00 \pm 0,01$. Отмечено восстановление активности ЦХО в лейкоцитах до исходного уровня при их эквilibрации с криопротектором в ПМП. Эквilibрация и замораживание лейкоцитов в ПМП приводят к достоверному увеличению активности ЦХО по сравнению с замораживанием без ПМП.

В исходных лейкоцитах активность Г-6-ФДГ составляет $1,09 \pm 0,03$. После экспозиции с ПЭО-400 активность Г-6-ФДГ не изменилась. Предварительная экспозиция лейкоцитов в ПМП не оказала стимулирующего влияния на активность Г-6-ФДГ. Во всех вариантах опытов, связанных с замораживанием — отогревом, отмечено достоверное снижение активности Г-6-ФДГ. Пребывание лейкоцитов в ПМП не оказало влияния на активность Г-6-ФДГ.

Содержание SH-групп в исходных лейкоцитах составляет $1,2 \pm 0,05$. После экспозиции с ПЭО-400 содержание SH-групп не отличается от исходного. Также не выявлено существенных отличий содержания SH-групп после тридцатиминутной эквilibрации лейкоцитов в ПМП. Однако содержание SH-групп достоверно увеличивается после замораживания лейкоцитов в ПМП с предварительной эквilibрацией в ПМП по сравнению с замораживанием без ПМП.

Вариационный анализ гетерогенности (разнокачественности) лейкоцитов при исследовании активности СДГ, ЦХО и Г-6-ФДГ не выявил каких-либо качественных изменений клеточной популяции. Коэффициент вариации во всех вариантах опытов находился в пределах физиологических колебаний. Исключение составляют SH-группы, снижение уровня которых в условиях замораживания до -196°C под защитой ПЭО-400 связано с небольшой функциональной вариабельностью лей-

коцитов ($V=13,6\%$). Однако после замораживания их в ПМП с предварительной тридцатиминутной эквilibрацией в ПМП коэффициент вариации находится в пределах физиологических колебаний ($7,2\%$), что свидетельствует об отсутствии функциональных изменений в клетках лейкоконцентрата крови доноров по данным SH-групп.

Обсуждение результатов. Изложенное выше позволяет говорить о влиянии ПМП на цитохимические реакции в условиях эквilibрации лейкоцитов в ПМП и замораживания их до -196°C . При этом ферменты и SH-группы подверглись влиянию ПМП в разной степени. Так активность Г-6-ФДГ, ключевого фермента пентозного цикла, существенно не изменилась при действии ПМП до и в момент замораживания.

В отличие от Г-6-ФДГ, активность ЦХО и СДГ после предварительной экспозиции в ПМП и последующего замораживания в ПМП увеличилась по сравнению с замораживанием без ПМП. Известно, что активность СДГ и ЦХО легко инактивируется при действии низких температур [10, 16]. Способность ПМП восстанавливать активность ЦХО в момент замораживания можно, по-видимому, объяснить непосредственным взаимодействием ПМП с участком электронно-транспортной цепи, как это было показано в работе С. Н. Ивановой [4].

Наиболее четко действие ПМП проявилось на содержании SH-групп. Действие ПМП в момент замораживания восстановило их количество до исходного уровня. Одним из возможных механизмов действия низких температур на клетки, по мнению Левитта [15], может быть их дегидратация во время замораживания, в результате чего белковые молекулы сближаются и образуют дисульфидные (SS) связи. Это приводит к потере каталитических свойств ферментов и уменьшению функциональной активности клеток.

Имеются также работы, в которых в сравнительном аспекте исследованы эффекты замораживания и дегидратации на одних и тех же ферментах (каталаза, пероксидаза) [14]. В связи с тем что уровень потери ферментативной активности при указанных воздействиях одинаковый, сделано заключение о ведущей роли дегидратации в механизме криповреждения молекул ферментов.

Учитывая роль дегидратации клеток при замораживании, целесообразно проследить характер изменения гидратационных и дегидратационных свойств клетки при действии ПМП. В наших ранних работах было показано, что водоудерживающая способность тканей растений при действии ПМП существенно меняется. Так, у корней проростков кукурузы в гидростате при относительной влажности 50% в поле 670 Э заметно повышалась водоудерживающая способность [8]. Установлено также, что ПМП напряженностью 200 Э вызывает снижение гидратационной способности переживающих тканей [7].

Таким образом, ПМП обладает способностью регулировать водный обмен в клетках. Поэтому можно предположить следующее: ПМП снижает дегидратационную способность эритроцитов и лейкоцитов, вызванную действием низких температур и тем самым препятствует конформационным изменениям белковых макромолекул. Это способствует сохранению каталитических свойств ферментов и реакционно-способных SH-групп.

1. Аристархов В. М., Пирузян Л. А., Цыбышев В. П. Физико-химические основы первичных механизмов биологического действия магнитного поля. — В кн.: Реакции биологических систем на магнитные поля. М.: Наука, 1978, с. 6—25.
2. Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П. Молекулярные механизмы криповреждений биомембран. — Итоги науки и техники. Сер. Биофизика, 1978, 9, с. 80—113.
3. Берстон М. Гистохимия ферментов. — М.: Мир, 1965. — 349 с.
4. Иванова С. Н. Об одном из аспектов механизма действия магнитных полей на клетки и органеллы. — В кн.: Клиническое применение магнитных полей. Ижевск, 1977, с. 27—28.

5. Кикут Р. П. Влияние магнитных полей на систему крови и кровообращение. — В кн.: Реакции биологических систем на магнитные поля. М.: Наука, 1978, с. 149—166.
6. Луговой В. И., Моисеев В. А. Влияние низких температур на растворимые ферменты. — Итоги науки и техники. Сер. Биофизика, 1978, 9, с. 53—79.
7. Новицкий Ю. И., Федорова О. Е. Действие магнитного поля на сухие семена ржи в связи с их водоудерживающей способностью. — В кн.: Материалы второго Всесоюз. совещ. по изуч. влияния магнит. полей на биол. объекты. М., 1969, с. 164—167.
8. Обозная Э. И., Шахбазов В. Г. Влияние постоянного магнитного поля на сухие семена кукурузы. — В кн.: Материалы второго Всесоюз. совещ. по изучению влияния магнит. полей на биол. объекты. М., 1969, с. 167—168.
9. Обозная Э. И., Маркова О. П. Исследование конечного звена цитохромной цепи — цитохромоксидазы в клетках костного мозга после глубокого охлаждения. — Криобиология и криомедицина, 1975, вып. 1, с. 60—61.
10. Пушкарь Н. С., Белоус А. М. Введение в криобиологию. — Киев: Наук. думка, 1975. — 343 с.
11. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. — Минск: Вышэйш. школа, 1967. — 319 с.
12. Astaldi G., Verga J. The glycogen content of the cell of lymphatic leucemia. — Acta haematol., 1957, 17, N 3, p. 129—136.
13. Barnett R. J., Seligman A. M. Demonstration of proteinbound sulfhydryl and disulfide groups by two new histochemical. — J. Nat. Cancer Inst., 1952, 13, p. 215.
14. Darbushire B. The results of freezing and dehydration of horseradish peroxidase. — Cryobiology, 1975, 12, N 3, p. 276—281.
15. Lewitt J. A sulfhydryl-disulfide hypothesis of frost injury and resistance in plants. — J. Theor. Biol., 1962, 3, N 3, p. 355—391.
16. Nachlas M. M., Tsou K., Souza E. Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole — J. Histochem. and Cytochem., 1957, 5, p. 420—436.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
10. 09. 80

УДК 57.024:576.8

И. П. Высеканцев, А. Е. Бутенко

ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ КИШЕЧНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ ПОСЛЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО КОНСЕРВИРОВАНИЯ

Низкотемпературное консервирование микроорганизмов широко применяется в медицинской и ветеринарной практике, микробиологической промышленности, при создании коллекций культур микроорганизмов [6, 7, 8].

В данной статье изучается влияние низкотемпературного консервирования на некоторые свойства кишечных бактериофагов фХ174, ТЗ, Т4.

Методика исследования. В работе использовали кишечные бактериофаги ТЗ, Т4, которые размножали на бактериях *E. coli* В, и фаг фХ174, который размножали на *E. coli* CN. Очистку и концентрирование фага ТЗ производили по методу, предложенному Лысенко с соавт. [4], фага Т4 — по методике, описанной Альбертсоном [2], фага фХ174 — по методу, применяемому Згага с соавт. [9]. Очищенные препараты фагов суспендировали в мясо-пептонном бульоне до концентрации 10^{11} фаговых частиц в 1 мл. Титрование фагов производили методом агаровых слоев [1].

Морфологию негативных колоний фагов изучали в стандартных условиях: питательная среда — мясо-пептонный агар, температура инкубирования 37°C , время инкубирования 16 ч, культура-хозяин для ТЗ, Т4 — *E. coli* В, для фХ174 — *E. coli* CN, возраст культуры-хозяина — шесть часов.

Спектр литического действия бактериофагов определяли по методу, применяемому для типирования брюшнотифозных бактерий [3].

Таблица 1. Выживаемость бактериофагов ϕ X174, T3, T4 после различных сроков хранения в жидком азоте

Срок хранения, годы	Количество инфекционных частиц в 1 мл					
	ϕ X174		T3		T4	
	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	%	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	%	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	%
До крио- воздействия	$(1,525 \pm 0,4743) \times 10^{11}$	100	$(1,33 \pm 0,07167) \times 10^{11}$	100	$(4,57 \pm 0,411) \times 10^{11}$	100
После крио- воздействия	$(1,230 \pm 0,1319) \times 10^{11}$ $p < 0,05$	80,65	$(1,315 \pm 0,107) \times 10^{11}$ $p > 0,05$	98,87	$(2,98 \pm 0,2066) \times 10^{11}$ $p < 0,05$	65,21
1	$(1,240 \pm 0,0527) \times 10^{11}$ $p < 0,05$	81,31	$(1,31 \pm 0,09718) \times 10^{11}$ $p > 0,05$	98,57	$(3,01 \pm 0,137) \times 10^{11}$ $p < 0,05$	65,64
2	$(1,235 \pm 0,04743) \times 10^{11}$ $p < 0,05$	80,98	$(1,32 \pm 0,09487) \times 10^{11}$ $p > 0,05$	99,25	$(2,97 \pm 1096) \times 10^{11}$ $p < 0,05$	64,93
3	$(1,215 \pm 0,0506) \times 10^{11}$ $p < 0,05$	79,67	$(1,29 \pm 0,1265) \times 10^{11}$ $p > 0,05$	96,99	$(2,93 \pm 0,1644) \times 10^{11}$ $p < 0,05$	64,11

Антигенные свойства фагов изучали в реакции нейтрализации, описанной Адамсом [1]. Антисыворотки к фагам получали иммунизацией кроликов путем подкожного введения 5 мл препаратов фагов с титром $\sim 10^{11}$ частиц/мл. Инъекции производили в течение трех недель с интервалом три—четыре дня. В реакции нейтрализации использовали антисыворотки с константой скорости нейтрализации, равной 46.

Замораживали фаги в полиэтиленовых ампулах объемом 1 мл по одноэтапной программе со скоростью охлаждения $400^\circ\text{C}/\text{мин}$ в интервале температур от 18 до -196°C . Хранили образцы в жидком азоте. Отогрев производили на водяной бане при 41°C . Свойства фагов изучали через 1—2 ч после замораживания и после хранения в течение 1, 2, 3-х лет. Полученные результаты обрабатывали статистически [5]. Достоверность расчетов 95%.

Результаты и обсуждение. При замораживании — отогреве инфекционный титр фага T3 не снижался. Выживаемость фага ϕ X174 после замораживания—отогрева составляла 80,65% исходного количества инфекционных частиц. Выживаемость фага T4 была наиболее низкой — 65,21%. Изучение инфекционных титров образцов фагов, хранившихся в жидком азоте в течение трех лет, показало, что дальнейшего снижения титров фагов не происходило (табл. 1).

Низкотемпературное консервирование не вызывало изменений морфологии негативных колоний фагов (рис. 1—3). Не изменялся при консервировании и спектр литического действия бактериофагов (табл. 2).

Контрольные и деконсервированные образцы фагов инактивировались специфическими антисыворотками с одинаковой скоростью (табл. 3).

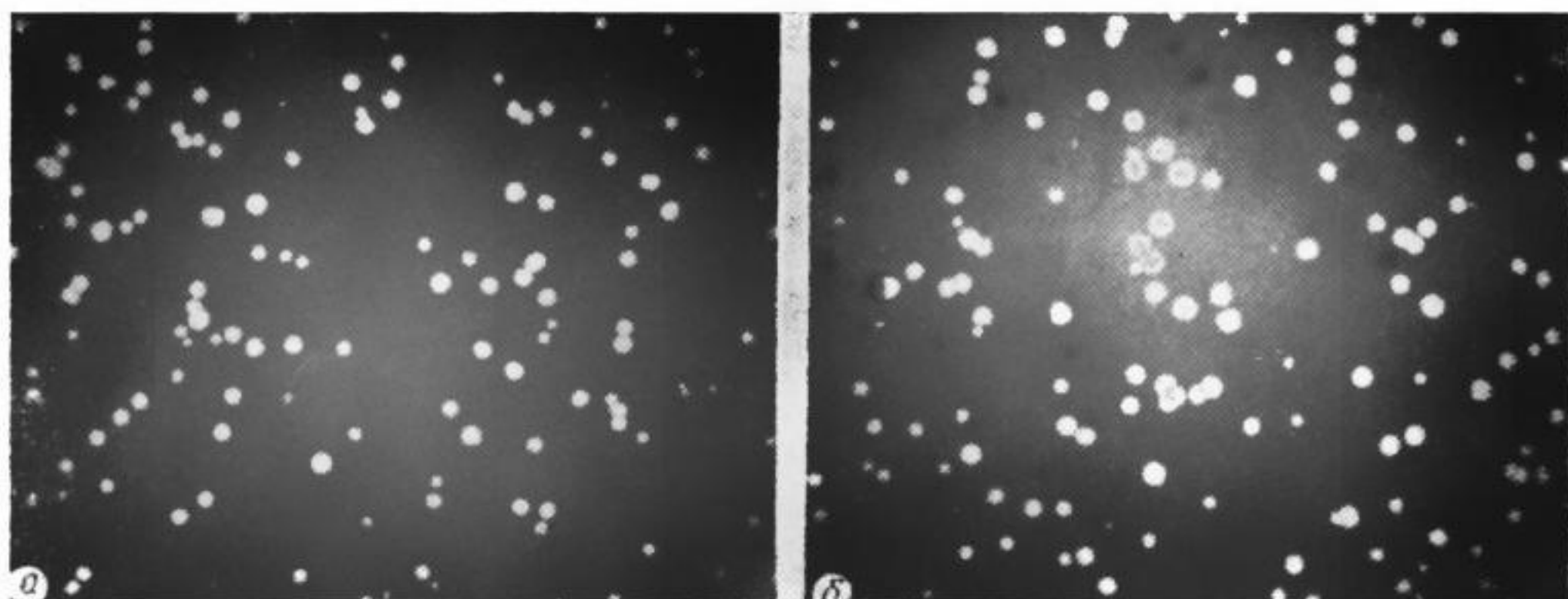


Рис. 1. Морфология негативных колоний фага T4 до (а) и после (б) криоконсервирования.

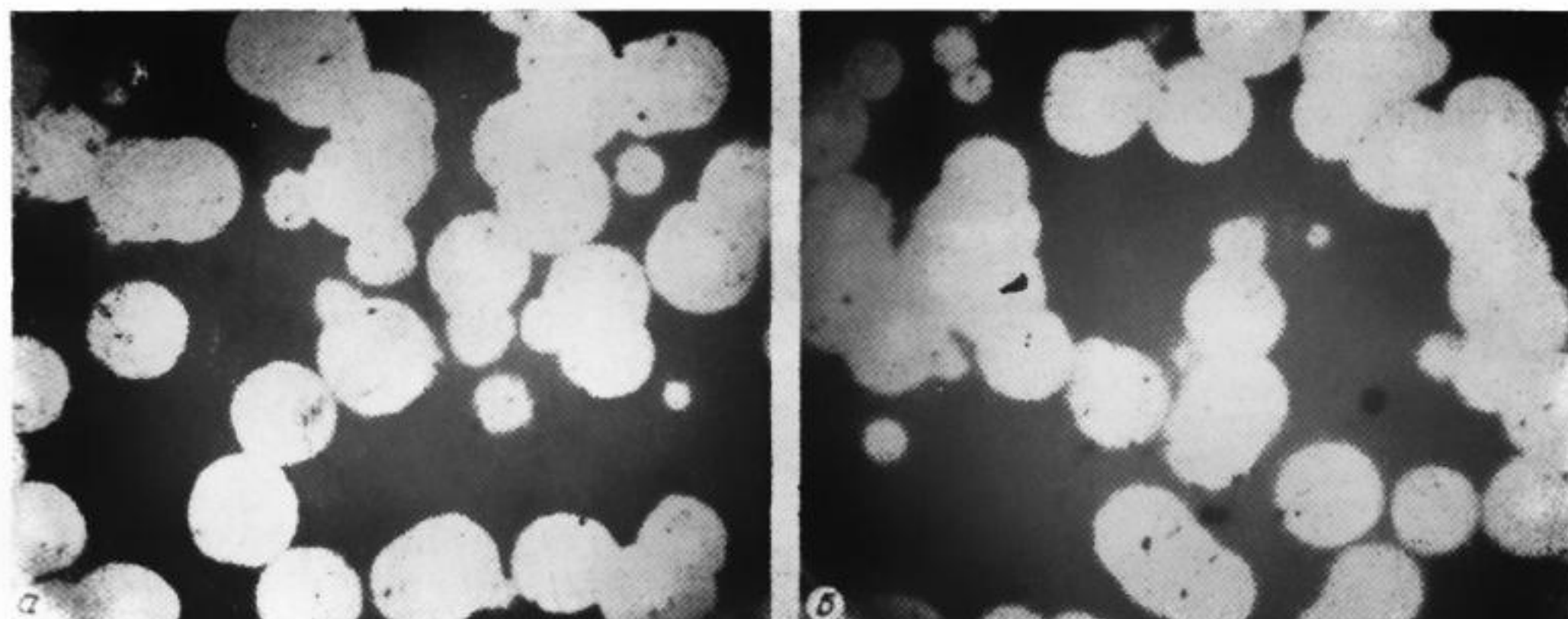


Рис. 2. Морфология негативных колоний фага фX174 до (а) и после (б) криоконсервирования.

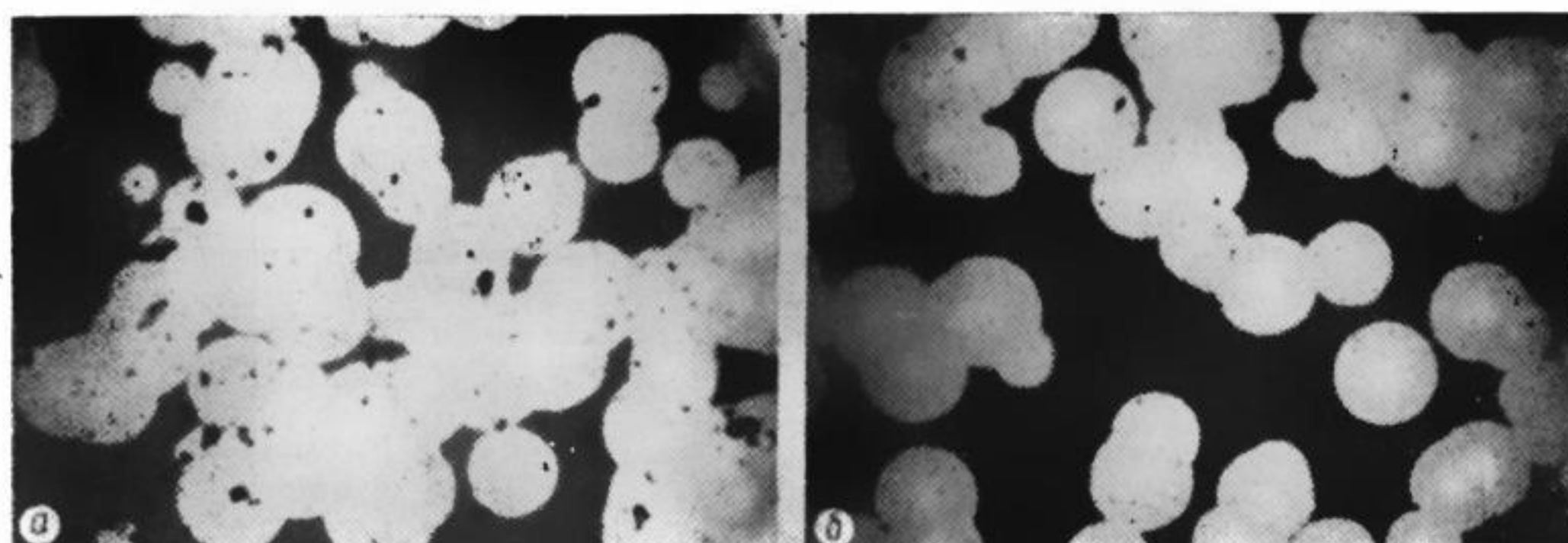


Рис. 3. Морфология негативных колоний фага T3 до (а) и после (б) криоконсервирования.

Таблица 2. Спектры литического действия фагов фX174, T3, T4 до и после криоконсервирования

Штамм	Чувствительность штаммов к фагам					
	фX174		T3		T4	
	до криоконсервирования	после криоконсервирования	до криоконсервирования	после криоконсервирования	до криоконсервирования	после криоконсервирования
CR-34 (λс 1857)	—	—	—	—	—	—
Br/WP ₂ Hcr-try-	+	+	+	+	+	+
Br/WP ₂ Hcr+try-	+	+	+	+	+	+
K-12 7026	+	+	+	+	+	+
C-600	+	+	+	+	+	+
O-111	—	—	—	—	—	—
CR (λ)	—	—	+	+	+	+
K-12 HfrH	—	—	—	—	+	+
B	—	—	+	+	+	+
CN	+	+	+	+	+	+
CR	—	—	+	+	+	+
K-12 723	+	+	+	+	+	+
CR-63	—	—	—	—	+	+
BS-1	+	+	+	+	+	+

Полученные результаты свидетельствуют о том, что снижение инфекционных титров бактериофагов при низкотемпературном консервировании происходит во время замораживания—отогрева. Длительное

Таблица 3. Нейтрализация деконсервированных фагов фХ174, ТЗ, Т4 специфическими антисыворотками *

Срок хранения, годы	Фаг	Количество инактивированных фаговых частиц (в %) за время, мин		
		5	10	15
До криовоздействия	фХ174	92	93	96
	ТЗ	94	97	99
	Т4	90	94	98
После криовоздействия, 3	фХ174	90	95	96
	ТЗ	93	95	99
	Т4	91	96	97

* Разведение антисывороток 1:100.

1. Адамс М. Бактериофаги. — М.: Изд-во иностр. лит., 1961. — 186 с.
2. Альбертсон Пер-Оке. Разделение клеточных частиц и макромолекул. — М.: Мир, 1974. — 270 с.
3. Гольдфарб Д. М. Бактериофагия. — М.: Медгиз, 1961. — 225 с.
4. Лысенко А. М., Белоусова А. А., Карагезов Л. К. Получение лизата, концентрация и очистка фага ТЗ. — *Вопр. вирусологии*, 1974, № 4, с. 498—500.
5. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. — Минск: Вышэйш. школа, 1973. — 319 с.
6. Anderson T. F., Rappaport C., Muscatine N. A. On the structure and osmotic properties of phage particles. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, 84, p. 5—14.
7. Colwell R. R. The role of culture collections in the era of molecular biology. — In: *ATCC 50th Anniversary Symp.* (Washington, 23 Sept. 1975). Washington: Amer. Soc. Microbiol., 1976. 240 p.
8. Lapage S. P., Redway K. F. Preservation of microorganisms. — *Handb. Microbiol.*, 1973, N 1, p. 713—724.
9. Zgaga V., Medić M., Salaj-Šmic E. et al. Infection of *Escherichia coli* envelope-membrane complex with lambda phage: Adsorption and penetration. — *J. Mol. Biol.*, 1973, 79, N 4, p. 697—708.

Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
24.09.80

III. КРИОМЕДИЦИНА

УДК 57.043.617:615.832.9

Н. С. Пушкарь, Б. П. Сандомирский

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРАКТИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ КРИОХИРУРГИИ

Интенсивное внедрение методов криомедицины в клиническую практику для лечения различных заболеваний диктует необходимость дальнейшей разработки научных основ методов холодового лечения и углубления исследований, направленных на выявление механизмов криоповреждения и криозащиты. При этом необходимо решить ряд таких актуальных задач: раскрыть общую и местную реакции организма на воздействие холодом, создать теоретические обоснования методов криохирургии при различных заболеваниях, а также осуществить конструирование автоматических программных инструментов, способных реализовать параметры охлаждения патологического очага при достижении максимального лечебного эффекта.

Развитие клинической медицины тесно связано с применением в качестве лечебного фактора холода. Первая попытка дозированного применения холода, вероятно, принадлежит англичанину Дж. Арнотту, который в 1851 г. сообщил об использовании смеси поваренной соли и льда в кожаных мешках для лечения рака молочной железы и шейки матки. Автор подчеркнул выгодные моменты использованного им холодового воздействия: облегчение болей, уменьшение кровотечения и раневых выделений, снятие неприятных ощущений, обратное развитие опухоли. Аналогичному лечению подвергались и пациенты с головными болями, межреберными невралгиями, зудом промежности и половых органов, рожистым воспалением [25].

Следующий этап развития криомедицины связан с получением хлористого этила, твердой и жидкой угольных кислот, сжиженных кислорода и азота. Преимущественно с последним хладагентом связаны основные успехи криохирургии, где жидкий азот используется для теплоотвода от патологического очага с помощью специальных инструментов.

В последние два десятилетия были достигнуты значительные успехи в создании теории криоповреждения биологических структур [11, 40, 46, 49], основным положением которой является взаимозависимость термодинамических изменений параметров среды и свойств клеток.

Развитие криомедицины ставит перед исследователями необходимость раскрытия механизмов лечебного эффекта, наблюдающегося при локальном замораживании или охлаждении тканей. При этом выявляются два основных эффекта от локального применения холода. Во-первых, криодеструктивное действие, используемое для разрушения тканей преимущественно опухолевого происхождения, что достигается охлаждением их до температуры, лежащей значительно ниже зоны криоустойчивости. Во-вторых, стимулирующее или защитное действие за счет снижения температуры, лежащей около порога устойчивости тканей человека к холоду или несколько выше его.

Для раскрытия механизмов криодеструкции после локального замораживания, построения общей концепции и выработки направлений

дальнейших исследований целесообразно использовать имеющиеся теоретические и экспериментальные данные, полученные на клетках, суспендированных в биологических средах (см. работы [1, 12, 51]). В этих работах рассмотрены процессы повреждения структур клеток при замораживании, которые в дальнейшем были использованы для объяснения механизмов криоповреждения на уровне тканей и органов, и выяснены изменения состояния воды, происходящие после низкотемпературного воздействия и играющие решающую роль в механизме криодеструкции тканей. С этой точки зрения существенное значение имеют состояние связанной воды в клеточных и тканевых системах при низких температурах [43], а также фазово-структурное состояние липидов клеточных мембран [5, 9, 28, 34, 36, 41, 47], которые могут играть большую роль в деструкции клеток. Внеклеточная кристаллизация [48, 50] и дегидратация клеток при медленном охлаждении являются сильными факторами криоповреждения. Очень быстрое охлаждение сопровождается образованием мелких кристаллов льда, которые во время медленного отогрева после криохирургической операции рекристаллизуются, превышая прежние их размеры. Вымораживание воды в процессе охлаждения приводит к росту концентрации электролитов в окружающей среде, весьма отрицательно влияя на стабильность липид-белковых комплексов мембран клеток [39], в результате чего образуются дефектные зоны в плазматической мембране и внеклеточные ионы попадают в клетки [59]. Рост кристаллов воды вызывает значительное изменение рН среды, а также межмолекулярных связей в жидкой фазе микроканальцев. В связи с этим можно полагать, что ткани с большим содержанием интерстициальной жидкости должны обладать пониженной криоустойчивостью.

Дегидратация как фактор криоповреждения была довольно подробно описана в работе [43] с помощью методов физико-математического анализа. Однако сложность полученного Мейзуром уравнения, описывающего обезвоживание клеток в процессе кристаллизации клеточной суспензии, не позволяет провести его аналитическое исследование, что является существенным недостатком указанной модели. Вместе с тем его численное решение при конкретных значениях клеточных параметров, описываемых в уравнении для обезвоживания, позволяет в некоторых случаях оценить значение оптимальных скоростей охлаждения для различных видов клеток.

Линь и Тянь [38], сгруппировав различные физические параметры, приведенные в уравнении Мейзура, в безразмерные комплексы, получили его решение для различных частных случаев. Анализ этих решений привел авторов к выводу о том, что существует предельная температура для замораживания клетки, при которой она погибает от чрезмерного обезвоживания. Важным является и то, что внутриклеточная кристаллизация в клетке неизбежна, если в процессе замораживания она охлаждается ниже определенного температурного предела. Понижение обеих предельных температур, соответствующих критическому обезвоживанию и повреждению клеток внутриклеточным льдом, может быть достигнуто уменьшением скорости охлаждения суспензии и добавлением в нее веществ, задерживающих кристаллизацию.

Мэнсури [42] предложил модель обезвоживания клеток в период кристаллизации жидкой фазы, которая отличается от модели Мейзура тем, что в ней учтены особенности внутриклеточного раствора, распространение температурного градиента в клетке, а также изменение площади поверхности клеточной мембраны в процессе обезвоживания.

В работах [6, 53] построена более общая модель обезвоживания клеток, которая дает возможность для аналитического расчета этого процесса, причем эта модель может быть использована и в областях

слабых концентраций, что позволяет применить ее в случаях замораживания клеток в присутствии криозащитных веществ.

Мейзур принимал, что химический потенциал воды вне клетки равен химическому потенциалу льда, т. е. величина термодинамической силы, вызывающая обезвоживание, совпадает с величиной переохлаждения клетки. Позднее было высказано предположение [7] о том, что данные показатели не совпадают, что позволило установить факт сильного влияния на дегидратацию клеток особенностей их пространственного расположения в структуре льда. Кроме того, оказалось [3], что при дегидратации клеток нельзя пренебрегать процессами переноса веществ внутри клеток, которые зависят от проницаемости плазматических мембран для воды. В случае высокой проницаемости они уже не являются основным диффузионным препятствием к обезвоживанию. В работе [2] учтено влияние начального процесса переохлаждения на кинетику обезвоживания и внутриклеточной кристаллизации, что позволило критически оценить модель Мейзура, согласно которой вода вне клеток находится в термодинамическом равновесии со льдом.

Необходимо подчеркнуть, что уравнение Мейзура [43] описывает кинетику обезвоживания клеток лишь при достаточно больших скоростях охлаждения, поскольку предполагается, что за время замораживания растворенные вещества не успевают перераспределиться между клетками и окружающей их средой. Получена система уравнений [4], позволяющая учесть влияние в системе проникающего вещества на процесс обезвоживания, что может быть использовано в случае медленного охлаждения. Значение других факторов криповреждений клеток описано в работах [21, 24, 35, 44].

Переходя к особенностям криповреждений клеток в составе тканей, необходимо отметить несколько характерных черт, отсутствующих в суспензиях.

