КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА

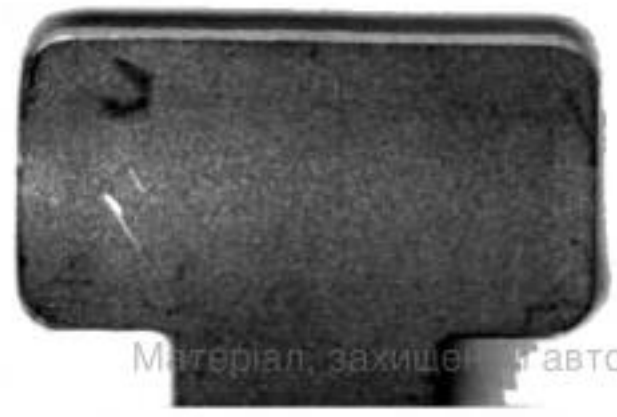
ISSN 0130—2663

12

1983

Матеріал, захищений авторським правом





Матеріал захищений авторським правом

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ

КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА

РЕСПУБЛИКАНСКИЙ МЕЖВЕДОМСТВЕННЫЙ СБОРНИК
НАУЧНЫХ ТРУДОВ

Основан в 1975 г.

ВЫПУСК
12

КИЕВ НАУКОВА ДУМКА 1983

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043

В сборнике представлены работы, посвященные частным вопросам криобиологии: низкотемпературному консервированию отдельных биологических объектов (клеток крови, митохондрий, кожи и др.), а также работы клинического плана, которые свидетельствуют о перспективности применения криодеструкции как метода лечения новообразований различного генеза. Для специалистов, разрабатывающих вопросы криобиологии и криомедицины и смежных областей биологических наук.

Редакционная коллегия

Н. С. Пушкарь *(ответственный редактор)*, А. М. Белоус *(зам. ответственного редактора)*, Ю. А. Иткин, Г. С. Лобынцева *(ответственный секретарь)*, В. И. Луговой, ~~В. И. Митасов,~~ В. А. Моисеев, Ю. М. Рудько, Б. П. Сандомирский, А. А. Цуцаева, М. Г. Шенберг, М. И. Шраго *(зам. ответственного редактора)*

Редакция межведомственных сборников

К $\frac{4106000000\text{-}022}{M221(04)\text{-}83}$ 456-83

© Издательство «Наукова думка», 1983

Матеріал, захищений авторським правом

I. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

УДК 57.043 : 612.111

Н. Р. Гусева, В. И. Луговой

ПРОБЛЕМА ПРОДЛЕНИЯ СРОКОВ ХРАНЕНИЯ РАЗМОРОЖЕННЫХ ЭРИТРОЦИТОВ: УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ РЕСУСПЕНДИРУЮЩИХ РАСТВОРОВ

В настоящее время достигнуты большие успехи в решении проблемы криоконсервирования эритроцитов [5, 6, 14, 22, 63, 71, 73]. Получила свое практическое подтверждение концепция о возможности длительного хранения замороженных клеток в условиях обратимого анабиоза. Разработка практических методов криоконсервирования эритроцитов, предназначенных для трансфузий, подтвердила, что эритроциты сохраняют способность к обратимому восстановлению даже после многолетнего хранения при ультранизких температурах, в то время как допустимые сроки общепринятого хранения крови при 4° С измеряются всего несколькими неделями.

Большим преимуществом криоконсервации эритроцитов (по сравнению с консервацией в жидком состоянии) является сохранение исходных уровней АТФ, 2,3-ДФГ и кислород-транспортной функции после многих лет пребывания клеток при —80 или —196° С [8, 13, 65, 75, 76]. Как известно, поддержание нормального уровня АТФ в эритроците связано с сохранением его формы и структуры, с жизнеспособностью и посттрансфузионной выживаемостью клеток [60, 62, 77], а способность эритроцитов отдавать кислород тканям в значительной степени определяется содержанием 2,3-ДФГ — важнейшего клеточного регулятора сродства гемоглобина к кислороду [26, 31].

Трансфузия размороженных эритроцитов осуществляется по тем же показаниям, что и переливание эритроцитов, консервированных при низкой положительной температуре [18, 19, 23, 61]. Размороженные эритроциты после длительного хранения при низких и ультранизких температурах практически не отличаются по своим физиологическим свойствам (жизнеспособность, кислородтранспортная функция) от свежезаготовленных эритроцитов 1—3 дней хранения при 4° С, но в то же время обладают целым рядом преимуществ по сравнению с эритроцитами, консервированными обычным методом [19, 32, 39, 69]. Так, во взвеси размороженных-отмытых эритроцитов нет ни цитрата натрия, ни продуктов метаболизма, накапливающихся в крови в процессе длительного хранения при 4° С, ни белковых компонентов плазмы, в частности, групповых агглютиногенов; она свободна от лейкоцитов и тромбоцитов. Поскольку большинство перечисленных выше сенсибилизирующих компонентов удаляется в процессе отмывания деконсервированных клеток, переливание размороженных-отмытых эритроцитов не сопровождается посттрансфузионными реакциями и не сенсибилизирует реципиента; при этом значительно уменьшается вероятность заражения вирусом гепатита. Кроме того, возможность длительного хранения эритроцитов в замороженном состоянии позволяет заблаговременно заготавливать эритроциты редкой групповой принадлежности, а также эритроциты, предназначенные для аутотрансфузий.

Однако серьезным препятствием на пути широкого практического использования криоконсервированных эритроцитов является то, что согласно существующим инструкциям срок возможного хранения при 4° С размороженных и деглицеринизированных клеток перед трансфузией ограничен 24 ч [19, 23]. Причиной этого являются резкое нарастание гемолиза, прогрессирующее падение дыхательной функции,

Матеріал, захищений авторським правом

дисбаланс электролитов, сокращение числа жизнеспособных клеток, развивающиеся при более длительном хранении деконсервированных эритроцитов. Удлинение сроков хранения размороженных-отмытых клеток в полноценном состоянии (даже на несколько дней) имеет большое значение в разработке проблемы криоконсервирования эритроцитов с точки зрения расширения возможностей внедрения их в лечебную практику.

Решение этой задачи невозможно без учета современных представлений о причинах прогрессирующего гемолиза в размороженных-отмытых эритроцитах. Известно, что выход гемоглобина из эритроцитов обусловлен повреждением полупроницаемого барьера мембраны и появлением повышенной проницаемости ее к макромолекулам. В настоящее время механизм гемолиза при замораживании представляется весьма отличным от осмотического гемолиза [3, 6, 9, 10, 54]. Так, если для осмотического гемолиза характерно коллоидно-осмотическое набухание клетки и за счет этого увеличение проницаемости неповрежденной мембраны, криогемолиз наступает в результате повреждения в первую очередь клеточной мембраны. По мнению многих исследователей, именно плазматическая мембрана является наиболее чувствительным и первичным звеном в механизме развития всего комплекса криоповреждений эритроцитов [3, 42, 43, 50]. Согласно Прайбор [54—56], низкотемпературное воздействие приводит к структурно-функциональной дезорганизации эритроцитарной мембраны, причем наряду с явными повреждениями, проявляющимися немедленным гемолизом и гибелью некоторого количества клеток сразу после оттаивания, могут иметь место и скрытые, латентные повреждения, не обнаруживаемые в течение некоторого времени.

Экспериментальные данные подтверждают гипотезу Прайбор о том, что причиной прогрессирующего гемолиза в размороженных-отмытых эритроцитах является наличие в плазматической мембране определенной части клеток скрытых повреждений, которые переходят в явные в процессе последующего хранения деконсервированных эритроцитов при 4° С [10, 80]. Развиваясь в процессе замораживания и оттаивания, на молекулярном уровне эти повреждения характеризуются изменением физико-химического состояния мембранных липидов, структурной дезорганизацией фосфолипидов, конформационными перестройками мембранных белков и нарушением нормальных белок-липидных взаимодействий в мембране [2, 54—56, 80]. Результатом структурных дефектов является альтерация как физико-химических, так и функциональных свойств мембраны. Снижается ее эластичность, изменяется форма клетки. Осмотическая лабилизация мембраны, ее неспособность поддерживать постоянство внутренней среды эритроцита ведет к утечке ионов, внутриклеточных метаболитов, белков, к нарушению метаболизма клетки в целом, что и обнаруживается в процессе хранения деконсервированных эритроцитов при 4° С прогрессирующим нарастанием количества свободного гемоглобина и ионов калия во внеклеточной среде, снижением внутриэритроцитарного уровня АТФ и особенно 2,3-ДФГ, сокращением числа жизнеспособных клеток.

В связи с этим в литературе все чаще обсуждается вопрос, касающийся допустимых сроков годности размороженных эритроцитов для переливания. В последнее время на основании накопленного положительного клинического опыта и определения приживаемости эритроцитов наметилась тенденция к увеличению этого срока. Так, для эритроцитов, ресуспендированных после деглицеринизации в растворе ЦНИИГПК 8в, первоначально допустимый срок хранения составлял 6 сут с момента оттаивания на основании поддержания уровня 24-часовой посттрансфузионной выживаемости не менее 70% числа перелитых эритроцитов [78]. Однако впоследствии этот срок был сокращен до 48 ч из-за прогрессирующего в процессе хранения при 4° С гемолиза эритроцитов. Тем не менее имеются сообщения об успешных перели-

Матеріал, захищений авторським правом

ваниях размороженных эритроцитов, хранившихся в растворе ЦНИИГПК 8в при 4° С до 7 сут, больным в клинике ортопедии и травматологии [1].

Пеппер и соавт. [52] были представлены данные об эффективных трансфузиях эритроцитарной взвеси после 5 дней хранения при 4° С в растворе АСД. По данным этих авторов, 24-часовая посттрансфузионная выживаемость составляла 93% для эритроцитов, хранившихся 1 день, и 89% — для эритроцитов, перелитых после 5 дней хранения при 4° С после деконсервации. Баттон и соавт. [30] считают, что деглицеринизированные эритроциты, хранившиеся в течение 3 дней при 4° С, вполне обеспечивают эффективность клинических трансфузий. Элмонд и Валери [25] представили данные об удовлетворительной in vivo выживаемости размороженных эритроцитов, хранившихся при 4° С после отмывания до 14 дней. Майер и соавт. [48] переливали деконсервированные эритроциты после 5 дней хранения при 4° С в солевом растворе с добавлением глюкозы и фосфата, причем лизис клеток в эти сроки был небольшой и трансфузии переносились хорошо. Необходимым условием клинического использования хранившихся размороженных-отмытых эритроцитов многие авторы считают осаждение клеток перед трансфузией и с удалением надосадка, содержащего все потенциально токсические вещества: продукты гемолиза, избыток ионов калия, компоненты ресуспендирующего раствора и др. Этот метод был применен Мичел и соавт. [46] перед трансфузией эритроцитов, консервированных при 4° С. Другие исследователи использовали его на размороженной-отмытой и хранившейся при 4° С крови [66, 67], и Валери рекомендует включать его в качестве обязательного этапа обработки деконсервированных эритроцитов независимо от длительности хранения клеток после оттаивания — отмывания.

Таким образом, эритроциты, деконсервированные и хранившиеся при 4° С более 3 дней в стандартных ресуспендирующих средах, нельзя признать годными для трансфузий. Многочисленные исследования in vivo и in vitro, показали, что в таких клетках вследствие резкого падения уровня 2,3-ДФГ повышается сродство гемоглобина к кислороду, изменяются биофизические свойства и форма эритроцитов, что неблагоприятно сказывается на сроках циркуляции перелитых клеток [7, 10, 27, 31, 34]. Происходящие в эритроцитах нарушения аналогичны тем, которые развиваются в процессе длительного хранения клеток при низких положительных температурах. В настоящее время большинство исследователей считает необходимым расширить требования, предъявляемые к эритроцитам, предназначенным для трансфузий (независимо от способа их консервации) [5, 73]. По современным представлениям, удовлетворительное консервирование предусматривает не только поддержание высокого уровня 24-часовой посттрансфузионной выживаемости и жизнеспособности клеток, но и нормальную продолжительность существования эритроцитов в кровяном русле реципиента при условии сохранения кислород-транспортной функции, что обеспечивает способность клеток немедленно после трансфузии осуществлять снабжение тканей кислородом [28].

Исследования по изысканию способов продления допустимых сроков годности деконсервированных эритроцитов должны включать вопросы усовершенствования всех этапов низкотемпературного консервирования клеток: замораживания, оттаивания, отмывания и взвешивания в ресуспендирующем растворе, поскольку ни применяемые методы замораживания, ни существующие способы отмывания в настоящее время не предотвращают нарастания гемолиза эритроцитов после деконсервации при последующем хранении их при 4° С. Это предполагает, в первую очередь, дальнейшее совершенствование процесса замораживания и оттаивания эритроцитов, а также поиск новых криопротектирующих веществ (в частности, экстрацеллюлярных, не требующих отмывания), так как применяемые в настоящее время криозащит-

Матеріал, захищений авторським правом

ные растворы с использованием глицерина и принятые скорости замораживания и оттаивания не обеспечивают 100%-ную защиту клеток от низкотемпературного повреждения [5, 10].

Поиск эффективных способов восстановления деконсервированных эритроцитов с латентными повреждениями предполагает создание условий, замедляющих процесс деструкции клеток, процесс перехода латентных повреждений мембраны в явные, а также отдаляющих развитие гемолиза, способствующих поддержанию метаболической активности и энергетического потенциала эритроцитов. Одним из известных в настоящее время путей достижения этой цели является усовершенствование растворов для ресуспендирования размороженных-деглицеринизированных эритроцитов [5, 10, 11]. Эта задача непосредственно связана с проблемой обратимости тех скрытых криоповреждений эритроцитарной мембраны, которые и являются причиной ускоренной деструкции деконсервированных клеток. Прайбор на основании изучения АТФазной активности и изменений формы замороженных-оттаянных мембран эритроцитов [54] пришел к выводу о возможности в некоторой степени репарации скрытых криоповреждений эритроцитарной мембраны [56]. По мнению некоторых авторов, определенные высокомолекулярные вещества (в частности, поливинилпирролидон) могут частично восстанавливать клетки со скрытыми повреждениями после замораживания благодаря способности к взаимодействию с поверхностными белками мембраны, в результате которого стабилизируется нативная конформация ее молекул и, таким образом, замедляется или предотвращается переход латентных повреждений в явные, приводящие к гемолизу [55, 56, 80].

Существующие методы криоконсервации эритроцитов представляют собой сложные многоступенчатые процессы, в той или иной степени повреждающие клетки. Поэтому при усовершенствовании существующих и создании новых растворов для ресуспендирования размороженных-отмытых эритроцитов желательно по возможности восполнить то, что утрачивается клетками на каждом этапе обработки [21].

Основными компонентами существующих и применяющихся в настоящее время взвешивающих растворов являются: электролиты, обеспечивающие изотонию среды; неорганический фосфат, действующий как буфер, и необходимый для нормального протекания процессов метаболизма и поддержания уровней важнейших органических фосфатов клетки [33, 37], обладающий предпочтительным влиянием на уровень 2,3-ДФГ эритроцита [40]; глюкоза — основной субстрат гликолиза; непроникающие сахара, стабилизирующие структурно-осмотические свойства эритроцитарной мембраны [15].

Основу ресуспендирующих растворов, применявшихся за рубежом для взвешивания деконсервированных эритроцитов, как правило, составлял изотонический раствор хлористого натрия (0,9%-ный или физиологический) без добавок [24] или с добавлением глюкозы [45, 58]. В настоящее время наиболее широко используемым и признанным большинством авторов является 0,9%-ный раствор хлористого натрия, обогащенный глюкозой (0,2%) и двузамещенным фосфатом натрия (0,065%) [70].

В СССР, в Центральном институте гематологии и переливания крови (Москва), были разработаны и внедрены в практику два взвешивающих раствора для деглицеринизированных эритроцитов: сахарозно-глюкозо-фосфатный [ЦНИИГПК $8^{б}$] и сахарозно-фосфатно-солевой [ЦНИИГПК $8^{в}$], основу которых составляет гипотонический раствор сахарозы [18]. Введение сахарозы обусловлено тем, что она, как известно, не только сама обладает криопротективными свойствами, но и способна, благодаря мембрано-стабилизирующему действию, предотвращать потерю гемоглобина клетками, поврежденными гипертоническими растворами при замораживании-оттаивании [79]. В присутствии сахарозы ослабляется коллоидно-осмотическое набухание

Матеріал, захищений авторським правом

клеток с аномально-проницаемыми мембранами, что способствует замедлению гемолиза деконсервированных эритроцитов. Применение раствора ЦНИИГПК 8в позволяет расширить срок пригодности размороженных клеток для переливания до трех дней при существенном ослаблении гемолиза и поддержании уровней АТФ и 2,3-ДФГ в эритроцитах не ниже 75 и 50% соответственно [11].

Усовершенствование существующих растворов для ресуспендирования деконсервированных эритроцитов как в нашей стране, так и за рубежом ведется в основном в двух направлениях: 1) путем обогащения имеющихся сред непроникающими сахарами, белками, полимерными коллоидами, способными, стабилизируя конформационное состояние мембранных белков, замедлять или предотвращать реализацию скрытых дефектов и развитие гемолиза; 2) путем введения в известные среды для взвешивания клеток проникающих в эритроциты стимуляторов гликолиза, метаболитов и других веществ, способствующих поддержанию обменных процессов и функциональной активности размороженных клеток в процессе хранения их при 4° С [73].

Предпринятые ранее попытки хранения деконсервированных эритроцитов в цельной плазме (до трех недель), 5%-ном альбумине или 5%-ном альбумине с добавлением глюкозы (в течение двух недель) дали положительные результаты [25, 38, 68, 74]. Однако необходимо учесть, что, хотя взвешивание размороженных эритроцитов в плазме или альбумине (весьма высокой концентрации) и способствует некоторому замедлению гемолиза клеток, оно повышает опасность бактериального загрязнения (по мере удлинения срока хранения при 4° С) и заражения вирусом гепатита, а также вероятность развития посттрансфузионных реакций, поскольку данные компоненты обладают, как известно, выраженным сенсибилизирующим действием [29, 41, 64]. Пеппер и соавт. [53], исследуя сравнительную эффективность ресуспендирующих сред различного состава, обнаружили, что выход гемоглобина из размороженных-отмытых клеток в процессе хранения их при 4° С последовательно уменьшался в ряду сред взвешивания: 0,9%-ный раствор хлористого натрия > 5%-ный альбумин > АСД + 0,9%-ный раствор хлористого натрия > АСД + 5%-ный альбумин, и пришли к выводу, что в последней среде эритроциты годны для трансфузий в течение 9 дней хранения после деконсервации.

Виноград-Финкель и соавт. [11] установили, что включение в стандартный сахарозно-фосфатно-солевой ресуспендирующий раствор ЦНИИГПК 8в половинного количества раствора ЦОЛИПК 7б положительно влияет на сохранность деконсервированных клеток при 4° С. Глюкозо-цитратные растворы ЦОЛИПК 7б и АСД являются стандартными, принятыми в СССР и за рубежом, соответственно гемоконсервантами для взятия и хранения при 4° С донорской крови. Возможно, что именно с эффектом цитрата, который является общим компонентом обоих растворов, и связано замедление прогрессирующего гемолиза деглицеринизированных клеток, взвешенных и хранящихся при 4° С в средах, содержащих АСД или ЦОЛИПК 7б. Согласно недавнему сообщению Меримен и Дуглас [44], нарастающее набухание и лизис деконсервированных эритроцитов могут быть предотвращены добавлением цитрата натрия, обладающего способностью за счет изменения проницаемости клеточной мембраны повышать ее устойчивость в отношении коллоидно-осмотического лизиса. По данным Майер и соавт. [47], деглицеринизированные эритроциты можно хранить в консерванте хлористый натрий-глюкоза, в аутологичной плазме, 5%-ном альбумине или в белковой фракции плазмы в течение по крайней мере 5 дней с незначительными изменениями (подразумевается потеря гемоглобина и ионов калия клетками, не превышающая максимально допустимый уровень). Лучшие показатели были получены этими авторами при использовании в качестве ресуспендирующей среды цельной плазмы, в то время как хранение клеток в 5%-ном альбумине или

Матеріал, захищений авторським правом

белковой фракции плазмы не представляет существенно лучших условий по сравнению с декстрозно-солевым раствором. И при более продолжительном хранении деконсервированных эритроцитов при 4° С уровень гемолиза клеток, взвешенных в аутологичной плазме, существенно ниже, чем в 5%-ном альбумине [67].

Дополняя раствор хлористый натрий-глюкоза-фосфат маннитолом или физиогелем, Валери удавалось поддерживать высокие уровни посттрансфузионной выживаемости (не ниже 70%) в течение 6 дней после отмывания — ресуспендирования эритроцитов при одновременном ослаблении гемолиза клеток [68, 72].

На основании теоретических предпосылок и экспериментальных данных о целесообразности введения в суспендирующий раствор коллоидных добавок [4, 11, 55, 56, 80], Виноград-Финкель и соавт. были испытаны различные полимерные препараты, главным образом те, которые получили применение в практике трансфузиологии: декальцинированный желатиноль, реополиглюкин (декстран 8 000), полиглюкин (декстран 70 000), гемодез (поливинилпирролидон 12 000), проксанол (плюроник, сополимер полиэтиленоксида с полипропиленоксидом 8 000), а также аутологичная плазма и альбумин [11, 12]. Эти исследования подтвердили данные работы Михнович [21], в которой было показано, что коллоидные препараты, в частности желатиноль и декальцинированный желатиноль, эффективно замедляют гемолиз деконсервированных эритроцитов при ресуспендировании их в растворах сложного состава, содержащих, помимо коллоидного вещества, сахарозу, глюкозу, фосфаты и др. При ресуспендировании эритроцитов в растворах полимеров на солевой основе (конечная концентрация 4%) не наблюдалось замедления гемолиза клеток по сравнению с основным 0,9%-ным раствором хлористого натрия. При этом концентрация свободного гемоглобина во внеклеточной среде после трех дней хранения при 4° С значительно превышала таковую для клеток, взвешенных в стандартном растворе ЦНИИГПК 8в.

Несколько лучшие результаты были получены в отношении эритроцитов, ресуспендированных в растворах, состоящих из смеси равных объемов ЦНИИГПК 8в и коллоидных растворов (при этом конечные концентрации коллоидных веществ во взвеси эритроцитов были вдвое ниже). Однако и в этом случае торможение выхода гемоглобина из эритроцитов, хранившихся после оттаивания — отмывания при 4° С, наблюдалось лишь в течение первых 2 дней хранения, а через 3 сут уровень свободного гемоглобина превышал таковой для клеток, взвешенных в растворе ЦНИИГПК 8в. Эффективное замедление гемолиза в течение 3 сут и более хранения деконсервированных эритроцитов при 4° С (по сравнению с раствором ЦНИИГПК 8в) было достигнуто при ресуспендировании клеток в растворе ЦНИИГПК 8в, обогащенном альбумином, проксанолом или декальцинированным желантинолем (конечные концентрации в эритроцитарной взвеси 2,5; 1 и 1,2% соответственно). Причем, из числа перечисленных веществ предпочтение следует отдать декальцинированному желатинолю, поскольку, помимо ослабления и отдаления гемолиза клеток, он обладает высокими реологическими свойствами, выраженным дезагрегирующим и гиповискозным действием [4, 17, 20].

Вторым направлением исследований по изысканию возможных способов продления допустимых сроков хранения деконсервированных эритроцитов является обогащение взвешивающих растворов веществами, способными поддерживать в клетках высокий уровень жизнеспособности и кислород-транспортной функции, основными биохимическими показателями которых являются соответственно уровни АТФ и 2,3-ДФГ. В частности, известно, что включение таких нуклеозидов и метаболитов, как аденин, инозин, пируват, в состав гемоконсервирующих сред обеспечивает длительное поддержание в эритроцитах, хранящихся при 4° С, максимальных уровней этих важнейших органических

Матеріал, захищений авторським правом

фосфатов, а биохимическая модификация (реставрация) эритроцитов в присутствии этих веществ после длительного хранения клеток при 4° С ведет к восстановлению нормального физиологического содержания АТФ и 2,3-ДФГ в них, а следовательно, и к восстановлению соответствующих им функций клеток, утраченных в процессе длительного хранения [35, 36, 49, 51, 57, 60, 71, 73].

Упомянутые выше вещества оказались эффективными и в отношении размороженных-деглицеринизированных эритроцитов. Исследованиями Гинзбург и соавт. [16] было установлено, что добавление в ресуспендирующий раствор аденина (140 мг/%) и инозина (268 мг/%) является надежным средством поддержания необходимого уровня АТФ и 2,3-ДФГ, средством повышения жизнеспособности и кислород-транспортной функции клеток. При этом 24-часовая посттрансфузионная выживаемость эритроцитов повышается в среднем на 10% по сравнению с клетками, взвешенными в сахарозно-глюкозо-цитратном растворе без добавок метаболитов, в течение 9 дней хранения деконсервированных клеток при 4° С. Помимо своей практической направленности, эти результаты интересны тем, что свидетельствуют о полной сохранности ферментных систем, ответственных за указанные метаболические превращения, в условиях длительного, многолетнего хранения эритроцитов в замороженном состоянии. Однако, по данным Виноград-Финкель и соавт. [11], присутствие аденина и инозина в составе сахарозно-глюкозо-фосфатной среды для взвешивания размороженных-отмытых эритроцитов, хотя и поддерживает уровни АТФ и 2,3-ДФГ в клетках, но не тормозит выхода гемоглобина из них. Гемолиз размороженных-ресуспендированных эритроцитов в таком растворе быстро нарастает особенно в поздние сроки хранения при 4° С. При обогащении той же стандартной среды (ЦНИИГПК 8в) аденином (1 мМ) и аскорбиновой кислотой (200 мг/%) наблюдается тенденция к ослаблению гемолиза эритроцитов в процессе хранения при сохранении положительного метаболического эффекта [11].

С целью возможного восстановления резистентности мембран деконсервированных эритроцитов в растворы для их взвешивания вводились вещества, обладающие мембранотропным, антицитолизирующим действием (аминазин, дипразин), которые, как было известно, задерживают гемолиз эритроцитов, консервированных в жидком состоянии при низкой положительной температуре [4], повышают их осмотическую резистентность. Мембрано-стабилизирующие свойства этих препаратов основаны на их способности к переорганизации молекулярной структуры мембраны [59]. Однако добавление указанных веществ в ресуспендирующие растворы для хранения деконсервированных клеток оказалось неэффективным. Возможно, что отсутствие ожидаемого результата обусловлено тем, что данные вещества повышают резистентность неповрежденной мембраны, а наличие в мембране деконсервированных эритроцитов скрытых дефектов затрудняет или предотвращает связывание их с мембраной и тем самым препятствует их положительному воздействию [11].

Недавно в ЦНИИГПК был разработан ресуспендирующий раствор ЦНИИГПК 16, который следует признать самым удачным из числа всех испытанных в нашей стране усовершенствованных сред для взвешивания размороженных-деглицеринизированных эритроцитов [11, 12, 19]. Благодаря содержанию в его составе стимуляторов гликолиза (аденина 0,14% и инозина 0,268%) и декальцинированного желатиноля этот раствор обеспечивает высокие уровни метаболизма и кислород-транспортной функции эритроцитов в течение длительных сроков хранения при 4° С (5—7 и более дней) наряду с замедлением гемолиза.

Таким образом, в настоящее время усилиями многих исследователей достигнуты определенные успехи в решении проблемы хранения размороженных эритроцитов в условиях низких положительных температур, однако полученные результаты еще не позволяют сделать оконча-

Матеріал, захищений авторським правом

тельные выводы, касающиеся оптимальных составов наиболее эффективных ресуспендирующих сред. С этой целью необходимо добиваться создания для деконсервированных эритроцитов условий, обеспечивающих наряду с сохранением оптимального уровня функционирования метаболических систем клетки поддержание также резистентности и возможную репарацию скрытых повреждений мембран размороженных-деглицеринизированных эритроцитов. Результаты проведенных исследований намечают теоретические и практические направления, по которым целесообразно продолжать более углубленные изыскания по разработке методов удлинения сроков сохранения деконсервированных ресуспендированных эритроцитов в функционально-полноценном, жизнеспособном состоянии.

1. *Агафонова А. И., Быков А. П., Жукова Ю. В.* Применение в травматологической практике трансфузий размороженных эритроцитов, хранившихся после оттаивания при 4° С до 7 дней.— Пробл. гематологии и переливания крови, 1976, **21**, № 9, с. 19—21.
2. *Белоус А. М.* Исследование молекулярной организации и функции биологических мембран при воздействии низких температур.— В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и медицины. Киев : Наук. думка, 1974, с. 5—8.
3. *Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П.* Молекулярные механизмы криоповреждения биомембран.— В кн.: Физико-химические механизмы криоповреждений биологических структур. М. (Итоги науки и техники / ВИНИТИ. Биофизика; 1978, Т. 9). с. 80—114.
4. *Виноград-Финкель Ф. Р.* Клиническое значение переливания крови, консервированной с веществами, повышающими ее терапевтические свойства.— Пробл. гематологии и переливания крови, 1956, 1, № 5, с. 49—54.
5. *Виноград-Финкель Ф. Р.* Успехи и перспективы проблемы консервирования крови.— Пробл. гематологии и переливания крови, 1979, **24**, № 5, с. 46—53.
6. *Виноград-Финкель Ф. Р., Аграненко В. А., Леонтович В. А. и др.* Криоконсервирование клеток крови: — В кн.: Проблемы гематологии и транфузиологии. М., 1976, с. 45—96. (Итоги науки и техники / ВИНИТИ. Физиология человека и животных; Т. 17).
7. *Виноград-Финкель Ф. Р., Дервиз Г. В., Гинзбург Ф. Г. и др.* К вопросу о сроках применения консервированной крови для трансфузий на основании новых данных о переносе гемоглобином кислорода к тканям.— Пробл. гематологии и переливания крови, 1972, **17**, № 12, с. 17—24.
8. *Виноград-Финкель Ф. Р., Гинзбург Ф. Г., Федорова Л. И. и др.* Криоконсервирование эритроцитов и их функциональная полноценность (хранение в жидком азоте до 7 лет).— Пробл. гематологии и переливания крови, 1973, **18**, № 9, с. 3—10.
9. *Виноград-Финкель Ф. Р., Федорова Л. И., Гинзбург Ф. Г. и др.* Низкотемпературное консервирование эритроцитов и их функциональная полноценность.— В кн.: Современные проблемы криобиологии и медицины. М. : Внешторгиздат, 1975, с. 56—58.
10. *Виноград-Финкель Ф. Р., Федорова Л. И., Кудряшова С. Н. и др.* Теоретические и практические аспекты хранения размороженных эритроцитов в условиях положительных температур.— Пробл. гематологии и переливания крови, 1975, **20**, № 9, с. 3—7.
11. *Виноград-Финкель Ф. Р., Федорова Л. И., Семенова Н. В.* Эффективные растворы для взвешивания размороженных-отмытых эритроцитов.— Пробл. гематологии и переливания крови, 1978, **23**, № 8, с. 16—21.
12. *Виноград-Финкель Ф. Р., Федорова Л. И., Семенова Н. В.* Усовершенствованные растворы для ресуспендирования размороженных эритроцитов после их деглицеринизации.— Криобиология и криомедицина, 1979, вып. 5, с. 14—20.
13. *Виноград-Финкель Ф. Р., Федорова Л. И., Семенова Н. В. и др.* Полноценность эритроцитов, хранившихся 12—15 лет при —196° С.— Пробл. гематологии и переливания крови, 1980, **25**, № 4, с. 8—11.
14. *Гаврилов О. К.* Криоконсервирование клеток крови и их применение в клинической практике.— Сов. медицина, 1976, № 8, с. 16—21.
15. *Гинзбург Ф. Г.* Применение сахарозы при длительном хранении крови.— Соврем. пробл. гематологии и переливания крови, 1946, № 22/23, с. 188—198.
16. *Гинзбург Ф. Г., Сухова А. Г., Тальская И. Н.* Усовершенствование растворов для хранения оттаянных эритроцитов при 4—6° С.— В кн.: Тр. XII Междунар. конгр. по переливанию крови. М. : Медицина, 1972, с. 173—175.
17. *Мельникова В. Н., Михнович, Е. П., Кузьмин В. А. и др.* Сравнительная оценка функциональных свойств эритроцитов различных гемотрансфузионных сред.— Пробл. гематологии и переливания крови, 1977, **22**, № 6, с. 11—16.
18. *Методы* долгосрочного хранения в замороженном состоянии эритроцитов, лейкоцитов и тромбцитов, предназначенных для трансфузий: Метод. письмо / Ред. Ф. Р. Виноград-Финкель, А. Е. Киселева.— М., 1969.
19. *Методы* долгосрочного хранения в замороженном состоянии эритроцитов, предназначенных для трансфузий : Метод. рекомендации / Ред. О. К. Гаврилова, В. А. Аграненко.— М., 1980.

Матеріал, захищений авторським правом

20. *Михнович Е. П.* Влияние различных плазмозамещающих растворов на вязкость плазмы, реакцию оседания и морфологию эритроцитов.— Пробл. гематологии и переливания крови, 1976, **21**, № 2, с. 53—56.
21. *Михнович Е. П., Рождественская М. А.* Отмывание и взвешивание размороженных эритроцитов.— Пробл. гематологии и переливания крови, 1973, **18**, № 9, с. 31—34.
22. *Abelson N. M.* Blood storage.— In: Topics in blood banking / Ed. Lea Fefiger. Philadelfia, 1974, p. 22—37.
23. *Additional* Standarts for Human Blood and Blood Products: Federal Register, 1976, **41**, 3 may, p. 18292.
24. *Akerblom O., Hõgman C. F.* Frozen blood: a method for low glycerol liquid nitrogen freezing allowing different postthaw deglycerolization procedures.— Transfusion, 1974, **14**, N 1, p. 16—26.
25. *Almond D. V., Valeri C. R.* Relatioship between lipid fractions of erythrocytes and their in vivo survival following preservation with glycerol and the slow freeze technique.— Transfusion, 1967, 7, N 1, p. 10—15.
26. *Benesch R., Benesch R. E.* The effect of organic phosphates from human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin.— Biochem. and Biophys. Res. Communs, 1967, **26**, N 2, p. 162—168.
27. *Benesch R., Benesch R. E.* Intracellular organic phosphates as regulators of oxygen release by hemoglobin.— Nature, 1969, **221**, N 3241, p. 618—620.
28. *Beutler E., Huel A., Wood L. A.* Depletion and regeneration of 2,3-DPG in stored red blood cells.— Transfusion, 1969, **9**, N 1, p. 109—112.
29. *Bland J. H. L., Laver M. B., Lowenstein E.* Vasodilator effect of commercial 5% plasma protein fraction solutions.— J. Amer. Med. Assoc., 1973, **224**, N 12, p. 1721—1724.
30. *Button L. M., Kevu S. V., Jacobson M. S.* The clinical use of cells after extended storage.— Transfusion, 1976, **16**, N 5, p. 519—523.
31. *Chanutin A., Curnish R. A.* Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes.— Arch. Biochem. and Biophys., 1967, **121**, N 1, p. 36—102.
32. *Crowley J. P., Valeri C. H.* The purification of red cells for transfusion by freeze preservation. III. Leukocyte removal and red cell recovery after red cell preservation by high or low glycerol concentration method.— Transfusion, 1974, **14**, N 5, p. 590—597.
33. *Dawson R. B.* Blood storage. XXII. Improvement in red blood cell 2,3-DPG levels at six weeks by 20 mM PO_4 in CPD-Adenine-Inosine.— Transfusion, 1976, **16**, N 5, p. 450—454.
34. *Dawson R. B., Kocholaty W. F.* Hemoglobin function during blood storage. XV. Effects of metabolic additives inosine and methylene blue on P_{50} and 2,3-DPG.— In: Hemoglobin and red cell structure and function : Adv. exp. med. and biol. ser. / Ed. G. J. Brewer. New — York : Plenum Press, 1972, vol. 28, p. 495—499.
35. *Duhm J., Gerlach E.* Metabolism and function of 2,3-DPG in red blood cells.— In: The human red cell in vitro / Eds T. J. Greenwalt, G. A. Jamieson. New York : Grune and Stratton, 1974, p. 111—118.
36. *Gabrio B. W., Finch C. A.* Effect of adenosine on biochemical lesion of stored erythrocytes.— Fed. Proc., 1954, **13**, N 1, p. 51—60.
37. *Gibson J. G. II, McCue J. P.* Reversal of the storage lesion in CPD bank blood: a problem in clinical medicine.— Transfusion, 1978, **18**, N 5, p. 524—529.
38. *Gibson J. G., Tullis J. L., Tinch R. J. et al.* The post-thaw viability of red blood cells of ACD and CPD blood preserved in frozen state with and without added adenine.— Transfusion, 1972, **12**, N 3, p. 198—205.
39. *Goldfinger D., Solis R. T., Meryman H. T.*— Microaggregates in frozen and saline washed red blood cells.— Transfusion, 1974, **14**, N 2, p. 151—154.
40. *Ioppolo C., Amiconi G., Currell D. L. et al.* Biochemical changes in storage of blood — decrease in rate of methemoglobin reduction and increase in oxygen affinity of storage of ACD blood.— Vox. sang., 1974, **27**, N 4, p. 403—410.
41. *Izaka K., Morichi S., Fujita Y. et al.* A kininogen-like substance in unheated plasma proteins.— Transfusion, 1975, **15**, N 1, p. 46—53.
42. *Lovelock J. E.* The mechanism of protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing.— Biochim. et biophys. acta, 1953, **11**, N 1, p. 28—34.
43. *Lovelock J. E., Bishop M. W. H.* Protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing.— Biochem. J., 1954, **56**, N 1, p. 215—271.
44. *Meryman H. T., Douglas M. St. J.* The effect of citrate on red cell volume and on freeze-thaw haemolysis.— Cryobiology, 1980, **17**, N 6, p. 610—611 (Abstr.).
45. *Meryman H. T., Hornblower M.* A method for freezing and washing red blood cells using a high glycerol concentration.— Transfusion, 1972, **12**, N 2, p. 145—152.
46. *Michael J. M., Dorner G., Burns D. et al.* Potassium load in CPD-preserved whole blood and two types of packed red blood cells.— Transfusion, 1975, **15**, N 2, p. 144—149.
47. *Myhre B. A., Nakasako Y. Y., Schott R.* Studies on 4°C stored frozen-reconstituted red blood cells. II. Chemical and cytological changes during storage.— Transfusion, 1978, **18**, N 1, p. 29—37.
48 *Myhre B. A., Schott R., Nakasako Y.* Studies on increasing the 4°C storage time of frozen-thawed red cells.— In: XIV Congr. Int. Soc. Blood Transfusion. Helsinki, 1975, p. 39—42 (Abstr.)