Существенным моментом при локальном замораживании клеток в тканях является то, что они расположены на разных расстояниях от криозонда, а потому подвержены отличающимися друг от друга термальными режимами охлаждения и нагревания. Следовательно, клетки под действием температурных факторов будут подвергаться разрушению в различной степени, которая будет зависеть от скорости, глубины охлаждения, времени выдержки в критическом температурном диапазоне и скорости отогревания. Исходя из этого, можно выделить четыре участка зоны замораживания, расположенные на различном расстоянии от ее центра. Первый участок, лежащий в проекции аппликатора и вблизи его и имеющий температуру, близкую к азотной, характеризуется высокой скоростью и большой глубиной охлаждения, в котором повреждающее действие оказывают такие летальные факторы, как внутриклеточная кристаллизация и механическое повреждение кристаллами льда мембран клеток вследствие процессов рекристаллизации при отогревании. Второй участок существенно отличается от предыдущего наличием значительного количества клеток, оставшихся интактными после цикла замораживания — отогрева, что обусловлено их расположением в диапазонах температур, близких к оптимальным для сохранения жизнеспособности в процессе криоконсервирования. В третьей зоне происходит достаточно медленное охлаждение, сопровождающееся равновесным обезвоживанием гиперконцентрированных растворов межклеточной среды, оказывающих летальное воздействие на клетки (рис. 1). В наиболее отдаленной, четвертой, зоне, лежащей по периферии замороженной области, происходит неполное замораживание среды, находящейся при температуре выше эвтектической, и эффект охлаждения выражен незначительно [45].

Такое представление результатов замораживания — отогрева тканей с помощью криохирurgicalического зонда явилось основанием для про-

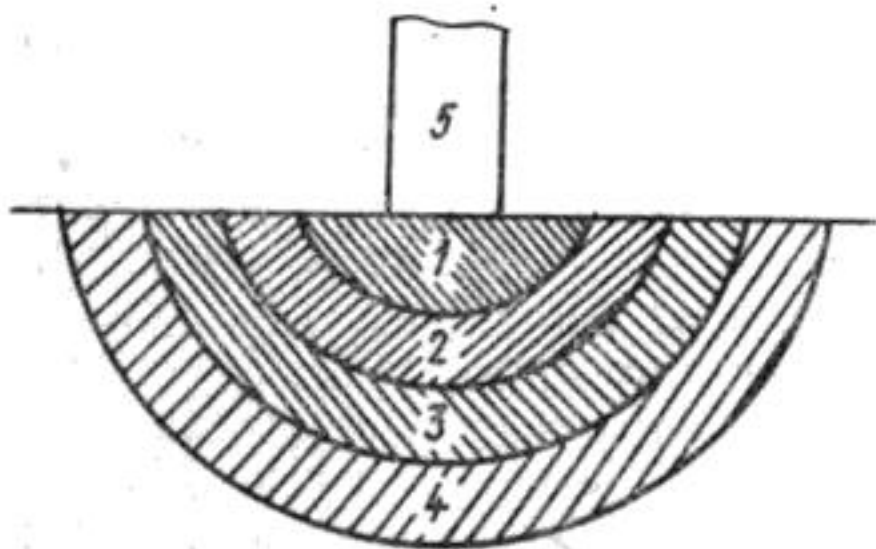


Рис. 1. Температурные зоны при криоаппликации:

1 — зона температур, близких к температуре криозонда (5), и высоких скоростей охлаждения; 2 — зона температур, сходных с температурами криоконсервирования; 3 — зона медленного охлаждения; 4 — зона неполного замораживания с температурами выше эвтектических.

ведения расчета режима охлаждения рабочей части криоаппликатора, при котором скорость замораживания во всей области криодеструкции превышает оптимальную и тем самым обеспечивает гибель заданного участка ткани [20, 23, 27, 29—33, 56, 62].

Если определения зоны замораживания и деструкции тканей после криоаппликации в основных чертах понятны и с определенной вероятностью могут прогнозироваться, то в отношении распределения температурных полей в биологическом объекте, подвергнутого охлаждению струей хладагента, т. е. орошению, подобных данных в литературе не

выявлено. В то же время орошение патологического очага холодоносителем является перспективным приемом криохирургии, так как позволяет более равномерно и на большей площади получить желаемые параметры охлаждения.

Анализ экспериментальных данных свидетельствует о том, что рассмотренные выше механизмы криповреждения в случае локального замораживания тканей [10, 52, 64] не всегда играют существенную роль. Хотя после криодеструкции экспериментальных злокачественных опухолей наблюдается пролиферация клеток новообразования, взятых из зоны, подвергавшейся деструкции, нет никаких сведений о том, что эти клетки локализованы в некоторой узкой зоне области замораживания. Более того, имеются данные об однородности некроза во всем объеме криодеструкции. При этом некоторые авторы считают, что для получения желаемого эффекта следует совместить изотерму с границами заранее намеченного участка ткани, от -10 до -20°C [37], являющуюся температурным порогом устойчивости к холоду.

Для усиления деструкции ткани часто применяют повторные циклы замораживания одного и того же участка. Такая процедура не обязательно приводит к дополнительному нарушению ультраструктуры ткани, поскольку эффективность повторной криодеструкции очень зависит от времени, прошедшего между циклами замораживания: чем оно меньше, тем больше создается условий для усиления процессов деструкции под влиянием повторного криовоздействия. Это указывает на то, что в замороженных тканях после отогрева возникают процессы регенерации, которые довольно быстро устраняют последствия криодеструкции. Следовательно, при локальном замораживании *in vivo* имеют место специфические механизмы криповреждения, которые нельзя полностью объяснить существующими теориями. Главной отличительной особенностью реакции клеток плотных тканей в сравнении с изолированными суспензиями на холодовое воздействие является наличие гемомикроциркуляционной системы, объединяющей клеточные элементы в функциональные единицы органа [21], которые обладают высокой способностью к регенерации. Данные, полученные за последние годы, показывают, что некроз ткани определяется в основном явлениями, происходящими в зоне замораживания после полного отогрева. К таким явлениям следует отнести в первую очередь развитие ишемического некроза, связанного с изменением проницаемости и кровообращения в мелких сосудах [63], а также нарушение иммунологических реакций в организме под влиянием продуктов распада [24, 57, 58].

Ответ сосудистого русла на холод в общих чертах сводится к тому, что непосредственно после отогрева замороженной области происходят полное восстановление кровотока и увеличение просвета сосудов. Однако спустя некоторое время возникают стаз крови, агрегация форменных элементов и тромбообразование. Необратимая закупорка сосудов обуславливает нарушение процессов обмена в ткани и последующее углубление деструктивных изменений.

Микрососудистое русло отвечает на низкотемпературное воздействие как изменением эндотелия капилляров, так и нарушениями сосудистого содержимого. Набухание эндотелия, нарушения клеточных контактов приводят к повышению капиллярной проницаемости. Вскоре после оттаивания внутри микрососудов, подвергавшихся действию субнулевых температур, появляются эмболы, что связано с повышением концентрации газов во внутрисосудистой жидкости во время замораживания. Развитие стаза и сладжей является одним из главных проявлений нарушения микрогемоциркуляции спустя несколько минут после криовоздействия. Тромбообразование, наиболее выраженное в веноулярном звене, совпадает по времени с вазодилатацией, сменяющей спазм. Объем тромбов увеличивается, и они могут полностью закрыть просвет сосуда (рис. 2).

После этого кровоток осуществляется лишь в направлении еще функционирующих капилляров, что выглядит как обратное или маятниковообразное движение крови. По истечении 30 мин отмечаются полный стаз и формирование ишемического некроза.

Таким образом, процесс, происходящий в тканях после действия низких температур, схематически можно представить в виде определенных сменяющихся фаз. Фаза замораживания и фаза оттаивания зависят главным образом от интенсивности и величины температурного градиента, теплоемкости тканей и хладопроизводительности инструмента, степени, времени и площади теплового контакта. Фаза кровенаполнения, начинающаяся сразу же после оттаивания, характеризуется дилатацией микрососудов, замедлением в них кровотока вплоть до стаза, агрегацией форменных элементов крови, образованием белых и красных тромбов, появлением отечной жидкости, нарушением проницаемости эндотелиальных мембран и прекращением кровотока в мелких сосудах. Замороженная ткань в этой фазе отграничена и отличается от окружающей незамороженной более темным цветом и отечностью. Фаза крионекроза становится заметной через 2—3 ч, а к концу первых суток четко развита. Фаза регенерации обусловлена ответом ткани на повреждение и имеет определенную специфику, связанную с особенностями холодового некроза. Как видно, гибель элементов ткани вызывается двумя главными компонентами — температурными повреждениями и сосудистыми изменениями, их сопровождающими. Вклад каждого из этих механизмов в криоповреждение клеток тканей довольно высок. Основываясь на термодинамической теории криоповреждения [43], можно предполагать, что уменьшение перфузии тканей, подвергающихся криовоздействию, должно приводить к увеличению объема гибели ткани. Однако в экспериментах на коже крысы было показано [55], что остановка периферического кровообращения при локальном криовоздействии приводила к значительно меньшему деструктивному эффекту, чем при замораживании кожи с нормальным кровотоком.

Исходя из изложенного выше механизма зональности повреждения клеток, можно ожидать более частого метастазирования раковых клеток, обусловленного неоднородностью их гибели в результате замораживания и оттаивания первичного очага. Однако этого в практике не наблюдается, более того, низкотемпературное воздействие стало методом выбора при лечении некоторых онкологических заболеваний [10, 64]. Данное противоречие объясняется тем, что в механизме крионе-

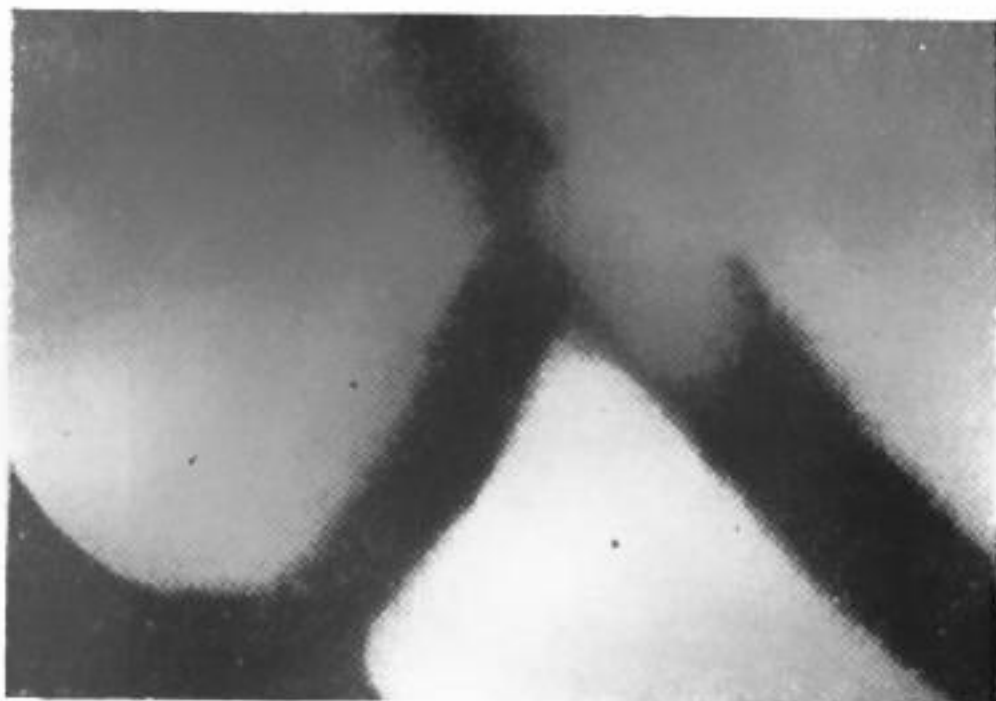


Рис. 2. Формирование белого тромба в венуле щечного мешка золотистого хомячка после криовоздействия, $\times 750$.

вых клеток сразу же после замораживания. Еще меньше информации накоплено относительно синергизма и антагонизма — этих главных факторов гибели ткани после низкотемпературного воздействия. Можно полагать, что механизмы деструктивного и стимулирующего воздействия холода на реакции сосудистого русла качественно не отличаются один от другого. Сосуды в месте охлаждения, например, кожи спазмируются, тогда как в глубже расположенных сосудах наблюдается их дилатация, вызванная рефлекторным действием вследствие сужения кожных сосудов. Эти наблюдения были подтверждены регистрацией количественных показателей кровотока методом венозной реографии [61]. Большое значение должно иметь соотношение времен реализации температурного и сосудистого компонентов криоповреждения, представление о котором можно получить, сравнив ультраструктурные и гистологические изменения в тканях после низкотемпературного воздействия. Подобного рода исследования были проведены на печени, где установлено, что начальные, малой степени выраженности изменения появляются не ранее чем через 15 мин после криовоздействия и выражаются в зазубренности клеточных ядер, набухании митохондрий, расширении и закупорке синусоидов. Со временем эти изменения в ткани печени нарастают, достигая максимума через 3 ч, когда прослеживаются нарушения в виде неровности клеточных ядер и скопления хроматина, набухания митохондрий эндоплазматического ретикулума, их фрагментации. По данным световой микроскопии на фоне проявившихся через 2 ч с момента криовоздействия дилатации и закупорки синусоидов появляются тромбы порталных сосудов и отграничение зоны крионекроза от нормальной ткани. Как видно, формирование сосудистых нарушений в ткани печени заканчивается через 3 ч после криовоздействия [60]. Исследуя архитектуру порталных сосудов печени методом их заполнения тушь-желатиновой смесью и протакрилом после криовоздействия, мы установили проходимость венозных сосудов спустя 20—40 мин после операции (рис. 3). Данное обстоятельство имеет большое практическое значение в хирургической гепатологии, где низкие температуры начинают применяться все чаще и шире, в том числе с целью гемостаза. Особенностью криовоздействия в этом аспекте является то, что надежность гемостаза усиливается со временем, прошедшим со времени операции. Указанные особенности делают криовоздействие методом выбора в хирургической гепатологии для профилактики холеррагии из раны печени, так как повышение давления в печеночных желчных ходах происходит не ранее первых суток после операции, т. е. тогда, когда закончится формирование крионекроза, являющегося надежным препятствием для истечения желчи и крови из раны органа.

кроза, особенно обеспечении его однородности, сосудистый компонент играет не менее важную роль, чем температурный. Если вклад температурного фактора в механизм криодеструкции практически решен на моделях клеточных суспензий, то экспериментальных данных для строгого количественного анализа влияния сосудистых нарушений в механизме крионекроза явно недостаточно. В то же время имеющиеся клинические наблюдения по использованию низких температур в онкологии убедительно демонстрируют иммобилизацию рако-

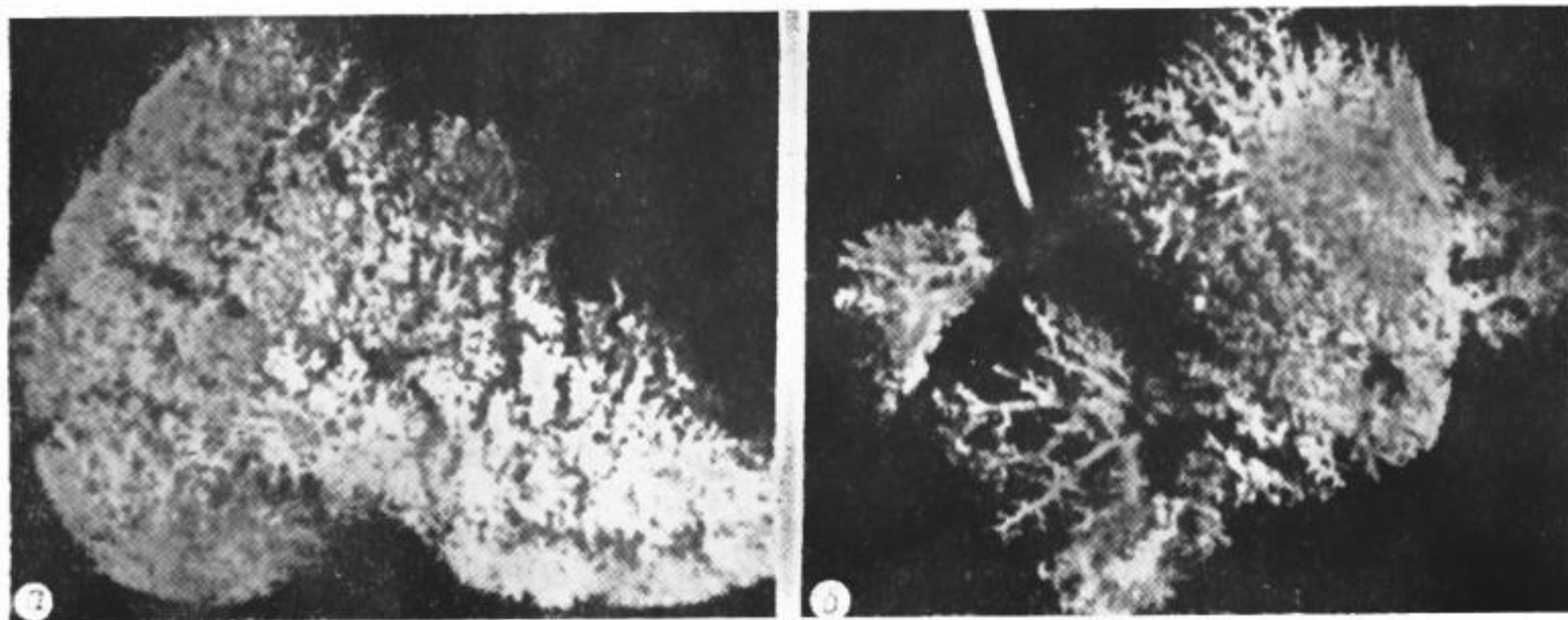


Рис. 3. Портальные сосуды печени кролика, заполненные протакрилом, в норме (а) и через 30 мин после криовоздействия на левую долю печени (б).

Существенным является выявление действия криохирургических приемов на функциональное состояние органа. С этой целью мы провели сравнительное исследование ферментов сыворотки крови (аланиновая и аспарагиновая аминотрансферазы, щелочная фосфатаза, лактатдегидрогеназа и рибонуклеаза), отражающих функциональное состояние печени после атипической резекции части органа с применением традиционных кетгутовых швов и криовоздействия по линии резекции [18]. Как видно из представленных данных (см. таблицу), криовоздействие приводит к менее выраженным нарушениям указанных ферментов, чем прошивные кетгутовые швы, нормализующиеся к 14 дню после операции, что позволяет относить криохирургический метод к разряду малотравматических.

Поскольку однократный процесс замораживания клеток часто не дает желаемого эффекта, используют методы и средства для усиления некроза. Имеются сообщения [26], указывающие на усиление деструкции после повторных циклов замораживания — отогрева, при этом интервал между воздействиями должен быть как можно большим, но не превышающим времени, по истечении которого происходит стаз в микрососудах. Данное обстоятельство обусловлено тем, что повторные криовоздействия оказывают влияние на клетки, уже довольно ослабленные процессами кристаллизации, гиперосмотичности и др.

Актуальным направлением в криохирургии является сочетание использования низкотемпературного и других факторов повреждения. Так, применение ультразвука перед замораживанием усиливает криоповреждение клетки, что обусловлено дезинтегрирующим действием ультразвука на ее структуры и увеличением криолабильности системы. Одновременное использование ультразвука и низких температур также вызывает дополнительные повреждения ткани, что связано с изменением кинетики кристаллизации жидких элементов ткани в процессе замораживания [14, 15, 22]. Сочетание использования криохирургического разрушения опухоли и лучевого лечения приводит как к уменьшению дозы облучения, так и к более полной гибели элементов новообразования [8]. Целесообразным приемом удаления тканей, в том числе опухолей, является применение ультразвуковой резекции и электрокоагуляции на фоне льда. Такие технические приемы особенно целесообразны в хирургии паренхиматозных органов.

Как известно, коагуляционный некроз, образующийся после действия на паренхиму органов положительных температур, преимущественно отторгается в процессе регенерации по линии демаркации, тогда как крионекроз организуется, замещаясь соединительной тканью. При-

Активность ферментов в сыворотке крови кроликов после резекции печени

Фермент	Контроль	Время после			
		1		7	
		a	б	a	б
Аланиновая аминотрансфераза	$1,39 \pm 0,49$ $n = 10$	$4,47 \pm 0,29$ $n = 6$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	$2,74 \pm 0,06$ $n = 4$ $p_1 < 0,001$	$1,50 \pm 0,26$ $n = 5$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$1,87 \pm 0,28$ $n = 5$ $p_1 > 0,05$
Аспарагиновая аминотрансфераза	$0,38 \pm 0,06$ $n = 8$	$1,28 \pm 0,08$ $n = 6$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	$0,86 \pm 0,02$ $n = 5$ $p_1 < 0,001$	$0,54 \pm 0,13$ $n = 5$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$0,73 \pm 0,04$ $n = 5$ $p_1 > 0,05$
Щелочная фосфатаза	$1,23 \pm 0,20$ $n = 9$	$1,10 \pm 0,15$ $n = 6$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$1,42 \pm 0,08$ $n = 4$ $p_1 > 0,05$	$1,47 \pm 0,19$ $n = 5$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$1,34 \pm 0,12$ $n = 5$ $p_1 > 0,05$
Лактатдегидрогеназа	$9,41 \pm 0,86$ $n = 10$	$10,58 \pm 0,60$ $n = 6$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$8,12 \pm 0,54$ $n = 4$ $p_1 > 0,05$	$9,88 \pm 1,84$ $n = 5$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$8,32 \pm 0,36$ $n = 5$ $p_1 > 0,05$
Рибонуклеаза	$3,39 \pm 0,20$ $n = 10$	$3,1 \pm 0,06$ $n = 4$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$3,24 \pm 0,003$ $n = 4$ $p_1 > 0,05$	$2,82 \pm 0,34$ $n = 5$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$3,64 \pm 0,14$ $n = 5$ $p_1 > 0,05$

Примечание. p_1 — сравнение с контролем; p_2 — сравнение двух вариантов резекции.

менение электрокоагуляции, ультразвукового резания замороженных тканей, в том числе печени, позволяет уменьшить негативные стороны теплового некроза, сохранив его положительные качества, направленные на обеспечение гемостаза.

Эндоскопическая криохирurgia является перспективным направлением в использовании низких температур. Так, эндотрахеальная криотерапия была использована для лечения структур трахеи, где туширование, местное применение кортикостероидов и различные хирургические манипуляции были не эффективны. Целесообразность эндотрахеального эндоскопического использования холода при экспериментальных структурах трахеи позволила обосновать применение метода у больных с различными поражениями трахеи [54]. Использование авторами работы [54] специального криохирургического зонда, в котором источником охлаждения являлась закись азота, позволило получить очень хороший эффект, который был выше всех известных методов терапии структур трахеи.

Криохирургическое лечение дуоденальных язв мы применили в комплексе консервативного лечения язвенной болезни у 68 больных, у которых во время фиброгастроскопического исследования производилось охлаждение зоны язвы специальным криогенным устройством с помощью фреона с температурой от -12 до -28°C в течение 10—20 с. У всех больных, получивших от 1 до 5 орошений в процессе лечения (до 4 недель), язвенный дефект был ликвидирован. Можно полагать, что местное охлаждение пептических дуоденальных язв приводило к выходу в зоне патологического очага из сосудистого русла плазменных белков, лейкоцитов, лимфоцитов и изменению воспаления в направлении репарации, завершавшейся заживлением язвенного дефекта.

Подобная методика была использована и для лечения гастродуоденальных кровотечений, при которых источник геморрагии замораживали, после чего на фоне льда осуществлялась электрокоагуляция, что во всех случаях приводило к полной остановке кровотечения.

с наложением кетгутовых швов (а) и после криорезекции (б)

операции, сут					
14		28		60	
а	б	а	б	а	б
$1,88 \pm 0,23$ $n=5$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$0,94 \pm 0,04$ $n=4$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$0,97 \pm 0,08$ $n=6$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$1,30 \pm 0,10$ $n=5$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$0,71 \pm 0,26$ $n=5$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$0,98 \pm 0,17$ $n=4$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$
$0,45 \pm 0,08$ $n=4$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$0,56 \pm 0,07$ $n=4$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$0,42 \pm 0,11$ $n=5$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$0,33 \pm 0,05$ $n=5$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$0,39 \pm 0,14$ $n=5$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$0,46 \pm 0,24$ $n=4$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$
$1,59 \pm 0,25$ $n=5$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$1,25 \pm 0,18$ $n=4$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$1,42 \pm 0,16$ $n=6$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$1,20 \pm 0,08$ $n=5$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$0,89 \pm 0,09$ $n=5$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$0,82 \pm 0,14$ $n=4$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$
$8,51 \pm 0,50$ $n=5$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$9,69 \pm 0,66$ $n=5$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$7,60 \pm 0,91$ $n=6$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$9,27 \pm 1,04$ $n=5$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$9,84 \pm 0,54$ $n=5$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$9,52 \pm 0,72$ $n=4$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$
$3,70 \pm 0,41$ $n=5$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$3,73 \pm 0,02$ $n=5$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$2,91 \pm 0,44$ $n=4$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$3,11 \pm 0,15$ $n=4$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$3,04 \pm 0,11$ $n=4$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$3,62 \pm 0,18$ $n=4$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$

Защитное и стимулирующее действие холода убедительно продемонстрировано при лечении ожоговых и гнойных ран [13, 16, 17]. Охлаждение гнойных ран до возникновения крионекроза поверхностных тканей способствует более быстрому очищению их от гнойно-некротических тканей и ускорению процесса заживления. Криотерапия термических ожогов струей хладагента в течение первых суток после травмы сопровождалась оптимизацией сосудисто-тканевой циркуляции в зоне повреждения, уменьшением токсичности омертвевших тканей, снижением послеожоговой деструкции и более быстрым ее очищением. Благоприятное влияние охлаждения на раны, заживающие вторичным натяжением, подтверждено при инфицировании обнаженной соединительной ткани после криохирургического лечения гемангиом у детей, когда после дополнительного воздействия жидким азотом на дно и края раны в течение 5—7 дней образовывался эпителиальный пласт [19].

Понижение температуры и замерзание тканей, являющееся основным повреждающим фактором криохирургического метода, может быть реализовано только при наличии адекватного криогенного инструментария. За двадцатилетнюю историю криохирургии были созданы два вида инструментов. Первый был представлен автономными устройствами, в которых аппликатор в рабочем режиме имел мало изменяющуюся температуру, регламентированную конструктивными особенностями инструмента и используемым хладагентом. Время работы такого устройства зависело от объема емкости для охлаждающей среды. Вторым видом отличался тем, что в нем были решены вопросы регулирования температуры криозонда в диапазоне положительных и отрицательных температур на всех этапах хирургического вмешательства, и возможности многократного повторения процедуры. Однако указанные устройства имеют недостатки, которые не позволяют решить ряд важных вопросов в криохирургической практике. Во-первых, они не позволяют проводить контролируемое замораживание опухоли любых размеров, которое должно быть достигнуто при большой холодопроизводительности

инструмента или одновременном охлаждении несколькими аппликаторами, в том числе открытой струей хладагента. Кроме того, они не позволяют производить смену кризонда во время операции. Во-вторых, такая криогенная техника не обеспечивает управление процессом охлаждения по показателям экстрагирования тепла, а не конечной температуры ткани. Решение этих вопросов позволит стабилизировать теплоотвод и, следовательно, реализовать температурные и временные параметры криодеструкции вне зависимости от индивидуальных особенностей хирурга. В-третьих, такие устройства не имеют субоперационной диагностики для выявления объема и формы опухоли, подлежащей разрушению, а также контроля качества деструкции во время или после операции.

Мы полагаем, что практическая реализация метода деструкции и защитно-стимулирующего действия низких температур должна базироваться на хорошей теоретической и практической основе. Однако многие вопросы механизмов действия холода на ткани и органы требуют дальнейшего изучения для совершенствования научно обоснованных методов криохирургии.

1. Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П. Молекулярные механизмы криоповреждений биомембран. — Итоги науки и техники. Сер. Биофизика, 1978, 9, с. 80—110.
2. Бронштейн В. Л., Розанов Л. Ф. Начальное переохлаждение как фактор повреждения при замораживании клеточных суспензий. — Криобиология и криомедицина, 1977, вып. 3, с. 26—29.
3. Гордиенко Е. А., Бронштейн В. Л., Козьмин Ю. В. Особенности внутриклеточной кристаллизации в эритроцитах. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. Киев: Наук. думка, 1974, с. 10—12.
4. Гордиенко Е. А., Иткин Ю. А., Ишков Г. С. Кинетика обезвоживания клеток в многокомпонентных средах при наличии проникающего через плазматическую мембрану вещества. — В кн.: Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических структур. Киев: Наук. думка, 1977, с. 16—17.
5. Жегунов Г. Ф., Максина А. Г., Артемова Л. Г. та ін. Зміна структури мембран саркоплазматичного ретикулуму після дії на них низьких температур. — Доп. АН УРСР, сер. Б, 1978, № 10, с. 924—926.
6. Иткин Ю. А., Бронштейн В. Л., Гордиенко Е. А. Анализ процессов кристаллизации и обезвоживания клеточных суспензий. — Криобиология и криомедицина, 1975, вып. 1, с. 40—42.
7. Иткин Ю. А., Бронштейн В. Л., Розанов Л. Ф. Изучение влияния структуры льда на процесс обезвоживания и внутриклеточную кристаллизацию при замораживании клеточной суспензии. — Там же, 1977, вып. 3, с. 35—41.
8. Киндзельский Л. П., Арунгазыева В. В., Курлянд В. А. Динамика структурно-функциональных показателей опухолевых клеток после криодеструкции и комбинированной криолучевой терапии экспериментальных опухолей. — В кн.: Специальные методы исследования, диагностики и лечения злокачественных опухолей: Тез. докл. респ. науч. конф. (Днепропетровск, 20—21 дек. 1979 г.). Днепропетровск, 1979, с. 282—283.
9. Конев С. В., Волотовский И. Д. Структурные перестройки биологических мембран. — В кн.: Биомембраны. Рига: Зинатне, 1977, с. 42—76.
10. Криогенный метод лечения опухолей головы и шеи / А. И. Пачес, В. В. Шенталь, Т. П. Птуха и др. — М.: Медицина, 1978. — 166 с.
11. Низкотемпературная кристаллизация в биологических системах / Н. С. Пушкар, А. М. Белоус, Ю. А. Иткин и др. — Киев: Наук. думка, 1977. — 243 с.
12. Пушкар Н. С., Белоус А. М. Введение в криобиологию. — Киев: Наук. думка, 1975. — 343 с.
13. Пушкар Н. С., Сандомирский Б. П., Митасов В. И. и др. Криохирургия гнойных ран. — В кн.: I Всесоюз. конф. по ранам и раневой инфекции: Тез. докл. М., 1977, с. 142—143.
14. Рикберг А. Б., Трушкевич Л. И. О возможности усиления криоповреждения. — В кн.: Механизмы криоповреждения и криопротекции биологических структур. Киев: Наук. думка, 1976, с. 116—118.
15. Рикберг А. Б., Кузьменко А. П., Андрейченко В. А. и др. Морфогистохимическая и ультраструктурная характеристика селезенки и карциномы Герена на различных этапах криоультразвукового воздействия. — В кн.: Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических структур: Тез. докл. Всесоюз. симпоз. (Харьков, дек. 1977 г.). Киев, 1977, с. 78—79.
16. Сандомирский Б. П., Пекарский Д. Е., Исаев Ю. И. и др. Обоснование криохирургии термических ожогов в эксперименте. — Клин. хирургия, 1977, № 12, с. 3—7.