Матеріал, захищений авторським правом

49. *Nakao M.* ATP-requiring phenomena in red cell membranes.— In: Cellular and molecular biology of erythrocytes / Eds H. Yoshikawa, S. M. Rapoport.— Univ. Tokyo press, 1974, p. 35—54.
50. *Nakao M., Nakao T., Tatibana M. et al.* Effect of inosine and adenine on ATP regeneration and shape transformation in long-stored erythrocytes.— Biochim. et biophys. acta, 1959, **32**, N 6, p. 564—570.
51. *Oski F. A., Travis S. F., Miller L. D. et al.* The in vitro restoration of red cells 2,3-DPG levels in banked blood.— Blood, 1971, **37**, N 1, p. 52—58.
52. *Pepper D. S., Allan A., Tavish J. et al.* A convenient low cost liquid nitrogen frozen blood bank.— In: XIV Congr. Int. Soc. Blood Transfusion. Helsinki, 1975, p. 48—53 (Abstr.).
53. *Pepper D. S., Amer K., Allan A. G. E. et al.* Improvements in frozen blood storage in liquid nitrogen.— Cryobiology, 1974, **11**, N 6, p. 537 (Abstr.).
54. *Pribor D. B.* Osmotyc hemolysis contrasted with freeze-thaw hemolysis.— Cryobiology, 1971, **8**, N 1, p. 14—24.
55. *Pribor D. B.* PVP contrasted with dextran and a multifactor theory of cryoprotection.— Cryobiology, 1974, **11**, N 1, p. 60—72.
56. *Pribor D. B., Pribor H. C.* Studies with dextran-40 in cryopreservation of blood.— Cryobiology, 1973, **10**, N 1, p. 93—103.
57. *Proctor H. J., Fry J.* Increased erythrocyte 2,3-DPG: usefulness during hypoxia.— J. Surg. Res., 1974, **16**, N 6,. p. 569—573.
58. *Rowe W., Derrick J. B., Miles W. et al.* The biochemistry and clinical use of red cells frozen by the low glycerol-rapid freeze technique.— In: Modern Problems of Blood Preservation / Eds W. Spielmann, S. Seidl. Stuttgart : Fischer, 1970, p. 184—198.
59. *Seeman Ph.* The membrane action of anesthetics and tranquilizers.— Pharmacol. Rev., 1972, **24**, N 4, p. 583—652.
60. *Simon E. R.* Adenine and purine nucleosides in human red cell preservation: a review.— Transfusion, 1967, **7**, N 4, p. 395—402.
61. *Standards* for blood banks and transfusion services.— 8th ed.— Amer. Assoc. Blood Banks, 1976.
62. *Strumia M. M., Strumia P. V.* Conditions affecting the maintenance of ATP, 2,3-DPG and oxygen dissociation by addition of adenine and inosine to blood stored at 1° C.— Transfusion, 1972, **12**, N 1, p. 68—75.
63. *Sumida S.* Erythrocyte.— In: Transfusion of blood preserved by freezing, Tokyo: Igaku Shoin, LTD. 1973, p. 5—66.
64. *Tullis J. L., Hinman J., Sproul M. T. et al.* Incidence of posttransfusion hepatities in previously frozen blood.— J. Amer. Med. Assoc., 1970, **214**, N 5, p. 719—722.
65. *Tullis J. L., Gibson J. G. II, Sproul M. T. et al.* Advantage of high glycerol mechanical systems for red cell preservation: a 10 years study of stability and yield.— In: Modern problems of blood preservation / Eds W. Spielmann, S. Seidl. Stuttgart : Fischer, 1970, p. 161—167.
66. *Ulmas J.* Washed, hyperpacked, frozen and shelf red blood cells.— Transfusion, 1975, **15**, N 2, p. 111—115.
67. *Valeri C. R.* In vivo and in vitro evaluation of thawed deglycerolized erythrocytes.— In: Long term preservation of red blood cells, Report of conference NAS—NRC / Ed. M. D. Sproule, 1964, 21—22 may, p. 27.
68. *Valeri C. R.* Effect of resuspension medium on in vivo survival and supernatant hemoglobin of erythrocytes preserved with glycerol.— Transfusion, 1965, **5**, N 1, p. 25—31.
69. *Valeri C. R.* Recent advances in techniques for freezing red cells.— CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 1970, **1**, p. 381—384.
70. *Valeri C. R.* Factors influencing the 24-hour posttransfusion survival and the oxygen transport function of previously frozen red cells preserved with 40% W / V glycerol and frozen at —80° C.— Transfusion, 1974, **14**, N 1, p. 1—15.
71. *Valeri C. R.* Liquid and freeze preservation of red blood cells.— In: Red Blood Cell / Ed. D. Mc. N. Surgenor.— 2nd ed.— New York ; London : Acad. press, 1974, vol. 1, p. 511—574.
72. *Valeri C. R.* Metabolic regeneration of depleted erythrocytes and their frozen storage.— In: The human red cell in vitro / Eds T. J. Greenwalt, G. A. Jamieson. New York : Grune and Stratton, 1974, p. 281—289.
73. *Valeri C. R.* Blood banking and the use of frozen blood products.— Cleveland (Ohio) : CRC Press, 1976.— 417 p.
74. *Valeri C. R., Bond J. C.* Observations on the preservation of autologous human erythrocytes using glycerol, slow-freeze technics and agglomeration.— Transfusion, 1966, **6**, N 3, p. 254—259.
75. *Valeri C. R., Runk A. H.* Long-term storage of human red blood cells: studies in vivo and in vitro of autologous red blood cells preserved up to six years with high concentrations of glycerol.— Transfusion, 1969, **9**, N 1, p. 5—10.
76. *Valeri C. R., Szymanski J., Runck A. H.* Therapeutic effectivenes of homologous transfusions following frozen storage at —80° C for seven years.— Transfusion, 1970, **10**, N 1, p. 102.
77. *de Verdier C. H.* Functional properties of stored red cells.— Vox sang., 1969, **16**, N 4, p. 361—366.
78. *Vinograd-Finkel F. R.* Cryobiological aspects of long term blood storage.— In: Proc. XII Int. Congr. Blood Transfusion. Moscow; Basel : Karger, 1971, p. 271—283.

Матеріал, захищений авторським правом

79. *Woolgar A. E.* Hemolysis of human red blood cells by freezing and thawing in solutions containing sucrose: relationship with posthypertonic hemolysis and solute movements.— Cryobiology, 1974, 11, N 1, p. 44—51.
80. *Woolgar A. E.* Hemolysis of human red blood cells by freezing and thawing in solutions containing PVP: relationship with posthypertonic hemolysis and solute movements.— Cryobiology, 1974, 11, N 1, p. 52—59.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
02.II.81

УДК 57.043.577.347

А. М. Белоус, В. А. Бондаренко, Т. П. Бондаренко, Л. А. Бабийчук

ТЕМПЕРАТУРОЗАВИСИМЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРЫ ЭРИТРОЦИТОВ. СООБЩЕНИЕ 1. РОЛЬ ИОНОВ И ФАЗОВЫХ ПЕРЕХОДОВ В ИНДУКЦИИ ПРОЦЕССОВ КРИОГЕМОЛИЗА

Изучение температурозависимых изменений структуры эритроцитов является одной из важных криобиологических проблем [1—3, 25, 34]. В первых работах Лавлока [25—27] было показано, что повреждение эритроцитов при охлаждении обусловлено нарушением белково-липидной решетки мембран под влиянием высоких концентраций солей. Эти работы также показали, что в условиях гипертонического стресса эритроциты человека становятся чувствительными к охлаждению в интервале температур 37—0° С [25—27]. Причем обнаруженная динамика гемолиза эритроцитов в условиях гипертонии при положительных температурах не отличалась принципиально от гемолиза, происходящего в условиях охлаждения от 0 до —30° С [25]. Охлаждение в среде с 6 М глицерином клеток не препятствовало их гемолизу. Изучение этого явления показало, что криогемолиз развивается при охлаждении эритроцитов как в солевой среде (NaCl), так и в среде, содержащей неэлектролиты (например, сахарозу).

Механизм криогемолиза эритроцитов до настоящего времени во многом остается неясным, хотя этому вопросу посвящен ряд работ. Так, в частности, не установлен конкретный вклад основных мембранных компонентов (липиды, холестерин и белки) в развитие структурных нарушений мембраны при охлаждении. Недостаточно глубоко изучена роль различных факторов (pH, ионная сила, время экспозиции в модифицированной фазе и др.), влияющих на уровень гемолиза клеток крови при охлаждении [17]. Вместе с тем есть основания считать, что криогемолиз эритроцитов в условиях гипертонии и охлаждения в значительной степени связан с состоянием субмембранного ретикулума [2, 3], состоящего из спектрина и актина, выстилающих внутреннюю поверхность мембраны [18, 28]. Следовательно, феномен криогемолиза можно рассматривать как модель криоповреждения, развивающегося под действием охлаждения в различных клетках и позволяющего вносить вклад мембранных структур в этот процесс. В исследованиях на эритроцитах человека, в которых выясняли вклад гипертонии и низких температур в процесс криогемолиза, установлено, что гемолитическое действие высоких концентраций сахарозы (0,86 М) проявляется только в условиях охлаждения клеток от температур выше 15° С (рис. 1). При этом повышение начальной температуры инкубации приводит к увеличению уровня гемолиза при последующем охлаждении эритроцитов. Подобный характер развития холодового гемолиза при охлаждении эритроцитов человека в гипертонической среде наблюдали и в других работах [17].

Собственные эксперименты показывают, что снижение физиологической концентрации NaCl в среде, содержащей 0,86 М сахарозу, при-

Матеріал, захищений авторським правом

водит к повышению чувствительности эритроцитов и последующему охлаждению. При этом наиболее значительное увеличение уровня холодового гемолиза клеток наблюдается после снижения концентрации NaCl до 0—40 мМ. Охлаждение эритроцитов в среде, содержащей электролит в высокой концентрации (NaCl 1,2 М), характеризуется несколько иным характером зависимости уровня холодового гемолиза от начальной температуры инкубации (см. рис. 1). Как видно из представленных данных, в отличие от образцов, содержащих неэлектролит, в данном случае на температурной шкале наблюдается локальный максимум гемолиза, соответствующий образцам, начальная температура инкубации которых составляла 15° С.

Известно, что один из структурно-фазовых переходов в мембранах эритроцитов происходит вблизи этой температуры (17° С [38]), причем

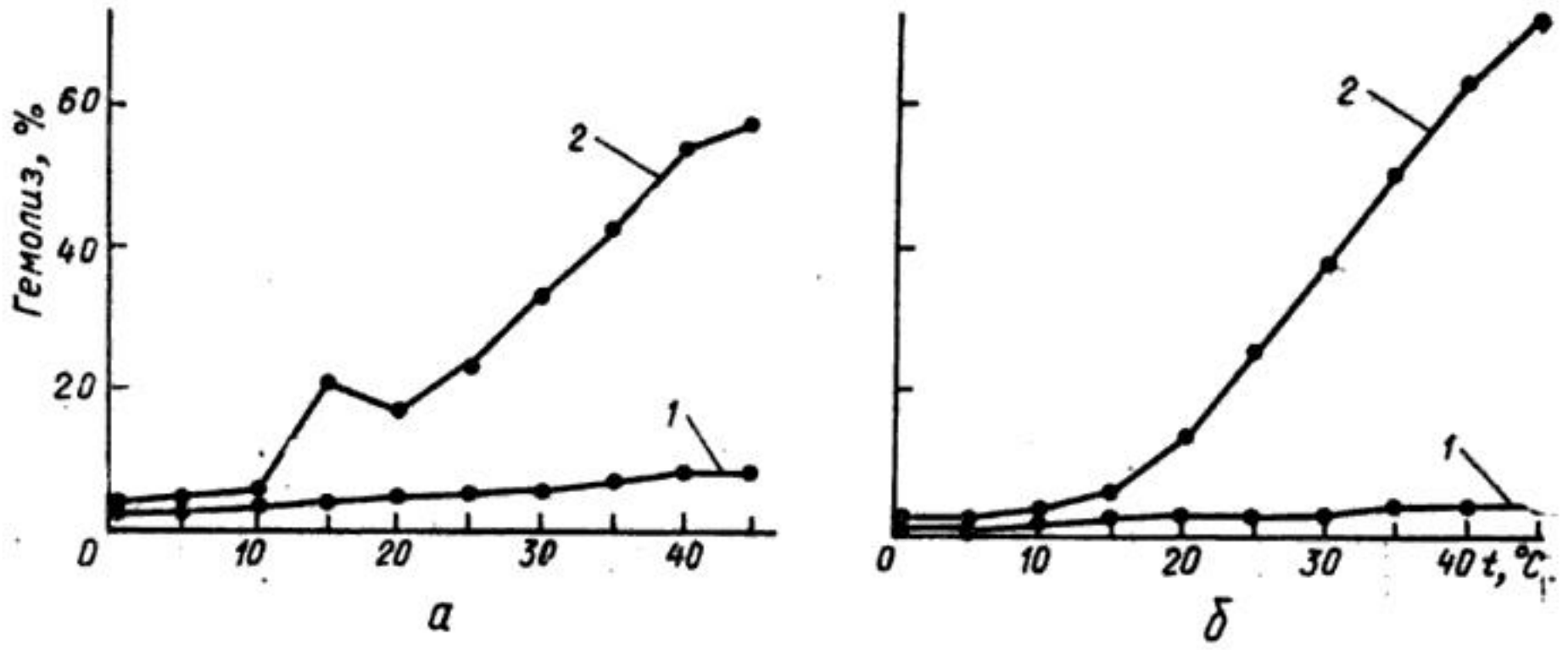


Рис. 1. Зависимость уровня холодового гемолиза эритроцитов от начальной температуры инкубации в присутствии 1,2 М, NaCl (*а*) и 0,86 М сахарозы (*б*):
1 — инкубация без охлаждения; *2* — охлаждение до 0° С.

указанный переход ассоциирован с изменением целого ряда параметров мембраны, включая такие, как вязкость [16, 41], конформация белковых молекул [38], проницаемость [22] и ряд других [15]. Тот факт, что электролиты (NaCl) и неэлектролиты (сахароза) неодинаково влияют на осмотические свойства эритроцитов [7, 9], позволяют предположить, что обнаруженные различия в характере развития холодового гемолиза связаны именно с этими факторами.

Криобиологическое изучение осмотического поведения и холодового лизиса эритроцитов требует анализа осмотических свойств этих клеток, а также исследования параметров проницаемости, структурных и механических свойств их мембраны. Считают, что осмотическое равновесие эритроцитов при различных температурах зависит от коэффициента проницаемости для воды и хлорида [7]. Если коэффициент проницаемости, относящийся к осмотическому потоку воды, обычно представляет собой величину, полученную из исследований осмотически индуцированных изменений клеточного объема [13], то коэффициент проницаемости для потока хлорида почти полностью выводится из параметров анионного самообмена [9]. Соответствующие температурные зависимости для этих процессов пересекаются приблизительно при комнатных температурах, т. е. при более высоких температурах скорость транспорта хлорида превышает таковую для водного транспорта, и, наоборот, ниже комнатной температуры равновесие для воды достигается быстрее, чем равновесие для ионов Cl^- [7]. Поэтому, рассматривая только транспорт воды и хлора (по отношению к равновесию клеточной воды), можно выделить два возможных состояния осмотического равновесия в эритроците [7]: равновесие для воды, равновесие воды и хлорида.

Матеріал, захищений авторським правом

Таким образом, в механизме холодового гемолиза эритроцитов индуцирование осмотическим воздействием и охлаждение ионов и гемоглобина может быть связано с изменением параметров осмотического равновесия. В норме мембрана эритроцитов непроницаема для белков. В свою очередь пассивный транспорт катионов является намного более медленным, чем осмотический транспорт воды и обмен анионов хлорида на хлорид и другие анионы [9]. Это означает, что, когда эритроциты подвергаются изменяющимся осмотическим воздействиям, некоторые компоненты клеточного раствора достигают их квазиравновесия, в то время как с другими компонентами изменений не произойдет. Иными словами, при осмотическом воздействии, т. е. когда клетки приспосабливаются к изменяющимся условиям среды, они должны пройти через определенную последовательность квазиравновесных осмотических состояний [7].