17. Сандомирский Б. П., Исаев Ю. И. Криотерапия термических поражений кожи. — Там же, 1978, № 3, с. 68—70.
18. Сандомирский Б. П., Коцько Н. И., Золочевская Л. И. Эффективность криовоздействия при резекции печени в эксперименте. — Вестн. хирургии, 1979, № 4, с. 24—26.
19. Ситковский Н. Б., Коломийцев А. К., Новак М. М. Клинико-морфологическое изучение результатов криохирургии жидким азотом гемангиом у детей. — Клини. хирургия, 1980, № 2, с. 32—34.
20. Филиппов Ю. П. Исследование криогенных систем для локального криовоздействия на биологические ткани: Автореф. дис. ... канд. техн. наук. — М., 1979. — 23 с.
21. Чернух А. М., Александров П. Н., Алексеев О. В. Микроциркуляция / Под ред. А. М. Чернух. — М.: Медицина, 1975. — 456 с.
22. Шенталь В. В., Трушкевич Л. И., Птуха Т. П. и др. Криогенный метод лечения в онкологии. — В кн.: Состояние и перспективы развития медицинской техники: Тез. докл. 1-го съезда Всесоюз. науч.-мед. техн. о-ва, М., 1975, 4.2, с. 108—109.
23. Эпштейн В. Г., Сандомирский Б. П. Область применения приближенного решения термической задачи криохирургии. — Криобиология и криомедицина, 1979, вып. 5, с. 78—81.
24. Ablin R. J., Reddy K. P. Cryosurgery of the monkey (Macaque) prostate. II. Apparent immunopathologic alterations following cryostimulation. — Cryobiology, 1977, 14, N 2, p. 205—214.
25. Arnott J. On the treatment of cancer by the regulated application of an anaesthetic temperature. — London: Churchill, 1851.
26. Augustynowicz S. D., Szmurlo W. F., Madej G. J. Cryosurgical nitrogen apparatus and recent results of its application in the radical treatment of certain neoplasms. — Cryobiology, 1977, 14, N 1, p. 52—59.
27. Barron R. F. Heat transfer problems in cryosurgery. — J. Cryosurgery, 1968, N 1, p. 316—325.
28. Chapman D., Urbina J. Phase transitions and bilayer structure of Mycoplasma Laidlawii B. — FEBS Lett., 1971, 12, N 1, p. 169—172.
29. Comini G., Giudice S. Тепловые аспекты криохирургии. — Теплопередача, 1976, № 4, с. 8—16.
30. Cooper T. E., Trezek G. F. Analytical prediction of the temperature field emanating from a cryogenic surgical canula. — Cryobiology, 1970, 7, N 2/3, p. 79—93.
31. Cooper T. E., Trezek G. F. Rate of lesion growth around spherical and cylindrical cryoprobe. — Ibid., 1971, 7, N 4/6, p. 183—190.
32. Cooper T. E., Petrovic W. K. An experimental investigation of the temperature field produced by a cryosurgical canula. — J. Heat Transfer, Ser. C, 1974, 96, N 3, p. 415—420.
33. Cravalho E. G. An analytical prediction of the spatial extent of necrosis in cryosurgery. — Cryobiology, 1971, 8, N 4, p. 396—398.
34. Eletr S., Inesi G. Phase changes in the liquid moisties of sarcoplasmic reticulum membranes induced by temperature and protein conformation changes. — Biochim. et biophys. acta, 1972, 290, N 1, p. 178—185.
35. Farrant J., Walter C. A., Heather Lee et al. Use of two-step cooling procedures to examine factors, influencing cell survival following freezing and thawing. — Cryobiology, 1977, 14, N 3, p. 273—286.
36. Lee A. G. Functional properties of biological membranes: a physical-chemical approach. — Progr. Biophys. Mol. Biol., 1975, 29, N 1, p. 3—56.
37. Lenz H., Goertz W., Preussler H. The freezing treshhold of the peripheral motor nerve: An electrophysiological and light-microscopical study on the sciatic nerve of the rabbit. — Cryobiology, 1975, 12, N 5, p. 486—496.
38. Ling G. R., Tien C. L. Analysis of cell freezing and dehydration. — J. Heat Transfer, 1970, 92, N 3, p. 393—398.
39. Lovelock J. E. Denaturation of lipid—protein complexes as a cause of damage by freezing. — Proc. Roy. Soc. Ser. B. Biol. Sc., 1957, 147, N 929, p. 427—433.
40. Luyet B., Rapatz G. A review of basic researches on the cryopreservation of red blood cells. — Cryobiology, 1970, 6, N 5, p. 425—441.
41. Lyons J. M. Phase transitions and control of cellular metabolism at low temperature. — Ibid., 1972, 9, N 5, p. 341—350.
42. Mansoori C. A. Kinetics of water loss from cells at subzero centigrade temperatures. — Ibid., 1975, 12, N 1, p. 34—45.
43. Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. — J. Gen. Physiol., 1963, 47, N 2, p. 347—369.
44. Mazur P. Physical and chemical basis of injury in single — celled micloorganismes subjected to freezing and thawing. — In: Cryobiology / Ed. by H. T. Meryman. New York; London: Acad. press, 1966, p. 213—315.
45. Mazur P. Physical-chemical factors underlying cell injury in cryosurgical freezing. — In: Cryosurgery / Ed. by R. W. Rand, A. P. Rinfret. Springfield, 1968, p. 32—51.
46. Mazur P. Cryobiology: The freezing of biological systems. — Science, 1970, 168, N 135, p. 939—949.

47. Meryman H. T. General principles of freezing and freezing injury in cellular materials. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1960, 85, p. 503—509.
48. Meryman H. T. Review of biological freezing. — In: Cryobiology / Ed. by H. T. Meryman, New York; Acad press., London, 1966, p. 2—144.
49. Meryman H. T. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. — Cryobiology, 1971, 8, N 6, p. 489—500.
50. Meryman H. T., Williams R. J., Douglas M. St. J. Freezing injury from "Solution effects" and its prevention by natural or artificial cryoprotection. — Ibid., 1977, 14, N 3, p. 287—302.
51. Morris G. L., Farrant J. Interactions of cooling rate and protective additive on the survival of washed human erythrocytes frozen to -196°C . — Ibid., 1972, 9, N 2, p. 173—182.
52. Practical cryosurgery / Ed. by H. B. Holden. — [London]: Pitman med., 1975. — 168 p.
53. Pushkar N. S., Itkin Yu. A., Bronstein V. L. et al. On the problem of dehydration and intracellular crystallization during freezing of cell suspensions. — Cryobiology, 1976, 13, N 3, p. 147—152.
54. Rodgers B. M., Talbert J. L. Clinical application of endotracheal cryotherapy. — J. Pediat. Surg., 1978, 13, N 6D, p. 662—668.
55. Rothenborg H. W. Cryoprotective properties of vasoconstriction. — Cryobiology, 1977, 14, N 3, p. 349—361.
56. Rubinsky B., Shitzer A. Исследование задачи Стефана для биологической ткани вокруг криохирургического зонда. — Теплопередача, 1976, № 3, с. 187—193.
57. Shulman S. Cryo-immunology and autoantibodies. — J. Saint. Barnabas Med. Center, 1961, 4, N 1, p. 308—313.
58. Shulman S., Yantorno C., Bronson P. Cryo-immunology: a method of immunization to autologous tissue. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1967, 124, p. 658—661.
59. Simatos D., Turc J. M. Fundamentals of freezing in biological systems. — Freeze Drying and Adv. Food Technol., 1975, 716, p. 17—28.
60. Smith J. J., Frazer J., Mac Iver A. G. Ultrastructure after cryosurgery of rat liver. — Cryobiology, 1978, 15, N 4, p. 426—432.
61. Trnavsky G. Quantitative Durchblutungsmessung vor, während und nach Eisapplikation zum wirkungs mechanismus der Kryotherapie. — Vasa, 1979, 8, N 1, S. 20—22.
62. Walder M. D. Experimental cryosurgery. — In: Cryosurgery. Ed. by R. W. Rand / A. P. Rinfret. Springfield, 1968, p. 3—18.
63. Zacarian S. A., Stone D., Clater M. Effects of cryogenic temperatures on microcirculation in the golden hamster cheek pouch. — Cryobiology, 1970, 7, N 1, p. 27—39.
64. Zacarian S. A. Cryosurgery of tumors of the skin and oral cavity. — Springfield: Charles Thomas Publ., 1973. — 293 p.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
27.06.80

УДК 57.043

А. Шольц, Г. Себастиан, В. Бертхольд,
В. Маттойс, Л. Песслер, Б. Кирхнер

КРИОХИРУРГИЧЕСКОЕ ЛЕЧЕНИЕ АНГИОМ КОЖИ И СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ

Использование низких температур при лечении доброкачественных и злокачественных опухолей получает в настоящее время все большее распространение. Сотрудничество медиков и техников привело к созданию технического оборудования и аппаратуры, позволяющих применять криохирургию в самых различных областях медицины [4, 8, 9, 15, 20, 23].

При лечении доброкачественных сосудистых аномалий и новообразований до сих пор преобладали хирургические методы, различные виды лучевой терапии и электрокаустика. Однако размеры опухоли и ее локализация не всегда позволяют добиться стойкого излечения, а поэтому перед клиницистами возникают проблемы, какому из предложенных методов терапии отдать предпочтение.

В данной статье представлены результаты лечения больных с ангиомами кожи и слизистых оболочек криогенным методом, который, по нашему мнению, вполне оправдан при данной патологии.

Материалы и методика. Сосудистые аномалии и новообразования в настоящее время подразделяются на сосудистые невусы и сосудистые опухоли [11, 13, 16, 19]. Поскольку результаты лечения антиэктатических невусов были рассмотрены в работе [21], в данной статье излагается только опыт применения криотерапии при лечении ангиом.

Ангиомы являются истинными опухолями с пролиферацией элементов сосудистых стенок. При капиллярных ангиомах дифференциация стенок происходит только за счет капилляров. Кавернозные ангиомы, напротив, характеризуются развитием соединительнотканых структур, которые повторяют строение артерий и вен, образуя крупные полости различной формы. Клиническая характеристика материала и их локализация представлены ниже.

Виды ангиом	Количество случаев
Капиллярные:	
плоскошероватые и шероватозно-узловатые гемангиомы	53
старческие ангиомы	5
Кавернозные	138
Всего	196

Чаще всего ангиомы встречались в области губ, слизистой рта и носоглотки. Из 116 случаев ангиомы чаще всего локализовались в области губ и края языка.

Локализация	Количество случаев
Волосистая часть головы	4
Лоб и виски	14
Веки	33
Нос	9
Щеки	6
Губы, область рта и носоглотка	166
Уши	2
Шея, затылок	5
Туловище	17
Конечности	6
Всего	262

Инструментарий и применяемая техника. Для лечения ангиом применялись методы контактного замораживания и замораживание — рас-

Локализация	Количество случаев
Губы	34
Язык	10
спинка	31
край	5
корень	
Дно рта и альвеолярный отросток	1
Слизистая оболочка щеки	16
Твердое нёбо и альвеолярный отросток	4
Мягкое нёбо с миндалинами	13
Гортаноглотка	2
Всего	116

пыление. При этом использовался инструментарий, который был создан рабочей и исследовательской группой «Криомедицина» Дрезденской медицинской академии «Карл Густав Карус» [15]. Контактное замораживание осуществлялось азотным криоаппликатором ИКГ-1, изготовленным Народным предприятием испытательных приборов, г. Мединген. Диаметр наконечника аппликатора от 4 до 12 мм. Этот прибор предназначен для кратковременной контактной криотерапии. Азотный

аппликатор для длительной терапии ИЕГ-2 можно использовать как для контактного замораживания, так и для замораживания распылением. При контактном замораживании прибором ИКГ-2 используются криозонды, позволяющие интенсивно воздействовать холодом на ткани. Контактные площади имеют при этом следующие размеры: 20×20 мм; 30×30 и 60×25 мм. При замораживании распылением охлаждающее средство распыляется непосредственно на подлежащую лечению площадь, при этом нормальные ткани вокруг закрываются. Для лечения ангиом слизистой полости рта был разработан метод с использованием пульверизатора [17].

Из акрилата изготавливают крышку, соответствующую величине опухоли. Край крышки приклеивается гистокрилом к хорошо высушенной слизистой оболочке таким образом, чтобы опухоль находилась во внутренней части крышки. Во внутреннюю часть крышки впрыскивают жидкий азот, который в виде газа выходит через второе отверстие наружу. Это отверстие должно быть достаточно большим, так как испарение азота связано со значительным расширением. В противном случае крышка может оторваться в результате повышенного давления.

Результаты лечения. Ангиомы кожи. Послеоперационное течение характеризовалось тем, что в первые дни на месте криоаппликаций возникали эритема и отек с последующим образованием волдырей и эрозий. В течение первой недели ограничивался участок некроза, и после его отторжения чистое дно раны эпителизировалось в последующие 3—4 недели. В результате криотерапии на коже образовывались гладкие, мягкие и в большинстве случаев слегка депигментированные рубцы. Каких-либо осложнений в виде кровотечений, незаживающих изъязвлений или повреждений не наблюдалось.

Плоскошероховатые ангиомы у детей грудного возраста после криотерапии полностью исчезали, на их месте оставались нежные рубцы с белесым оттенком (рис. 1). При шероховато-узловатых ангиомах были получены также хорошие результаты.

Ангиомы в области слизистой оболочки. Криолечение ангиом слизистой губ, щек, твердого нёба и языка проводилось в амбулаторных условиях. В большинстве случаев отсутствовала необходимость в применении анестезии и только в отдельных случаях прибегали к местной инфильтрационной анестезии. Ангиомы большого размера, особенно при локализации в области корня языка с переходом на миндалины и в области гортаноглотки, требовали примерно 7 дней лечения в условиях стационара в связи с опасностью отека гортани вплоть до асфиксии и затрудненным приемом пищи.

Вопрос о том, проводить ли операцию под эндотрахеальным наркозом или без дополнительной анестезии, решался индивидуально в зависимости от локализации опухоли и психического состояния больного. Во время оперативного вмешательства и в послеоперационном периоде не наблюдалось таких опасных осложнений, как кровотечение и отек гортани, даже у больных с локализацией ангиомы в грушевидном синусе.

При ангиомах величиной больше лесного ореха в большинстве случаев после нескольких недель был необходим дополнительный сеанс криотерапии. Маленькие очаги всегда ликвидировались окончательно после первого сеанса. У всех больных был получен хороший функциональный или косметический результат. Использование антибиотиков не требовалось, так как заживление ран протекало во всех случаях без осложнений.

Обсуждение результатов. По сравнению с принятыми методами терапии результаты криотерапии сосудистых аномалий и новообразований необходимо оценивать, учитывая локализацию и размеры опухолей,

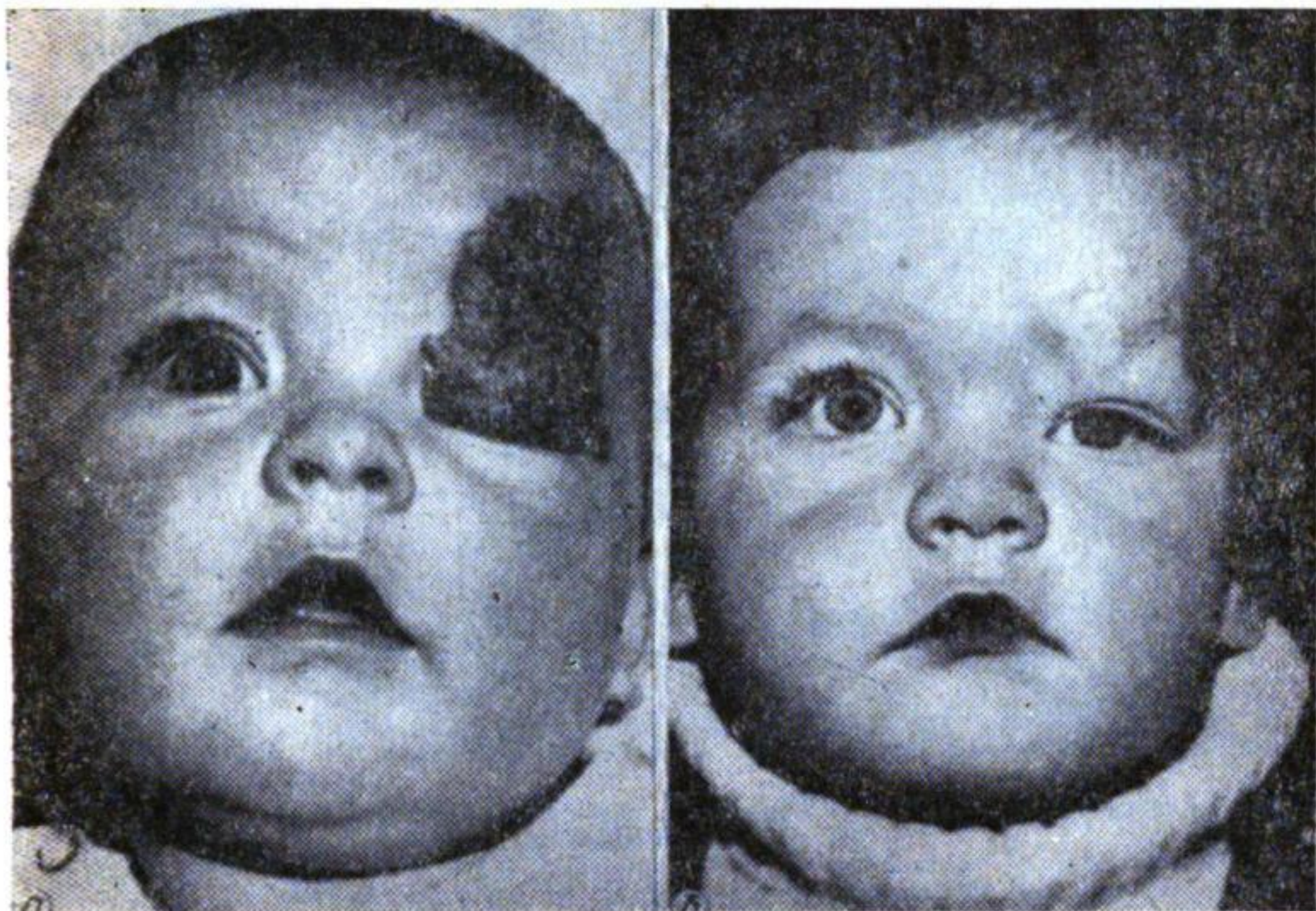


Рис. 1. Быстро растущая гемангиома у шестимесячного ребенка (а); через пять месяцев после лечения методом контактного замораживания (б).

а также косметические и функциональные результаты. Имеет значение также оценка применяемой криогенной техники.

Капиллярные ангиомы у детей грудного возраста дают в подавляющем большинстве случаев высокий процент самопроизвольного излечения, в связи с чем чаще всего применяется выжидательная тактика при условии постоянного наблюдения за больным [12, 14, 22]. Активное лечение применяют при ускоренном росте ангиомы, особенно при таких функционально-критических локализациях, как веки, кончик носа и губы, когда в результате давления и смещения могут возникнуть осложнения. Это относится и к тем случаям, когда гемангиома приводит к опущению верхнего века и его край закрывает область зрачка. При этом у детей раннего возраста возникает опасность амблиопии, что должно предотвращаться своевременным лечением гемангиомы. Необходимо особо отметить очень благоприятные функциональные и косметические результаты криотерапии именно при лечении ангиом века (предотвращение аномалий положения краев век и ресничек, щажение слезных точек и слезных канальцев).

Учитывая это, мы провели лечение 35 больных методом криотерапии с плоскошероватыми ангиомами. После лечения они полностью регрессировали, шероховато-узловатые ангиомы удалось значительно выровнять.

Таким образом, мы можем подтвердить опыт других клиницистов [1, 2, 7, 22], которые при определенных показаниях настоятельно рекомендуют применение низких температур при капиллярных ангиомах. Многие авторы в настоящее время в связи с этим отказываются от лучевой терапии [14, 18], поскольку наблюдались отдельные случаи возникновения рака на рубцах после лучевой терапии гемангиом, подвергшихся облучению в юношеском возрасте [8].

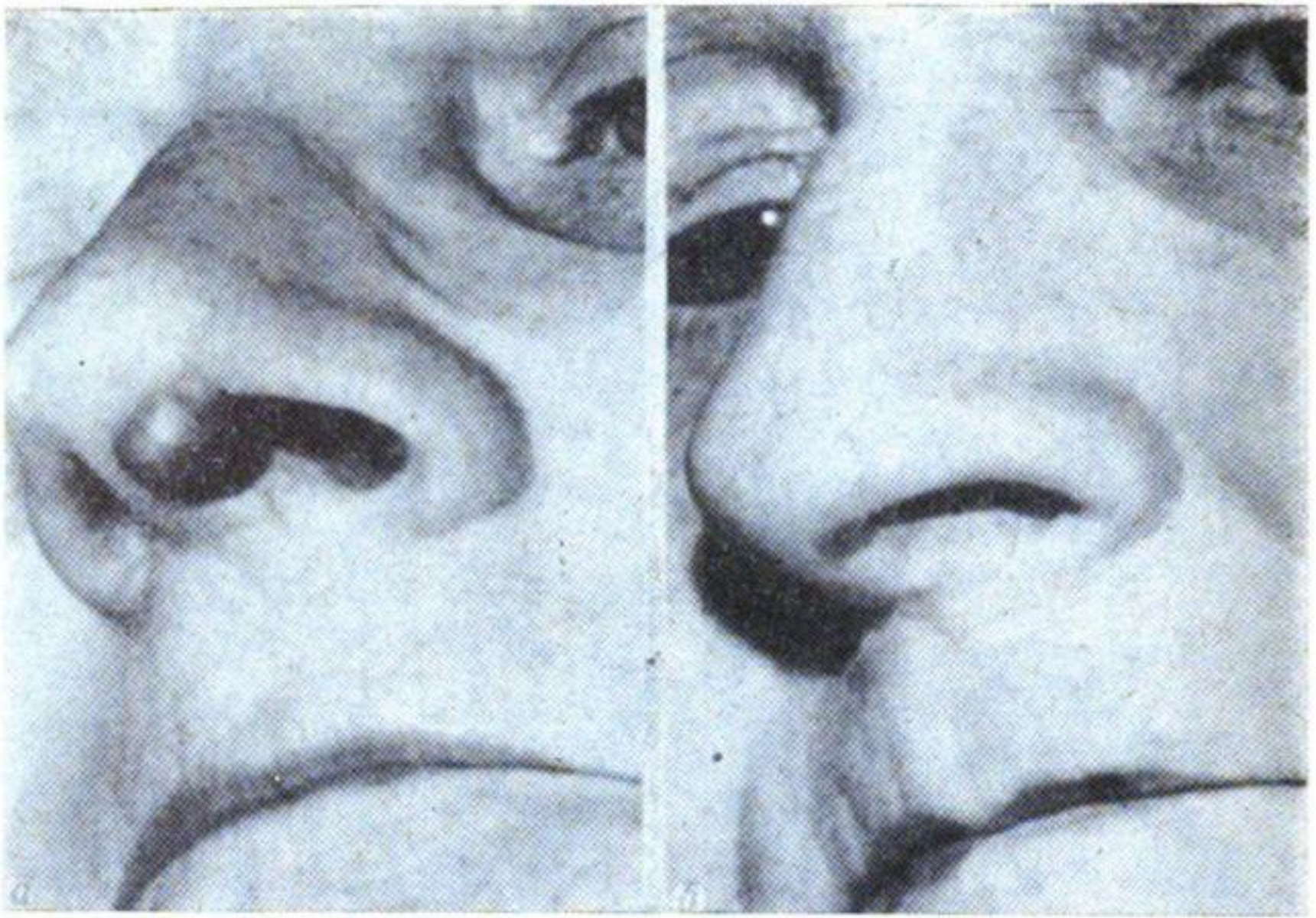


Рис. 2. Кавернозная ангиома в области носа у больного 54 лет (а); через два месяца после лечения (б).

Поскольку кавернозные ангиомы с их соединительнотканными и мышечными структурами стенок не проявляют склонности к самопроизвольной регрессии, при соответствующих жалобах (кровотечении после ранения, ущербе речи, нарушении актов глотания и дыхания) всегда необходима активная терапия. При этом хирургические методы, электрокаустика, внутритканевая радиотерапия или другие методы наружного облучения приводят часто к рецидивам. Причиной этого является чаще всего неполное удаление опухоли из-за кровотечения и вынужденного ограничения облучения, чтобы не вызвать функциональных и косметических нарушений. Проблема выбора метода терапии возникает в связи с этим прежде всего при следующих локализациях: веки, кончик и перегородка носа, угол рта, а также полость рта, глотка и гортань.

Опыт применения криохирургии при лечении 138 агрессивно не увеличивающихся кавернозных ангиом показал, что использование низких температур является альтернативой терапии при перечисленных локализациях (рис. 2). Убеждение в преимуществе криотерапии базируется на том, что в результате криовоздействия ангиомы подвергаются инволюции без осложнений и опасности кровотечений, а также на отличных функциональных и косметических результатах. Соответствующая оценка этого метода дана в работах [1—3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 17]. Следует подчеркнуть, что криотерапия ангиом особенно показана у больных с гемофилией. При локализации ангиом на коже применялось исключительно контактное замораживание. Только, если опухоль располагалась на слизистой оболочке, использовали замораживание распылением. Контактная обработка приборами ИКГ-1 и ИКГ-2 с замкнутой системой криозондов имеет то преимущество, что сосуды опухоли под давлением наложенных аппликаторов сжимаются, тепловое сопротивление тока крови, таким образом, снижается, что значительно усиливает холодовое воздействие.

Преимущество замораживания методом распыления (орошения) состоит в оптимальной передаче холода с повышенной степенью охлаж-

дения. Однако этот эффект значительно нейтрализуется при недостаточном сжатии высоким тепловым сопротивлением опухоли сосуда. При локализации ангиом в плоскости рта криораспыление производилось с использованием пульверизатора и предложенные методы оказались успешными.

Таким образом, можно утверждать, что криотерапия может служить одним из методов выбора при лечении как первичных, так и рецидивных кавернозных ангиом. При капиллярных ангиомах криотерапия является высокоэффективным методом, расширяя диапазоны современных средств терапии доброкачественных опухолей кожи и слизистой оболочки. Значительным преимуществом ее является также возможность проведения в амбулаторных условиях.

1. Гераскин В. И., Шафранов В. В., Гробишев В. В., Репников Г. И. Криохирurgia гемангиом у детей. — Хирургия, 1979, № 11, с. 58—62.
2. Пачес О. А., Шенталь В. В. Криогенный метод лечения гемангиом у детей. — В кн.: Опухоли головы и шеи. Ташкент: Медицина, 1977, с. 150—157.
3. Прусаков В. А., Митрофанов Г. Г., Комаров В. А. Хирургия гемангиом полости рта и лица. — Стоматология, 1976, № 22, с. 49—51.
4. Adamus J., Przywara S., Godel M. Kriochirurgia w Leczeniu nowotworow jamy ustnej. — Otolaryngol. pol., 1974, 27, N 1, s. 41—46.
5. Charachon R., Junien-Larillauroy C., Accoyer B. et al. The place of cryosurgery in the treatment of supraglottic angiomas in the infant. — Clin. Otolaryngol., 1977, 2, N 2, p. 207—211.
6. Emmings F. G., Koepf S. W., Gage A. A. Cryotherapy for benign lesions of the oral cavity. — J. Oral Surg., 1967, 25, N 5, p. 320—326.
7. Goldwin R. M. Evaluation of cryosurgery for hemangiomas. — In: ZACA — RIAN, S. A.: Cryosurgical advances in dermatology and tumors of the head and neck. Springfield: Charles C., Thomas, 1977, p. 75—78.
8. Hadlich J., Linse R. Basaliome nach Hämangiombestrahlung. — Dtsch. Gesundheitsw., 1979, 34, N 5, S. 447—449.
9. Hausamen J. E. The basis, technique and indication for cryosurgery in tumors of the oral cavity and face. — J. max. fac. Surg., 1975, 3, N 1, p. 41—49.
10. Henderson R. L. Cryosurgical treatment of hemangiomas. — Arch. Otolaryngol., Chicago, 1971, 93, N 6, p. 511—513.
11. Hundeiker M. Gefäßnaevi und Gefäßgeschwulste der Haut. — Forschr. Med., 1979, 97, S. 1495—1504.
12. Jarzab G. Clinical experience in the cryosurgery of hemangioma. — J. max. fac. Surg., 1975, 3, N 1, p. 146—149.
13. Leopard P. I., Poswillo D. E. Practical cryosurgery for oral lesions. — Brit. Dent. J., 1974, 136, N 2, p. 185—196.
14. Luger A. Strahlentherapie der Hämangiome. — Pädiat. Prax., 1973, 13, N 2, S. 133—146.
15. Matthäus W., Krantz H. Kryotherapie in der Augenheilkunde. — Dresden: Steinkopff, 1973. — 257 S.
16. O'neil J. V., Snyder G., Toomey J. M. Cryosurgery of supraglottic cavernous hemangioma. — Arch. Otolaryngol., Chicago, 1976, 102, N 1, p. 55—57.
17. Pässler L., Weise R., Eckelt U. Besonderheiten der Kryotherapie in der Mundhöhle. — Stomatol. DDR, 1980, 30, S. 140—144.
18. Schieferstein G. Zur Strahlentherapie der Hämangiome. — Z. Hautkr., 1970, 45, N 5, S. 483—494.
19. Schnuder F. W. Hämangiome (einschließlich Teleangiektasien und verwandte Hauterscheinungen). — In: Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten. Berlin etc.: Springer, 1963, S. 495—567.
20. Scholz A., Sebastian G. Möglichkeiten und Grenzen der Kryotherapie in der Dermatologie. — Dtsch. Gesundheitsw. 1980, 35, S. 1024—1028.
21. Sebastian G., Scholz A. Therapeutische Anwendung tiefer Temperaturen bei angeborenem Naevus und Hämangiomen. — Acta chirurgiae maxillo-facialis, 1980, N 1, s. 43—49.
22. Wulf K. Behandlung von Hämangiomen bei Kindern. — Pädiat. Prax., 1973, 13, N 2, S. 147—151.
23. Zacarian S. A. Cryosurgical advances in dermatology and tumors of the head and neck. — Springfield: Charles C., Thomas, 1977. — 270 p.

Медицинская Академия
«Карл Густав Карус», Дрезден, ГДР

Поступила в редколлегию
03.03.80

*Г. А. Бабийчук, С. В. Луденцова,
Е. Я. Панков, И. Ю. Микляев*

СОСТОЯНИЕ НЕЙРОСЕКРЕТОРНЫХ ЯДЕР ПЕРЕДНЕГО ГИПОТАЛАМУСА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ НЕКРОЗЕ МИОКАРДА И ГИПОТЕРМИИ

В исследованиях функционального значения гипоталамо-гипофизарной системы для регуляции сердечно-сосудистой деятельности была обнаружена важная роль этих эндокринных образований. В эксперименте было установлено, что гипоталамус оказывает регулирующее влияние на вазомоторы и, следовательно, на сосудистый тонус.

В настоящее время наряду с экспериментальными доказательствами роли гипоталамуса в регуляции деятельности сердечно-сосудистой системы имеется большой клинический материал, показывающий зависимость нарушений сердечно-сосудистой системы от функции ядер гипоталамуса.

В связи с изложенным выше мы считали целесообразным установить изменение состояния ядер переднего гипоталамуса при экспериментальном некрозе миокарда и кранио-церебральной гипотермии.

Эксперименты проведены на 20 беспородных собаках массой 20—25 кг. Инфаркт миокарда моделировали с помощью перевязки нисходящей ветви левой коронарной артерии на границе верхней и средней трети. Умеренная гипотермия (31—30°C) достигалась с помощью аппаратуры, изготовленной в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР и обладающей возможностью программного охлаждения.

Для исследования извлекали мозг, вычленяли гипоталамическую область и проводили гистологическую обработку с окраской по методу Гомори в модификации А. Л. Поленова.

У интактных собак гипоталамус занимает на основании мозга центральное место: крупноклеточные нейросекреторные ядра — парные супрооптическое и паравентрикулярное — составляют группу ядер переднего гипоталамуса. На фронтальных срезах на уровне хиазмы, латеральнее перерезанных артериальных трактов начинают появляться нейроны супрооптических ядер, неплотно примыкающих один к другому. Нейроны супрооптических ядер представляют собой крупные нервные клетки округлой или неправильно многогранной, иногда удлиненной формы. Нейросекреторные клетки парного супрооптического ядра располагаются латерально от оптической хиазмы, а также вдоль боковых плоскостей зрительного тракта.

Парное паравентрикулярное ядро имеет меньшую протяженность, чем супрооптическое, оно располагается вдоль стенки третьего желудочка. Сравнительно небольшие индивидуальные колебания в размерах нейросекреторных клеток наблюдаются в супрооптических и паравентрикулярных ядрах. При этом клетки супрооптического ядра несколько больше, чем паравентрикулярного. Наблюдается также небольшое разнообразие клеточных форм, причем большинство нейронов супрооптического ядра — средних размеров с умеренным содержанием секреторных гранул (около 65%). Отчетливо видны ядра клеток и ядерная мембрана. Имеется некоторое количество крупных светлоокрашенных нейронов (до 25%) вследствие бедности их секреторными гранулами.

Незначительная часть клеток (до 15%) содержит большое количество Гомори-положительного нейросекреторного вещества, гранулы которого могут сливаться в общую массу, маскирующую ядро.

Кроме этих основных клеток, встречаются дегенерирующие нейроны. Их, как правило, не более 5%. Тело нейрона уплощено и имеет вид комочка гомофильных субстанций.

Следовательно, в супрооптическом ядре интактных собак встречаются различные типы нейронов, отражающие их функциональное состояние: 1) умеренно окрашенные нейроны (55—65%); 2) клетки, бедные нейросекретом (22—30%); 3) клетки, обильно заполненные нейросекретом (12—65%); 4) дегенерирующие нейроны (2—5%).

В паравентрикулярных ядрах преобладающими являются умеренно окрашенные нейроны (до 75%). Небольшое количество клеток густо заполнено нейросекретом (до 15%), реже встречаются крупные светлоокрашенные нейроны с незначительным количеством нейросекреторного вещества (до 7—10%). Дегенеративно измененные темноокрашенные нейроны имеют наименьшую величину и встречаются в тех же соотношениях, что и в супрооптическом ядре (рис. 1).

В ходе собственных исследований проведено изучение гипоталамуса собак в первые 30—90 мин после оперативной перевязки левой вечной артерии. Супрооптические ядра таких собак имеют следующие изменения по сравнению с интактными: большинство клеток сморщено, у них нарушены четкие контуры клеточных мембран, так что граница некоторых клеток не определяется; уплотнены и деформированы ядра (лежат плотным комком неправильной формы, изрезаны контуры ядерных мембран), не определяются ядрышки.

Преобладают умеренно окрашенные клетки средних размеров, встречаются темные мелкие клетки, заполненные Гомори-положительными гранулами (рис. 2). Наблюдается небольшое количество светлых крупных нейронов с четко выраженными ядрышками, ядерной и клеточной мембранами (до 10%).

Преобладают умеренно окрашенные нейроны с деформированными ядрами и ядерными мембранами и мелкой пылевидной зернистостью (до 50%).

Наличие таких нейронов следует рассматривать как угасание нейросекреторной функции клеток, которой предшествовала повышенная их активность.

На застойные явления в супрооптических ядрах указывает и наличие темноокрашенных нейронов с большим количеством нейросекреторного вещества.

Следует отметить, что угнетение функциональной активности наблюдается и в па-

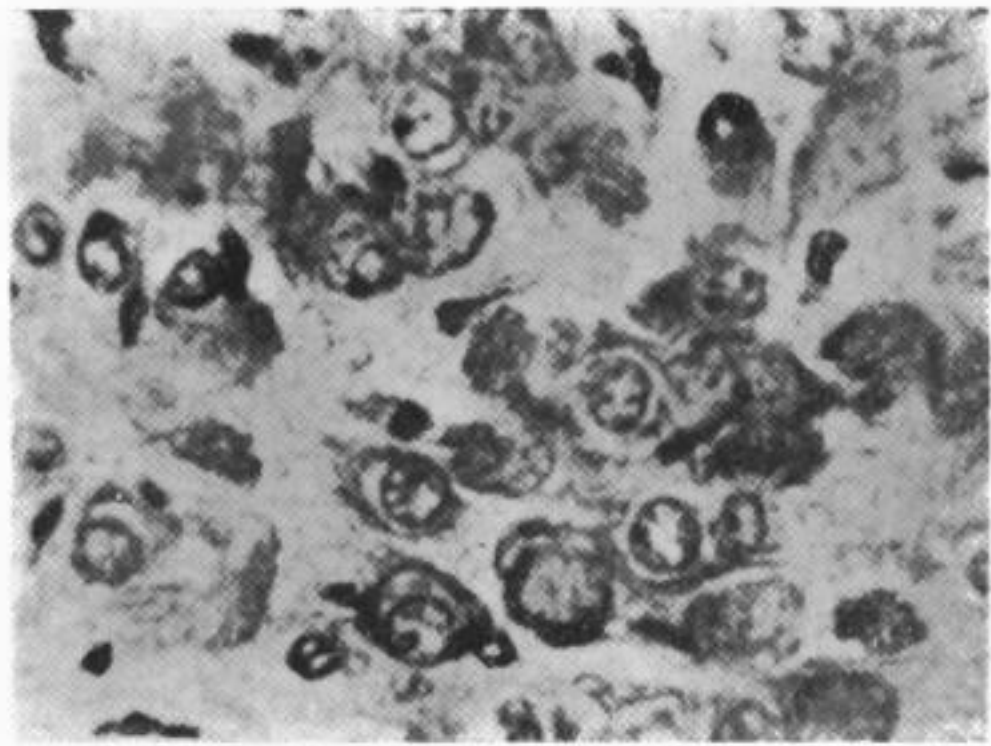


Рис. 1. Супраоптическое ядро гипоталамуса интактной собаки. Окраска по Гомори — Поленову. Об. $\times 40$, ок. $\times 8$.

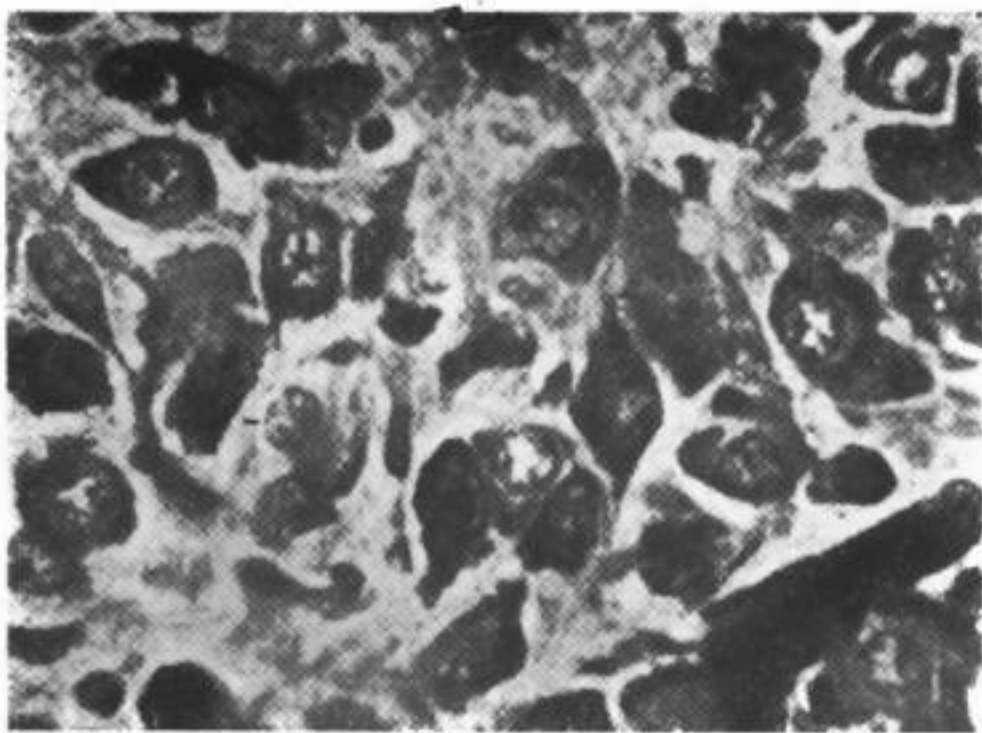


Рис. 2. Супраоптическое ядро гипоталамуса собаки через 40 мин после перевязки левой коронарной артерии. Окраска по Гомори — Поленову. Об. $\times 25$, ок. $\times 10$.

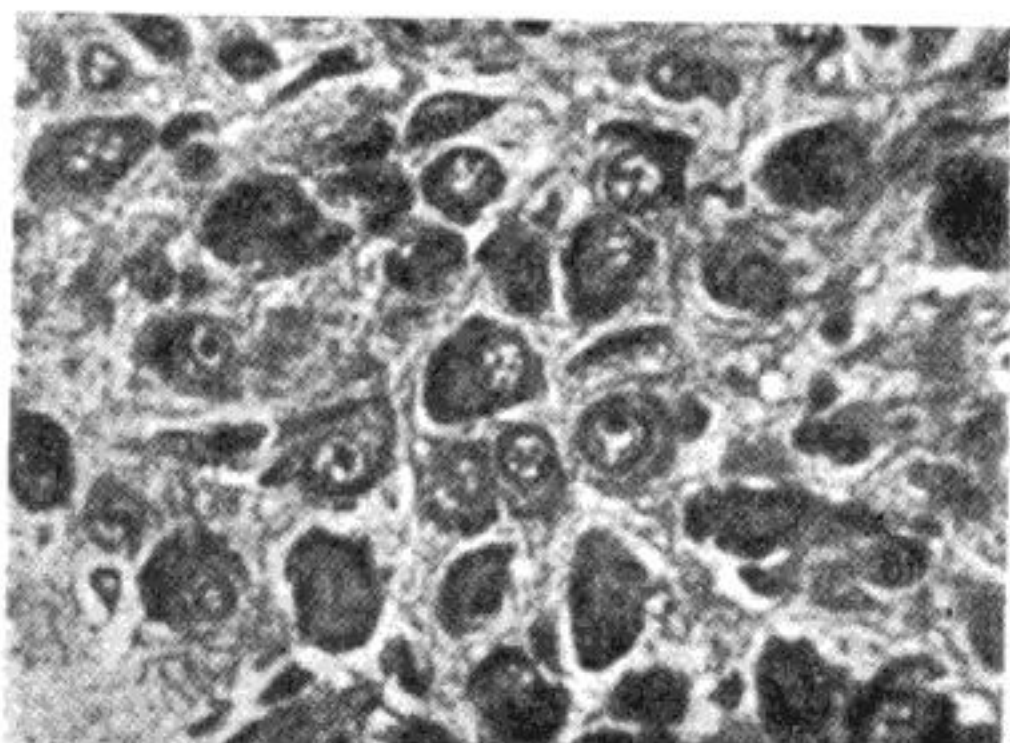


Рис. 3. Супраоптическое ядро гипоталамуса собаки с некрозом миокарда после проведения кранио-церебральной гипотермии. Окраска по Гомори — Поленову. Об. $\times 40$, ок. $\times 8$.

для нейронов крупноклеточных ядер, присутствие которой указывает на интенсивные секреторные процессы в клетках.

Таким образом, ишемия миокарда в ранние после перевязки венечной артерии сроки вызывает в нейросекреторных ядрах гипоталамуса резкую активацию нейронов, ведущую к замедлению и угнетению впоследствии функции нейросекреции в них, что подтверждается изменением соотношения клеток и их морфологической структуры.

Следует отметить, однако, что не у всех опытных собак степень угнетения функциональной активности нейронов выражена одинаково. В большинстве случаев (63%) преобладает угнетение фазы синтеза нейросекрета (клетки опустошены, зернистость в них мелкая, слабовыраженная, иногда наблюдаются пустые полости в цитоплазме клеток; границы клеток размыты, поэтому контуры последних определяются с трудом, отсутствует субстанция Ниссля).

При экспериментальном некрозе миокарда и кранио-церебральной гипотермии наблюдается следующая реакция нейросекреторных клеток гипоталамуса: большинство нейронов — темноокрашенные, с четко выраженными границами цитоплазмы, средних размеров (до 70%), имеются мелкие нейроны, густо заполненные нейросекреторными гранулами (рис. 3). Ядра в них часто не видны, замаскированы глыбками секрета, этих нейронов до 20%. Такое количество наблюдаемых нейронов явно указывает на застойные процессы нейросекреции в супрооптических ядрах, а именно на фазу задержки выведения нейросекрета из цитоплазмы нейронов. Имеется незначительное количество умеренно окрашенных нейронов правильной овальной формы с четко выраженными ядром, ядрышком, субстанцией Ниссля и мелкими глыбками се-

равентрикулярных ядрах, однако здесь оно выражено менее заметно. Клетки в паравентрикулярных ядрах преимущественно средние и мелкие, преобладают умеренно окрашенные нейроны. Наряду с этим наблюдается практически полное исчезновение светлых нейронов.

Из крупных умеренно окрашенных нейронов преобладают клетки с нечетко выраженными границами, пикнотичными ядрами с мелкой зернистостью, расположенные по всей цитоплазме клеток.

В клетках отсутствует субстанция Ниссля, характерная

Изменение соотношения нейронов в супраоптических ядрах переднего гипоталамуса в различных экспериментальных условиях, %

Вид	Интakт-ные собаки	Кардиогенный шок	Некроз миокарда с гипотермией
Умеренно окрашенные нейроны	55—65	68—70 (с признаками дегенерации)	8—10
Клетки, бедные нейросекретом (светлоокрашенные)	22—30	7—10	—
Клетки, обильно заполненные нейросекретом (темноокрашенные)	10—15	8—10	70—72
Дегенерирующие нейроны	2—5	7—10	20—22

крета, таких нейронов до 7—10%. Совершенно отсутствуют светлые круглые нейроны (см. таблицу). Аналогичные нейроны наблюдаются в паравентрикулярных ядрах.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об изменении нейросекреторных процессов ядер переднего гипоталамуса в сторону угнетения их активности с последующей фазой усиленной активности при экспериментальном инфаркте миокарда и гипотермии и указывают на тесную зависимость функции ядер переднего гипоталамуса от состояния сердечно-сосудистой системы. Это обстоятельство необходимо учитывать при возможном применении умеренной кранио-церебральной гипотермии как метода лечения некроза миокарда.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
29.09.80

УДК 57.043.616.31—001.4:615.832.9:576.8

*И. П. Высеканцев, Р. В. Точиловская,
К. В. Григорьева, В. И. Стогний*

ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА МИКРОФЛОРУ ХРОНИЧЕСКИХ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ЯЗВ, ЭРОЗИЙ, ТРЕЩИН СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА

Метод криотерапии различных заболеваний слизистой оболочки полости рта и губ прочно вошел в практическую стоматологию. Однако до настоящего времени вопрос о влиянии низких температур на микрофлору ротовой полости в литературе не освещен.

Настоящая статья посвящена изучению влияния низких температур (-196°C) на микрофлору хронических неспецифических эрозий, язв, трещин слизистой оболочки полости рта.

Методика исследования. В работе использовали криоаппарат КАС-01, воспроизводящий парожидкостную струю азота. Исследование проведено на экспериментальном и клиническом материалах. В эксперименте на 14 собаках и 36 кроликах получены модели хронических язв, по клинической и цитоморфологической картине сходных с таковыми у человека.

Исследование микрофлоры хронических язв как в эксперименте, так и в клинике производили до криовоздействия и сразу же после оттаивания ледяной корки. Забор материала осуществляли по методике, рекомендованной для микробиологических исследований в стоматологии [2, 3]. Используемый материал культивировали в мясо-пептонном бульоне при температуре 37°C в течение 18 ч, после чего пересевали на чашку с мясо-пептонным агаром. Через сутки определяли вид микробов по морфологическим, культуральным, биохимическим и патогенным свойствам.

Определение серологической группы выделенного стрептококка производилось с помощью реакции преципитации групповыми кроличьими сыворотками, полученными из Института эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи. Экстракты, содержащие групповую субстанцию, готовили по методу Ленсфильд в модификации, применяемой в ИЭиМ им. Н. Ф. Гамалеи [4].

Результаты и их обсуждение. При бактериологическом исследовании микрофлоры хронических язв слизистой оболочки полости рта и губ у 28 ($77,77 \pm 1,73\%$) из 36 экспериментальных кроликов до и после криовоздействия были выделены микроорганизмы, растущие на мясо-пептонном агаре круглыми, слегка возвышающимися над его поверхностью колониями. Колонии имели ровные края, золотистый цвет. В маз-

ках, окрашенных по Граму, были обнаружены грамположительные кокки, расположенные неправильными гроздьями. Культуры выделенных микроорганизмов ферментировали глюкозу, лактозу, сахарозу, мальтозу, глицерин и маннит с образованием кислоты без газа, давали незначительный гемолиз на агаре с 5% дефибрированной бараньей крови, вызывали при внутрикожном введении кроликам гиперемию и инфильтрат, сварачивали цитратную плазму кролика через шесть и более часов, что позволило их отнести к группе условно-патогенных золотистых стафилококков [1]. При дальнейшей идентификации выделенных культур с помощью основного набора стафилококковых бактериофагов они лизировались бактериофагами I группы.

У восьми кроликов ($22,23 \pm 1,47\%$) были выделены грамположительные кокки, располагающиеся короткими цепочками, растущие на 5%-ном кровяном агаре мелкими колониями, окруженными выраженной зоной гемолиза. Культуры этих микроорганизмов не редуцировали метиленовую синьку в молоке, не давали роста в 40%-ном желчном бульоне, расщепляли лактозу, сахарозу, салицин, аргинин. При внутрибрюшинном введении белым мышам массой 14—16 г восемнадцатичасовых бульонных культур, содержащих $5 \cdot 10^6$ — $5 \cdot 10^7$ микробных тел, гибель животных наступала на 1—3 сутки. Выделенные из суточных культур экстракты, содержащие групповую субстанцию, давали реакцию преципитации со стрептококковой кроличьей сывороткой серогруппы А. Перечисленные свойства позволили отнести выделенные микроорганизмы к β -гемолитическим стрептококкам серогруппы А [4].

При повторном изучении микрофлоры язв кроликов непосредственно после криогенного воздействия у 28 кроликов вновь были выделены стафилококки, у восьми — β -гемолитические стрептококки. Культуральные, биохимические и патогенные свойства выделенных штаммов до и после криогенного воздействия оказались идентичными.

Аналогичные результаты были получены при изучении микрофлоры хронических язв, полученных в эксперименте на слизистой губ 14 собак. У двенадцати ($85,71 \pm 1,0\%$) из них до и после криовоздействия были выделены золотистые стафилококки, у двух ($14,29 \pm 2,47\%$) — β -гемолитические стрептококки серогруппы А. Биологические свойства стафилококков и стрептококков, как и в опытах на кроликах, оказались такими же, как и до низкотемпературного воздействия.

В клинике бактериологическое исследование мазков из хронических язв, эрозий, трещин проводилось у 63 больных (17 — с хроническими язвами, 14 — с хроническими трещинами, 32 — с хроническими эрозиями). У 59 ($93,65 \pm 1,72\%$) из них до и после криовоздействия были обнаружены золотистые стафилококки, у четырех ($6,35 \pm 1,66\%$) — β -гемолитический стрептококк серогруппы А. Биологические свойства стафилококков и стрептококков, выделенных у больных до и после криовоздействия, не претерпели изменений.

Следовательно, микробиологические исследования хронических язв в эксперименте и клинике показали, что под воздействием низких температур (-196°C) грамположительные микроорганизмы, преобладающие при данной патологии, не погибают и сохраняют все присущие им морфологические, культуральные, биохимические и патогенные свойства.

1. *Выгодчиков Г. В.* Стафилококковые инфекции. — В кн.: Руководство по микробиологической диагностике инфекционных болезней. М.: Медицина, 1973, с. 350—356.
2. *Кускова В. Ф., Ребреева А. И.* Методика микробиологического исследования в стоматологии: Условия и способы взятия проб материала. — Стоматология, 1971, № 4, с. 57—80.
3. *Кускова В. Ф., Ребреева А. И.* Методика микробиологического исследования в сто-

матологии: Культивирование и идентификация микроорганизмов полости рта. — Там же, № 5, с. 59—63.

4. Лямперт И. М. Стрептококковые инфекции. — В кн.: Руководство по микробиологической диагностике инфекционных болезней. М.: Медицина, 1973, с. 298—318.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
19.07.80

УДК 57.043.2:616.5:547.422

Н. А. Волкова, Б. П. Сандомирский

ВЛИЯНИЕ ПЭО-400 НА РАЗВИТИЕ ЭКСПЛАНТАТОВ ТРУПНОЙ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА В ОРГАННОЙ КУЛЬТУРЕ

В настоящее время в экспериментальной биологии и медицине заметен повышенный интерес к методу органного культивирования [2, 6, 8, 10], сохраняющему основное гистологическое строение, определенный уровень дифференцировки и некоторые функциональные свойства тканей, наблюдаемые в целостном организме [5]. Одним из доступных и практически важных объектов, изучаемых таким способом, является кожа взрослого человека [11, 13, 16]. Органное культивирование кожи может быть инструментом исследования практически всех аспектов биологии этой ткани, включая действие на нее различных фармакологических агентов.

Наименее изученным является вопрос о влиянии на органную культуру кожи сред и компонентов, применяемых для защиты кожи от разрушения на этапах криоконсервирования. Показаны [3, 4] сохранение и приживание кожи человека, консервированной при -196°C под защитой отечественного малотоксичного криопротектора полиэтиленоксида с молекулярной массой 400 (ПЭО-400). Однако в доступной литературе отсутствуют данные о влиянии ПЭО-400 на развитие кожи и состояние ее гистологических структур.

Целью настоящего исследования явилось изучение морфофункционального состояния кожи человека после нахождения ее в средах для низкотемпературного консервирования, содержащих ПЭО-400.

Материал и методы. Стерильные образцы кожи толщиной 0,4—0,7 мм были взяты у девяти трупов возраста 55—71 года через 5—6 ч после скоропостижной смерти и хранились до эксплантации в различных исходных условиях, определивших три серии экспериментов: а) по одному лоскуту от каждого из девяти трупов помещали в стерильные сухие флаконы и хранили при 4°C в течение 18—24 ч; б) по одному лоскуту от каждого из трех трупов хранили в таких же условиях в течение 20 ч, а затем добавляли на три часа раствор, содержащий 15% ПЭО-400 в среде Хенкса; в) по одному лоскуту от каждого из девяти трупов сразу после взятия помещали во флаконы с 15% ПЭО-400 в растворе Хенкса при 4°C на 18—24 ч. Непосредственно перед эксплантацией лоскуты дважды промывали в растворе Хенкса и измельчали до размера $1,5\text{—}2\text{ мм}^2$. Органное культивирование производили в чашках Конвея по методу Лурия [1, 2] для кроветворной и лимфоидной тканей с небольшими изменениями. Эксплантаты поддерживали на поверхности питательной среды с помощью миллипоровых фильтров НА (диаметр пор $0,45\text{ мкм}$). Жидкая фаза состояла из 70% среды 199, 10% телячьей эмбриональной сыворотки, 10% сыворотки крови человека IV (AB) группы, 10% куриного эмбрионального экстракта и была дополнена из расчета 400 мг глюкозы, 10 мг аскорбиновой кислоты, 20 мг L-глутамина, по 50 ед. пенициллина и стрептомицина на 10^{-4} м^3 среды. Культивирование вели при 37°C в атмосфере воздуха, обогащенного 5%-ным CO_2 . Смену жидкой фазы производили через 48 ч на одну треть

ее объема. Эксплантаты отделяли от фильтра и фиксировали на 2, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 16, 18-е сутки в 96°-ном этаноле в течение 1 ч, обезживали и заключали в целлоидин-парафин. Серийные срезы 5—7 мкм, полученные перпендикулярно к эпидермальной поверхности, окрашивали гематоксилин-эозином и изучали под световым микроскопом. От каждого трупа в динамике культивирования исследовали по 22—24 образца, всего изучено 482 эксплантата.

Результаты исследования. Исходный материал через 18—24 ч гипотермического хранения представлял собой дермо-эпидермальный фрагмент кожи, имеющий в своем составе эпидермис, сосочковый и часть сетчатого слоя собственно кожи. Эпидермис имел типичное многослойное строение, область его контакта с дермой представлена в виде выростов в дерму, которая характеризовалась типичным расположением коллагеновых волокон и присутствием соединительнотканых клеточных элементов.

При культивировании эксплантатов на вторые сутки наблюдали существенные признаки их развития: миграцию эпителиальных клеточных элементов эпидермиса из резаного края по свободной поверхности дермы вплоть до поддерживающего миллипорового фильтра (эпиболия). При этом заметно некоторое истончение эпидермиса за счет сокращения числа шиповатых клеток и сглаживание эпидермальных выростов в дерму. Базальные клетки ориентированы обычно, ядра их проявляют резкую базофилию, а прилегающие к ним шиповатые клетки несколько уплощены при сохранении нормальных тинкториальных свойств. В лежащих выше слоях шиповатых клеток наблюдается мозаичное расположение нормальных и обладающих пикнотичным ядром и эозинофильной цитоплазмой клеток. Роговой слой на значительном протяжении отделен от поверхности эпидермиса, покрытой слоем ромбовидных зернистых клеток (рис. 1, а).

В течение следующих суток миграция эпителиальных клеток продолжается вплоть до полной инкапсуляции дермы эпиболийным слоем, образованным уплощенными, базофильно красящимися клетками со светлой цитоплазмой и крупным ядром. По мере дифференцировки ядра описанных клеток приобретают сферическую форму и пикнотизируются, а цитоплазма становится оксифильной. В исходном эпидермисе наблюдается дистрофия части шиповатых клеток, увеличиваются межклеточные щели в базальном слое. Клетки базального слоя обнаруживают способность к митотическому делению, базофилия их ослаблена, а размеры увеличены.

На пятые сутки наблюдаются изменения в шиповатых клетках: число их сокращается и составляет один — три слоя уплощенных базофильных клеток с овальным ядром, над которым расположены три — пять рядов клеток, часть из которых содержит крупные базофильные гранулы, видимо, кератогиалина («зернистые» клетки). Ядра в них по мере приближения к поверхности пикнотизируются. Верхние резкооксифильные слои бывших шиповатых клеток покрыты кое-где тонким роговым слоем, образованным в процессе паракератоза, над которым располагается «старый» роговой слой.

На седьмые сутки базальные клетки несколько дезориентированы относительно базальной мембраны: они потеряли четко перпендикулярную ориентацию. Лежащие выше шиповатые клетки, не достигнув поверхностной зоны, превращаются в «зернистые», что сопровождается иногда отделением поверхностной части эпидермиса, включающей роговой слой вместе с некротизированными, еще имеющими ядро клетками исходного эпидермиса.

В последующую неделю происходит постепенное ослабление связи как между эпидермисом и подлежащей дермой (причем кое-где встречается некроз росткового слоя), так и между более поверхностными и

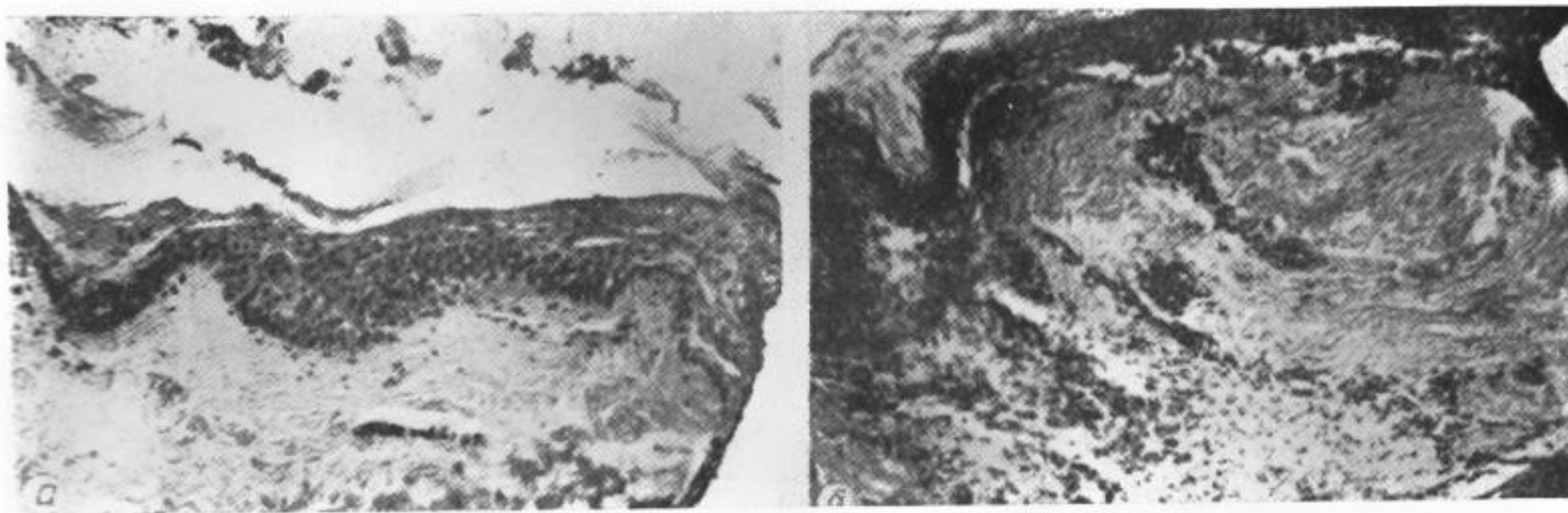


Рис. 1. Трупная кожа человека в органной культуре после 22 ч хранения при 4°C: а — двухдневный эксплантат. Миграция эпидермальных клеток на дерму. Гематоксилин-эозин, $\times 100$; б — двенадцатидневный эксплантат. Паракератоз, очаговый некроз слоя шиповатых клеток. Гематоксилин-эозин, $\times 100$.

глубокими слоями эпидермиса на уровне некротизированных шиповатых клеток (рис. 1, б). К концу второй недели очевидны некоторые изменения в дерме, которая до этого не отличалась от исходного материала. В частности, проявилась склонность отдельных участков к базофилии, хотя рисунок коллагеновых волокон сохранен. В клеточных элементах дермы изредка отмечается кариопикноз без грубых изменений фибробластов.

В дальнейшем, на 16—18 сутки, отмечено ослабление межклеточных связей в эпидермисе, который в конце третьей недели был представлен слоями базальных, шиповатых (с нормальными тинкториальными свойствами, пикнотизированных, а также некротизированных) и роговых клеток, каждый из которых рыхло связан с соседними. Тинкториальные свойства отдельных локусов дермы несколько изменены, верхняя часть дермы насыщена клеточными элементами, трудно поддающимися дифференцировке.