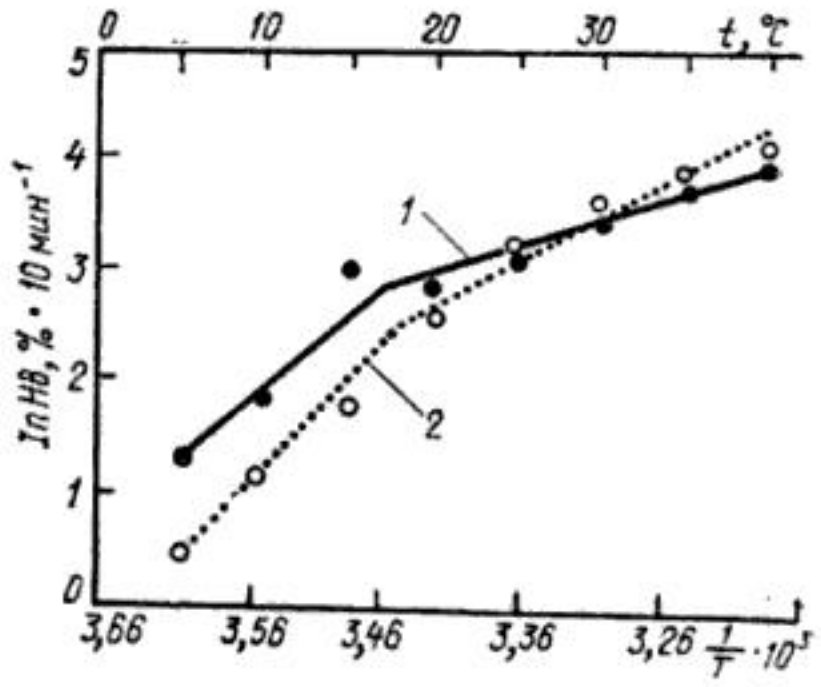


Рис. 2. Температурная зависимость (в координатах Аррениуса) освобождения гемоглобина (0°С) при изменении начальной температуры инкубации:

1 — в присутствии 1,2 М NaCl; *2* — 11—0,86 М сахарозы.

Экспонирование эритроцитов в различных условиях может влиять на содержание растворимых в клетке веществ и воды и поэтому на клеточный объем, а также разницу электрического потенциала и другие клеточные параметры [7, 40]. Одним из подходов к интерпретации полученных нами результатов может быть рассмотрение последовательности изменений параметров клетки при инкубации с гипертоническими солями и неэлектролитами. Если клетки экспонировать в различных экстремальных условиях, например в среде с различным осмотическим давлением, клетки или набухают или сжимаются, пытаясь приспособиться к новым условиям [40]. Установлено, что набухание (сжатие) клеток может происходить по-разному в зависимости от температуры и состава наружного раствора [7]. При температуре ниже 20° С, когда транспорт воды происходит быстрее транспорта хлорида, в начальной фазе эксперимента набухание (сжатие) клеток определяется движением воды [7]. В этом случае водное равновесие устанавливается ранее каких-либо значительных изменений в содержании хлорида в клетке. Окончательное приспособление клеточного объема к внешним условиям определяется эквилибрацией хлорида и, таким образом, реэквилибрацией воды. При температуре выше 20° С фаза достижения водного равновесия, по-видимому, отсутствует.

Рассматривая изменения в осмотическом давлении при различных внешних условиях, следует также учитывать различные объемы клеток, уравновешенных по хлору в электролитной и сахарозной средах [7, 40]. Проведенный в работе анализ показывает, что основные черты осмотического поведения эритроцитов применительно к клеточному объему при температуре ниже 20° С следующие: 1) в гипотонической (гипертонической) среде клетки набухают (сжимаются) при достижении равновесия для воды и подходят к состоянию, когда уравновешиваются ионы хлора без каких-либо значительных изменений в объеме; 2) в гипотонической (гипертонической) сахарозной среде начальное набухание (сжатие) при уравновешивании воды сменяется сжатием (набуханием) клеток при уравновешивании хлора.

При более высоких температурах клетки переходят непосредственно из начального состояния в состояние равновесия для ионов Cl^-. Подобный общий анализ осмотического поведения клеток может быть расширен и применительно к осмотическому гемолизу в электролитной и сахарозной средах при 0° С (см. рис. 1). Как видно из рис. 2,

Матеріал, захищений авторським правом

график зависимости уровня холодового гемолиза от начальной температуры инкубации характеризуется изломом вблизи 15° С как в образцах, подвергнутых охлаждению в присутствии NaCl, так и в образцах, содержащих сахарозу. Исследование динамики развития гемолиза в процессе относительно продолжительной инкубации при 0° С (до 60 мин) позволяет более отчетливо наблюдать различия, связанные с преимущественным влиянием электролитов и неэлектролитов на свойства клеток. После охлаждения в 1,2 М NaCl от 37 до 0° С уровень гемолиза

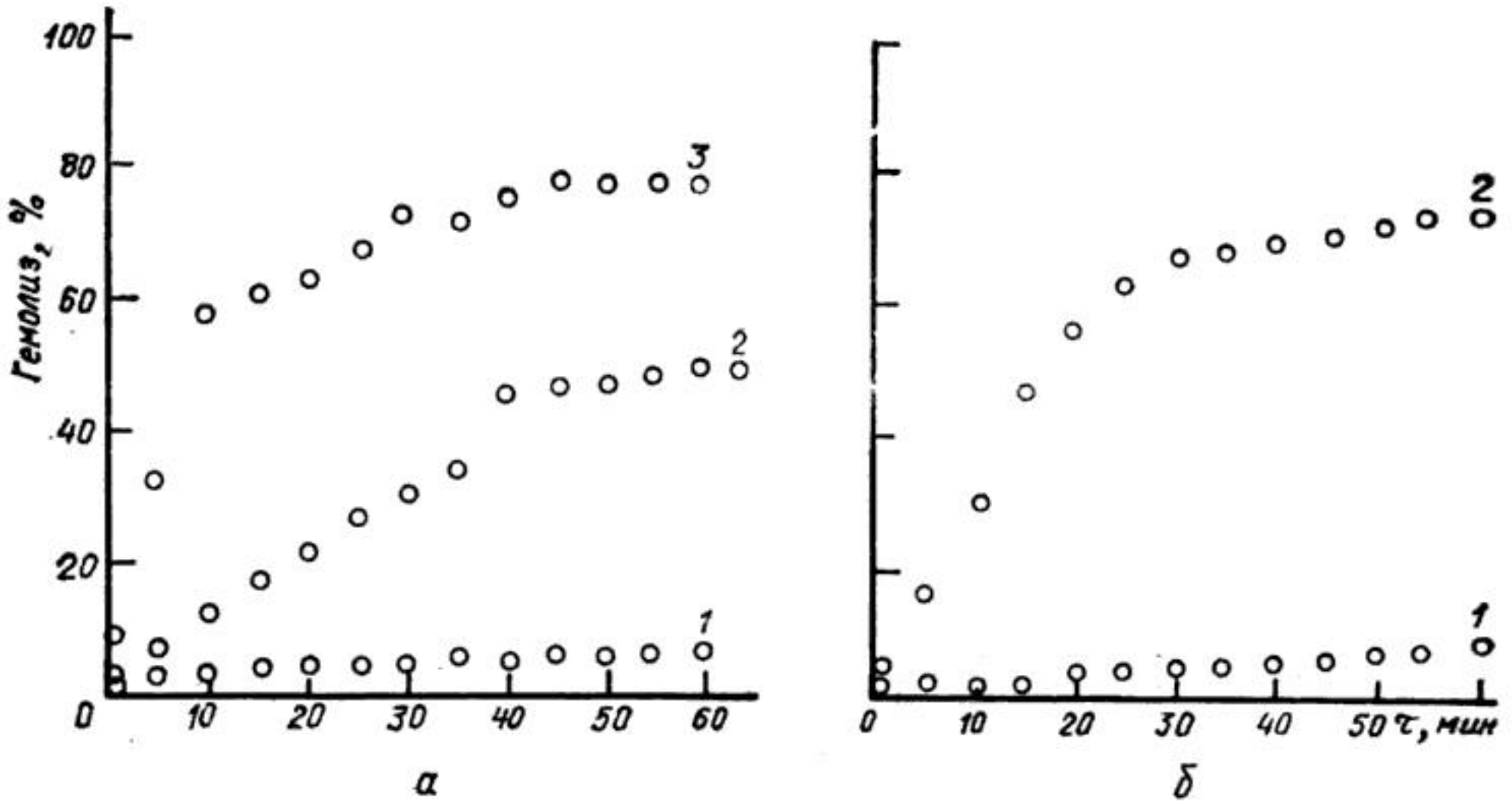


Рис. 3. Влияние продолжительности выдерживания при 0° С на уровень гемолиза эритроцитов, подвергнутых охлаждению от 37 до 0° С в среде, содержащей 1,2 М NaCl (*а*) и 0,86 М сахарозу (*б*):
1 — охлаждение в 0,15 М NaCl от 37° С (*а*) и 0,86 М сахарозе от 15° С (*б*); *2* — охлаждение в 1,2 М NaCl от 37° С (*а*) и в 0,86 М сахарозе от 37° С (*б*); *3* — охлаждение в 1,2 М NaCl от 37° С (*а*).

в первые 10 мин инкубации составляет 70—90% максимальных значений, соответствующих 60-й минуте инкубации. Эти данные совпадают с результатами, полученными в работе [17]. Однако зависимость уровня гемолиза от температуры является, очевидно, достаточно сложной. На это указывает изменение количества клеток, подвергающихся гемолизу, наблюдаемое на 30-й — 40-й минуте инкубации (рис. 3). Более заметно эта тенденция наблюдается в образцах, подвергнутых охлаждению от 15 до 0° С. Охлаждение в 0,86 М сахарозе от 37 до 0° С сопровождается более медленным нарастанием гемолиза во времени. В образцах, подвергнутых охлаждению от 15 до 0° С, наблюдается незначительный гемолиз на всем протяжении холодовой инкубации (0—60 мин). Подобный характер развития гемолиза во времени после охлаждения эритроцитов в сахарозе и NaCl косвенно указывает на гетерогенность клеточной популяции, только часть из которой является чувствительной к охлаждению и подвергается гемолизу при холодовой инкубации. Очевидно, это отражает различия в осмотических свойствах клеток [7]. Данные, представленные на рис. 3, указывают на более выраженные различия в поведении популяций клеток при холодовом воздействии в присутствии гипертонических концентраций NaCl. Очевидно, популяция, подвергающаяся гемолизу после 30—40 мин инкубации, включает клетки с «субкритическим» изменением мембраны, и продолжительная инкубация приводит к дополнительному циклу изменений в состоянии клеток, что в конечном итоге вызывало гемолиз.

Максимальный уровень гемолиза, наблюдаемый к 60-й минуте инкубации при 0° С, практически соответствует величине гемолиза, достигаемой к 30-й — 40-й минуте инкубации. При охлаждении эритроцитов от 37 до 0° С в присутствии 1,2 М NaCl и 0,86 М сахарозы боль-

Матеріал, захищений авторським правом

шинство клеток гемолизировало в первые 20 мин инкубации. В интервале температур 0—37° С конечной температурой охлаждения (при переносе клеток от 37° С), при которой развивался максимальный гемолиз эритроцитов, была температура 0° С. Охлаждение эритроцитов от 37 до 5° С не приводило к столь интенсивному гемолизу. Следует отметить, что охлаждение от 37 до 0° С с пятиминутными остановками при различных температурах с интервалом в 5° С, хотя и сопровождалось несколько более высоким гемолизом в зоне температур 10—37° С, однако при 0° С уровень гемолиза в этих образцах был ниже по сравнению с таковым при быстром охлаждении. Это указывает на возможную

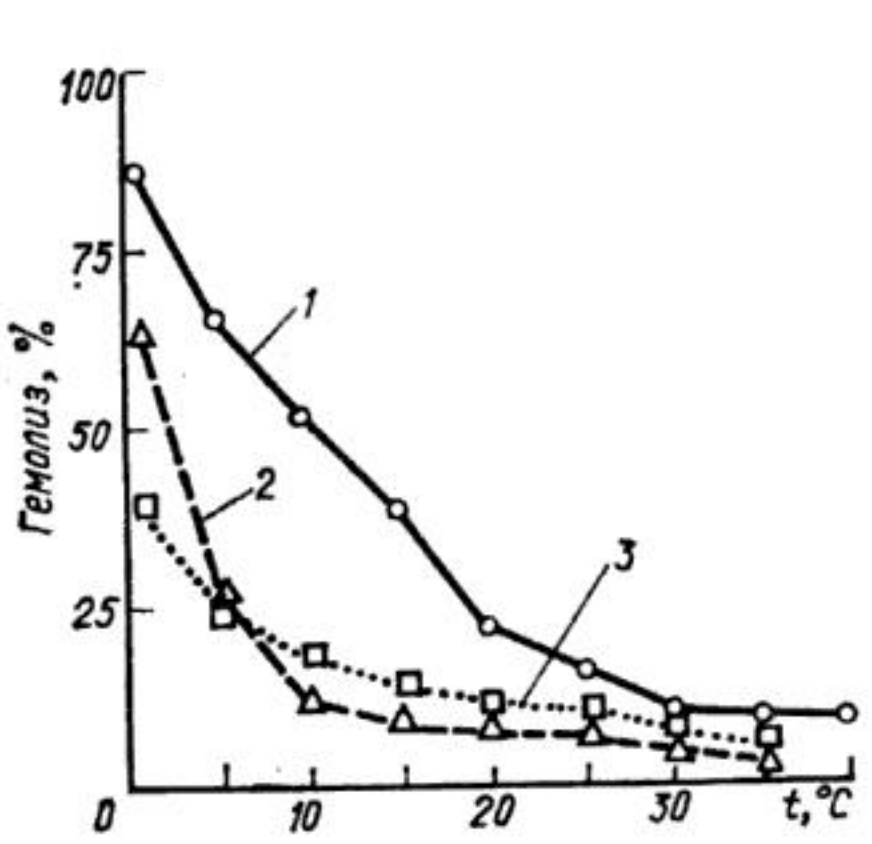


Рис. 4. Зависимость уровня гемолиза эритроцитов от конечной температуры охлаждения в присутствии 1,2 М NaCl:

1 — преинкубация с 1,2 М NaCl с последующим охлаждением клеток, ресуспендированных при различных температурах; *2* — быстрое охлаждение от 37° С; *3* — ступенчатое охлаждение от 37° С.

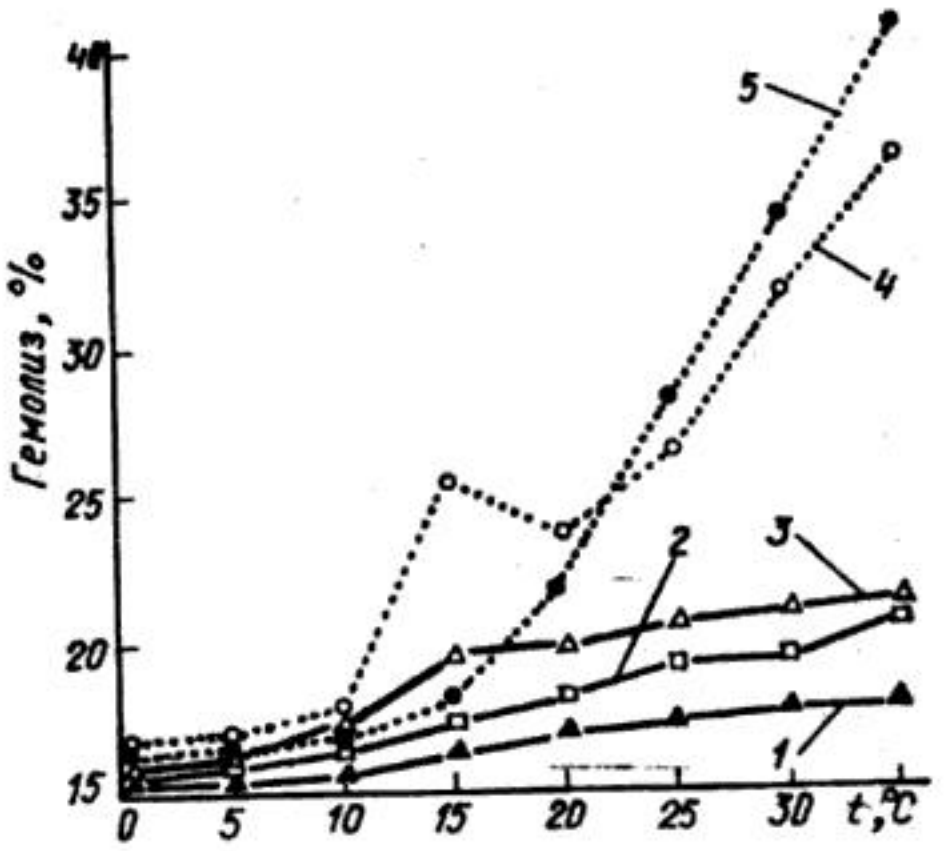


Рис. 5. Уровень гемолиза эритроцитов в зависимости от уровней предобработки и начальной температуры охлаждения:

1 — предварительная инкубация при 0° С с последующей инкубацией при различных температурах в интервале 5—37° С и повторным охлаждением до 0° С; *2* — тоже с 1,2 М NaCl; *3* — охлаждение с 1,2 М NaCl эритроцитов, предварительно истощенных по АТФ; *4* и *5* — охлаждение до 0° С немодифицированных эритроцитов в 0,86 М сахарозе и 1,2 М NaCl соответственно.

адаптацию клеток к неблагоприятным внешним условиям при ступенчатом охлаждении. Очевидно, в этом случае характер адаптации в значительной степени определяется температурой, при которой находятся клетки: чем ниже температура, тем более низкой становится способность клеток к адаптации.

Действие гипертонического стресса на эритроциты при фиксированных температурах не сопровождается гемолизом клеток. Как показывают проведенные эксперименты, гемолиз клеток развивается при сдвиге температуры или при обратном переносе эритроцитов из гипертонических условий в изотонические (рис. 4). В последнем случае повышение температуры обусловливает более низкий уровень постгипертонического гемолиза. Можно предположить, что при более высоких температурах снижение гемолиза связано с более высокой способностью клеток к структурной адаптации к изменившимся условиям среды. Из рис. 4 следует, что наиболее выраженной эта способность проявляется в интервале температур — 20—37° С.