Изучение развития эксплантатов, подвергавшихся действию ПЭО-400 в течение трех часов перед культивированием, показало, что на третьи сутки эпителиальные клетки полностью обрастали дерму, строение эпидермиса не отличалось от интактного в этот же срок. К концу недели обращал на себя внимание широкий ростковый слой с умеренной базофилией и ориентацией клеток параллельно поверхности эпидермиса. Над ним располагался слой базофильных клеток с компактным сферическим ядром, выше клетки приобретали оксифилию цитоплазмы и эпидермис с поверхности был покрыт широким, образованным по типу паракератоза роговым слоем.

Дальнейшее пребывание эксплантатов в культуре приводило к расслоению на четырнадцатые сутки эпидермиса при нормальном строении дермы с обилием в ней клеточных элементов.

Следует отметить, что при сравнении трупной кожи, хранившейся в отсутствие жидких сред и 15%-ном растворе ПЭО-400, не обнаружены различия ее строения как при трехчасовом, так и при длительном, 18—24-часовом, контакте с раствором криопротектора. При культивировании уже через 48 ч обнаружена некоторая перестройка эксплантатов из лоскута, хранившегося 18—24 ч в среде, содержащей 15% ПЭО-400 в растворе Хенкса, по сравнению с материалом, перенесшим только гипотермическое хранение. Эпидермис утолщен, выросты в дерму сглажены, базальные клетки ориентированы нормально. Поверхностнее располагаются 1—4 ряда уплощенных базофильных шиповатых клеток, имеющих в нижних рядах нормальное, а поверхностнее — резко хромофильное пикнотичное ядро. По мере приближения к поверхности цитоплазма приобретает оксифильность. Самые поверхностные слои

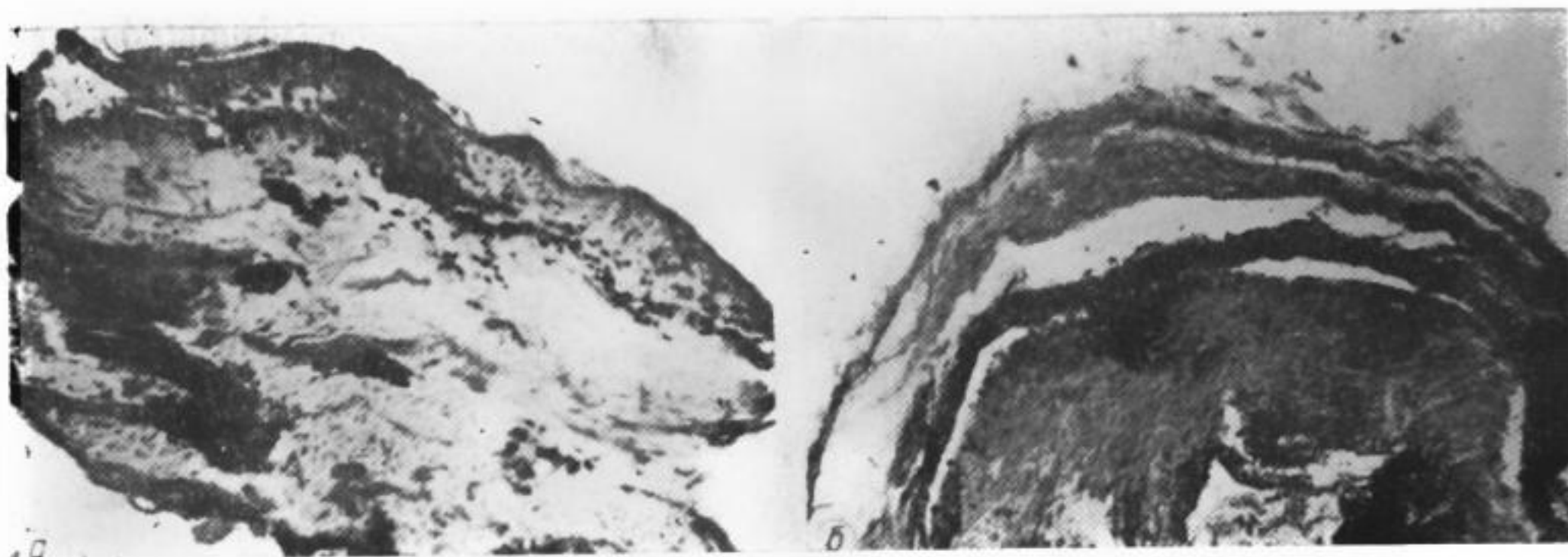


Рис. 2. Трупная кожа человека в органной культуре после 21 ч хранения в 15%-ном растворе ПЭО-400 в растворе Хенкса при 4°C:

а — двухдневный эксплантат. Эпидермальная миграция не выражена. Гематоксилин-эозин, $\times 100$;
б — двенадцатидневный эксплантат. Паракератоз, расслоение и частичная отслойка эпидермиса. Гематоксилин-эозин, $\times 100$.

рыхло соединены один с другим. Количество уплощенных эозинофильных клеток убывает к краям эксплантата, между ними и базофильными клетками располагаются полигональные с пикнотичным ядром и неравномерно окрашенной оксифильной цитоплазмой клетки. Поверхностный слой содержит «зернистые» клетки с гранулами кератогиалина. Обращает на себя внимание отсутствие признаков миграции эпидермальных клеток (рис. 2, *а*).

Через сутки в базальных клетках были обнаружены митозы, часть этих клеток имела пикнотичное ядро. Уменьшилось число уплощенных шиповатых клеток и возросло количество слоев «зернистых» клеток, наблюдавшихся в толще эпидермиса и по мере приближения к поверхности теряющих свое ядерное содержимое. Явления миграции эпителия незначительны.

Позже, на пятые сутки, обрастание дермы эпителиальными клетками усиливается, однако не все эксплантаты окружены эпиболийным слоем. Наряду с этим наблюдается рыхлость эпидермиса: если базальные клетки надежно прикреплены к базальной мембране, то по мере приближения к поверхности связь ослабевает и роговой слой представлен в виде мощных, расслаивающихся пластов роговых чешуек.

Дальнейшее культивирование приводит к горизонтальной ориентации базальных клеток, которые увеличены в размерах, слабо базофильны, имеют крупное ядро. На десятые сутки наблюдаются полное обрастание дермы эпиболийным слоем и широкий новообразованный роговой слой. В это же время появляются признаки дистрофии дермы: пикноз ядер некоторых клеток, склонность волокнистых структур к локальной базофилии.

К двенадцати суткам дистрофические явления нарастают: на фоне расслоения эпидермиса наблюдаются участки некроза росткового слоя, в дерме — явления кариорексиса (рис. 2, *б*). В дальнейшем эти явления прогрессируют, и через 18 суток эпидермис почти полностью отделяется от дермы, сохраняя лишь слабую связь в месте выхода концевых отделов дериватов кожи, а поверхностные слои дермы содержат большое количество трудно дифференцируемых клеточных элементов с нормальной окраской.

Обсуждение результатов. Органная культура широко применяется при изучении влияния на живую кожу компонентов питательной среды, гормонов, витаминов, канцерогенов и некоторых других соединений [6, 9, 14, 15, 18 и др.]. Для правильной оценки эксплантатов вырабо-

таны критерии, характеризующие их состояние в органной культуре. Это миграция эпителиальных клеток, формирование нового рогового слоя клетками исходного эпидермиса, выявление митозов в базальных клетках эпидермиса, сохранность основного строения эпидермиса как многослойного ороговевающего эпителия, сохранность межклеточных связей, а также нормальных тинкториальных свойств элементов эпидермиса и дермы [7, 12, 16, 17, 19]. На основании этих характеристик представляется возможным судить о способности кожи человека к росту, восстановлению и специфической функции — кератинизации.

Анализ собственных данных позволяет отметить, что кожа трупов может прогрессивно развиваться в органной культуре до двух недель, после чего в ней появляются дистрофические изменения. В течение срока исследования эксплантат сохраняет многослойное строение, способность к ороговению и некоторые другие свойства, характерные для данного типа ткани.

Трехчасовая экспозиция кожных лоскутов в 15%-ном ПЭО-400 в растворе Хенкса не вызвала резких изменений в развитии эксплантатов по сравнению с интактными. Обрастание дермы клетками эпидермиса и паракератоз наступали в те же сроки, хотя расслоение эпидермиса, видимо, как следствие ослабления межклеточных связей наступало несколько раньше и более резко, чем в коже, перенесшей только гипотермическое хранение. Длительный контакт кожи человека с 15%-ным ПЭО-400 существенно влияет на ряд ростовых характеристик органной культуры кожи, что выражается в торможении проявления миграционной способности эпителия, более раннем, чем в контроле, ослаблении межклеточных контактов в самом эпидермисе и дермо-эпидермальной связи вплоть до некроза росткового слоя на большом протяжении. Эти признаки свидетельствуют, по нашему мнению, о более ранних дистрофических изменениях эпидермиса опытных образцов по сравнению с интактными. При этом следует отметить, что в сериях как контрольного, так и опытного материала полная гибель эксплантатов к восемнадцати суткам не наблюдалась, т. е. к середине третьей недели потенциальные ростовые возможности эксплантата не были исчерпаны.

Таким образом, длительная инкубация в среде с 15%-ным ПЭО-400 (18—24 ч) кожи трупов перед помещением ее в органную культуру, вызывая определенный сдвиг во времени появления ряда характерных

Сравнительная гистологическая характеристика развития кожи человека в органной культуре при различных условиях хранения до эксплантации

Срок наблюдения, сут	Условия хранения	
	+4°С на протяжении 18—24 ч	15%-ный ПЭО-400 в растворе Хенкса при +4°С в течение 18—24 ч
2	Истончение эпидермиса, активная миграция эпителия на дерму	Утолщение эпидермиса
3	Обрастание дермы эпидермальными клетками, митотически делящиеся базальные клетки	Митозы в ростковом слое, слабые явления миграции эпителия, признаки паракератоза
5	Явления паракератоза	Паракератоз, рыхлость эпидермиса, миграция эпителия
6—14	Паракератоз, рыхлость эпидермиса	Обрастание дермы клетками эпителия, признаки дистрофии в дерме, нарастание некроза росткового слоя, расслоение эпидермиса
15—18	Постепенное расслоение эпидермиса, изменение нормальных характеристик дермы	Отслойка части эпидермиса, изменение нормальных характеристик дермы

признаков развития эксплантатов, свидетельствующий о неблагоприятном биологическом действии криопротектора, не может быть расценена как фактор, исчерпывающий до конца морфофункциональные свойства кожи трупов в данных условиях культивирования.

1. *Лурия Е. А., Пьянченко И. Е.* Культивирование лимфатических узлов морских свинок в органных культурах на среде с гомологичной сывороткой. — В кн.: Материалы симпозиума по общ. иммунологии Ин-та эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи. М., 1966, с. 55—56.
2. *Лурия Е. А.* Кроветворная и лимфоидная ткань в культурах. — М.: Медицина, 1972. — 176 с.
3. *Сандомирский Б. П., Волкова Н. А., Панков Е. Я., Бронштейн В. Л.* Оценка жизнеспособности криоконсервированной кожи человека. — В кн.: Трансплантация тканей в восстановительной хирургии: Тез. докл. VII Всесоюз. конф. по пересадке органов и тканей. Ростов н/Д, 1976, с. 139—140.
4. *Сандомирский Б. П., Волкова Н. А.* Определение состояния трупной кожи человека на этапах низкотемпературного консервирования. — В кн.: Трансплантация органов и тканей: Тез. докл. VIII Всесоюз. конф. по пересадке органов и тканей. Тбилиси, 1979, с. 284.
5. *Цыпкин Л. Б., Горюнова А. Г.* Органные культуры нормальных тканей и возможность их использования для изучения процессов регенерации. — В кн.: Фармакологическая регуляция регенераторных процессов. Йошкар-Ола, 1979, с. 111—112.
6. *Шабад Л. М., Колесниченко Т. С., Сорокина Ю. Д.* Трансплацентарный blastogenesis и органные культуры. — М.: Медицина, 1975. — 129 с.
7. *Caron G. A.* Organ culture of normal and psoriatic skin. — Arch. Dermatol., 1968, 97, N 5, p. 575—586.
8. *Fell H. B.* The development of organ culture. — In: Organ culture Biomed. Res. Cambridge etc., 1976, p. 1—13.
9. *Hambrick G. S., Lamberg S. I., Bloomberg R.* Observations on keratinization of human skin in vitro. — J. Invest. Dermatol., 1966, 47, p. 541—550.
10. *Hodges G. M. A.* A review of methodology in organ culture. — In: Organ culture in biomedical research: Brit. Soc. Cell Biol. Symp. 1. Cambridge etc., ed Michael Balls, 1976, p. 15—59.
11. *Karasek M. A.* In vitro growth and maturation of epithelial cells from postembryonic skin. — J. Invest. Dermatol., 1975, 65, N 1, p. 60—66.
12. *Levine M.* The growth of adult human skin in vitro. — Brit. J. Dermatol., 1972, 86, N 5, p. 481—489.
13. *Prunieras M., Delescluse C., Regnier M.* The culture of skin a review of theories and experimental methods. — J. Invest. Dermatol., 1976, 67, N 1, p. 58—65.
14. *Reaven E. P., Cox A. J.* Organ culture of human skin. — J. Invest. Dermatol., 1965, 44, N 3, p. 151—156.
15. *Reaven E. P., Cox A. J.* Behavior of adult human skin in organ culture. 2. Effects of cellophane tape stripping, temperature, oxygen tension, pH and serum. — J. Invest. Dermatol., 1968, 50, N 2, p. 118—128.
16. *Sarkany J., Grice K., Caron G. A.* Organ culture of human skin. — British J. Dermatol., 1965, 77, N 2, p. 65—76.
17. *Siddiqui A. H., Janssen de Limpens A. M., Cormane R. H.* In vitro organ culture of adult human and mouse skin. — Acta Dermatol. Venereol. (Stockh), 1974, 54, p. 255—258.
18. *Sugimoto M., Tajima K., Kojima A., et al.* Differential acceleration by hydrocortisone of the accumulation of epidermal structural proteins in the chick embryonic skin growing in a chemically defined medium. — Develop. Biol., 1974, 39, N 2, p. 259—307.
19. *Tammi R., Jansén C. T., Santti R.* Histometric analysis of human skin in organ culture. — J. Invest. Dermatol., 1979, 73, N 2, p. 138—140.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
29.09.80

*А. П. Грохольский, Н. Ф. Данилевский, В. В. Миклашевич,
А. В. Мостицкий, В. М. Худзинский*

ТЕХНИКО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ И ПРИМЕНЕНИЕ КРИОГЕННОЙ АВТОНОМНОЙ СТОМАТОЛОГИЧЕСКОЙ УСТАНОВКИ

За последние два десятилетия в медицинской литературе появилось много работ по применению низких температур для лечения самых различных заболеваний. В стоматологии низкие температуры рекомендуют применять для лечения пульпитов, гипертрофического гингивита, пародонтоза, кератозов и опухолей [1—11].

Ведущее место в разработке криохирургических аппаратов для стоматологических целей принадлежит Физико-техническому институту низких температур АН УССР, в котором разработана серия криоаппаратов, работающих на жидком хладагенте по принципу распыления парожидкостной струи (криооросители КР-1, КР-4, КАС-01). Сотрудники Украинского института усовершенствования врачей МЗ УССР во главе с проф. В. А. Никитиным провели клинико-экспериментальные исследования этих криооросителей и рекомендуют их в широкую стоматологическую практику [4, 10].

Внедрение криогенного метода лечения в клиническую практику потребовало создания промышленных образцов криомедицинской аппаратуры. Одним из таких образцов является автономная стоматологическая криоустановка «Криоэлектроника-1».

«Криоэлектроника-1» выполнена на основе системы охлаждения замкнутого цикла. Аппаратура этого типа постоянно готова к работе, способна работать длительное время (до нескольких лет) без дозаправки хладагентом, проста в эксплуатации. «Криоэлектроника-1», имеющая сравнительно небольшую холодопроизводительность, предназначена для криовоздействия на небольшие участки ткани (максимальная поверхность деструкции при однократном воздействии не более 1—2 см²). Установка предназначена для стоматологических целей, но при использовании комплекта сменных наконечников может успешно применяться в других областях медицины, в частности оториноларингологии, гинекологии, урологии, дерматологии.

Основные технические характеристики установки следующие: температуры криовоздействия от 0 до -130°C ; время подготовки к работе не более 30 мин; время выхода на режим не более 2 мин, время отогрева до температуры окружающей среды ($+20^{\circ}\text{C}$) более 1,5 мин; потребляемая мощность (от сети трехфазного тока) 0,7 кВт, срок службы 5 лет.

«Криоэлектроника-1» (рис. 1) выполнена на основе дроссельной системы охлаждения и состоит из трех основных узлов — компрессорной установки, пульта управления и криоинструмента.

В компрессорной установке применен серийно выпускаемый фреоновый холодильный агрегат ВС-1,13, срок службы которого составляет 10 000—14 000 ч; реле давления РД-3—02 для управления работой холодильного агрегата; соленоидный клапан ВСВ, обеспечивающий отсечку линии нагнетания от криоинструмента во время отогрева наконечника.

Использование серийного одноступенчатого холодильного компрессора для получения сравнительно низкой температуры охлаждения стало возможным благодаря разработанному многокомпонентному хладагенту, позволяющему достичь высокой термодинамической эффективности при сравнительно низком давлении нагнетания (1,7—1,9 МПа).

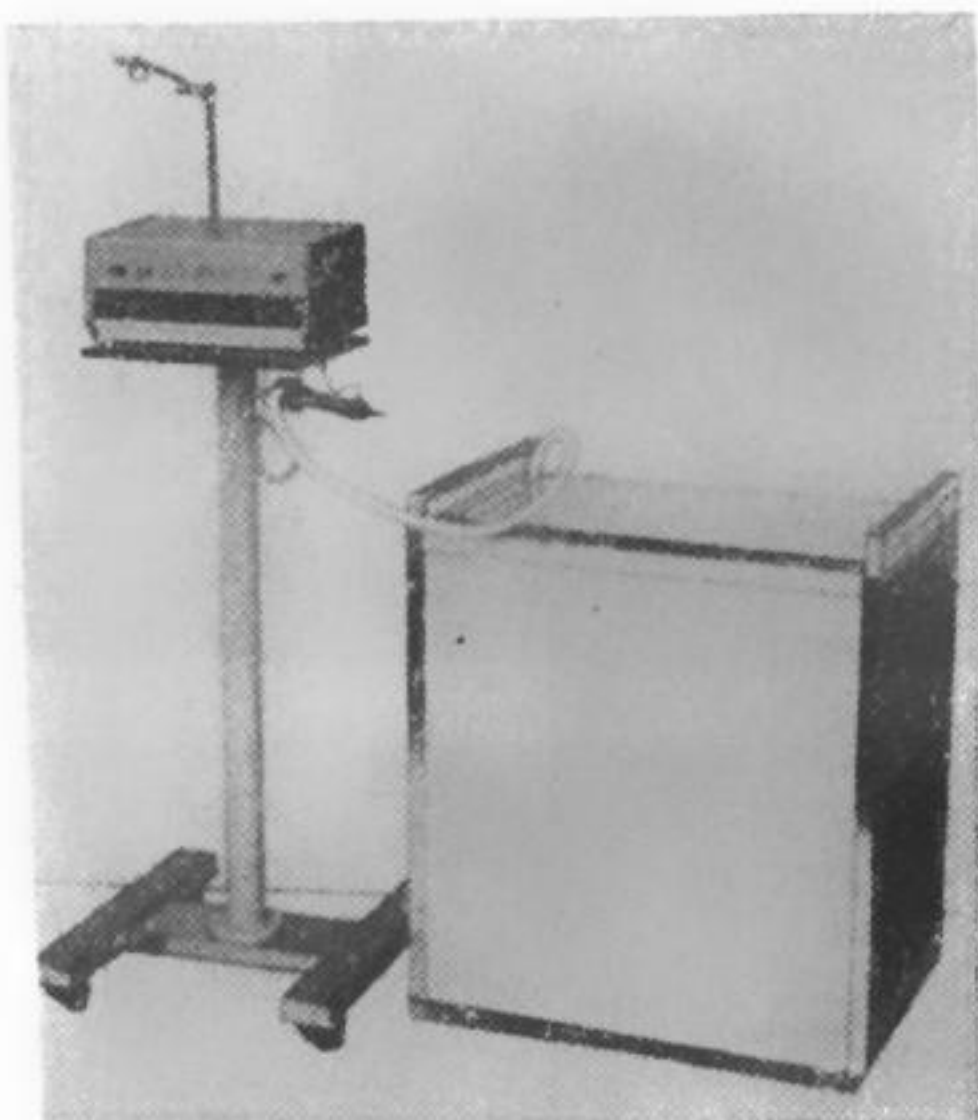


Рис. 1. Криогенная автономная стоматологическая установка КУАС-01 МТ

Пульт управления, предназначенный для задания, измерения и стабилизации температуры криовоздействия, а также управления компрессорной установкой, может размещаться на передвижной стойке или компрессорной установке. На переднюю панель выведены следующие органы пульта управления: кнопка «Сеть» — для подачи напряжения 380 В к компрессорной установке; кнопка «Охлаждение» — включение компрессора; кнопка «Отогрев» — выключение компрессора и подача напряжения 24 В на нагреватель криоинструмента; рукоятка «Время отогрева» — задание времени отогрева; рукоятка «Установка температуры» — задание требуемой температуры криовоздействия от 0 до -130°C .

Криоинструмент с комплектом сменных крионасадок показан на рис. 2. Он состоит из регенеративного теплообменника и дросселя, расположенных в вакуумном корпусе. Трубки прямого и обратного потоков хладагентов, связывающие криоинструмент с компрессорной установкой, выполнены из полихлорвинила и покрыты лавсановой оплеткой для повышения прочности, при этом трубка прямого потока расположена внутри трубки потока обратного. Длина коаксиального трубопровода, на которую можно удалить криоинструмент от компрессорной установки и пульта управления, составляет 10—15 м, что определяет максимальное расстояние.

Работа установки происходит следующим образом. Сжатый хладагент из компрессорной установки поступает по трубопроводу в регенеративный теплообменник, где охлаждается обратным потоком хладагента, частично конденсируясь. При прохождении через дроссель давление потока падает с 1,7—1,9 МПа до 0,1—0,15 МПа. Парожидкостная смесь после дросселя поступает во внутреннюю полость базового наконечника, впаянного в рабочий конец криоинструмента, где кипит, отводя тепло от объекта криовоздействия. После снятия тепловой нагрузки хладагент поступает в межтрубное пространство регенеративного теплообменника, полностью испаряется, охлаждая прямой поток, и возвращается в компрессорную установку.

Температура криовоздействия и размер зоны замораживания зависят от формы наконечника (насадки). Минимальная температура криовоздействия на границе с модельной средой для различных наконечников достигает следующих значений: вогнутый диаметром 15 мм — -90°C ; плоский диаметром 12 мм и цилиндрический диаметром 3 мм — -100°C , конический диаметром 4,1 мм — -110°C , базовый диаметром 5,6 мм — -130°C .

Зона замораживания по форме приближается к полусфере и диаметр ее по истечении 10 мин криовоздействия для вогнутого наконечника диаметром 15 мм составляет 39 мм; для плоского диаметром 12 мм — 33, для цилиндрического диаметром 3 мм — 35, для конического диаметром 4/1 мм при глубине погружения 1 мм — 25, при глубине базового погружения 5,6 мм составляет 37 мм.

«Криоэлектроника-1» успешно прошла технические и клинико-экс-

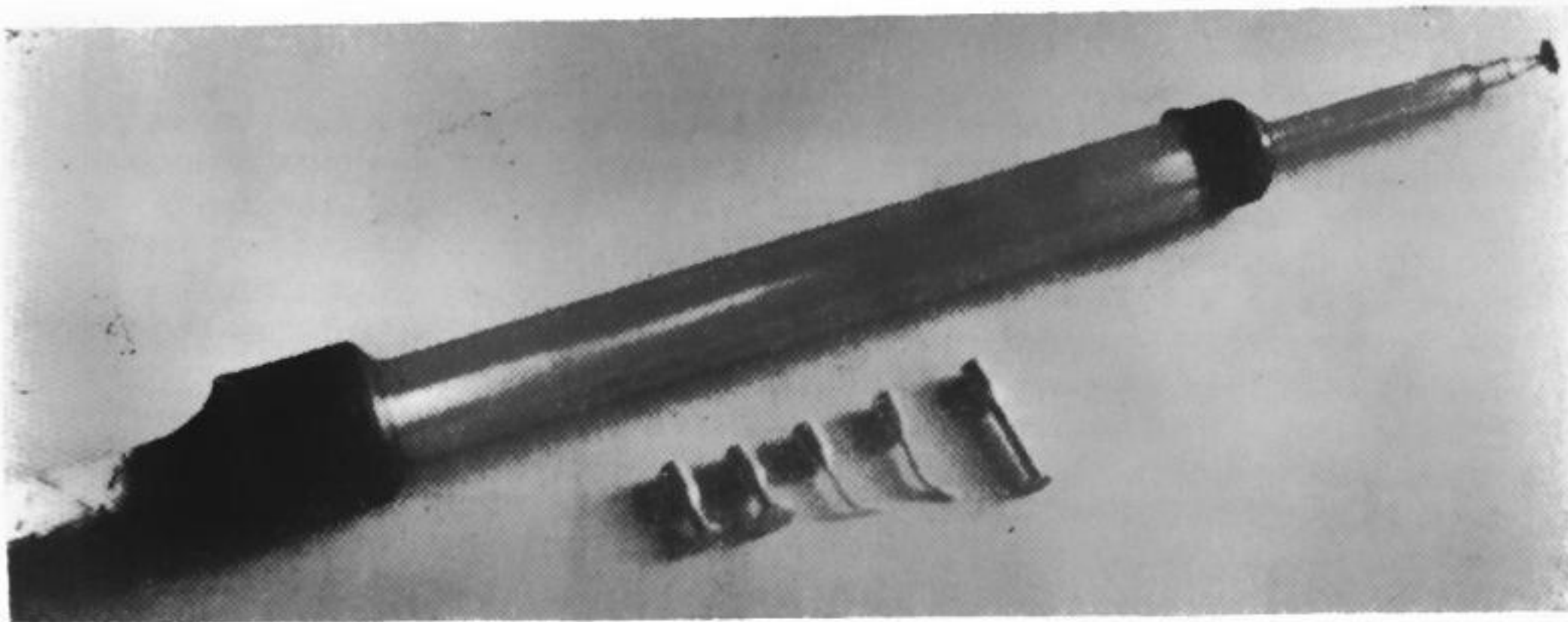


Рис. 2. Криоинструмент с комплектом крионасадок.

периментальные испытания на кафедре госпитальной терапевтической стоматологии Киевского медицинского института. Клиническому применению низких температур предшествовала серия экспериментальных исследований на животных. Были изучены процессы, происходящие в слизистой оболочке полости рта под воздействием низких температур, а также определена оптимальная экспозиция криовоздействия при различных патологических состояниях. Начиная с 1976 г. аппаратом «Крио-электроника-1» проведено криолечение свыше 800 различных стоматологических больных.

Криотерапию применяли при образовании патологических зубодесневых карманов глубиной 3—7 мм; обильном разрастании в карманах грануляционной ткани и постоянном выделении гнойного содержимого; с целью деструкции вегетаций многослойного плоского эпителия, участвующего в образовании пародонтальных абсцессов вследствие обострения пародонтоза; симптоматическом и самостоятельном гипертрофическом гингивите; папиллитах II—III степени; эпулиде; перикоронарите с наличием десневого капюшона; свищевых ходах мягких тканей пародонта; лейкоплакии слизистой оболочки полости рта; эрозивно-язвенной, буллезной и инфильтративно-перигландулярной формами красного плоского лишая слизистой оболочки; хроническом рецидивирующем афтозном стоматите; декубитальных и трофических язвах; глубоких трещинах губ; хейлите Манганотти; папилломах; фибромах; гемангиомах; ретенционных кистах; опухолях слизистой полости рта.

Результаты проведенных технических, экспериментально-морфологических и клинических исследований позволили разработать методику контактной криотерапии болезней пародонта и слизистой оболочки полости рта.

Методика лечения включает следующие этапы.

1. Подготовка криогенной установки к работе. Выполняются все пункты инструкции по ее эксплуатации.

2. Подготовка больного к операции. Она включает тщательное орошение полости рта слабыми растворами антисептика, удаление различных механических раздражителей (зубные отложения, острый край кариозной полости, выступающие края пломбы и т. д.), обработку и изоляцию операционного поля стерильными ватными валиками, введение вакуум-отсоса для слюны.

3. Обезболивание зависит от объема и глубины вмешательства. При поверхностном криовоздействии обезболивание можно не проводить.

4. Криовоздействие. Методика применения низких температур тесно связана с поставленной целью (криодеструкция ткани, стимуляция

процессов регенерации), областью ее применения (зубодесневой карман, десна, другие участки слизистой), особенностями развития патологического процесса (нарушение целостности ткани, пролиферативные процессы и т. д.).

При криокюретаже рабочая часть криоинструмента вводится непосредственно в зубодесневой карман. При этом используются специальные крионасадки, которые имеют форму малой или большой зубоврачебной гладилки. В процессе работы плоская сторона прижимается к поверхности мягких тканей патологического зубодесневого кармана. По окончании криовоздействия рабочая часть криоинструмента извлекается из кармана. Время охлаждения и замораживания кармана регламентируется степенью дистрофически-воспалительной формы пародонтита, в среднем при I степени оно равно 10—12 с, при II — 12—13 и III степени пародонтита — 13—15 с. На время, необходимое для замораживания ткани, оказывают влияние степень гипертрофии зубодесневых сосочков, характер разрастания грануляционной ткани, содержание гнойного экссудата. В связи с повышением теплопроводности тканей с возрастом промерзание их у пожилых людей протекает несколько быстрее. Если время замораживания превышает 30 с, то во избежание криоповреждения пульпы зуба между зубом и рабочей частью криоинструмента следует вводить криопротектор.

При глубине зубодесневых карманов 8 мм и более для лучшего доступа к его дну проводится вспомогательный полулунный разрез десны на уровне средней трети длины корня. Криодеструкция проводится в два этапа через дополнительный и естественный входы в карман.

В течение одного посещения криодеструкцию целесообразно проводить не более чем в 4—5 патологических зубодесневых карманах.

Для криодеструкции других отделов слизистой полости рта применяют крионасадки полуовальной или округлой формы, плоские или вогнутые, желательно, чтобы форма насадки приближалась к размерам участка поражения слизистой. При более обширных изменениях слизистой криовоздействие производится в различных участках поочередно.

Экспозиция криовоздействия при лейкоплакии равна 15—20 с, красном плоском лишае — 12—15, хроническом афтозном стоматите — 10—12, декубитальных и трофических язвах — 25—30, папилломах, фибромах, гемангиомах и ретенционных кистах — 40—55 с.

Если возникает необходимость провести более глубокое замораживание, прибегают к увеличению экспозиции или применяют двух-трехциклового метод криовоздействия. Под влиянием низких температур элементы поражения превращаются в плотный ледяной конгломерат, по краю покрытый слоем инея. С прекращением криовоздействия наступает быстрое оттаивание и на поверхности слизистой оболочки появляются капельки влаги, затем гиперемия, отек, некроз, регенерация и эпителизация.