На возможную роль структурной адаптации в механизме холодового гемолиза эритроцитов указывали ранее Грин и Юнг [17]. Однако до сих пор остается неясным, какие структурные факторы — белки или липиды — обеспечивают адаптацию. Исследования, проведенные на простых липидных моделях, свидетельствуют о наличии состояний структуры, которые можно рассматривать как метастабильные [23, 24]. Это указывает на возможность появления гистерезисных явлений при циклическом сдвиге температуры [24]. В то же время остается неясным механизм адаптации к гипертоническому стрессу. В этом случае

Матеріал, захищений авторським правом

важную роль, по-видимому, играют структурное состояние белковых компонентов мембраны и характер осмотического равновесия клетки.

Предварительная инкубация эритроцитов в условиях гипертонии (1,2 М NaCl) при 0° С приводит к резкому снижению уровня гемолиза в последующем цикле инкубации клеток при 5—37° С и повторного охлаждения до 0° С (рис. 5). Отсюда следует, что адаптация эритроцитов в условиях одновременного действия гипертонического стресса и охлаждения в определенной степени связана со способностью клеток принимать несколько структурных состояний [4]. Подобное отсутствие структурной «консервативности», очевидно, связано с исходной метастабильностью клеточной структуры [23].

Объяснение более высокой стабильности эритроцитов при повышенных температурах к осмотическому гемолизу может предполагать несколько механизмов. Один из них заключается в том, что температура влияет на осмотическое равновесие [21], второй — предполагает важную роль реакции клеточной мембраны на снижение температуры [5, 17]. Действительно, температурозависимые изменения объема (менее выраженные в сахарозной среде [7]) достаточно велики для учета в указанном явлении. С другой стороны, наличие отдельных состояний осмотического равновесия для воды и хлора, а также различий в соответствующих клеточных объемах как функции состава наружной среды (которые строго температурозависимы [7]) свидетельствует в пользу того, что частичное объяснение изменений стабильности эритроцитов следует искать во влиянии температуры на проницаемость клеточной мембраны в условиях осмотического транспорта воды и обмена хлорида [17]. Осмотические явления, которые происходят вследствие прямой модификации мембраны, приводящей к более быстрой пассивной диффузии катионов, рассматриваются как переход к осмотическому равновесию для катионов [7]. Несмотря на увеличение катионного обмена (K^+, Na^+), транспорт катионов обычно остается относительно медленным по сравнению с осмотическими потоками воды и обменом анионов (так как он ограничен относительно медленным собственно хлоридным транспортом [9]), т. е. основную роль играют, по-видимому, осмотические потоки воды и хлорида.

Наблюдаемое в наших экспериментах увеличение уровня холодового гемолиза при снижении концентрации NaCl от 150 до 0 мМ в среде, содержащей 0,86 М сахарозу, очевидно, указывает на значение в этом процессе электрохимического потенциала. Известно, что увеличение катионной проницаемости может быть обусловлено действием электрохимического потенциала через клеточную мембрану [13]. Изменение в разности потенциала может быть вызвано изменением соотношения между концентрациями электролитов и сахарозы [7]. В то же время в характерной линейной зависимости утечки нейтральных солей против логарифма наружной концентрации электролитов наблюдаются два излома: один — вблизи 2 М NaCl, другой — при концентрации около 30 мМ (NaCl) электролитов. Последнее указывает, что начальной величиной электрического потенциала, индуцирующего катионную проницаемость, является 45 мВ [7].

Фактором, способным повысить катионную проницаемость, является также механическое напряжение, прикладываемое к мембране, например сжатие до критического объема [7, 39]. Многие исследования показывают, что предгемолитический этап в эритроцитах характеризуется образованием небольших пор для катионов, т. е. возрастание катионной проницаемости предшествует утечке гемоглобина [7, 39]. Увеличение катионной проницаемости при холодовом гемолизе доказывается увеличением обмена K^+ на Na^+ [39]. Однако если этот процесс описать переходом от равновесия по воде и хлору к равновесию по катионам, тогда однонаправленный транспорт хлора все равно должен регулировать достижение равновесного состояния для катионов [K^+, Na^+].

Матеріал, захищений авторським правом

Данные по изучению частичного гемолиза [40] подтверждают это допущение. Так, показано, что частично гемолизированные эритроциты делятся на популяции, находящиеся в медленной или быстрой фазе гемолиза, независимо от того, осуществлялся ли гемолиз быстро или медленно. Эритроциты в медленной фазе — это те клетки, которые лизируют после того, как снижение наружного осмотического давления на определенном этапе было остановлено. Очевидно, эти клетки при данной тоничности имеют субкритический объем, но мембрана растягивается до такой степени, что становится проницаемой для катионов. В чисто электролитной среде все клетки, составляющие популяцию в медленной фазе, лизируют в пределах 60 мин [39]. Этот период сравним с временем, необходимым для достижения равновесия по катионам, полученного в экспериментах с полиеновыми антибиотиками [7]. С другой стороны, присутствием 20 мМ сахарозы, которой достаточно для перехода клеток в стабильное равновесие по катионам, протектирует от гемолиза клетки, находящиеся в медленной фазе [7]. Это совпадает с известными осмотическими явлениями, когда клеточная проницаемость изменяется напряжением мембраны и достижение равновесия по катионам определяется однонаправленной диффузией хлорида [9].

Как видно из рис. 3, быстрая фаза холодового гемолиза эритроцитов при 0° С в среде, содержащей 0,86 М сахарозу, протекает в интервале 0—30 мин, в то время как в солевой среде в интервале — 0—10 мин. В целом это указывает на то, что в среде, содержащей сахарозу (0,86 М), важную роль в механизме холодового гемолиза может играть электрохимический потенциал.

В свою очередь структурное состояние мембраны эритроцитов в значительной степени определяется спектрином [28]. Наиболее простым способом модификации характера взаимосвязи спектрина и мембраны является изменение внутриклеточного содержания АТФ [28]. Как свидетельствуют данные, представленные на рис. 5, охлаждение эритроцитов, истощенных по АТФ, сопровождается снижением уровня гемолиза клеток при охлаждении. Обеднение фонда АТФ в эритроцитах обусловливает сложный комплекс изменений в структуре и функции клеток [14, 28], причем одним из этапов изменений является резкое возрастание характера ассоциации спектрина и компонентов мембраны [28].

Термодинамические данные свидетельствуют о том, что при связывании спектрина с фосфолипидным бислоем имеет место стабилизация бислоя [32, 33]. Будучи поверхностным белком, спектрин (возможно, с другим белком эритроцитов — актином) формирует сеть, ограничивающую латеральную подвижность интегральных белков мембраны. Это указывает на то, что спектрин представляет собой удлиненную молекулу, которая связывается с различными участками на протоплазматической поверхности эритроцитов [28]. Можно предположить, что сокращение поверхностной цитоплазматической сети («субмембранного ретикулума» [18]) при истощении АТФ обусловливает репарацию «дефектных зон», или каналов утечки ионов [14], формируемых в мембране под влиянием гипертонического стресса и охлаждения.

Исследование температурной зависимости освобождения ионов K^+ в условиях, когда эритроциты подвергаются охлаждению в интервале температур 0—37° С в присутствии 1,2 М NaCl, указывает на сходство процессов освобождения K^+ и гемоглобина (рис. 2, 6). Следует, однако, отметить, что освобождение ионов K^+ происходит уже на первом этапе, т. е. в условиях предварительной инкубации эритроцитов с 1,2 М NaCl без охлаждения. Согласно имеющимся данным [31], освобождение ионов K^+ является одним из начальных этапов реакции клеток на гипертонический стресс. Как видно из рис. 6, последующее охлаждение эритроцитов приводит к значительному освобождению ионов K^+ как в температурной области 10—25° С (с максимумом при 15° С), так и

Матеріал, захищений авторським правом

в области температур 25—37° С. Подобная температурная зависимость освобождения ионов K^+ весьма напоминает таковую для освобождения гемоглобина (рис. 6). Однако следует отметить более высокий уровень освобождения K^+ при повышении начальной температуры инкубации до 15—20° С. Возможно, это связано с быстрым формированием в этой области температур популяции эритроцитов с латентными «субкритическими» повреждениями (см. рис. 6), которые проявляются на более поздних этапах охлаждения. Освобождение ионов K^+ в этих популяциях можно предположительно рассматривать в качестве одного из проявлений повреждения структуры мембраны. Следует отметить, что и в этом случае предварительное истощение эритроцитов по АТФ обусловливает их более высокую устойчивость к охлаждению. Полученные результаты указывают, что освобождение ионов K^+ отражает изменение структурного состояния мембран эритроцитов, однако остается открытым вопрос о локализации каналов утечки ионов K^+ и гемоглобина.

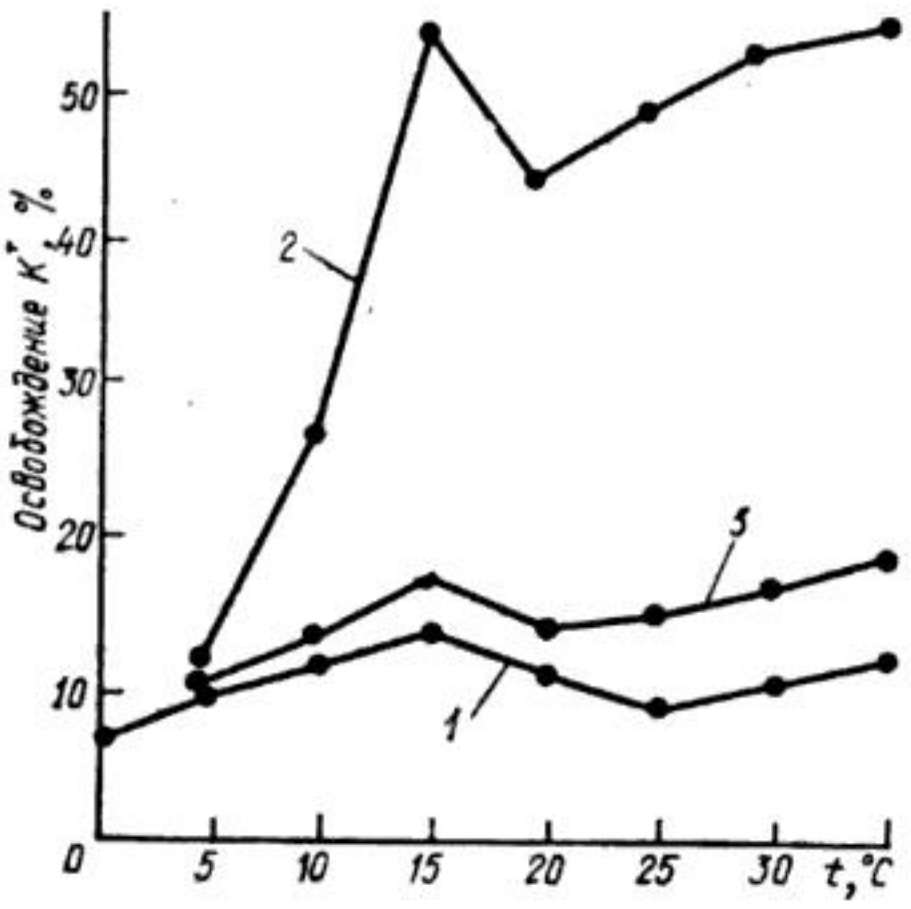


Рис. 6. Влияние начальной температуры инкубации на уровень освобождения ионов K^+ после охлаждения до 0° С:

1 — инкубация с 1,2 М NaCl при 37° С; *2* — то же с последующим охлаждением до 0° С; *3* — то же после истощения по АТФ.

Наличие локального минимума освобождения гемоглобина и ионов K^+ (см. рис. 6) свидетельствует, что в основе холодового гемолиза эритроцитов могут лежать фазовые переходы липидов [1—3]. Подобное предположение высказано также Грином и Юнгом [17]. Исследования, проведенные на модельных системах (липидные везикулы и липосомы), позволяют выявить факт спонтанной утечки различных ионов и молекул в области фазового перехода липидов [30]. Предполагается, что это обусловлено формированием дефектных областей мембран на границе между твердыми и жидкими доменами мембраны [30].

Что касается данных о мембранах эритроцитов по отношению к фазовым переходам липидов, то они противоречивы. Основываясь на данных вискозиметрии был постулирован фазовый переход в эритроцитах при 18—19° С [41]. Переход вокруг этой температурной области может объяснять изломы в аррениусовских кривых для транспортных процессов [22] и активности мембранно-связанных ферментов [23]. Однако в липосомах, приготовленных из общих липидов эритроцитов, фазовые переходы не обнаруживаются ни рентгеновской дифракцией [16], ни калориметрическими исследованиями [20]. Только в истощенных по холестерину «общих фосфолипидных» фракциях обнаружены (калориметрически) переходы типа «гель — жидкий кристалл» [20]. Отсутствие определяемых фазовых переходов в природных мембранах чаще всего объясняют фосфолипидхолестериновыми взаимодействиями [10]. Исследования на модельных системах показывают, что подобные взаимодействия приводят бислой к промежуточному состоянию текучести, когда отсутствуют резкие переходы из жидко-кристаллического состояния в состояние геля [10]. В нативной эритроцитарной мембране мольное отношение холестерина к фосфолипидам примерно равно 0,8 [10], причем считалось, что холестерин распределен случайно. Это может устранить какой-либо кооперативный фазовый переход. Однако последние данные свидетельствуют, что холестерин в мембране эритроцитов распределен не случайно [19]. Это весьма важно для оценки возможных механизмов холодового гемолиза эритроцитов. Можно предположить, что в условиях охлаждения формирование дефектных обла-

Матеріал, захищений авторським правом

стей мембраны при температурах фазовых переходов липидов ассоциировано с участками, обедненными холестерином.

По данным дифракции рентгеновских лучей [16], в гидратированных липидах мембран эритроцитов (истощенных по холестерину в различной степени) при содержании холестерина 6 мол.% в интервале температур 2—20° С могут существовать области в жидко-кристаллическом и кристаллическом состояниях, хотя даже при —10° С преобладают жидко-кристаллические домены. При высоком содержании холестерина жидко-кристаллическое состояние может сохраняться до —20° С. Похожая информация была получена в работе [20], где не могли калориметрически зарегистрировать фазовый переход, пока из мембран не удаляли 81% холестерина. В этих условиях наблюдался широкий фазовый переход с центром при 25° С. В то же время Циммер и соавт. [41] описали термотропные изменения вязкости с нарушением непрерывности при 18—20° С в мембране эритроцитов и в истощенных по холестерину мембранах, что коррелировало с нарушением непрерывности при 19° С для транспорта глюкозы [11, 22]. Недавние исследования мембран теней эритроцитов с помощью ЭПР спин-метки, меченной нитроксидной жирной кислотой, отчетливо показали наличие термального перехода при 13—16° С и pH — чувствительного перехода при 37,5—40,5° С [38].

Переход при 13—16° С хорошо коррелирует с обнаруженной нами критической температурной областью развития криогемолиза (при 0° С) при изменении начальной температуры инкубации эритроцитов (см. рис. 1). В то же время сравнение уровней гемолиза при различных конечных температурах охлаждения от 37° С указывает на наличие критической температурной области, верхней границей которой является 10° С.

Калориметрическое поведение четырех главных фосфолипидов эритроцитов человека свидетельствует [37], что лецитин имеет переход с центром при —20° С и с верхним плечом от —10 до 10° С. Это, вероятно, является следствием присутствия в нем примерно 12 мол.% динасыщенных липидов [37]. При моделировании этой липидной фазы с использованием 44 мол. % яичного лецитина, 44 мол. % лецитина сои и 12 мол.% дипальмитоиллецитина, которые приблизительно имитируют жирнокислотный состав лецитинов эритроцитов, наблюдаются сходные термограммы. Сфингомиелин характеризуется переходом в относительно высокотемпературной области (20—37° С), что весьма важно, если учесть наличие в нем очень длинных насыщенных цепей и мононасыщенных жирных кислот в комбинации с относительно короткой цепью сфингозинового скелета. Фосфатидилэтаноламин характеризуется переходом от —5 до 10° С [37]. Из исследований с синтетическими липидами известно, что фосфатидилэтаноламины с насыщенными цепями имеют переход, который на 20—30° С выше, чем у соответствующих фосфатидилхолинов [35]. Однако недавние модельные исследования [37] показали, что температуры перехода фосфатидилэтаноламина с двумя ненасыщенными цепями находятся в том же температурном интервале, что и у соответствующих лецитинов. Как ведут себя смеси липидов в природной мембране, еще не совсем понятно, но по имеющимся данным можно сделать вывод, что, хотя жирные кислоты фосфатидилэтаноламина более ненасыщенны [37] по сравнению с лецитином, температурный интернал перехода во фракции лецитина существенно ниже [37].

Таким образом, наиболее вероятно, что в области температур 0—37° С в механизм криогемолиза вовлечены структурно-фазовые превращения фосфатидилэтаноламина, причем указанные превращения, по-видимому, регулируются холестерином и мембранными белками. В норме мембранные белки эритроцитов лишены мобильности в плоскости мембраны [15, 38] и ограничивают мобильность мембранных липидов [8]. В этих условиях неравномерное распределение холесте-

Матеріал, захищений авторським правом

рина между двумя монослоями мембраны и различное сродство холестерина к разным фосфолипидам обусловливают неодинаковость локальных свойств мембраны. Из всех фосфолипидов эритроцита фосфатидилэтаноламин имеет самое низкое сродство к холестерину [15] и подвергается термотропному переходу от 10 до —10° С [37]. Можно предположить, что при осмотической дегидратации клеток перераспределение белков в мембране влияет на ассоциацию холестерина с компонентами внутреннего монослоя мембран, что, в свою очередь, облегчает переход фосфатидилэтаноламина из жидко-кристаллического состояния в состояние геля. Низкие температуры способны приводить к исключению белков из районов, обогащенных фосфатидилэтаноламинами [15]. Ключевым моментом, по-видимому, является то, что фосфатидилэтаноамин мембран эритроцитов при 10° С претерпевает переход из бислойной в гексагональную структуру [15]. При 37° С он стремится принять небислойную структуру, если латерально отделен от других липидных компонентов. Контроль такой небислойной структуры может осуществляться спектрином, его взаимодействием с аминсодержащими фосфолипидами внутреннего монослоя, в частности с фосфатидилсерином [32, 33]. Таким образом, нарушение взаимодействия спектрина с внутренним монослоем может усилить образование неустойчивой небислойной конфигурации и тем самым усилить такие процессы, как флип-флоп, формирование дефектов и образование пузырьков в мембране.