5. Уход за послеоперационной раной осуществляется с учетом течения и фазы развития криодеструкции. В первые 24—48 ч, когда в тканях наступает крионекроз, следует рекомендовать больному тщательный гигиенический уход за полостью рта. В этот период для интенсификации лизиса некротических тканей используют протеолитические ферменты с антибиотиками. В дальнейшем, по мере отторжения ткани, целесообразны лекарственные средства, улучшающие защитные свойства тканей пародонта и слизистой оболочки, усиливающие метаболические процессы и регенерацию. С этой целью следует применять метацил, мефенаминат натрия, витамины Е, С, А в виде паст, аппликаций, аэрозолей. После полного отторжения некротических тканей следует применять кератопластические средства, средства растительного происхождения (календула, каланхоэ, чистотел), из физиотерапевтических средств — тубус-кварц, магнитное поле.

Криовоздействие является бескровным и щадящим методом, легко переносится больными, потребность в обезболивании возникает лишь при обширном и глубоком промораживании тканей. Заживление ран протекает без послеоперационных осложнений, с образованием нежного и высококосметического рубца.

В процессе лечения нормализуются показатели эмиграции лейкоцитов в полости рта по Ясиновскому, моноцитогаммы по Григорьевой. Динамика цитологических наблюдений свидетельствует об активном течении регенеративных процессов, сокращаются сроки эпителизации и рубцевания зубодесневых карманов и участков слизистой. Рентгенологически определяются снижение остеопороза, стабилизация прикуса в межзубных перегородках альвеолярной кости.

Гистологическое изучение препаратов в условиях эксперимента и клиники показывает, что после криовоздействия образуется меньше рубцовой ткани, чем при применении других хирургических методов, она более нежная, коллагеновые волокна тонкие, имеют правильное расположение. Полученные данные позволяют более широко рекомендовать низкие температуры для лечения болезней пародонта и слизистой оболочки полости рта.

Комиссия Министерства здравоохранения СССР по внедрению новых лекарственных средств и медицинской техники рекомендовала аппарат «Криоэлектроника-1» к серийному производству (протокол № 11 от 28.12.78). Получено регистрационное удостоверение в том, что в соответствии с приказом министра здравоохранения СССР Управление по внедрению новых лекарственных средств и медицинской техники МЗ СССР зарегистрировало 25 июля 1979 г. за № 79/766—76 и включило в номенклатуру разрешенных для применения в медицинской практике и серийного производства изделий медицинской техники «Установку криогенную автономную стоматологическую КУАС-01». Для приобретения установки необходимо подавать заявки на имя начальника объединения Союзмедтехника по адресу: Москва, 118021, улица Тимура Фрунзе, 16.

1. Аниутин Р. Г. Применение криогенной техники для лечения новообразований полости рта и глотки. — Мед. техника, 1976, № 3, с. 35—37.
2. Балиева И. Л. Применение криогенного метода в стоматологии. Обзор зарубежной литературы. — Стоматология, 1974, № 2, с. 49—53.
3. Беляева Н. Г. Экспериментальное обоснование применения в стоматологии метода криообезболивания зуба: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Куйбышев, 1972. — 17 с.
4. Веркин Б. И., Никитин В. А., Носов И. Е., Григорьева К. В. Применение низких температур при лечении заболеваний полости рта. — В кн.: Механизмы криоповреждения и криопротекции биологических структур. Киев: Наук. думка, 1976, с. 109—110.
5. Данилевский Н. Ф., Противень Н. Ф. Криокюретаж как метод лечения патологических зубодесневых карманов при пародонтозе. — Терапевт. стоматология, 1975, вып. 10, с. 48—50.
6. Данилевский Н. Ф., Грохольский А. П., Противень Н. Ф. Низкие температуры при лечении пародонтоза. — В кн.: Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических структур. Киев: Наук. думка, 1977, с. 68—69.
7. Грохольский А. П., Миклашевич В. В., Мостицкий Л. В. и др. Криохирургическая установка для реабилитации стоматологических больных. — В кн.: Крат. тез. V съезда стоматологов УССР (26—28 апр. 1978 г.). Одесса, 1979, с. 140—142.
8. Грохольский А. П., Противень Н. Ф., Рахний Ж. И., Рубан А. И. Применение низких температур при лечении заболеваний пародонта и слизистой оболочки полости рта. — В кн.: Крат. тез. V съезда стоматологов УССР (26—28 апр. 1978 г.), Одесса, 1978, с. 93—95.
9. Лапоногов О. А., Птуха Т. П., Пушкарь Н. С. и др. Состояние и перспективы развития криохирургии. — В кн.: Первый съезд Всесоюз. науч. мед.-техн. о-ва, 1975, с. 104—108.
10. Никитин В. А., Медведев Е. М., Муринец Б. Н. и др. Стоматологический криозонд. — Криобиология и криомедицина, 1975, вып. 1, с. 141—143.
11. Трушкевич Л. И. Криогенные методы лечения злокачественных новообразований челюстно-лицевой области. — В кн.: Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических структур. Киев: Наук. думка, 1976, с. 118—122.

Киевский медицинский институт
им. акад. А. А. Богомольца

Поступила в редколлегию
18.03.80

IV. КРИОГЕННАЯ ТЕХНИКА

УДК 57.043:664.8.037.002.5:621.59.001.5

*Ю. М. Рудько, А. М. Бражников, М. Л. Печеный,
Т. Б. Левшина, О. Н. Остапова*

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ТЕПЛООБМЕНА В ОСЕСИММЕТРИЧНЫХ КАМЕРАХ КРИОЗАМОРАЖИВАТЕЛЕЙ

При выполнении криоконсервирования биологических объектов в программном криозамораживателе с целью однозначного выполнения процесса должно быть обеспечено строгое чередование следующих основных требований: 1) осуществление возможности одновременной загрузки заданным количеством одного вида биологического объекта в одинаковых контейнерах; 2) реализация режима отвода тепла объекта по определенной, индивидуальной для каждого вида объекта программе в заданном температурном интервале; 3) выполнение процесса при наименьшем расходе хладагента — жидкого азота — за один цикл снижения температуры объекта по обусловленной программе.

Следует, однако, отметить, что анализ работы известных конструкций аппаратов по второму и третьему требованиям затруднен. Это связано прежде всего с отсутствием методов расчета и единого подхода к разработке и оценке работы аппаратов. Учитывая важность создания инженерной методики расчета криозамораживателей, мы провели описанный в настоящей работе цикл исследований.

Предшествовавший исследованиям анализ применяемых в мировой практике схем организации отвода тепла в криозамораживателях [10] показал перспективность создания осесимметричных конструкций универсальных аппаратов по типу аэродинамических труб с циркулирующим при вынужденном течении двухфазным потоком азота. Выяснилось также, что только в одном варианте аппарата [9] поставлена и частично реализуется задача обеспечения одинаковых условий для отвода тепла от всех помещенных в рабочую зону контейнеров с объектами независимо от их количества и места установки. Для всех остальных схем в активной зоне характерно наличие предположительно значительных величин неоднородности параметров циркулирующего потока, оказывающих влияние на теплообмен между поверхностями контейнеров и охлаждающим потоком. Это предопределило изложенную ниже последовательность выполнения работ по моделированию процессов отвода тепла при различных конструктивных схемах криозамораживателей биологических объектов с целью экспериментального исследования процесса внешнего теплообмена.

Стенд и общая методика работы. Для выполнения поставленной задачи с учетом возможности моделирования изменяющихся граничных условий при исследовании внешнего теплообмена, аналогичных реализуемым в криозамораживателях, которые созданы в мировой практике, был разработан и изготовлен стенд, оборудованный теплообменником-камерой, криогенной и измерительными системами (рис. 1).

Конструктивно теплообменник стенда представляет собой вертикально расположенную аэродинамическую трубу замкнутого типа с отношением размеров по вертикали и горизонтали примерно 1 : 1. Поток, создаваемый центробежным вентилятором, совершает в камере

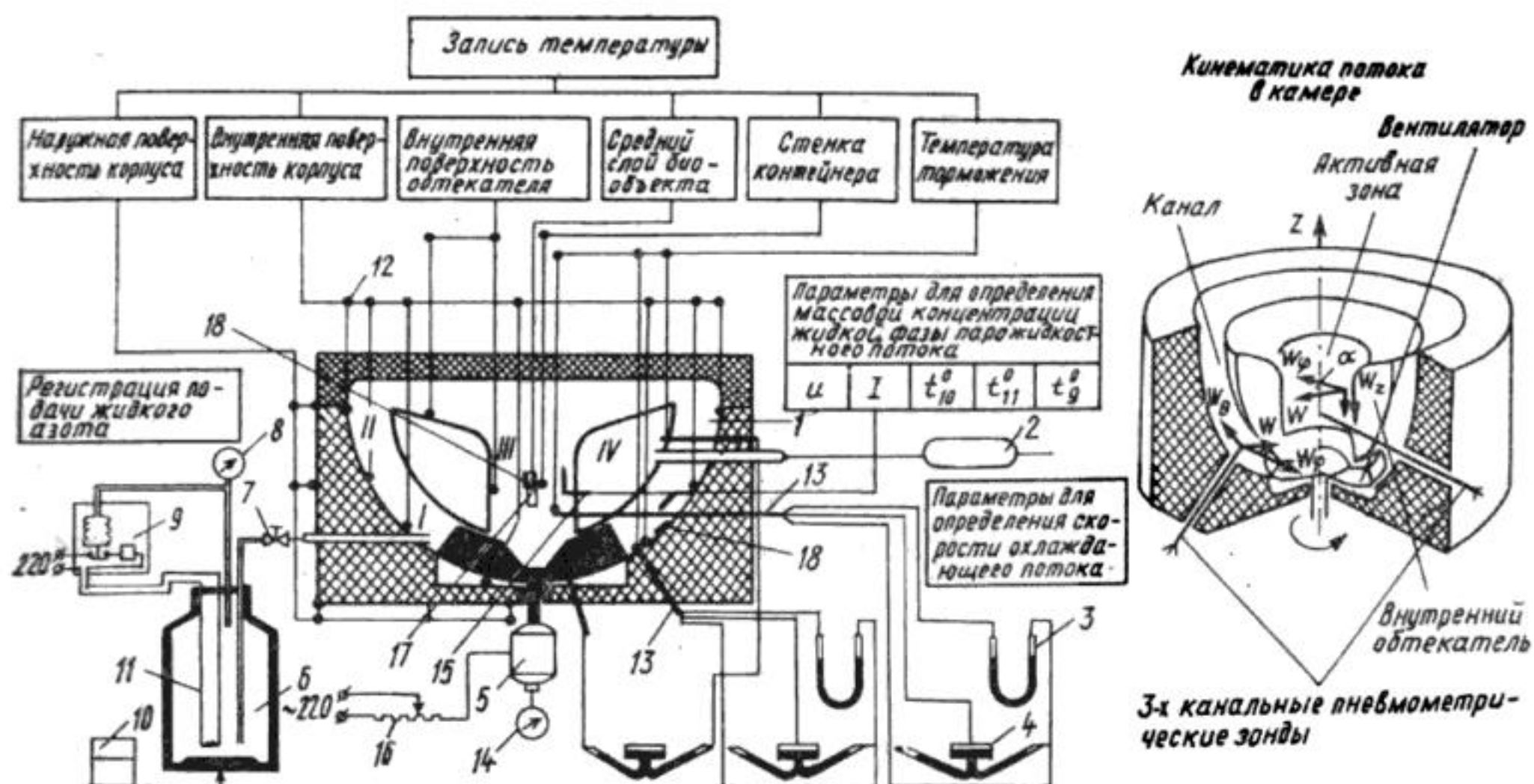


Рис. 1. Конструктивная схема экспериментального стенда:

1 — камера замораживания; 2 — отвод из камеры паров азота; 3 — U-образный манометр; 4 — микроманометр; 5 — электропривод вентилятора; 6 — сосуд Дьюара; 7 — вентиль; 8 — манометр образцовый; 9 — блок регулировки давления в сосуде; 10 — блок записи изменения веса; 11 — нагреватель; 12 — медь-константановая термопара; 13 — пневмометрический зонд; 14 — тахометр; 15 — электрокалориметрический зонд; 16 — автотрансформатор; 17 — контейнер с биообъектом; 18 — датчик теплового потока.

подъемное движение в канале по спирали. После поворота в активную зону под действием динамического напора и разрежения на входе в вентилятор поток совершает опускное движение. Путем относительно простых конструктивных преобразований на стенде возможно изучение различных схем организации отвода тепла от контейнеров с объектами. Принципиальная схема конструктивного оформления организации процесса теплообмена показана на рис. 2.

Главная часть стенда — камера — содержит коаксиально расположенные основные узлы: теплоизолированные пенополиуретаном и влагозащищенные герметичными оболочками корпус 1 и крышку 2, обтекатель (контейнер охлаждения) 4, расположенный под обтекателем вентилятор 3. В процессе исследований цилиндрический теплоизолированный корпус и соосно с ним установленные обтекатель и вентилятор не изменялись. Новые конструктивные элементы вводились в результате предварительно выполненных исследований и анализа результатов с целью изменения параметров циркулирующего потока, направленных на повышение однородности поля параметров потока в активной зоне. Распыление поступающей через азотопровод парожидкостной смеси азота для искусственного создания дисперсного режима в циркулирующем потоке отличается нижним или верхним расположением распыляющих жидкий азот устройств и элементами для формирования потока. При нижней подаче хладагент поступает в поток (рис. 1, зона I), создаваемый вентилятором, где распыляется на капли крупного размера. Дальнейшее деление капель происходит при подъемном движении в кольцевом канале, зона II, и опускном — в активном (рабочем) объеме камеры, зона III. При верхней подаче предварительное распыление осуществляется с помощью форсунки с круговым щелевым соплом и соударяющимися струями (рис. 1, п. 12). Последующее дробление капель происходит в смесительной камере и мелкоячеистой сетке. Прошедший через активную зону поток попадает в кольцевой канал. Зоны I—III существенно отличаются гидродинамической обстановкой и режимными параметрами [1, 5, 9].

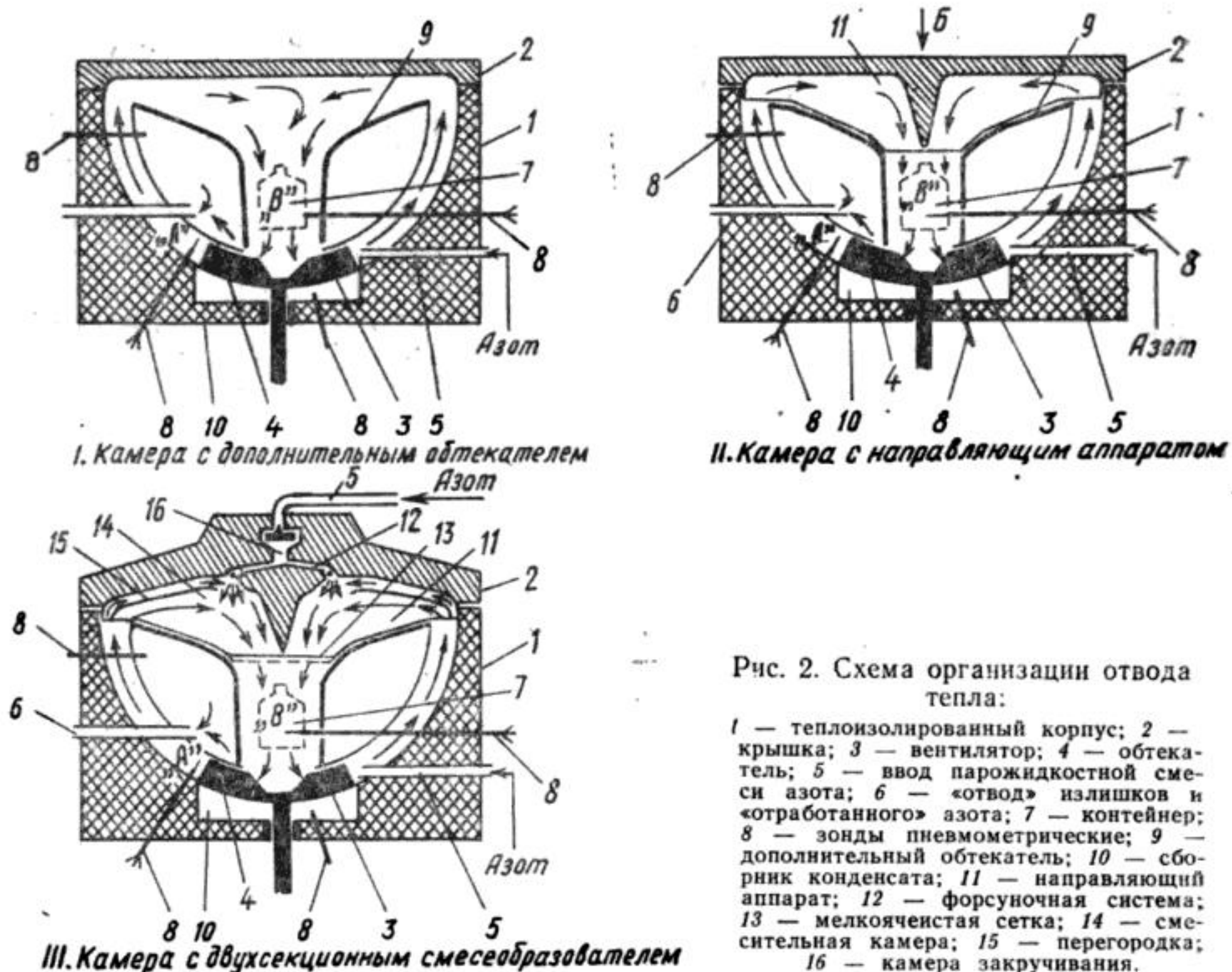


Рис. 2. Схема организации отвода тепла:

1 — теплоизолированный корпус; 2 — крышка; 3 — вентилятор; 4 — обтекатель; 5 — ввод парожидкостной смеси азота; 6 — «отвод» излишков и «отработанного» азота; 7 — контейнер; 8 — зонды пневмометрические; 9 — дополнительный обтекатель; 10 — сборник конденсата; 11 — направляющий аппарат; 12 — форсуночная система; 13 — мелкая сетка; 14 — смешительная камера; 15 — перегородка; 16 — камера закручивания.

В среднем по высоте сечения активной зоны проводились измерения следующих величин: температурных полей нагретых стенок t_c ; температуры t_n и давлений — статического P_c и полного P^* парообразной фазы потока; удельных тепловых потоков через нагретые стенки q ; массовой расходной концентрации жидкой фазы Y_p . Аналогичные параметры измерялись в I зоне. Здесь поток движется по криволинейному каналу и интенсивно насыщается жидким азотом при нижней подаче, оказывая существенное влияние на изменение параметров среды в рабочем объеме.

Одновременно с перечисленными измерялись также расход жидкого азота из сосуда Дьюара, скорость вращения вентилятора и значения мощности электропривода вентилятора для определения величины аэродинамических потерь и КПД системы «мотор — вентилятор».

В процессе исследования течения одно- и двухфазных циркулирующих потоков в осесимметричных камерах криозамораживателей необходимо установить следующее.

1. Изменение полной скорости циркулирующего потока W (в тангенциальном направлении) и ее составляющих — окружной W_ϕ и осевой W_z , W_θ при одно- и двухфазном течениях.

2. Характер изменения полей Y_p в циркулирующем потоке.

3. Влияние изменения температуры, при которой работает камера, на поле скоростей однофазного потока.

4. Изменение поля скоростей при установке плоских контейнеров в рабочей (активной) зоне камеры.

5. Изменение коэффициентов теплоотдачи на характерных поверхностях — боковых плоскостях контейнера α_k и криволинейной поверхности камеры $\alpha_{кр}$, а также величины и состава безразмерных аргументов критериального уравнения для безразмерного коэффициента теплоотдачи — соответственно Nu_k и $Nu_{кр}$, отражающих наиболее существ-

венные стороны физических явлений, которые имеют место в рабочем процессе [2, 5, 6].

Измерения температур выполнялись в соответствии с Международной практической температурной шкалой и обозначением температуры в °С. При этом применялись медь-константановые термопары (диаметр провода 0,12 мм) для измерения температур поверхностей, объекта в жидком и твердом состояниях, теплоизоляции и газообразной части потока от 50 до —196°С. Регистрирующими приборами являлись автоматические потенциометры КСП-4, ЭПП-09, Н-306, а также микроампер-милливольтметры Ф-30 и КП-59.

Как известно, при лучистом теплообмене между газом и поверхностью твердых тел существенное значение имеет излучение. Однако применение в наших исследованиях азота, излучение которого незначительно и может не приниматься во внимание, и поверхностей с малой степенью черноты позволило нам устанавливать термодатчики без экранов в соответствии с рекомендациями [6, 14]. При контактном методе измерения температуры производилась зачеканка утопленных спаев в канавках деталей корпуса и обтекателя, а также припайка неутопленных спаев на поверхностях контейнеров с последующей прилейкой проводов термопар на изотермических поверхностях. Расстояние до центра чувствительного элемента термоприемника от поверхности тела во всех случаях менее толщины электрода. Схема установки термопар на высоте корпуса показана на рис. 1. В каждом сечении по высоте и диаметру камеры установлены по три равностоящие и параллельно подключенные термопары, всего 11 поясов. Одна термопара фиксирует температуру в середине наибольшей толщины теплоизоляции корпуса. Схема установки термопар на поверхностях и внутри контейнеров показана на рис. 3. Для измерения температуры газообразной фазы потока применялся термоприемник с защищенной термопарой и частичным торможением потока (коэффициент восстановления $r=0,96$) в соответствии с рекомендациями, разработанными в работах [8, 14].

Плотность тепловых потоков через нагретые поверхности контейнеров и стенки корпуса камеры измерялась датчиками теплового потока типа ДТП-05, разработанными и изготовленными в Институте технической физики АН УССР (предел измерения до $20 \cdot 10^3$ Вт/м², чувствительность 0,0231 мВ·м²/Вт, постоянная времени не более 5 с и точность 2,5% при диаметре 27 мм и толщине 1,85 мм). Датчики теплового потока прикреплялись на поверхностях контейнеров и камеры с помощью высокотеплопроводной пасты из окиси бериллия с последующим прижатием за окантовку датчика плоскими пружинами из нержавеющей стали. Регистрация показаний производилась графопостроителями Н-306 и ПДП-4.

Всего на стенде фиксировались одновременно 29 значений температуры и значения удельных тепловых потоков на трех поверхностях.

Основные элементы созданной системы для регулируемой подачи азота в камеру в виде парожидкостной смеси описаны в работе [9]. На стенде в систему были дополнительно включены блок записи измерения массы сосуда с азотом и образцовый манометр, которые предназначались для контроля расхода азота через вентиль. Точность открытия щели регулирующего вентиля обеспечивалась в пределах $\pm 0,1$ мм. Расход азота $G_{\text{аз}}$ изменялся от 0,25 до 1,45 кг/мин.

Измерение аэродинамических параметров потока в характерных сечениях зон I и III выполнялось с помощью установленных в координатных устройствах пневмометрических трехканальных зондов полного и статического давлений, а также угла направления потока согласно работам [8, 14]. Снятие показаний с пневмометрических зондов осуществлялось чашечными микроманометрами типа ММН-240, заполненных этиловым спиртом, и U-образными водяными дифференциальными

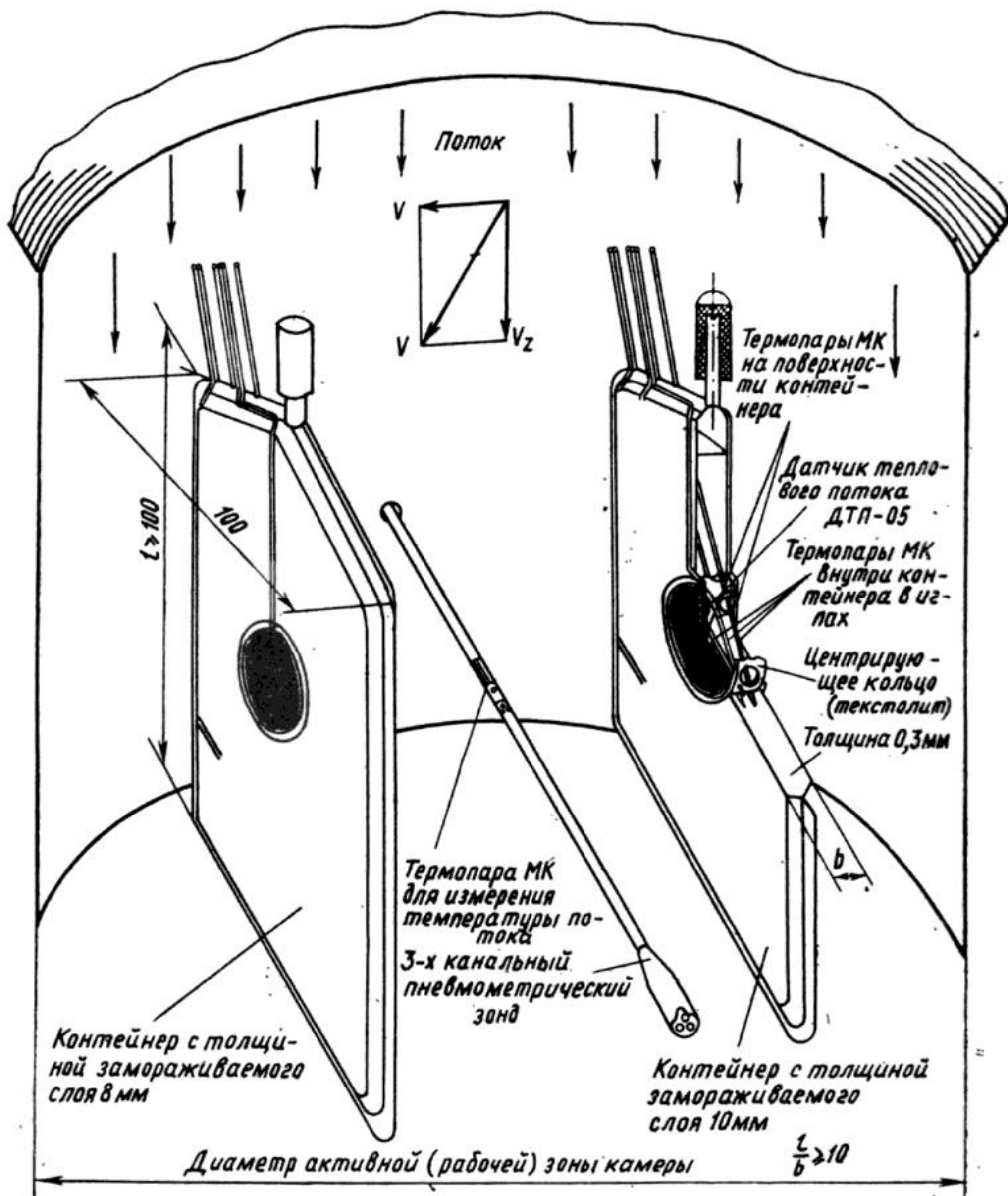


Рис. 3. Схема размещения датчиков на контейнерах.

манометрами. Поскольку зонды-термоприемники были присоединены к пневмометрическим зондам, это позволило при траверсировании потока одновременно измерять поля давлений и температур по сечению канала.

Скорость движения потока в камере для различных серий опытов изменялась вариацией чисел оборотов вентилятора 500, 1000,, 2500 об/мин, которые поддерживались неизменными на протяжении выполняемого опыта.

Для определения Y_p в циркулирующем потоке применялся калориметрический метод с электрическим перегревом отсасываемой пробы аналогично работам по определению степени влажного пара в турбинах [1, 3, 4, 7]. Из-за трудностей методического характера измерение скорости жидкой фазы в экспериментах не представилось возможным.

Примененный в исследованиях калориметр позволяет измерять параметры для вычисления Y_p с интервалом до 45 с и погрешностью до 4%. В опытах интервал между замерами составлял 1 мин [11].

Существенно определение аэродинамического тепла $Q_{аэр}$, которое выделяется при сжатии газовой фазы охлаждающего потока в вентиляторе Q_v [Вт]

$$Q_v = \frac{G}{2} (W_B^2 - W_0^2) \left(\frac{1}{\eta_v} - 1 \right) \quad (1)$$

и при трении потока о стенки камеры и преодолении местных сопротивлений $Q_{тр}$ [Вт]

$$Q_{тр} = \frac{G}{2} \sum \xi_i W_i^2; \quad (2)$$

$$Q_{аэр} = Q_v + Q_{тр} = \frac{G}{2} \left[(W_B^2 - W_0^2) \left(\frac{1}{\eta_v} - 1 \right) + \sum \xi_i W_i^2 \right], \quad (3)$$

где $W_0 = W$ — скорость потока в активной зоне; $W_B = W_{кр}$ — скорость потока в канале; G — массовый расход; η_v — КПД вентилятора; ξ_i — коэффициент сопротивления участков газового тракта камеры.

В связи с тем что величины η_v и ξ_i в отдельности определить невозможно, представим зависимость $Q_{аэр}$ в следующем виде:

$$Q_{аэр} = \frac{G}{2} [K_A(n, t_n) W_0^2 - (W_B^2 - W_0^2)]; \quad (4)$$

$$K_A = \frac{1}{W_0^2} \left(\frac{W_B^2 - W_0^2}{\eta_v} + \sum \xi_i W_i^2 \right) = \frac{\sum N_{дв} \eta_{дв}}{G W_0^2}, \quad (5)$$

где $N_{дв}$ — мощность электродвигателя; n — число оборотов; $\eta_{дв}$ — КПД электродвигателя.

Поэтому методика определения $K_A(n, t_n)$ учитывает выполнение работ как для однофазного газообразного потока, так и для двухфазных газожидкостных потоков различной концентрации.

Определение $Q_{аэр}$ производится для нескольких фиксированных температурных уровней ($-196, -160, -120, \dots, 0, 40^\circ\text{C}$) и пяти фиксированных значений чисел оборотов вентилятора (500, 1000, ..., 2500 об/мин).

Работа на стенде. Исследования структуры потока в теплообменнике (см. рис. 1, 2), выполненные с однофазной газовой средой, показали, что в зоне поворота поток в рабочую полость камеры $\vec{W}$ направлен под углом $\alpha = 5-15^\circ$ и незначительно увеличивается по мере его опускания к вентилятору. В канале камеры также образуется зона возвратных токов вследствие значительной неравномерности параметров потока на входе в вентилятор, приводящих к неравномерности распределения расхода по сечению канала [13].

Значительное изменение структура потока претерпевает при установке в активную зону двух плоских контейнеров, которые имитируют действие сглаживающей решетки и позволяют практически исключить вихревую зону. Однако характер распределения поля скоростей в активной зоне с максимумом W вблизи ее образующей остается. Таким образом, в схеме I (см. рис. 1, 2) из-за существенно неравномерного поля скоростей основное количество поступающих в активную зону капель сосредоточивается на ее периферии, что приводит к значительно

более интенсивному теплообмену между циркулирующим потоком и расположенными там объектами по сравнению с находящимися в центре рабочей полости.

Рассматривая возможность качественного выполнения заданных режимов в одновременно замораживаемых объектах, можно предположить, что контейнеры должны располагаться в зоне с наибольшей равномерностью параметров теплоотводящей среды. Однако она занимает ограниченное пространство вблизи стенок канала, а поле параметров, влияющих на теплообмен, зависит от места установки, количества и размеров объектов. Поэтому такая схема организации теплообмена не может быть рекомендована в качестве базовой для создания работоспособной конструкции аппарата как не обеспечивающая идентичных условий отвода тепла от контейнеров, расположенных в рабочем объеме камеры.

На втором этапе исследовалась структура потока в теплообменнике (см. рис. 1, 2). Применение направляющего аппарата привело к более «упорядоченному» движению потока в активной зоне и возрастанию расхода среды по сравнению с I вариантом в 3—4 раза [13]. Полученные значения W с пятилопастным направляющим аппаратом при 500—1500 об/мин практически для всего сечения отличаются не более чем на 1 м/с (около 10%), 2000 об/мин — 3 м/с и 2300 об/мин — 4 м/с (до 25%), при этом $\alpha = 50\text{—}80^\circ$.

Для III схемы камеры, содержащей направляющий аппарат, сетку и дополнительные лопасти, получены более равномерные поля W при $\alpha = 60\text{—}85^\circ$. Одновременно с возрастанием W резко увеличилось значение W_z при существенном уменьшении W_α в активной зоне. Исследования полей скоростей при изменении температуры потока от 30 до -196°C показали слабую зависимость значений $W = f(t_{\text{п}})$.

Выполненные исследования газодинамических параметров камеры позволяют сделать заключение, что перспективными следует считать II и III варианты организации теплообмена в связи с осуществленной возможностью повышения равномерности полей скоростей в активных зонах этих камер. С учетом полученных значений для чисел Re , характерных для области развитого турбулентного течения, и соответствующих условий распыла азота можно принять допущение о равномерном распределении мелкодисперсных капель по горизонтальным сечениям активных зон исследованных схем камер.

На этапе экспериментов по исследованиям теплообмена работа проводилась согласно указаниям работ [11, 12].

В результате замораживания бидистиллированной воды в контейнерах с толщиной слоя объекта 8 и 10 мм при различных схемах организации отвода тепла получены необходимые данные для количественной оценки процесса теплоотдачи в активной зоне и канале. Исследования выполнены в следующем диапазоне изменения параметров: $q_{\text{к}}$ (контейнеров) до $3 \cdot 10^5$ Вт/м² и $q_{\text{кр}}$ (криволинейной поверхности канала) до $1 \cdot 10^5$ Вт/м²; W_0 — до 17 м/с и $W_{\text{в}}$ — до 27 м/с; $Y_{\text{р}}$ — до 39%; средних температур $t_{\text{п}}$ от 20—40 до -196°C .

Контроль скорости замораживания $\dot{\theta}$ с помощью термопар, установленных в сечениях по толщине слоя бидистиллированной воды, показал, что полученные наибольшие значения скоростей отвода тепла в проведенных экспериментах перекрывают диапазон значений $\dot{\theta}$, описанных в литературе, при экспериментальном и практическом замораживании различных биологических объектов, холодильная обработка которых производится по заданным программам. Средние значения $\dot{\theta}$ достигают 41 град/мин при нижней подаче и 98 град/мин при верхней. При сравнении полученных результатов для схем II и III, в которых осуществлена подача жидкого азота снизу, видно, что значения $a_{\text{к}}$ на нагретых поверхностях примерно одинаковы. При увеличении $G_{\text{аз}}$ су-

ущественно возрастают q_k в схеме III с верхней подачей жидкого азота через щелевой распылитель и смесеобразователь.

Обобщение опытных данных выполнялось по исходным уравнениям для Nu_k и $Nu_{кр}$. Величины определяющих и определяемых критериев рассчитывались согласно работе [11].

Уравнение для теплообмена при обтекании двухфазным потоком азота пластин-контейнеров в активной зоне запишем в обобщенном виде:

$$Nu_k = 0,0048 Re^{0,8} Pr^{0,43} Y_p^{0,115} (\Theta/K)^{0,175} D^{0,45}. \quad (6)$$

Теплообмен при обтекании криволинейной поверхности камеры, теплоизолированной пенополистиролом

$$Nu_{кр} = 0,0117 Re^{0,8} Pr^{0,43} Y_p^{0,085} (\Theta/K)^{0,26} (We_\omega/D)^{0,075}, \quad (7)$$

где $Nu_k = \alpha_k l_k / \lambda$; $Nu_{кр} = \alpha_{кр} l_{кр} / \lambda$; $Re = Wl/\nu$; $Pr = \nu/a$;
 $K = r/C(t_c - t_s)$; $D = \sigma/\rho_{ж}\nu W$; $\Theta = (t_{п} - t_s)/(t_c - t_{п})$;

$$Y_p = G_{ж}/(G_{ж} + G_{п}); \quad \alpha_k = q_k/(t_c - t_{п}); \quad We_\omega = \sigma/\rho_{ж} n^2 R_{вент}^2 R_{кр};$$

$$l_{кр} = \frac{R_{кр}^2 - R_{вн}^2}{R_{кр}} \text{ — характерный размер канала, м; } R_{вн} \text{ — внутренний}$$

радиус кривизны канала; l_k — характерный размер — длина контейнера, м; λ — коэффициент теплопроводности, Вт/м·К; ν — кинематический коэффициент вязкости, м²/с; C — удельная теплоемкость, Дж/кг·К; $\rho_{ж}$ — плотность жидкой фазы, кг/м³; r — теплота испарения, Дж/кг; t_s — температура фазового перехода жидкого азота, °С; σ — коэффициент поверхностного натяжения, Н/м; $R_{вент}$ — радиус вентилятора, м; $R_{кр}$ — наружный радиус кривизны канала, м; $G_{ж}$, $G_{п}$ — расход соответственно жидкой и газообразной фазы, кг/с; q — тепловой поток, Вт.

Границы изменения критериев активной зоны и канала составили: Nu — 1200—50; Re — $1,7 \cdot 10^6$ — $3 \cdot 10^4$; Pr — 0,8—0,7; Y_p — 0,39—0,05; K — 30—0,86; Θ — 80—1,2; D — 330—2,1; We_ω — $1,6 \cdot 10^{-6}$ — $1 \cdot 10^{-7}$.

Таким образом, разработана методика экспериментального исследования газодинамики и теплообмена при вынужденной конвекции в осесимметричных камерах криозамораживателей. Создан экспериментальный стенд, позволяющий исследовать процессы отвода тепла от биообъектов дисперсным парожидкостным потоком азота при изменяющейся концентрации жидкой фазы и скорости потока и различных схемах организации процесса теплообмена.

На основании анализа и исследования теплообмена при течении двухфазной среды в каналах камер осесимметричных типов, моделирующих известные типы конструкций и их возможные модификации, показано следующее.

1. В распространенной на практике схеме I камеры (с нижней подачей азота) невозможно достижение равномерного отвода тепла с ожидаемой степенью точности для контейнеров, которые располагаются в различных местах активной зоны. Это связано со значительным перераспределением капельной фазы в соответствии с характером поля окружной составляющей скорости в активной зоне. Схема отличается низкой пропускной способностью сечения активной зоны, а загрузка ее контейнерами изменяет параметры и структуру потока, так как контейнеры играют роль решетки.

2. Наличие даже относительно небольших значений окружной скорости W_ϕ (до 30%) в активной зоне создает неравномерное поле кон-

концентраций жидкой фазы Y_p в потоке. Снижение неравномерности полей скоростей и концентраций возможно конструкторскими приемами, в частности установкой направляющих аппаратов, смесеобразователей и др.

3. Изменение температуры газообразного потока от $+30$ до -196°C оказывает слабое влияние на величину его скорости.

4. При подаче азота в поток происходит изменение в активной зоне окружной W_ϕ и осевой W_z составляющих скорости в сторону уменьшения W_ϕ и увеличения W_z . Указанные изменения достигают соответственно 3—5% при нижней подаче азота и 10—12% при верхней.

5. Получены уравнения подобия для средней теплоотдачи к двухфазному потоку от поверхностей плоских контейнеров и сферической поверхности теплоизолированного корпуса. Предложенные уравнения подобия дают возможность описывать условия теплообмена на нагретых поверхностях в рассмотренных случаях течения с погрешностью до 20%.

1. Дейч М. Е., Филиппов Г. А. Газодинамика двухфазных сред. — М.: Энергия, 1968. — 422 с.
2. Капинос В. М., Чиркин Н. Б., Поволоцкий Л. В. и др. Экспериментальные исследования теплообмена при течении воздушно-водяного потока. — Теплоэнергетика, 1975, № 5, с. 28—31.
3. Кириллов И. И., Ермаков В. Г., Носовицкий А. И. и др. Электрокалориметрический метод определения весовой степени влажности водяного пара. — Тр. Цент. котло-турб. ин-та, 1966, вып. 65, с. 11—16.
4. Кириллов И. И., Циглер Х. Х., Фадеев И. П. Применение электрокалориметрического метода измерения влажности в потоке влажного пара. — Там же, с. 7—10.
5. Кошкин В. К., Калинин Э. К., Дрейцер Г. А., Ярхо С. А. Нестационарный теплообмен. — М.: Машиностроение, 1973. — 328 с.
6. Петухов Б. С. Опытное изучение процессов теплопередачи. — М.; Л.: Госэнергоиздат, 1952. — 343 с.
7. Печеный М. Л., Рудько Ю. М., Вишневский В. Д. Применение калориметрического метода для определения весовой концентрации жидкого азота в охлаждающем потоке. — В кн.: Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических структур. Киев: Наук. думка, 1977, с. 116—117.
8. Повх И. Л. Аэродинамический эксперимент в машиностроении. — М.: Машгиз, 1959. — 396 с.
9. Рудько Ю. М. Аппарат для замораживания биообъектов. — Холодил. техника, 1977, № 2, с. 33—36.
10. Рудько Ю. М. Технические средства криозамораживания биологических объектов: Обзор. — Харьков, 1978. — 17 с. — Рукопись деп. в ВИНТИ, № 611—79 Деп.
11. Рудько Ю. М. Исследование процессов теплообмена при регулируемом отводе тепла с целью разработки аппарата для программного замораживания биологических объектов: Автореф. дис. ... канд. техн. наук. — М., 1979. — 24 с.
12. Рудько Ю. М., Печеный М. Л. К вопросу о тепловом расчете камеры замораживания биообъектов. — В кн.: Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических структур. Киев: Наук. думка, 1977, с. 117—118.
13. Рудько Ю. М., Печеный М. Л. Влияние направляющего регистра на структуру охлаждающего потока в камере замораживателя биообъектов. — В кн.: Вопросы криоконсервирования биологических объектов. Киев: Наук. думка, 1978, с. 89—92.
14. Теплотехнический справочник: В 2-х т. / Под общ. ред. В. Н. Юренева. — 2-е изд., перераб. — М.: Энергия, 1976. — Т. 2, 896 с.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
05.06.80

Н. В. Репин, Б. А. Скорняков

МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОГО МЕТОДА ЗАМОРАЖИВАНИЯ — СКАЛЫВАНИЯ

Методы подготовки биологических объектов для электронно-микроскопических исследований по способу фиксации делятся на химические и физические. К последним относится получение углеродно-металлических реплик с поверхностей сколов криофиксированных биообъектов — метод замораживания — скалывания.

Получение реплик является многоэтапным процессом и включает следующие операции: подготовку биообъекта, его криофиксацию, скалывание, сублимационное травление и нанесение углеродно-металлической реплики на поверхность скола, а также последующую очистку реплики. Криофиксация, лежащая в основе метода, представляет собой максимально быстрое замораживание до температур ниже -100°C . При этом лучше, чем в случае химической фиксации, сохраняется прижизненная локализация органических и неорганических компонентов биообъекта, включая воду [5], происходит мгновенная остановка процессов жизнедеятельности и надежно фиксируются все промежуточные продукты метаболизма.

Однако метод не лишен некоторых недостатков. Он, в частности, не исключает артефакты, обусловленные вероятностью случаев неполного соответствия рельефов реплик поверхностей сколов биообъектов. В настоящее время отсутствует надежный способ контроля артефактов сублимационного травления поверхности скола, которые могут имитировать глобулярные структуры [2]. К недостаткам метода следует также отнести ограниченное разрешение — не более $20 \text{ \AA}$ — и невозможность идентификации рельефа.

Несмотря на имеющиеся ограничения, метод замораживания — скалывания позволяет изучать морфологические особенности мембран биообъектов, практически недоступные при изучении другими способами. Он является как бы промежуточным между методами ультратонких срезов и растровой электронной микроскопии. Способ подготовки объектов позволяет исследовать характеристики структур в трехмерном измерении. При этом могут изучаться не только внешние, но и внутренние поверхности мембран.

Учитывая отмеченные особенности, предполагаем, что метод замораживания — скалывания позволит решить ряд задач при исследовании повреждений биообъектов в процессе низкотемпературного консервирования, в частности при изучении динамики нарушения целостности мембран клеток, изменений пространственного расположения глобулярных структур мембран, что отражает, вероятно, изменение белок- и липид-липидных взаимодействий, и при решении других вопросов.

Необходимо, однако, отметить, что техническое обеспечение метода замораживания — скалывания отстает от теоретических и практических требований. В настоящее время выпускаются единичные образцы приборов, которые имеют технические ограничения. Поэтому основная масса исследований выполнена на дорогостоящих зарубежных установках или переоборудованных вакуумных постах [1, 3, 4, 6, 8].

Целью нашей работы было создание аппаратуры и методики для получения углеродно-металлических реплик с поверхностями сколов криофиксированных биообъектов.

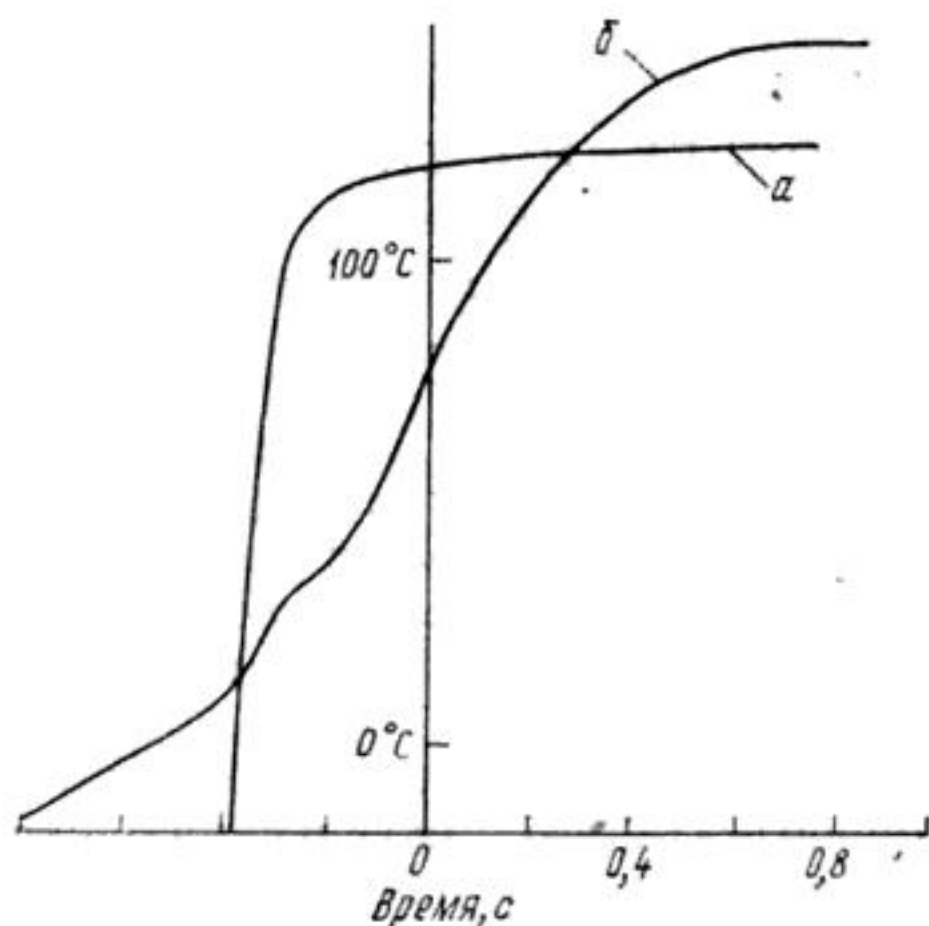


Рис. 1. Осциллограмма охлаждения биообъектов в переохлажденном фреоне-22 (а) и жидком азоте (б).

трово́ды для измерительных цепей. В рабочем пространстве расположены электронно-лучевые испарители, охлаждаемый нож с электромагнитным приводом, охлаждаемый экран-конденсатор, используемый в режимах сублимационного травления и при напылении, а также столик-объектодержатель с системой охлаждения и приводом вращения столика. Внешняя система контролирующих и управляющих устройств включает блоки контроля температуры ножа и объекта, а также блоки управления ножом и столиком-объектодержателем.

Особенности работы установки целесообразно рассмотреть во взаимосвязи с описанием методики обработки биообъекта.

К исследованиям готовятся образцы заданных размеров и геометрической формы: капли суспензий клеток или кусочки ткани размером не более 1—2 мм.

Второй этап методики — криофиксация биообъекта. Одним из главных критериев успешной фиксации является отсутствие кристаллической фазы в объекте. Наиболее распространенный способ достижения такого результата — быстрое охлаждение образца. Скорость охлаждения, как известно, зависит от объема и формы объекта, свойств охлаждающей среды и ее термического контакта с объектом. Хладоагент должен быть химически инертным. Наиболее полно отмеченным требованиям удовлетворяет фреон-22, температура затвердевания которого — -145°C . В качестве хладоагента успешно могут быть использованы переохлажденные изопентан (температура затвердевания — $-160,5^{\circ}\text{C}$) и пропан ($-187,1^{\circ}\text{C}$).

Теоретические предпосылки для выбора скорости охлаждения основаны на том, что для полной аморфизации воды ее необходимо охладить до -100°C за время, соизмеримое со временем перегруппировки молекул порядка 10^{-10} с, т. е. со скоростью $10^{-12}^{\circ}\text{C}/\text{с}$. Практически удовлетворительной считают аморфизацию воды в биологических объектах, если кристаллическая фаза не выявляется методами электронной микроскопии. Это соответствует скорости охлаждения порядка $10^4^{\circ}\text{C}/\text{с}$. Применение криопротекторов позволяет получить квазиаморфное состояние воды при скоростях охлаждения 10^2 — $10^3^{\circ}\text{C}/\text{с}$.

В нашей работе объект — суспензия клеток — насыщается глицерином (10—20%) и охлаждается в переохлажденном фреоне-22. Охлаждение в фреоне-22 происходит значительно быстрее, чем в жидком азоте (рис. 1). Как видно из рисунка, фреон-22 позволяет повысить

Конструкцию установки проектировали с учетом требований высокой производительности и воспроизводимости этапов методики. При этом учитывалось, чтобы криофиксированный биообъект на этапах обработки подвергался минимальным тепловым воздействиям.

В основу изготовленной установки взят отечественный пост ВУП-2К. Рабочая камера включает металлическое переходное кольцо, расположенное между основанием и стеклянным колпаком. Кольцо имеет вакуумный шлюз для манипуляций с объектом. В переходное кольцо вмонтированы вводы для жидкого азота и элект-

скорость охлаждения объекта в сравнении с азотом на порядок. Измеренная нами скорость охлаждения была 800°C в 1 с.

Этап скалывания криофиксированного образца обеспечивает обнажение клеточных поверхностных и внутренних структур и обычно осуществляется с помощью ножа или разламывания объекта на части. И в том и в другом случае поверхность скола является структурно-обусловленной, т. е. проходит по участкам и плоскостям с более слабыми в энергетическом отношении связями.

В целях исключения субъективного фактора и стандартизации скола мы разработали и изготовили полуавтоматическую систему скола, состоящую из столика-объектодержателя, рассчитанного на шесть объектов и имеющего термостабилизацию; электромагнитного ножа с автономным охлаждением и блока управления, рассчитанного на шесть циклов, каждый из которых состоит из поворота объекта на 60° , включения ножа на скол.

Поверхность скола для проявления рельефа структур биообъекта подвергают сублимационному травлению. В основе этого метода лежит разность скоростей испарения из замороженного состояния воды и веществ, составляющих биологические структуры. Скорость сублимации льда в вакууме является функцией его температуры, давления насыщенных паров воды и вакуума. Так, для чистого льда при давлении порядка 10^{-5} торр скорость сублимации при -100°C составляет $2,3 \text{ \AA}$ в 1 с, а для -130°C — $0,01 \text{ \AA}$ в 1 с [6]. Для нормальной сублимации льда необходимо, чтобы вакуум был несколько выше, чем давление насыщенных паров, в противном случае наблюдается конденсация молекул воды на поверхность образца. Именно конденсацией, а не фазовыми превращениями объясняется появление псевдоструктур типа шероховатой пленки или отдельных образований, напоминающих глобулярные частицы мембран.

Применение антизагрязняющих ловушек, экранов, у которых скорость конденсации выше, чем скорость сублимации молекул воды, позволяет существенно снизить указанные артефакты. В качестве антизагрязняющей ловушки мы использовали подвижный экран, охлаждаемый жидким азотом.

Для нанесения углеродно-металлических реплик на поверхность скола в установке применены электронно-лучевые испарители, конструкция которых основана на известных принципах [9]. Достоинствами применяемых испарителей являются малое тепловое воздействие на замороженный объект, практически точечный источник распыления, многократность действия, управляемость и воспроизводимость процесса напыления. В качестве распыляемого материала используют платино-углеродную смесь в весовом отношении 1 : 4. Практически платино-углеродная смесь к распылению готовится в виде стержней. Получаемые таким образом пленки как по результатам наших испытаний, так и по данным литературы [7] не обнаруживают кристаллических образований, дающих дифракцию.

В целом на всех этапах отработанного метода замораживания — скалывания мы использовали наиболее прогрессивные приемы и спо-



Рис. 2. Сегментоядерный гранулоцит ($\times 190000$) (в центре — ядро клетки).



Рис. 3. Поверхность эритроцита ($\times 90000$) (в левой нижней части цитоплазматическая мембрана сколота).

собы обработки, что позволяет надеяться на хорошую сохранность биообъекта и получение удовлетворительных реплик с рельефов сколов их структур.

Для оценки возможностей разработанной аппаратуры и методики подготовки биообъектов были проведены изучения реплик лейкоцитов и эритроцитов крови человека.

Как показывает анализ полученных электронограмм, сохранность цитоплазматических мембран и клеточных структур, а также информативность препаратов удовлетворяют предъявляемым требованиям.

На электронограмме (рис. 2) представлен скол гранулоцита. Как видно из рисунка, в клетке хорошо проявляются компоненты сложного ядра, митохондрии и гранулы цитоплазмы. Хорошо выявлены поверхность мембраны ядра и его содержимое. Все структурные элементы сохранены.

На рис. 3 представлена микрофотография скола эритроцита, проходящего через внутреннюю и внешнюю поверхности мембраны.

Таким образом, осуществлено техническое и методическое обеспечение метода замораживания — скалывания, позволяющее значительно уменьшить влияние субъективного фактора и стандартизовать операции подготовки биообъекта при хорошей сохранности клеточных структур. Получаемые электронограммы удовлетворяют современным требованиям.

1. Белавцева Е. М., Титова Е. Ф., Облонцева Е. С. Метод замораживания — травления в электронной микроскопии биологических объектов. — Арх. анатомии, гистологии и эмбриологии, 1973, 64, № 4, с. 56—59.
2. Боровягин В. А. Методы ультратонких срезов негативного контраста и криоскалывания в исследованиях ультраструктурной организации модельных и клеточных мембран. — Успехи совр. биологии, 1974, 77, № 3, с. 399—421.
3. Комиссарчик Я. Ю., Филатов С. Е. Упрощенная установка для препарирования электронно-микроскопических объектов методом замораживания — травления. — Цитология, 1973, 15, № 120, с. 1539—1542.
4. Кузьминых С. Б., Аллахвердов Б. Л., Хуцян С. С. Проблемы развития и аппаратура криометодов. — В кн.: Криогенные методы в электронной микроскопии: II Всесоюз. симпоз. по электрон. микроскопии. Пущино, 1977, с. 101—107.
5. Савельева Н. А., Аллахвердов Б. Л., Погорелов А. Г. Микрозондовые исследования водорастворимых элементов в криостатированных срезах биологической ткани. — Там же, с. 92—95.
6. Фихте Б. А., Заичкин Э. И. Новые методы физического препарирования биологических объектов для электронно-микроскопического исследования. — М.: Наука, 1973. — 150 с.
7. Bredly D. E. High resolution shadow-casting technique for the electron microscope using the simultaneous evaporation of platinum and carbon. — Brit. J. Appl. Physiol., 1959, 10, p. 198—203.
8. Elgsakter A. A new freeze-etch unit for freeze-etch rotary shadowing low temperature freeze — fracture and conventional freeze — etching. — J. Microsc., 1978, 113, pt. 1, p. 83—94.
9. Herbert K., Hagler F., Werner W. Schulz and Rolland C. Reynold. A simple electron bean gun to platinum evaporation. — J. Microsc., 1977, 110, pt. 2, p. 149—153.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
26. 03. 80

СОДЕРЖАНИЕ

I. Теоретическая и экспериментальная криобиология

Белоус А. М., Жегунов Г. Ф. Влияние низких температур на транспорт Ca^{2+} через мембраны саркоплазматического ретикулума	3
Новиков А. Н., Олейник С. Т., Левченко Э. Н. Иницирование льдообразования при криоконсервации эмбрионов млекопитающих	16
Новиков А. Н., Вишневский В. И., Душейко А. Г. Влияние ультразвуковых колебаний на первичное зародышеобразование льда в биологических растворах	19
Морозова Т. Ф., Грек А. М., Коптелов В. А., Моисеев В. А., Луговой В. И. Изменение спектральных свойств бычьего сывороточного альбумина в концентрированных растворах хлористого натрия	22
Морозова Т. Ф., Моисеев В. А. Влияние солей на стабильность иммуноглобулина лошади	27

II. Криоконсервирование биологических объектов

Федотенков А. Г. Актуальные вопросы проблем криоконсервирования костного мозга	30
Цуцаева А. А., Попов Н. Н. Восстановление иммунореактивности облученных в среднелетальной дозе животных под влиянием трансплантации криоконсервированных лимфоцитов	35
Дроздова О. А., Цуцаева А. А., Попов Н. Н., Воскобойникова Т. Н. Влияние ультрафильтрации на свойства криоконсервированных клеток донорского и трупного костного мозга	37
Обозная Э. И., Вишневский В. И., Скорняков Б. А., Стусь Л. К., <u>Обозный Э. П.</u> Механизм действия магнитного поля на некоторые показатели внутриклеточного метаболизма	40
Высеканцев И. П., Бутенко А. Е. Изучение свойств кишечных бактериофагов после низкотемпературного консервирования	43

III. Криомедицина

Пушкарь Н. С., Сандомирский Б. П. Теоретические и практические вопросы криохирургии	47
Шольц А., Себастиан Г., Бертхольд В., Маттойс В., Песслер Л., Кирхнер Б. Криохирургическое лечение ангиом кожи и слизистой оболочки	58
Бабийчук Г. А., Луденцова С. В., Панков Е. Я., Микляев И. Ю. Состояние нейросекреторных ядер переднего гипоталамуса при экспериментальном некрозе миокарда и гипотермии	64
Высеканцев И. П., Точилова Р. В., Григорьева К. В., Стогний В. И. Влияние низких температур на микрофлору хронических неспецифических язв, эрозий, трещин слизистой оболочки полости рта	67
Волкова Н. А., Сандомирский Б. П. Влияние ПЭО-400 на развитие эксплантатов трупной кожи человека в органной культуре	69
Грохольский А. П., Данилевский Н. Ф., Миклашевич В. В., Мостицкий А. В., Худзинский В. М. Техничко-экспериментальные данные и применение криогенной автономной стоматологической установки	75

IV. Криогенная техника

Рудько Ю. М., Бражников А. М., Печеный М. Л., Левшина Т. Б., Остапова О. Н. Методика экспериментального исследования теплообмена в осесимметричных камерах криозамораживателей	80
Репин Н. В., Скорняков Б. А. Методические особенности и техническое обеспечение электронно-микроскопического метода замораживания — скалывания	89

CONTENTS

I. Theoretical and Experimental Cryobiology

<i>Belous A. M., Zhegunov G. F.</i> Low-Temperature Effects on Ca^{2+} Transport Across the Sarcoplasmic Reticulum Membranes	3
<i>Novikov A. N., Oleinik S. T., Levchenko E. N.</i> Initiation of Ice Nucleation in Mammalian Embryo Cryopreservation	16
<i>Novikov A. N., Vishnevsky V. I., Dusheiko A. G.</i> Supersonic Oscillation Effects on Ice Nucleation Initiation in Biological Solutions	19
<i>Morozova T. F., Grek A. M., Koptelov V. A., Moiseev V. A., Lugovoy V. I.</i> Changes in Spectral Properties of Bovine Serum Albumin in Concentrated Solutions of Sodium Chloride	22
<i>Morozova T. F., Moiseev V. A.</i> Effect of Salts on Stability of Horse Immunoglobulin	27

II. Cryopreservation of Biological Systems

<i>Fedotenkov A. G.</i> Current Problems of Bone Marrow Cryopreservation	30
<i>Tsutsaeva A. A., Popov N. N.</i> Restoration of Immunoreactivity of Animals Arradiated with a Mean Lethal Dose and Stimulated by Cryopreserved Lymphocyte Transplantation	35
<i>Drozdova O. A., Tsutsaeva A. A., Popov N. N., Voskoboinikova T. N.</i> The Effect of Ultrafiltration on Properties of Cryopreserved Donor and Cadaver Bone Marrow Cells	37
<i>Oboznaya E. I., Vishnevsky V. I., Skorniyakov B. A., Stus L. K., <u>Obozny E. P.</u></i> The Mechanism of Magnetic Field Effect on Certain Parameters of Intracellular Metabolism	40
<i>Vysekantsev I. P., Butenko A. E.</i> A Study of Properties of Intestinal Bacteriophages After Low-Temperature Preservation	43

III. Cryomedicine

<i>Pushkar N. S., Sandomirsky B. P.</i> Cryosurgery: Theoretical and Practical Aspects	
<i>Scholz A., Sebastian G., Berthold W., Matthäus W., Pässler L., Kirchner B.</i> Cryosurgical Treatment of Skin and Mucose Angiomas	58
<i>Babiichuk G. A., Ludentsova S. V., Pankov E. Ya., Miklyaev I. Yu.</i> The State of Anterior Hypothalamus Neurosecretory Nuclei Under Experimental Necrosis of Myocardium and Hypothermia	64
<i>Vysekantsev I. P., Tochilovskaya R. V., Grigorieva K. V., Stogny V. I.</i> The Effect of Low Temperatures on the Microflora of Chronic Nonspecific Ulcers, Erosions, Oral Mucosa Fissures	67
<i>Volkova N. A., Sandomirsky B. P.</i> The Effect of Peo-400 on the Development of Human Cadaver Skin Explants in Organ Culture	69
<i>Grokholsky A. P., Danilevsky N. F., Miklashevich V. V., Mostitsky A. V., Khudzhinsky V. M.</i> Technicoexperimental Data and Application of an Autonomous Cryogenic Dental Unit	75

IV. Cryogenic Techniques

<i>Rudko Yu. M., Brazhnikov A. M., Pecheny M. L., Levshina T. B., Ostapova O. N.</i> A Technique of an Experimental Study of Heat Exchange in Axisymmetric Chambers of Cryofreezers	80
<i>Repin N. V., Skorniyakov B. A.</i> Methodological Peculiarities and Technical Maintenance of the Electron-Microscopic Freeze-Fracture Technique	89

УДК 57.043

Влияние низких температур на транспорт Ca^{2+} через мембраны саркоплазматического ретикулума / Белоус А. М., Жегунов Г. Ф. — Криобиология и криомедицина, 1982, вып. 10, с. 3—16.

Анализируется литература с привлечением собственного экспериментального материала о действии низких температур на ионные насосы биомембран. На основании изучения кинетических параметров функционирования Са-АТФазы мембран саркоплазматического ретикулума, различных структурных характеристик липидного бислоя везикул высказывается предположение о компенсаторном принципе нарушения функционирования транспортных АТФаз вследствие модификации структуры биомембран после замораживания — отогрева биообъектов.