Отсюда следует, что различия в динамике холодового гемолиза, наблюдаемые при изменении начальной (фаза прединкубации) и конечной температур (фаза охлаждения) обусловлены тем, что дестабилизация спектриновой сети гипертоническим стрессом при температурах выше 10° С может способствовать формированию неустойчивой гексагональной фазы фосфатидилэтаноламина и последующее охлаждение до 0° С обусловливает формирование дефектных зон в этих областях мембраны. Охлаждение температур выше 10° С не вызывает гемолиза клеток, так как 10° С является верхней границей фазового перехода фосфатидилэтаноламина [37].

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что изменения структурно-фазового состояния фосфолипидов играют определяющую роль в механизме холодового повреждения мембраны эритроцитов. При этом значение осмотических факторов (т. е. факторов, связанных с действием высоких концентраций не проникающих в клетку электролитов и неэлектролитов) проявляется в первую очередь в нарушении структуры белкового цитоскелета («субмембранного ретикулума») клетки в процессе их осмотического сжатия. Возникает вопрос о характере взаимосвязи между процессами, происходящими в липидном матриксе мембраны, и процессами, изменяющими белковую решетку клетки. Наиболее очевидно, что общей основой, связывающей обе группы процессов, является динамическое поведение мембранных компонентов, и в первую очередь развитие, направленность и скорость диффузии липидных и белковых молекул в плоскости мембраны. В липидной фазе мембраны это, как правило, приводит к фазовому разделению на участки, обогащенные или обедненные тем или иным типом молекул, или участки с различной плотностью их упаковки. Подобное состояние является причиной структурной нестабильности мембраны при охлаждении [1—3,17]. Значение белков при этом заключается в их способности ограничить латеральную диффузию липидных молекул в первую очередь в липидных микрофазах, окружающих белки. В то же время в условиях осмотического сжатия изменение формы клеток является причиной индуцированного («вторичного») латерального перераспределения белковых молекул, когда формируются обширные области, лишенные их [12, 29]. В конечном итоге происходит формирование обогащенных белками зон (или белковых агрегатов) и участков бислоя, лишенных их стабилизирующего влияния. Последние при-

Матеріал, захищений авторським правом

обретают свойства простых липидных везикул, как известно, легко теряющих внутреннее содержимое при простом охлаждении до температур фазового перехода формирующих их липидов [30]. В этой связи становится достаточно очевидным значение таких факторов, как структурная динамика мембраны при изменении формы клетки и динамика поведения участков мембраны, включающих холестерин (третий важнейший после липидов и белков компонент мембраны, препятствующий фазовым переходам липидов). Роли указанных факторов в механизме холодового повреждения эритроцитов будет посвящено следующее сообщение.

1. *Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П.* Молекулярные механизмы криоповреждений биомембраны.— В кн.: Физико-химические механизмы криоповреждений биологических структур. М., 1978, с. 80—114 (Итоги науки и техники / ВИНИТИ. Биофизика; Т. 9).
2. *Белоус А. М., Бондаренко Т. П., Бондаренко В. А.* Молекулярные механизмы криоповреждений мембран эритроцитов.— В кн.: I Всесоюз. съезд гематологов: Тез. докл. Баку, 1979, с. 458—459.
3. *Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П., Белоус А. М.* Температурозависимые изменения мембран эритроцитов: значение фазовых переходов липидов и формы клетки.— В кн.: Материалы II Всесоюз. симпоз. «Липиды биологических мембран». Ташкент, 1980, с. 174—176.
4. *Маркин В. С.* Организация мембран в плоскости слоя и форма клетки. Биологические следствия теории.— Биофизика, 1981, **24**, № 1, с. 158—167.
5. *Aloni B., Eitom A., Livne A.* The erythrocyte membrane site for the effect to temperature on osmotic fragility.— Biochim. et biophys. acta, 1977, **465**, N 1, p. 46—54.
6. *Bondarenko T. P., Babiychuk L. A., Belous A. M.* Effect of cooling on the state of erythrocyte membranes with different cholesterol contents. I. Resistance of normal and cholecterol depleted erythrocytes to cooling in the range of 37 to 0° C.— Cryo-Letters, 1981, 2, N 7, p. 217—224.
7. *Brumen M., Glaser R., Svetina S.* Osmotic states of the red blood cell.— Bioelectrochem. Bioenerg., 1979, **6**, N 2, p. 227—243.
8. *Cherry R. J.* Rotational and lateral diffusion of membrane proteins.— Biochim. et biophys. acta, 1979, **559**, N 4, p. 289—329.
9. *Dalmark M.* Chloride and water distribution in human red cells.— Cryobiology, 1974, **250**, N 1, p. 65—84.
10. *Demel R. A., Kruyjff B.* The function of sterols in membranes.— Biochim. et biophys. acta, 1979, **457**, N 2, p. 102—132.
11. *Deuticke B., Rickert I., Beyer E.* Stereoselective, SH-dependent transfer of lactase in mammalian erythrocytes.— Biochim. et biophys. acta, 1978, **507**, N 1, p. 137—155.
12. *Dolowy K.* Dynamic structure of the erythrocyte cell membrane.— Stud. biophys., 1976, **60**, N 3, p. 187—190.
13. *Donlou J. A., Rothstein A.* The cation permeability of erythrocytes in low ionic strength media of various tonicities.— J. Membrane Biol., 1969, **1**, N 1, p. 37—52.
14. *Elgsaeter A., Shotton D. M., Branton D.* Intramembrane particle aggregation in erythrocyte ghosts. II. The influence of spectrin aggregation.— Biochim. et biophys. acta, 1976, N 1, p. 101—122.
15. *Gerritsen W. J., Verkleij A. J., Deenen L. L. M.* The lateral distribution of intramembrane and recombinant vesicles.— Biochim. et biophys. acta, 1979, **555**, N 1, p. 26—41.
16. *Gottlieb M. H., Eanes E. D.* On phase transitions in erythrocyte membranes and extracted membrane lipids.— Biochim. et biophys acta, 1974, **373**, N 3, p. 519—522.
17. *Green F. A., Jung C. Y.* Cold-induced hemolysis in ahypertonic mileu.— J. Membrane Biol., 1977, **33**, N 3/4, p. 249—262.
18. *Hainfeld J. F., Steck T. L.* The submembrane reticulum of the human erythrocyte: a scanning electron microscope study.— J. Supramol. Struct., 1977, **6**, N 3, p. 301—311.
19. *Higgins J. A., Florendo N. T., Barnett R. J.* Localization of cholesterol in membranes of erythrocyte ghosts.— J. Ultrastruct. Res., 1973, **42**, N 1, p. 66—81.
20. *Jackson U. W., Kostyla J., Nordiu J. H., Brandts J. F.* Calorimetric study of protein transitions in human erythrocyte ghosts.— Biochemistry, 1973, **12**, N 19, p. 3662—3667.
21. *Jacobs M. A., Paspart A. K.* Osmotic properties of the erythrocyte. II. The influence of pH, temperature and oxygen on hemolysis by isotonic solutions.— Biol. Bull. (Woods Hole), 1931, **60**, p. 95—119.
22. *Lacko L., Wittke B., Geck P.* The temperature dependence of the exchange transport of glucose in human erythrocytes.— J. Cell. Physiol., 1973, **82**, N 2, p. 213—218.
23. *Lee A. G.* Functional properties of biological membranes: a physical-chemical approach.— Progr. Biophys. and Mol. Biol., 1975, **29**, N 1, p. 3—56.
24. *Lee A. G.* Lipid phase transitions and phase diagrams. I. Lipid phase transitions.— Biochim. et biophys. acta, 1977, **472**, N 2, p. 237—281.
25. *Lovelock J. E.* The hemolysis of human red blood cells by freezing and thawing.— Biochim. et biophys. acta, 1953, **10**, N 4, p. 414—420.

Матеріал, захищений авторським правом

26. *Lovelock J. E.* The denturation of lipid protein complexes as a cause of damage by freezing.— Proc. Roy. Soc. Ser. B, 1957, **147**, N 4, p. 427—433.
27. *Lovelock J. E.* Physical instability and thermal shock in red cells.— Nature, 1954, **173**, N 4406, p. 659—661.
28. *Marchesi V. T.* Spectrin: present status of a putative cytoskeletal protein of the red cell membrane.— J. Membrane Biol., 1979, **51**, N 2, p. 101—133.
29. *Marikovsky Y., Khodadad J. K., Weinstein R. S.* Influence of red cell shape on surface charge topography.— Exp. Cell. Res., 1978, **116**, N 1, p. 191—197.
30. *Marsh D., Watts A., Knowles P. F.* Evidence for phase boundary lipid. Permeability of TEMPO-choline into dimyristoyl — phosphatidylcholine vesicles at the phase transitions.— Biochemistry, 1976, **15**, N 16, p. 3570—3578.
31. *Medzihradsky F., Marks M. J.* Measures of viability in isolated cells.— Biochem. Med., 1975, **13**, N 2, p. 164—177.
32. *Mombers C., Van Dijck P. W. M., Van Deenen L. L. M., De Gier J., Verkleij A. J.* The interaction of spectrin actin and synthetic phospholipids.— Biochim. et biophys. acta, 1977, **470**, N 2, p. 152—160.
33. *Mombers C., Verkleij A. J., Gier J. de, Deenen L. L. M. van.* The interaction of spectrin-action and synthetic phospholipids. II. The interaction with phosphatidylserine.— Biochim. et biophys. acta, 1979, **537**, N 2, p. 271—281.
34. *Morris G. J., Farrant J.* Effect of cooling rate on thermal sheck hemolsis.— Cryobiology, 1973, **10**, N 2, p. 119—125.
35. *Phillips M.* The physical state of phospholipids and cholesterol in monolayers, bilayers and membranes.— Progr. Surface and Membr. Sci., 1972, **5**, p. 139—221.
36. *Pribor D. B.* PVP contrasted with dextran and multifactor theory of cryoprotection.— Cryobiology, 1974, **11**, N 1, p. 60—72.
37. *Dijek P. W. M. van, Loelen E. J. J. van, Seldenkijk R., Deenen L. L. M. van, Gier J. de.* Calorimetric behavior of individual phospholipid classes from human and bovine erythrocyte membranes.— Chem. and Phys. Lipids, 1976, **17**, N 2/3, p. 336—343.
38. *Wallach D. F. H., Verna S. P., Fookson J.* Application of Laser Raman and infrared spectroscopy to the analysis of membrane structure.— Biochim. et biophys. acta, 1979, **559**, N 2/3, p. 153—208.
39. *Zade-Oppen A. M.* Post-hypertonic hemolysis in sodium chloride systems.— Acta physiol. scand., 1969, **73**, N 3, p. 341—350.
40. *Zeidler R. B., Kim H. D.* Effects of low electrolyte media on salt lodd and hemolysis of mammalian red blood cells.— J. Cell. Physiol., 1979, **100**, N 3, p. 551—563.
41. *Zimmer G., Schirmer H.* Viscosity changes of erythrocyte membrane lipids at transition temperature.— Biochim. et biophys. acta, 1974, **345**, N 3, p. 314—320.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
04. 11 81

УДК 57.043 : 548.0 : 661.073.585

Л. Г. Кулешова, Г. А. Худяков

ПОВРЕЖДЕНИЯ КЛЕТОК ПОЧЕК СИРИЙСКОГО ХОМЯКА ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ

Основные повреждающие факторы при криоконсервации биологических объектов развиваются при фазовом переходе вода — лед при замораживании и лед — вода при отогреве.

При замораживании фазовый переход приводит к нарушению термодинамического равновесия клетка — окружающая среда, что в свою очередь индуцирует в системе явления, стремящиеся восстановить его. Выравнивание химических потенциалов вне и внутри клетки может реализоваться двумя путями: дегидратацией или внутриклеточной кристаллизацией. Та или иная возможность определяется физико-химическим состоянием среды, способностью клетки терять воду, скоростью охлаждения. Однако и дегидратация и внутриклеточная кристаллизация могут оказаться летальными для клетки [5].

В данной работе предпринята попытка количественного анализа вклада указанных факторов в повреждение клеток почек сирийского хомяка.

Методика. Работа выполнена методом криомикроскопии. Программное замораживание образцов осуществлялось с помощью регулирующего устройства, обеспечивающего точность выполнения программ ±5%. Температура контролировалась дифференциальной медь-констан-

Матеріал, захищений авторським правом

тановой термопарой, помещенной в суспензию клеток. Точность измерения температуры ±0,5° С. В экспериментах использовалась перевиваемая культура клеток почек сирийского хомяка, суспендированная в среде Игла, содержащей 10% бычьей сыворотки. Суспензия клеток охлаждалась по одноэтапной программе со скоростями 1° С/мин, 5° С/мин, 10° С/мин до —25° С и двухэтапной — со скоростью 1° С/мин до температуры начала фазового перехода и далее 5° С/мин или 10° С/мин до —25° С. Скорость отогрева была постоянной во всех эксперимен-

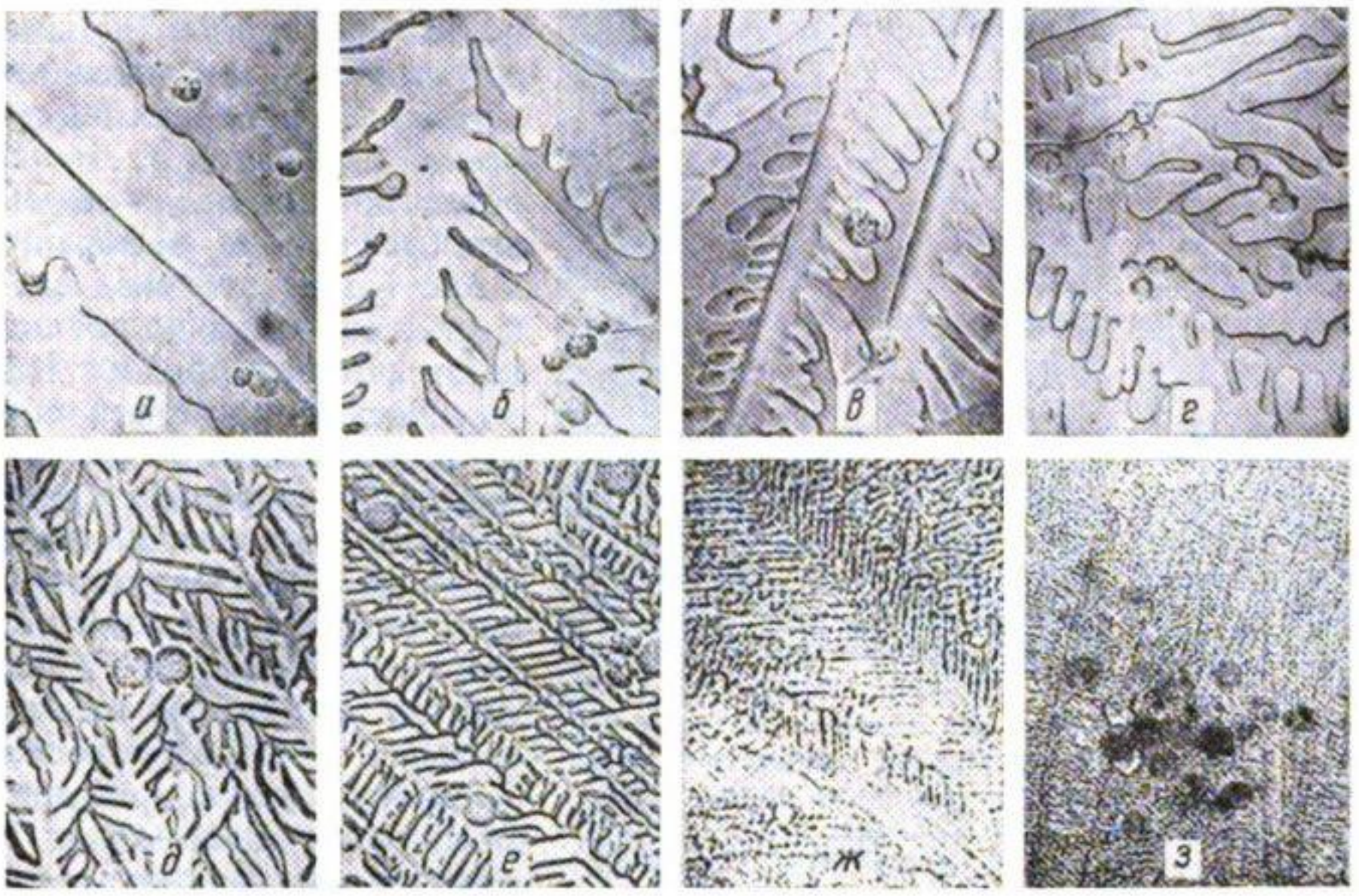


Рис. 1. Классификация первичных кристаллических структур:
а — d = 44,80; *б* — d = 17,97; *в* — d = 12,37; *г* — d = 11,20; *д* — d = 6,97; *е* — d = 4,62; *ж* — d = 2,40; *з* — d < 2.

тах и составляла 3° С/мин. Для исключения переохлаждения в суспензию вносили затравочные кристаллы AgJ. В качестве криопротектора использовали глицерин, концентрацию которого варьировали в пределах от 2,5 до 10%. Для тестирования грубых повреждений клеток применялось суправитальное окрашивание их трипановым синим в соотношении 1 : 1 непосредственно в рабочей камере криомикроскопа перед циклом замораживания — отогрева, что позволяло изучать его накопление поврежденными клетками. Кинетика физико-химических явлений, происходящих при замораживании, регистрировалась фотографически. Экспериментально определялась исходная сохранность клеток (процент клеток, не окрашенных трипановым синим), процент клеток, в которых произошла внутриклеточная кристаллизация, и сохранность клеток после отогрева.

Результаты и их обсуждение. В качестве характеристики первичной структуры, возникающей при фазовом переходе, нами использована средняя длина пересекающего плоское зерно отрезка прямой. Основной принцип метода заключается в том, что измеряется число зерен n, попавших на случайную секущую общей длиной l. Средняя длина отрезка определяется как $d = {}^{e}/_{n}$ [1]. Это позволило классифицировать реализующуюся кристаллическую структуру по степени дисперсности и выделить три типа условий роста кристаллов льда: мягкие $d>15$; средние $5<d<15$; жесткие $d<5$, которые обусловлены как физико-химическим состоянием среды, так и режимом охлаждения. В мягких условиях наблюдается медленный рост кристаллов дендритного типа. Клетки при этом оттесняются в образующиеся каналы (рис. 1, *а, б*). В средних условиях роста кристаллов увеличивается степень развет-

Матеріал, захищений авторським правом

вленности вторичной структуры. Наблюдается как обрастание клеток кристаллами льда, так и их вмерзание в лед (рис. 1, *в — д*). В жестких условиях реализуется мелкокристаллическая структура, которая в процессе дальнейшего охлаждения рекристаллизуется. Клетки в этом случае захватываются растущими кристаллами (рис. 1, *е — з*).

Суправитальное окрашивание клеток позволило отдифференцировать повреждения, возникающие в различных условиях роста первичной структуры и обусловленные в связи с этим различными факторами. При росте кристаллов дендритного типа клетки, оттесняясь в каналы, подвергаются действию «эффектов раствора»: обезвоживаются, уменьшаются в размере, деформируются. После отогрева такие клетки значительно увеличиваются в размере, их плазматическая мембрана образует выпячивание в виде пузырей, которые, разрастаясь, сливаются вместе (рис. 2). Образование пузырей предшествует появлению многочисленных гранул внутри клетки, что является прямым доказательством необратимого повреждения. Медленное накопление суправитального красителя, а также сплошное окрашивание ядра только при температурах выше 0° С свидетельствуют о частичной потере полупроницаемости мембраны клеток. Золлингер [6] отмечал образование пузырей на мембране клеток, подвергнутых гипертоническому воздействию. Аналогичные изменения наблюдались нами при изучении взаимодействия клеток перитонеального экссудата мыши с гипертоническими растворами криопротекторов [3]. В работе [4] аналогичные явления описываются при замораживании лейкоцитов. Все это позволяет предположить, что в данных условиях повреждение наступает в результате достижения критической степени дегидратации при замораживании и проявляется при отогреве как результат осмотического стресса.

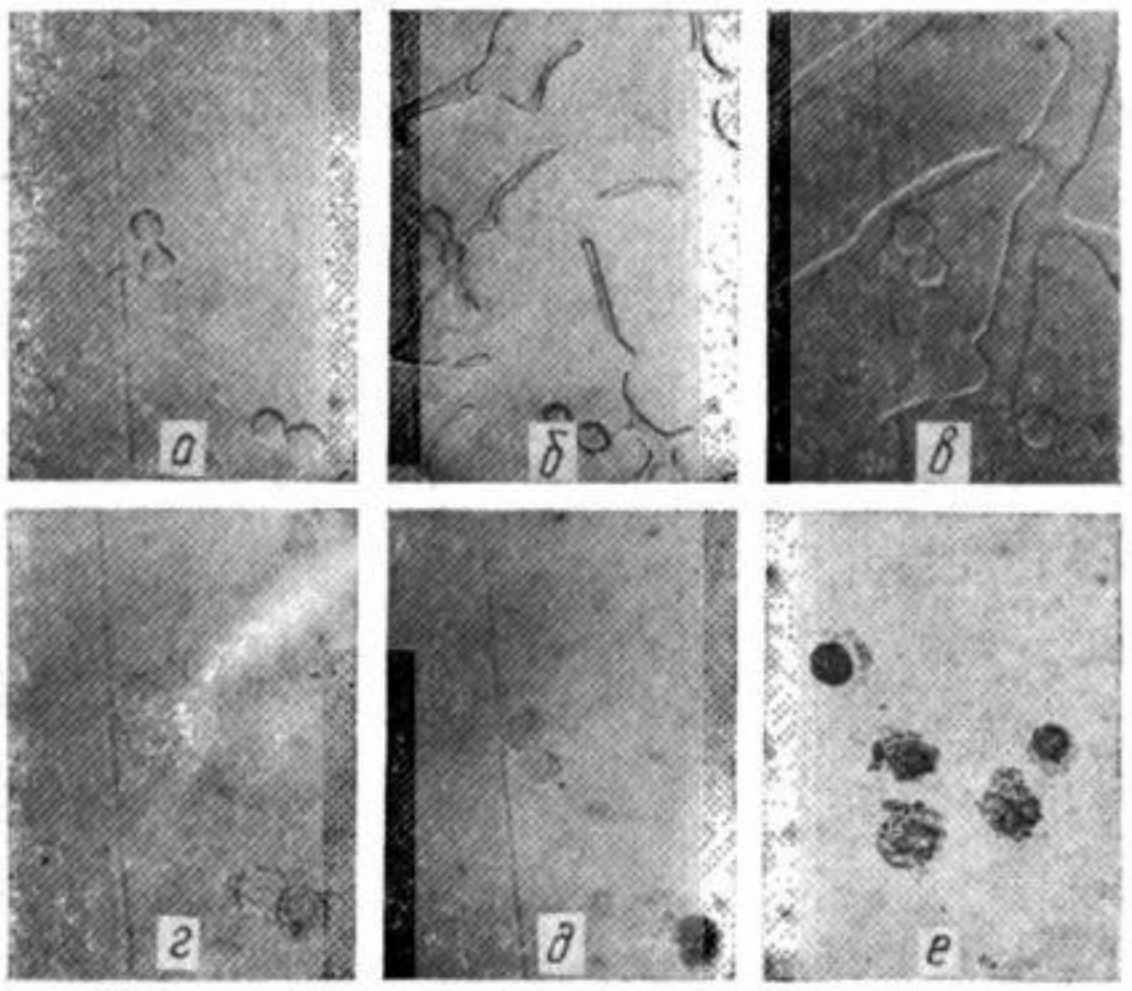


Рис. 2. Кинетика процесса замораживания — отогрева клеток почек сирийского хомяка под защитой 2,5%-ного глицерина. Скорость охлаждения — I этап 1° С/мин, II этап 5° С/мин; t = 24° С (*а*).— 25° С (*б*),— 5° С (*в*), 0° С (*г*), 5° С (*д*), 24° С (*е*).

Внутриклеточная кристаллизация наступает, как правило, в жестких условиях роста кристаллов льда, следуя сразу же за внеклеточным кристаллообразованием (рис. 3, *а, б*). В процессе охлаждения наблюдается рекристаллизация внутриклеточных кристаллов (рис. 3). После отогрева мембрана клеток лишена пузырей. Однако быстрое накопление красителя, появление значительного числа гранул в цитоплазме, а также прокрашивание ядра уже при 0° С свидетельствуют о наступившем повреждении (рис 3, *г — е*).

Количественная оценка соотношения этих факторов показала следующее. Оказалось, что указанные повреждающие факторы в исследованных условиях могут реализоваться одновременно, а степень вклада в суммарный процент поврежденных клеток каждого из них определяется физико-химическими условиями замораживания.

Так, при замораживании незащищенной суспензией клеток со скоростью 1° С/мин суммарное количество поврежденных клеток составляет 83,3%, причем 50% из них приходится на повреждение в результате возникновения внутриклеточных кристаллов. При увеличении скорости

Матеріал, захищений авторським правом

охлаждения до 5° С/мин количество поврежденных клеток возрастает в основном за счет внутриклеточной кристаллизации, которая при охлаждении со скоростью 10° С/мин достигает 100% (рис. 4).

Применение 2,5%-ного глицерина при одноэтапном замораживании со скоростью 1° С/мин и 5° С/мин исключает возникновение внутриклеточной кристаллизации, и повреждение наступает только за счет дегидратационного фактора. Степень повреждения при охлаждении со скоростью 5° С/мин минимальна. Такой характер зависимости может быть обусловлен тем, что при замораживании со скоростью 1° С/мин клетки в неблагоприятных условиях действия «эффектов раствора» находятся не менее 20 мин. Увеличение скорости охлаждения до 5° С/мин при тех же мягких условиях роста кристаллов льда сокращает время действия дегидратационного фактора до 5 мин, вследствие чего клетки не успевают достичь критической степени обезвоживания, что и обусловливает повышение сохранности. При охлаждении по одноэтапной программе со скоростью 10° С/мин и двухэтапной со скоростью 10° С/мин на втором этапе имеет место повреждение обоими факторами (рис. 5).

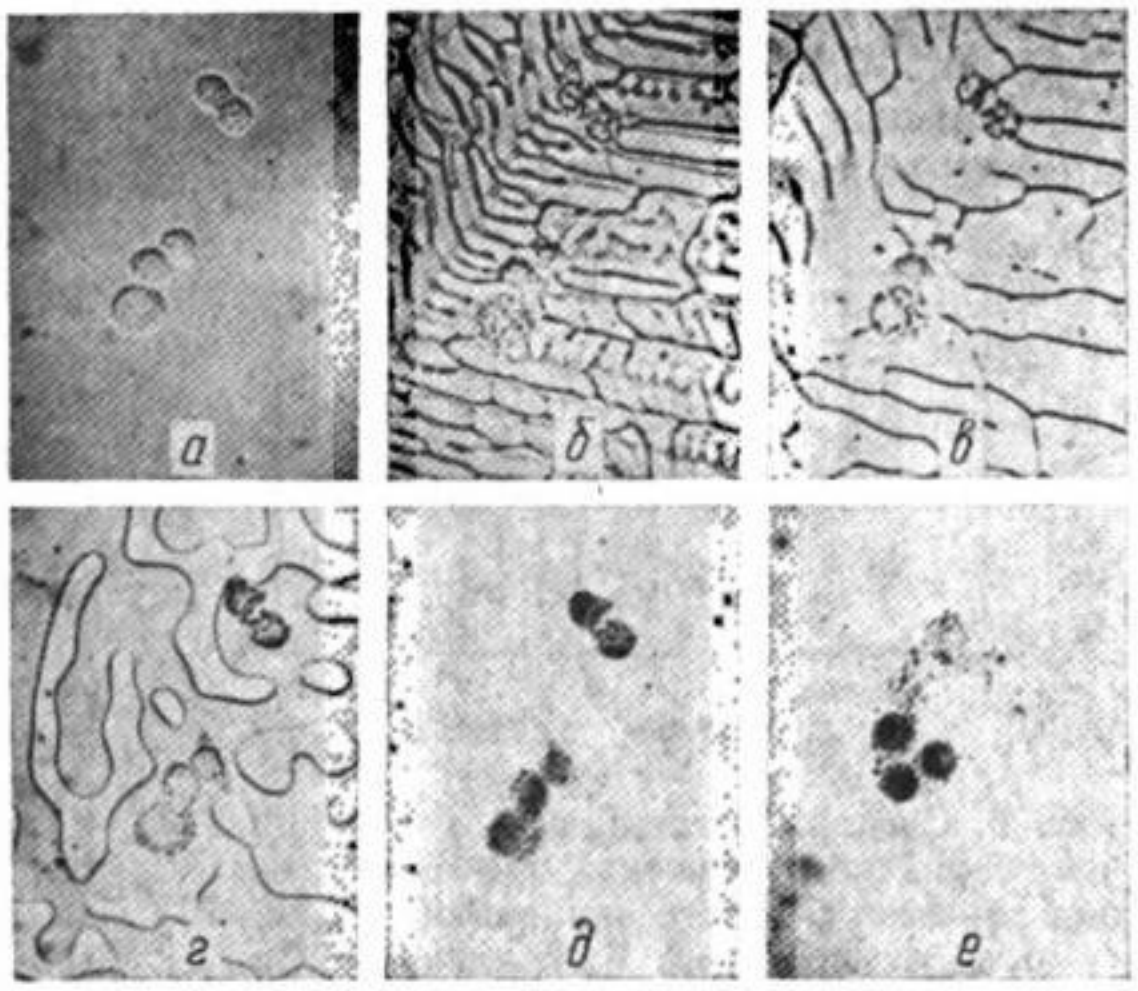


Рис. 3. Кинетика процесса замораживания — отогрева клеток почек сирийского хомяка под защитой 2,5%-ного глицерина. Скорость охлаждения — I этап 1° С/мин, II этап 10° С/мин; t = 24° С (*а*),— 2,5° С (*б*),— 6° С (*в*), —1,5° С (*г*), 0° С (*д*), 24° С (*е*).

Применение 5%-ного глицерина обеспечивает практически полное отсутствие повреждения клеток как при охлаждении по одноэтапной программе со скоростью 1° С/мин, так и при охлаждении по двухэтапной программе со скоростью 5° С/мин на втором этапе. Переход к режимам 5° С/мин и 10° С/мин приводит к образованию внутриклеточного льда и повреждению клеток в результате действия обоих факторов, причем при увеличении скоро-

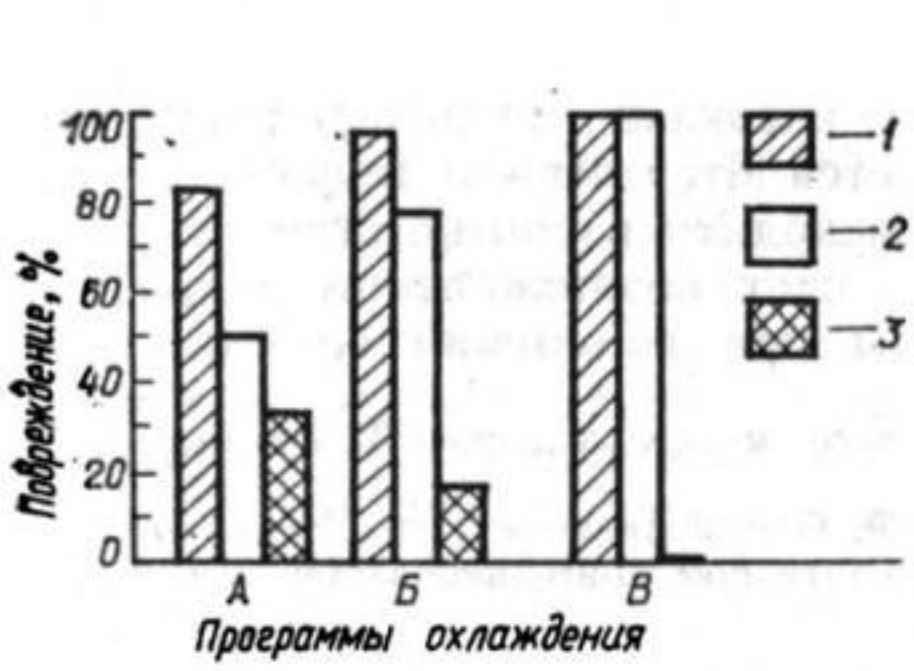


Рис. 4. Степень повреждения клеток почек сирийского хомяка в зависимости от скорости охлаждения незащищенной суспензии при замораживании по одноэтапным программам:

1 — общее количество поврежденных клеток; *2* — количество клеток, поврежденных в результате образования внутриклеточного льда; *3* — количество клеток, поврежденных дегидратационными явлениями; *А* — 1° С/мин, *Б* — 5° С/мин, *В* — 10° С/мин.



Рис. 5. Степень повреждения клеток почек сирийского хомяка, замороженных под защитой 2,5%-ного глицерина, в зависимости от программ охлаждения:

А, *Г*, *Д* — одноэтапные программы; *Б*, *В* — двухэтапные; *1—3* — то же, что и на рис. 4.

Матеріал, захищений авторським правом

сти охлаждения соотношение их возрастает в сторону внутриклеточной кристаллизации (рис. 6).

Применение 10%-ного глицерина в режиме одноэтапного охлаждения суспензии клеток со скоростью 1° С/мин и двухэтапного со скоростью 5° С/мин обеспечивает 100%-ную сохранность клеток. После отогрева наблюдается полное восстановление исходного состояния клеток. В остальных режимах существенным оказывается только дегидратационный фактор. Внутриклеточная кристаллизация возникает в области более высоких скоростей охлаждения начиная с 20° С/мин на первом этапе (рис. 7).

Таким образом, анализ характера повреждений клеток при замораживании показал, что повреждение наступает в результате дей-

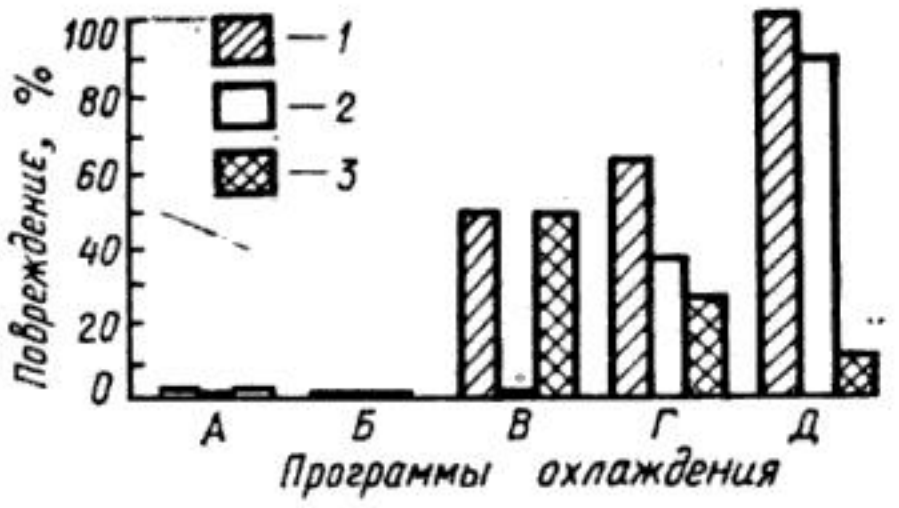


Рис. 6. Степень повреждения клеток почек сирийского хомяка, замороженных под защитой 5%-ного глицерина, в зависимости от программ охлаждения. Обозначения те же, что и на рис. 5.

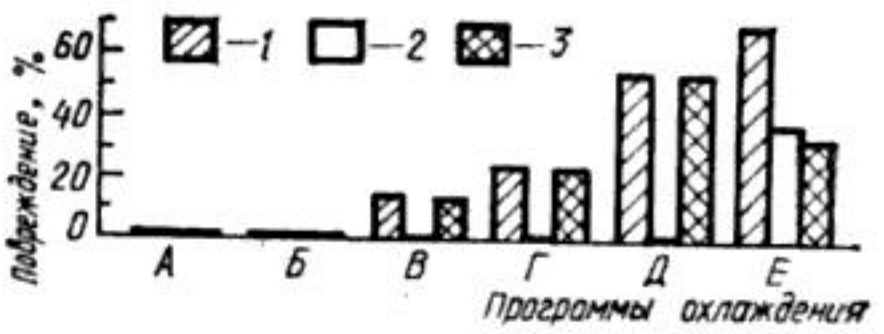


Рис. 7. Степень повреждения клеток почек сирийского хомяка, замороженных под защитой 10%-ного глицерина. Обозначения те же, что и на рис. 5. *Е* — скорость охлаждения 20° С/мин.

ствия двух основных факторов: внутриклеточной кристаллизации и дегидратации и сопутствующих ей явлений. При исследованных условиях можно выделить три области: 1) область, в которой повреждение наступает только в результате «эффектов раствора»; 2) область смешанного действия факторов; 3) область, в которой повреждение обусловлено только внутриклеточной кристаллизацией. Границы этих областей определяются условиями замораживания.