Ил. 6. Табл. 3. Библиогр.: 41 назв.

УДК 57.043.611.651.1

Иницирование льдообразования при криоконсервации эмбрионов млекопитающих / Новиков А. Н., Олейник С. Т., Левченко Э. Н. — Криобиология и криомедицина, 1982, вып. 10, с. 16—19.

Дано качественное объяснение процессов, вызывающих необходимость льдообразования при криоконсервировании эмбрионов млекопитающих. Оценена льдообразующая активность ряда нерастворимых веществ гексагональной сингонии. Перспективность применения инициатора льдообразования — йодистого серебра — показана при криоконсервации эмбрионов мышей.

Табл. 2. Библиогр.: 9 назв.

УДК 57.043.548.52;577.44

Влияние ультразвуковых колебаний на первичное зародышеобразование льда в биологических растворах / Новиков А. Н., Вишневский В. И., Душейко А. Г. — Криобиология и криомедицина, 1982, вып. 10, с. 19—22.

Рассмотрены некоторые механизмы влияния ультразвука на кинетические параметры фазового превращения в воде и растворах плазмы костного мозга с криопротектором при замораживании. Показано, что ультразвуковые колебания в диапазоне используемых при замораживании клеточных суспензий средних удельных мощностей способны увеличивать количество зародышей льда как в воде, так и в биологических растворах.

Ил. 1. Табл. 2. Библиогр.: 8 назв.

УДК 57.043.547.962.3

Изменение спектральных свойств бычьего сывороточного альбумина в концентрированных растворах хлористого натрия / Морозова Т. Ф., Грек А. М., Коптелов В. А., Моисеев В. А., Луговой В. И. — Криобиология и криомедицина, 1982, вып. 10, с. 22—27.

Методами спектрофотометрии и спектрофлуориметрии изучалось влияние хлористого натрия на конформационное состояние бычьего сывороточного альбумина. Рассмотрены спектральные изменения, происходящие при добавлении соли в конечной концентрации 0,15; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,6; 2,6; 4,6 М к растворам белка. Обсуждены особенности влияния хлористого натрия на состояние хромофоров альбумина.

Ил. 2. Табл. 2. Библиогр.: 13 назв.

УДК 57.043.547.962.4

Влияние солей на стабильность иммуноглобулина лошади / Морозова Т. Ф., Моисеев В. А. — Криобиология и криомедицина, 1982, вып. 10, с. 27—29.

Методом спектрофотометрии изучено влияние различных концентраций солей на конформационное состояние иммуноглобулина лошади. Установлены значения концентраций солей, при которых происходят конформационные переходы иммуноглобулина при 36°C. Обсуждены особенности влияния различных солей на состояние иммуноглобулина.

Ил. 2. Библиогр.: 6 назв.

УДК 57.043

Актуальные вопросы проблем криоконсервирования костного мозга / Федотенков А. Г. — Криобиология и криомедицина, 1982, вып. 10, с. 30—34.

Проведено изучение иммунобиологических свойств миелокариоцитов, замороженных до -196°C под защитой ограждающего вещества раствора Гемжел и глицерина 15%-ной концентрации. Изучено влияние сроков хранения костного мозга на сохранность стволовых гемопоэтических клеток.

Ил. 1. Табл. 4. Библиогр.: 8 назв.

УДК 57.043:612.112.94:615.385.3:616—001.26

Восстановление иммунореактивности облученных в среднетельной дозе животных под влиянием трансплантации криоконсервированных лимфоцитов / Цуцаева А. А., Попов Н. Н. — Криобиология и криомедицина, 1982, вып. 10, с. 35—37.

В экспериментах на инбредных мышах (CBA×C57Bl)F₁, облученных в дозе 650 Р (ЛД 50/30), установлено, что трансплантация криоконсервированных клеток лимфатических узлов, спленоцитов, тимоцитов значительно повышает у реципиентов реакции гуморального и клеточного иммунитета, способствует их быстрому восстановлению до нормы.

Показано, что изученные криоконсервированные лимфоидные клетки выявляют различную активность при восстановлении этих реакций.

Ил. 1. Табл. 1. Библиогр.: 3 назв.

УДК 57.043.48.047:616.419—089.843:612.119

Влияние ультрафильтрации на свойства криоконсервированных клеток донорского и трупного костного мозга / Дроздова О. А., Цуцаева А. А., Попов Н. Н., Воскобойникова Т. Н. — Криобиология и криомедицина, 1982, вып. 10, с. 37—40.

Проведено изучение эффективности и целесообразности применения ультрафильтрации с целью улучшения свойств криоконсервированного трупного и донорского костного мозга. Объектом исследования служили криоконсервированные клетки трупного и донорского костного мозга мышей линии CBA. Полученные результаты свидетельствуют о том, что с помощью предложенного метода можно значительно повысить качество криоконсервированного костного мозга, обогатив его колониеобразующими единицами.

Табл. 3. Библиогр.: 2 назв.

УДК 57.043.611.0,18.46:615.014.4:536.48

Механизм действия магнитного поля на некоторые показатели внутриклеточного метаболизма / Обозная Э. И., Вишневский В. И., Скорняков Б. А., Стусь Л. К., [Обозный Э. П.] — Криобиология и криомедицина, 1982, вып. 10, с. 40—43.

Цитохимически изучены активность сукцинатдегидрогеназы, цитохромоксидазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и содержание SH-групп в лейкоцитах крови доноров при низкотемпературном консервировании с применением постоянного магнитного поля.

Показана различная чувствительность цитохимических показателей к действию постоянного магнитного поля. Наиболее существенные изменения произошли в активности цитохромоксидазы и SH-групп. Обсуждается возможный механизм стимулирующего действия магнитного поля на указанные параметры.

Табл. 1. Библиогр.: 16 назв.

УДК 57.024:576.8

Изучение свойств кишечных бактериофагов после низкотемпературного консервирования / Высеканцев И. П., Бутенко А. Е. — Криобиология и криомедицина, 1982, вып. 10, с. 43—46.

Изучены свойства кишечных бактериофагов T3, T4, X174 после хранения в жидком азоте в течение трех лет. Установлено, что бактериофаги обладают различной чувствительностью к инактивирующему действию замораживания — отогрева. Низкотемпературное консервирование фагов обеспечивает сохранение морфологии негативных колоний, спектра литического действия, серологических свойств.

Ил. 3. Табл. 3. Библиогр.: 9 назв.

УДК 57.043.617:615.832.9

Теоретические и практические вопросы криохирургии / Пушкарь Н. С., Сандомирский Б. П. — Криобиология и криомедицина, 1982, вып. 10, с. 47—58.

Представлены данные научной литературы и собственных исследований о механизмах деструкции тканей после криохирургических воздействий. Показаны два главных фактора криодеструкции: температурные повреждения и сосудистые изменения, приводящие к формированию крионекроза. Механизмы деструктивного и стимулирующего действия низких температур имеют количественные различия, но реализуются одними и теми же путями.

Ил. 3. Табл. 1. Библиогр.: 64 назв.

УДК 57.043

Криохирургическое лечение ангиом кожи и слизистой оболочки / Шольц А., Себастиан Г., Бертольд В., Маттойс В., Песслер Л., Кирхнер Б. — Криобиология и криомедицина, 1982, вып. 10, с. 58—63.

Представлены результаты криотерапии у 197 больных с 212 ангиомами. Наиболее преобладающей формой терапии явился метод контактного замораживания, который позволяет одновременно осуществить лечение сосудистых опухолей. Криотерапия кавернозных ангиом кожи и слизистой оболочки особенно в случаях опасных локализаций дала хорошие результаты и может являться методом выбора, в том числе у детей грудного возраста.

Ил. 2. Библиогр.: 23 назв.

УДК 57.043:616.127—005.8:616.832.9

Состояние нейросекреторных ядер переднего гипоталамуса при экспериментальном некрозе миокарда и гипотермии / Бабийчук Г. А., Луденцова С. В., Панков Е. Я., Микляев И. Ю. — Криобиология и криомедицина, 1982, вып. 10, с. 64—67.

Описаны гистологические изменения состояния ядер переднего гипоталамуса при экспериментальном некрозе миокарда и кранио-церебральной гипотермии.

Полученные результаты свидетельствуют об угнетении активности ядер как при экспериментальном инфаркте миокарда, так и при гипотермии, что указывает на тесную зависимость их функции от состояния сердечно-сосудистой системы и охлаждения организма.

Ил. 3. Табл. 1.

УДК 57.043.616.31—001.4:615.832.9:576.8

Влияние низких температур на микрофлору хронических неспецифических язв, эрозий, трещин слизистой оболочки полости рта / Высеканцев И. П., Точиловская Р. В., Григорьева К. В., Стогний В. И. — Криобиология и криомедицина, 1982, вып. 10, с. 67—69.

Статья посвящена изучению влияния низких температур (-196°C) на микрофлору хронических неспецифических эрозий, язв, трещин слизистой оболочки полости рта. На основании экспериментально-клинических исследований установлено, что после воздействия низких температур грамположительные микроорганизмы (золотистые стафилококки и β -гемолитические стрептококки серогруппы А) не погибают и сохраняют все присущие им биологические свойства.

Библиогр.: 4 назв.

УДК 57.043.2:616.5:547.422

Влияние ПЭО-400 на развитие эксплантатов трупной кожи человека в органной культуре / Волкова Н. А., Сандомирский Б. П. — Криобиология и криомедицина, 1982, вып. 10, с. 69—74.

На основании изучения развития трупной кожи человека в органотипической культуре после гипотермического хранения в средах, содержащих 15% ПЭО-400, выявлено действие этого криопротектора на ряд ростовых характеристик органной культуры кожи.

Ил. 2. Табл. 1. Библиогр.: 19 назв.

УДК 57.043:616.31:615.832.97—47

Технико-экспериментальные данные и применение криогенной автономной стоматологической установки / Грохольский А. П., Данилевский Н. Ф., Миклашевич В. В., Мостицкий А. В., Худзинский В. М. — Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 10, с. 75—79.

Дано представление о криогенной автономной стоматологической установке КУАС-01 МТ. Технически, экспериментально и клинически обосновано ее применение при лечении болезней пародонтоза и слизистой оболочки полости рта. Описана методика криолечения. Обсуждены результаты лечения низкими температурами.

Ил. 2. Библиогр.: 11 назв.

УДК 57.043.664.8.037.002.5:621.59.001.5

Методика экспериментального исследования теплообмена в осесимметричных камерах криозамораживателей / Рудько Ю. М., Бражников А. М., Печеный М. Л., Левшина Т. Б., Остапова О. Н. — Криобиология и криомедицина, 1982, вып. 10, с. 80—88.

Разработаны методика и стенд, позволяющий моделировать известные схемы организации отвода тепла и осесимметричных криозамораживателях с программным управлением процессом. На стенде исследовался процесс теплоотдачи при охлаждении горячих поверхностей двухфазным потоком дисперсно распыленного азота. В опытах изменялись массовая расходная концентрация жидкой фазы и скорость потока.

Ил. 3. Библиогр.: 14 назв.

УДК 57.043:088.9

Методические особенности и техническое обеспечение электронно-микроскопического метода замораживания — скалывания / Репин Н. В., Скорняков Б. А. — Кробиология и криомедицина, 1982, вып. 10, с. 89—92.

В статье приводится описание изготовленной установки для метода замораживания — скалывания и этапов методики получения углеродно-металлических реплик с поверхности скола криофиксированных биообъектов. Дается анализ этапов метода и возможных артефактов. Обсуждается возможность использования метода замораживания — скалывания в криобиологических исследованиях.

Ил. 3. Библиогр.: 9 назв.

UDC 57.043

Low-Temperature Effects on Ca^{2+} Transport Across the Sarcoplasmic Reticulum Membranes / Belous A. M., Zhegunov G. F. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1982, iss. 10, p. 3—16.

The paper is concerned with the analysis of data available in literature and results of the authors' own experience in the study of the low-temperature effects on the ionic biomembrane pumps. On the basis of data on the kinetic parameters of sarcoplasmic reticulum membrane Ca-ATPase functioning and various structural characteristics of a vesicle lipid bilayer, it is suggested that the impairment of transport ATPases functioning is reversible and is due to the biomembrane structure modification after freezing and thawing of biological systems.

6 figs. 3 tables. Refs: 41 titles.

UDC 57.043.611.651.1

Initiation of Ice Nucleation in Mammalian Embryo Cryopreservation / Novikov A. N., Olejnik S. T., Levchenko E. N. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1982, iss. 10, p. 16—19.

A qualitative account is given for processes requiring initiation of ice nucleation in mammalian embryo cryopreservation. The ice-forming activity of some insoluble substances of hexagonal syngony is estimated. The employment of silver iodide to initiate ice nucleation is shown to be perspective in the mouse embryo cryopreservation.

2 tables. Refs: 9 titles.

UDC 57.043.548.52;577.44

Supersonic Oscillation Effects on Ice Nucleation Initiation in Biological Solutions / Novikov A. N., Vishnevsky V. I., Dusheiko A. G. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1982, iss. 10, p. 19—22.

Some mechanisms are considered for the supersonic effects on kinetic parameters of phase transitions in water and bone marrow plasma solutions with cryoprotectants during freezing. It is shown that supersonic oscillations in the range of medium specific powers used during freezing of cell suspensions can increase the amount of ice nuclei both in water and in biological solutions.

1 fig. 2 tables. Refs: 8 titles.

UDC 57.043.547.962.3

Changes in Spectral Properties of Bovine Serum Albumin in Concentrated Solutions of Sodium Chloride / Morozova T. F., Grek A. M., Koptelov V. A., Moiseev V. A., Lugovoy V. I. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1982, iss. 10, p. 22—27.

Spectrophotometry and spectrofluorimetry were used to study the effect of sodium chloride on the conformational state of bovine serum albumin. Spectral changes are observed when adding the salt in final concentrations of 0.15, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.6, 2.6 and 4.6 M to albumin solutions. Peculiarities of NaCl effect on the albumin chromophore state are discussed.

2 figs. 2 tables. Refs: 13 titles.

UDC 57.043.547.962.5

Effect of Salts on Stability of Horse Immunoglobulin / Morozova T. F., Moiseev V. A. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1982, iss. 10, p. 27—29.

Spectrophotometry was employed to determine the effect of various salt concentrations on the conformational state of horse immunoglobulin. The values of salt concentrations at which there occur conformational changes of immunoglobulin at 36°C are determined. Peculiarities are discussed for the effect of various salts on the immunoglobulin state.

2 fig. Refs: 6 titles.

UDC 57.043

Current Problems of Bone Marrow Cryopreservation / Fedotenkov A. G. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1982, iss. 10, p. 30—34.

Immunobiological properties of myelocaryocytes frozen to -196°C are studied in the presence of the cryoprotective Hemme-gel solution and 15% glycerol. The effect of bone marrow storage periods on the survival of hemopoietic cells is studied.

1 fig. 4 tables. Refs: 8 titles.

UDC 57.043:612.112.94:615.385.3:616—001.26

Restoration of Immunoreactivity of Animals Irradiated with a Mean Lethal Dose and Stimulated by Cryopreserved Lymphocyte Transplantation / Tsutsaeva A. A., Popov N. N. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1981, iss. 10, p. 35—37.

Experiments with inbred mice (CBA $\times$ C57Bl) F_1 irradiated with a dose of 650 Rem (LD 50/30) show that transplantation of cryopreserved lymph node cells, splenocytes, thymocytes significantly increases the reactions of humoral and cellular immunity in recipients and promotes their rapid restoration to the normal level.

It is demonstrated that the cryopreserved lymphoid cells studied manifest different activities in the restoration of these reactions.

1 fig. 1 table. Refs: 3 titles.

UDC 57.043.48.047:616.419—089.843:612.119

The Effect of Ultrafiltration on Properties of Cryopreserved Donor and Cadaver Bone Marrow Cells / Drozdova O. A., Tsutsaeva A. A., Popov N. N., Voskoboinikova T. N. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1981, iss. 10, p. 37—40.

The effectiveness and expediency of ultrafiltration applied to improve properties of cryopreserved cadaver and donor bone marrow are studied. The cryopreserved cadaver and donor bone marrow cells of CBA strain mice were an object of the investigation. The results obtained indicate that this technique enables the quality of cryopreserved bone marrow to be essentially improved by enriching it with colony-forming units.

3 tables. Refs: 2 titles.

UDC 57.043.611.0.18.46:615.014.4:536.48

The Mechanism of Magnetic Field Effect on Certain Parameters of Intracellular Metabolism / Oboznaya E. I., Vishnevsky V. I., Skorniyakov B. A., Stus L. K., Obozny E. P. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1982, iss. 10, p. 40—43.

A cytochemical study of succinate dehydrogenase, cytochrome oxidase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities and SH-group contents of donor blood leukocytes is made in the process of their low-temperature preservation with a constant magnetic field applied.

Various sensitivities of cytochemical parameters to the constant magnetic field effect is demonstrated. Cytochrome oxidase and SH-groups have the largest magnetic susceptibility. A possible mechanism of the stimulative magnetic field effect on the above mentioned parameters is discussed.

1 table. Refs: 16 titles.

UDC 57.024:576.8

A Study in Properties of Intestinal Bacteriophages After Low-Temperature Preservation / Vysekantsev I. P., Butenko A. E. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1982, iss. 10, p. 43—46.

Properties of intestinal bacteriophages T3, T4, ϕ X174 are studied after their 3-year preservation in liquid nitrogen. It is found that the bacteriophages have various sensitivities to the inactivating freezing-thawing effect. The low-temperature storage of the phages preserves the morphology of negative colonies, the spectrum of lytic effect, and serologic properties.

3 figs. 3 tables. Refs: 9 titles.

UDC 57.043.617:615.832.9

Cryosurgery: Theoretical and Practical Aspects / Pushkar N. S., Sandomirsky B. P. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1981, iss. 10, p. 47—58.

Data available in literature and derived from the authors' own studies on mechanisms of tissues destruction after cryosurgical treatment are discussed. There are two major factors of cryodestruction: thermal injury and vascular changes resulting in cryonecrosis. Mechanisms of destructive and stimulative effects of low temperatures differ quantitatively but are realized in one and the same way.

3 figs. 1 table. Refs: 64 titles.

UDC 57.043

Cryosurgical Treatment of Skin and Mucose Angiomas / Scholz A., Sebastian G., Berthold W., Matthäus W., Pässler L., Kirchner B. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1982, iss. 10, p. 58—63.

The results of cryotherapy are discussed for 197 patients with 212 angiomas. The predominant form of cryotherapy is a contact freezing technique enabling a simultaneous compression of vascular tumours to be performed. The cryotherapy of cavernous skin and mucose angiomas, particularly in cases of their dangerous localization, has given good results and can be an alternative technique of treatment, especially for babies.

2 figs. Refs: 23 titles.

UDC 57.043:616.127—005.8:616.832.9

The State of Anterior Hypothalamus Neurosecretory Nuclei Under Experimental Necrosis of Myocardium and Hypothermy / Babiichuk G. A., Ludentsova S. V., Pankov E. Ya., Miklyaev I. Yu. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1982, iss. 10, p. 64—67.

Histological changes in the state of anterior hypothalamus nuclei are described for experimental necrosis of myocardium and craniocerebral hypothermia.

The results obtained testify to the inhibition of nuclei activity under both experimental myocardial infarction and hypothermia indicating close relationship between their function and the state of the cardiovascular system and organism cooling.

3 figs. 1 table.

UDC 57.043.616.31—001.4:615.832.9:576.8

The Effect of Low Temperatures on the Microflora of Chronic Nonspecific Ulcers, Erosions, Oral Mucosa Fissures / Vysekantsev I. P., Tochilovskaya R. V., Grigorieva K. V., Stogny V. I. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1982, iss. 10, p. 67—69.

The paper deals with the effect of low temperatures (-196°C) on the microflora of chronic nonspecific erosions, ulcers, and oral mucosa fissures. The results of clinical and experimental investigations demonstrate that the application of low temperatures does not result in the death of Gram-positive microorganism (*Staphylococcus aureus* and *Streptococcus β -hemolyticus* of serogroup A) and does not inhibit their biological activities.

Refs: 4 titles.

UDC 57.043.2:616.5:547.422

The Effect of PEO-400 on the Development of Human Cadaver Skin Explants in Organ Culture / Volkova N. A., Sandomirsky B. P. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1982, iss. 10, p. 69—74.

The effect of PEO-400 on a number of growth characteristics of a skin organ culture is determined by studying the development of the human cadaver skin in an organotypical culture after hypothermic storage in media containing 15% PEO-400.

2 figs. 1 table. Refs: 19 titles.

UDC 57.043:616.31:615.832.97—47

Technicoexperimental Data and Application of an Autonomous Cryogenic Dental Unit / Groknolsky A. P., Danilevsky N. F., Miklashevich V. V., Mostitsky A. V., Khudzinsky V. M. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1982, iss. 10, p. 75—79.

Characteristics of an autonomous cryogenic dental unit (KVAC-01MT) are presented. Technical, experimental and clinical grounds are given for the application of this unit in treatment of paradontosis and oral mucosa diseases. The technique of cryotreatment is described. The results of low-temperature treatment are discussed.

2 figs. Refs: 11 titles.

UDC 57.043:664.8.037.002.5:621.59.001.5

A Technique of an Experimental Study of Heat Exchange in Axisymmetric Chambers of Cryofreezers / Rudko Yu. M., Brazhnikov A. M., Pecheny M. L., Levshina T. B., Ostapova O. N. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1982, iss. 10, p. 80—88.

A technique and stand are developed enabling known patterns of heat removal to be modelled in axisymmetric chambers of cryofreezers with programmed control of the process. Heat loss under cooling of hot surfaces with a two-phase flow of dispersed nitrogen was studied by means of the stand. The consumed mass concentration of the liquid phase and the flow rate were varied in the experiments.

3 figs. Refs: 14 titles.

UDC 57.043:088.9

Methodological Peculiarities and Technical Maintenance of the Electron-Microscopic Freeze-Fracture Technique / Repin N. V., Skornyakov B. A. — *Kriobiologiya i kriomeditsina*, 1982, iss. 10, p. 89—92.

An installation is described designed for the freeze-fracture and metallocarbon-replication technique to obtain replicas from the surface of fracture of cryofixed biological systems. Stages of the technique and possible artifacts are analyzed. Possible application of the freeze-fracture technique in cryobiological investigations is also discussed.

3 figs. Refs: 9 titles.

ПАМЯТКА ДЛЯ АВТОРОВ СТАТЕЙ РЕСПУБЛИКАНСКОГО МЕЖВЕДОМСТВЕННОГО СБОРНИКА «КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА»

1. В сборнике публикуются оригинальные и обзорные статьи по криобиологии и криомедицине.

2. Рукопись представляется в двух экземплярах. К рукописи следует приложить рекомендацию научного семинара или направление научного учреждения, в котором выполнена работа, акт экспертизы и авторскую справку (для сотрудников других учреждений). Направление подписывается руководителем научного учреждения. В нем должны быть указаны фамилии всех авторов и точное название статьи, в авторской справке — фамилия, имя, отчество, ученая степень и звание, должность, служебный адрес автора. Отдельно следует указать фамилию, имя, отчество, служебный адрес и телефон автора, с которым редколлегия может вести переписку.

3. Объем статьи не должен превышать 0,5 л. (При оценке объема следует исходить из того, что авторский лист содержит 40 000 печатных знаков. Это составляет 24 страницы обычного машинописного текста, либо 28 страниц текста, насыщенного формулами, либо 35—40 рисунков размеров 6×9 см.).

4. Последовательность расположения материала в статье должна быть следующей: номер УДК, инициалы и фамилия автора, название статьи, текст, литература (на отдельной странице), полное название учреждения, в котором работает автор (после списка литературы, на отдельной странице), резюме на английском языке (на отдельной странице), подписи к рисункам (на отдельной странице), реферат (на отдельной странице). Пример оформления статьи дан в приложении 1.

5. Резюме должно содержать основные результаты исследования, а реферат должен раскрывать содержание статьи, содержать четкую формулировку задачи, метода ее решения и основные результаты.

6. Содержание статьи должно быть изложено с предельной ясностью и четкой рубрикацией. Следует избегать излишних подробностей и известных положений.

7. Авторы подписывают оба экземпляра рукописи и рисунки (на обороте).

8. Рукопись печатается на машинке со стандартным шрифтом через два интервала на одной стороне белой писчей бумаги стандартного формата. Через два интервала печатаются также сноски, литература, таблицы, подписи к рисункам. Библиография работ иностранных авторов печатается на машинке с английским шрифтом. При печатании следует оставлять достаточно места для вписывания формул.

9. Формулы и буквенные обозначения должны быть вписаны четко, крупно, черными чернилами. Индексы и показатели степени вписываются так, чтобы они были в два раза меньше основных обозначений, к которым относятся. Следует, по возможности, избегать громоздких обозначений и упрощать набор формул, например, применяя $\exp$ (...) вместо $e^{(\dots)}$. Прописные и строчные буквы в формулах, одинаковые по начертанию и отличающиеся только размером (С и с; К и к, О и о, Р и р, S и s, U и u, V и v, W и w, Z и z), подчеркиваются: прописные буквы — двумя черточками снизу, строчные — двумя черточками сверху. Следует особенно четко вписывать сходные по написанию буквы: е и l, I и J, h и n. Курсивные буквы подчеркиваются волнистой линией, прямые, буквы (и нуль) — знаком $_$, полужирные — прямой линией. Нумерация формул должна быть сквозной в пределах статьи (арабскими цифрами в круглых скобках). Разметка формул и обозначений в тексте и на рисунках следующая: синими чернилами — курсивные, прямые и полужирные буквы прописные (С) и строчные (с) буквы, векторы ($\mathbf{k}$, $\mathbf{a}$) и матрицы ($\mathbf{F}$, $\mathbf{P}$), индексы и показатели степени (N^i , $a^h b^2$); красным карандашом — греческие буквы; синим — готические. Нестандартные знаки (математические, физические, химические) выписываются на поле (один раз) с указанием их значения. Разметка текста производится в обоих экземплярах.

10. Каждая таблица печатается на отдельной странице, которая вкладывается в рукопись вслед за страницей, содержащей первую ссылку на эту таблицу. При

первой ссылке на таблицу на поле карандашом делается пометка в рамке [Табл. 2.] Каждая таблица начинается словом «Таблица» (в правом углу) с указанием ее порядкового номера. Таблица должна быть озаглавлена. Примечания к таблице даются непосредственно под ней.

11. Рисунки выполняются черной тушью на кальке, чертежной бумаге (или в виде фотографии). На них следует наносить только те условные обозначения, которые требуются в данной работе. Расшифровка их дается в тексте или в подписи к рисунку. На координатных осях приводятся обозначения переменных величин и их размерности (например: λ , Å). На обороте каждого рисунка указывается его порядковый номер, фамилия автора, название статьи и название сборника. При первой ссылке на рисунок на поле чернилами делается пометка в рамке [Рис. 3]

12. Список литературы составляется в алфавитном порядке авторов, опубликованных на русском или украинском языке. Фамилия редактора книги (при отсутствии фамилии авторов на титульной странице) помещается после заглавия; в списке литературы такие издания располагаются по алфавиту заглавия. В тексте ссылка на литературу дается порядковым номером в квадратных скобках (например, [2]). Библиографическое описание должно соответствовать титульной странице издания и даваться на языке оригинала. Заглавия статей, а также монографий, сборников, трудов совещаний, тезисов докладов, авторефератов диссертаций и препринтов указываются полностью. Название периодических и продолжающих изданий на иностранных языках сокращаются в соответствии с правилами, принятыми в изданиях ВИНТИ (указатель периодических и продолжающихся изданий, реферируемых ВИНТИ, М., 1977), а на русском и украинском языках — в соответствии с ГОСТ 7.12—77 и РСТ УРСР 1743—76. Для статей обязательно указываются год издания, том, начальная и конечная страницы, а для монографий — место издания, издательство, год издания, общее число страниц. Примеры библиографического описания приведены в приложении 2.

13. Ссылки на неопубликованные работы не допускаются.

14. Иностранные фамилии в тексте даются в русской транскрипции.

15. Редакция принимает рукописи, оформленные в строгом соответствии с настоящими правилами.

16. Принятые к печати рукописи не возвращаются.

Заказы на выпуски сборника принимают книжный магазин издательства «Наукова думка» (252001, Киев-1, ул. Кирова, 4), а также все книжные магазины в обычном порядке по тематическому плану издательства «Наукова думка».

Приложение 1

ПРИМЕР ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЬИ

УДК 521.27

В. В. Конин

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ КРИОЭКСТРАКЦИИ КАТАРАКТЫ

Текст статьи

Список литературы

Украинский институт усовершенствования
врачей МЗ УССР

Поступила в редколлегию

УДК 521.27

Влияние низкотемпературной консервации на тканевые лимфоциты мышей / Воскобойникова Т. Н. — Кробиология и криомедицина, 1980, вып. 6, с. 9—12.

Текст реферата.

Ил. 3. Табл. 7. Библиогр.: 9 назв.

VDC 521.27

The Effect of Low-Temperature Preservation on Mouse Tissue Lymphocytes / Vosko-boinikova T. N. — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1982, iss. 9 p. 80—88.

Текст резюме

3 figs. Refs: 11 titles.

ПРИМЕРЫ БИБЛИОГРАФИЧЕСКОГО ОПИСАНИЯ

Статья из журнала или периодического сборника

- Мустель Э. Р., Чугай Н. Н. О модели Сверхновой I типа вблизи максимума блеска. — Астрон. журн., 1975, 52, с. 673—681.
Конин В. В. Склонения 96 дополнительных звезд программы Пулковского зенит-телескопа. — Астрометрия и астрофизика, 1973, вып. 20, с. 106—109.

Статья из неперiodического сборника

- Хойл Ф. О происхождении солнечной туманности. — В кн.: Вопросы космогонии. М.: Мир, 1960, т. 7, с. 15—49.

Монография

- Король А. К. Склонения ярких и слабых фундаментальных звезд в единой системе. — Киев: Наук. думка, 1969. — 242 с.

Автореферат диссертации

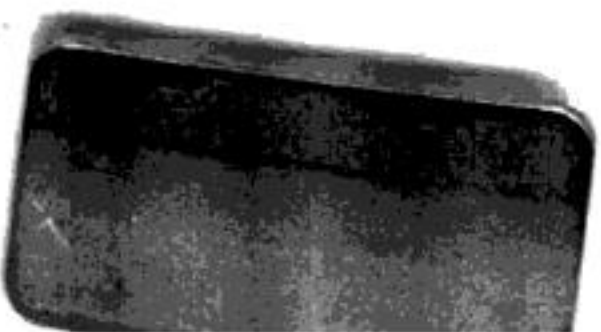
- Дибай Э. А. Исследование кометообразных туманностей: Автореф. дис. ... д-ра физ.-мат. наук. — М., 1969. — 12 с.

Препринт

- Амбарцумян В. А. Фуоры. — Ереван, 1971. — 23 с. — (Препринт Бюракан. астрофиз. обсерватории; № 3).

Тезисы доклада и другие материалы совещаний

- Нестеров В. В. Функции распределения средних за ночь широт. — В кн.: Пленум комиссии по изучению вращения Земли Астрономического совета АН СССР (Киев, 30 сент. — 3 окт. 1969 г.): Тез. докл. Киев: Наук. думка, 1969, с. 15—16.



1 руб. 50 коп.

«НАУКОВА ДУМКА»

Криобиология и криомедицина. 1982, вып. 10, 1—104