Быстрое накопление красителя клетками, поврежденными внутриклеточной кристаллизацией, свидетельствует о полной потере избирательной проницаемости их мембран.

Медленное накопление красителя клетками, поврежденными дегидратационными явлениями, объясняется отсутствием полного разрушения мембраны, которое может происходить в соответствии с механизмом, описанным в работе [2], за счет возникновения локальных напряжений плазматической мембраны при изменении ее геометрии.

1. *Вейнберг Ф.* Приборы и методы физического металловедения: В 2-х вып.— М.: Мир, 1973.— Вып. 1, с. 276—331.
2. *Гордиенко Е. А., Ишков Г. С., Розанов Л. Ф.* Обезвоживание и некоторые механизмы криоповреждения клеток при низкотемпературном консервировании суспензии.— Криобиология и криомедицина, 1977, вып. 3, с. 29—34.
3. *Кулешова Л. Г., Розанов Л. Ф., Лобасенко Н. П.* Микроскопическое изучение кинетики изменения объема клеток в гипертонических средах.— Пробл. гематологии и переливания крови, 1980, № 4, с. 32—35.
4. *Crowley J. P., Rene A., Valeri C. R.* The Recovery, Structure and Function of Human Blood Leukocytes after Freeze-Preservation.— Cryobiology, 1974, **11**, N 4, p. 395—409.
5. *Meryman H. T.* Freezing injury and its prevention in living cells.— Ann. Rev. Biophys. and Bioeng., 1974, **3**, p. 341—363.
6. *Zollinger H. U.* Cytologic studies with the phase microscope. I. The formation of blisters on cells in suspension (photocytosis) with observations on the nature of the cellular membrane.— Amer. J. Pathol., 1948, **47**, p. 545—566.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
30.09.81

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043.577.1 : 576.347 : 615.014.41

А. Ю. Петренко

ВЛИЯНИЕ СКОРОСТИ ЗАМОРАЖИВАНИЯ И ОТОГРЕВА НА АКТИВНОСТЬ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

Существуют многочисленные данные о повреждающем действии низких температур на окислительное фосфорилирование митохондрий, которое является интегральным показателем функционального состояния этих органелл. В процессе замораживания — оттаивания нарушается механизм сопряжения дыхания и фосфорилирования [5]. Однако вопрос о непосредственном влиянии замораживания на активность дыхательной цепи остается малоизученным. Выяснение этого вопроса необходимо для понимания конкретных механизмов молекулярных нарушений биоэнергетических процессов при охлаждении.

В этом сообщении представлены результаты исследования активности электронтранспортной цепи после замораживания — оттаивания митохондрий по различным программам.

Методы и материалы. Митохондрии выделяли по методу [2] из печени крыс линии Вистар. Полученный осадок суспендировали в среде, содержащей 300 мМ сахарозу, 10 мМ трис-NaCl pH 7,4 и 1мМ ЭДТА, разливали в полиэтиленовые ампулы (1 мл) и замораживали в жидком азоте со скоростью 300—400° С/мин до —196° С. Замороженную суспензию отогревали или быстро (в водяном термостате при 37° С), или медленно (на воздухе при комнатной температуре).

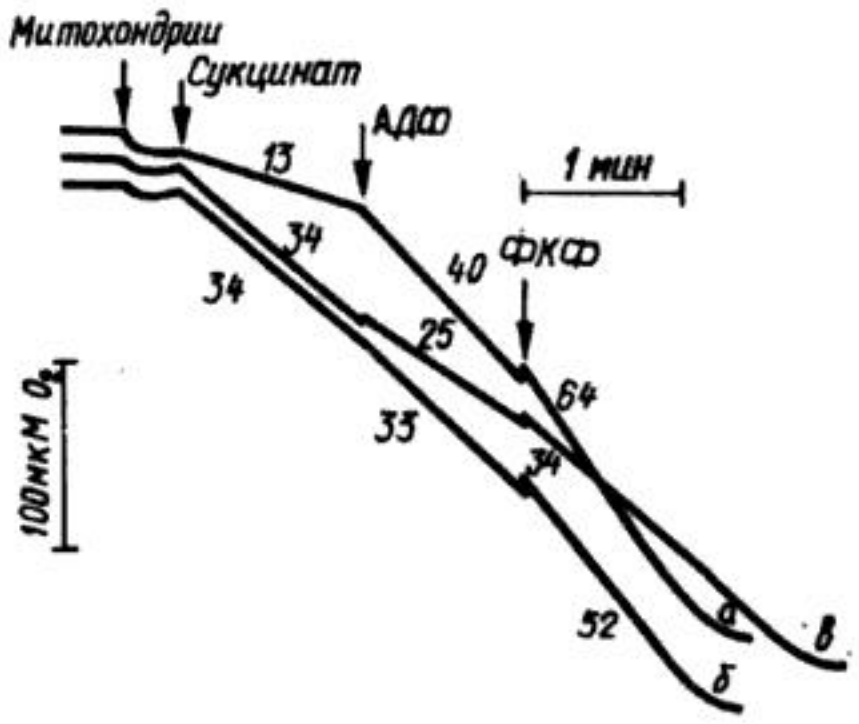


Рис. 1. Изменение скорости окисления сукцината после различных программ замораживания—оттаивания митохондрий:

а — контроль; *б* — быстрое замораживание — быстрое оттаивание; *в* — быстрое замораживание — медленное оттаивание.

Интенсивность окислительного фосфорилирования определяли по скорости потребления кислорода в среде, содержащей 150 мМ сахарозу, 75 мМ KCl, 5 мМ KH_2PO_4, 4 мМ $MgCl_2$ pH 7,4 в присутствии 10 мМ сукцината и 1 мкМ ротенона. НАДН-оксидазную активность определяли после добавления 0,5 мМ НАДН и 30 мкМ цитохрома С в присутствии антимицина А (1 мкГ/мг белка). Цитохромоксидазную активность определяли по скорости окисления аскорбата (5 мМ) в присутствии тетраметилпарафенилендиамина (ТМПД, 0,4 мМ). Активность сукцинатдегидрогеназы определяли по методу [4]. Белок определяли методом Лоури [1].

Результаты и обсуждение. Как видно из рис. 1, замораживание — оттаивание митохондрий вызывало увеличение скорости окисления сукцината в состоянии 4, по Чансу [3], на 150—200%. Степень стимуляции дыхания практически не зависела от программы замораживания — оттаивания образца и обусловливалась, видимо, разобщением дыхания и фосфорилирования [5]. При добавлении АДФ дыхание митохондрий, подвергнутых замораживанию, уменьшалось, причем после медленного отогрева угнетение дыхания в 3-м метаболическом состоянии было выражено сильнее, чем после быстрого отогрева.

Замораживание — оттаивание вызывало также значительное угнетение скорости дыхания в состоянии 3 по сравнению с незамороженными образцами. Добавка разобщителя трифторметоксикарбонилцианид-фенилгидразона (ФКФ) стимулировала потребление кислорода нативными митохондриями в состоянии 3. После быстрого замораживания —

Матеріал, захищений авторським правом

быстрого отогрева стимуляция дыхания была выражена в меньшей степени, чем в контроле. Разобщитель не стимулировал дыхание в 4-м состоянии митохондрий, подверженных быстрому замораживанию и медленному отогреву. Уменьшение скорости дыхания митохондрий после замораживания — оттаивания в присутствии разобщителя указывает на повреждение цепи транспорта электронов.

В связи с тем что сукцинатдегидрогеназа участвует в начальном этапе окисления сукцината электронтранспортной цепью митохондрий и может лимитировать дыхание, исследовали влияние замораживания — оттаивания на активность этого фермента. Данные, приведенные в таблице, свидетельствуют о том, что замораживание — оттаивание приводило к угнетению активности сукцинатдегидрогеназы. Наиболее значительное уменьшение активности этого фермента вызывал режим замораживания с медленным отогревом, однако уровень сукцинатдегидрогеназной активности даже в этом случае оставался достаточно высоким и составлял более 60% контроля.

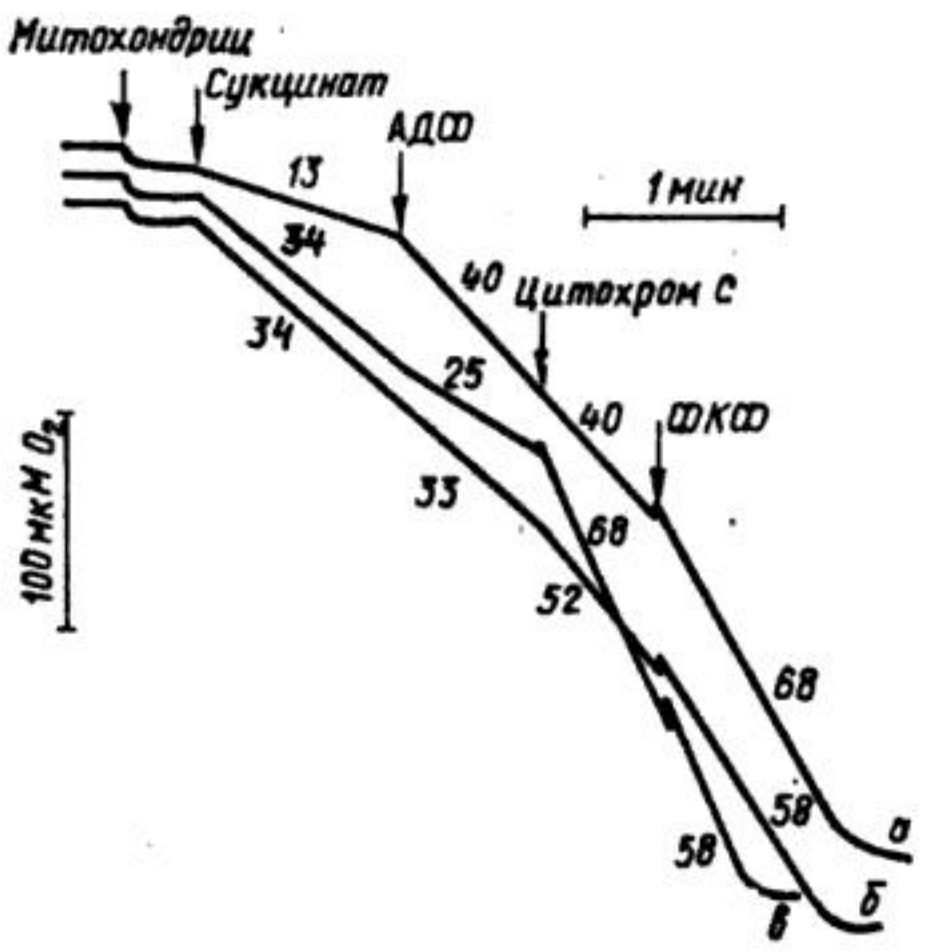


Рис. 2. Влияние экзогенного цитохрома С на дыхание митохондрий после замораживания и отогрева:
а — контроль; *б* — быстрое замораживание — быстрое оттаивание; *в* — быстрое замораживание — медленное оттаивание.

Транспорт электронов по дыхательной цепи также может лимитироваться на терминальном, цитохромоксидазном участке. Исследуя активность этого участка по скорости окисления аскорбата в присутствии ТМПД (см. таблицу), обнаружили, что активность цитохромоксидазы изменялась незначительно при различных программах криовоздействия. Вместе с тем, учитывая, что ТМПД окисляется не цитохромоксидазой, а отдает электроны цитохрому С, локализованному на внешней поверхности внутренней мембраны, можно предположить, что в процессе замораживания — оттаивания эндогенный цитохром С отделяется от внутренней мембраны, ингибируя транспорт электронов по дыхательной цепи. Действительно, добавление экзогенного цитохрома С приводило к более чем двукратному увеличению цитохромоксидазной активности митохондрий после замораживания в сочетании с медленным отогревом. Этот факт позволяет предположить, что, во-первых, цитохромоксидазный участок дыхательной цепи не повреждается в процессе замораживания — оттаивания, а, во-вторых, эндогенный цитохром С лимитирует транспорт электронов по дыхательной цепи в этих условиях.

Изменение активности сукцинатдегидрогеназы (мкГ трифенилформазана 20^{-1} мин$^{-1}$ · мг$^{-1}$ белка), цитохромоксидазы (мкМ O_2 мин$^{-1}$ · мг$^{-1}$ белка) и НАДН-оксидазы митохондрий после различных программ криовоздействия

Программа криовоздействия	Сукцинатдегидрогеназа	Цитохромоксидаза		НАДН-оксидаза
		Аскорбат + ТМПД	Аскорбат + ТМПД + цитохром С	
Контроль	40,50 ± 2,30	101,20 ± 2,50	106,16 ± 3,06	11,91 ± 1,09
Быстрое замораживание — быстрый отогрев	34,04 ± 1,80 $p < 0,05$	80,62 ± 4,55 $p > 0,05$	138,06 ± 2,28 $p < 0,001$	71,61 ± 2,18 $p < 0,001$
Быстрое замораживание — медленный отогрев	25,28 ± 1,25 $p < 0,001$	88,41 ± 7,74 $p > 0,05$	233,12 ± 5,74 $p < 0,001$	69,83 ± 4,16 $p < 0,001$

Матеріал, захищений авторським правом

Как видно из рис. 2, экзогенный цитохром не оказывал влияния на скорость окисления сукцината по двум причинам: плохой проницаемости его через внешнюю мембрану и достаточного количества эндогенного цитохрома, связанного с мембраной. Цитохром С, добавленный в среду с митохондриями, подвергнутыми замораживанию с медленным отогревом, вызывал стимуляцию дыхания до величины, характерной для разобщенных митохондрий, не подвергавшихся криовоздействию. После быстрого отогрева цитохром С стимулировал дыхание таким образом, что в присутствии ФКФ скорость потребления кислорода была такой же, как в контроле.

Приведенные результаты свидетельствуют о том, что в процессе замораживания — оттаивания эндогенный цитохром С отделяется от внутренней мембраны митохондрий, что и является причиной угнетения активности дыхательной цепи. Учитывая тот факт, что экзогенный цитохром С стимулировал также окисление НАДН по антимициннечувствительному пути (см. таблицу), а также стимуляцию окисления других субстратов (сукцината, аскорбата) после любых режимов замораживания — оттаивания, следует предполагать о холодовом повреждении наружной мембраны, в результате чего возникают условия для окисления цитохрома С цитохромоксидазой. С другой стороны, с повреждением наружной мембраны создается возможность выхода из митохондрий эндогенного цитохрома С, отделившегося от внутренней мембраны в процессе замораживания и отогрева. Однако для более детального анализа этого вопроса необходимы дополнительные исследования, направленные на изучение природы диссоциации цитохрома С с внутренней мембраной в условиях репарации замороженно-отогретых митохондрий.

1. *Марцишаускас Р. П., Тарасявичене Н. Э., Канопкайте С. И.* Определение белка по методу Лоури в разных модификациях.— В кн.: Методы биохимии. Вильнюс, 1975, с. 5—12.
2. *Мосолова И. Н., Горская И. А., Шольц К. Ф., Котельникова Т. П.* Выделение интактных митохондрий из печени крыс.— В кн.: Методы современной биохимии.— М.: Наука, 1975, с. 45—47.
3. *Chance B., Williams G. R.* Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation.— J. Biol. Chem., 1955, 217, N 1, p. 383—395.
4. *Nordmann J., Nordmann R., Gauchery O.* Determination de l'activité dehydrogenasique des mitochondries a l'aide du 2,3,5-triphenyltetrazolium.— Bull. Stat. Chim. Biol., 1951, 33, N 11/12, p. 1826—1835.
5. *Sherman J. K.* Corelation in cryoinjury of mitochondrial ultrastructure with respiratory control ration, cytochrome oxidase activity and rate of tissue oxygen consumption.— Cryobiology, 1970, 7, N 6, p. 581—583.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
08.10.81

УДК 57.043

Н. Е. Гусакова, Б. П. Сандомирский, Р. К. Хайкин

СОСТОЯНИЕ СОКРАТИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ ПРИ ТЕМПЕРАТУРНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЯХ КОЖИ

Глубокие ожоги вызывают повреждения структуры кожи и подлежащих тканей, в том числе мышц, расположенных в зоне травмы. В настоящее время для лечения ожоговых травм используют дозированное холодовое воздействие (−6 — +13° С) [8], которое в значительной мере нормализует структурно-функциональное состояние тканей, подвергавшихся перегреву.

Структурные и функциональные изменения мышечных клеток при тепловом паранекрозе связаны с денатурацией белковых компонентов [1, 11], причем гибель мышечных волокон не является следствием одновременной денатурации всех клеточных белков, а только наименее

Матеріал, захищений авторським правом

Содержание общего белка, мг/мл (*I*), и АТФазная активность, мкмоль Н+/мг белка в ми

Вид температурного воздействия	Статистический показатель	3 ч		1 сут	
		1	*2*	*1*	*2*
Ожог	n	5	5	6	3
	M	24,60	0,284	12,33	0.255
	m	±3,81	±0,007	±0,423	±0,001
	P	>0,1	<0,1	<0,1	<0,1
	P_2	>0,1	>0,1	<0,1	>0,1
	P_3	>0,1	>0,1	>0,1	>0,1
Криовоздействие	n	6	5	5	3
	M	28,18	0,279	16,0	0,256
	m	±5,62	0,008	±1,06	±0,001
	P	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
	P_1	>0,1	>0,1	<0,1	>0,1
	P_3	>0,1	>0,1	<0,1	>0,1
Ожог с криовоздействием	n	5	5	5	3
	M	32,90	0,278	12,24	0,255
	m	±5,65	±0,008	±0,770	±0,001
	P	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
	P_1	>0,1	>0,1	>0,1	>0,1
	P_2	>0,1	>0,1	<0,1	<0,1
Контроль	n	1	—	2	—
	M	7	—	—7	—
	m	15,91±1,520	—	0,322±0,008	—

Обозначения: P — сравнение с контролем; P_1 — сравнение с ожогом; P_2 — сравнение с криовоздей

термоустойчивых, к числу которых относится и актомиозин [2—4, 10]. При нагреве до 38—40° С в течение 15 мин наступает необратимая утрата возбудимости мышечного волокна, происходит увеличение общего выхода водорастворимых белков и актомиозина из мышц в окружающую среду, наблюдается 50%-ное снижение АТФазной активности актомиозина, играющей важную роль в энергетическом обмене клеток [9].

Вместе с тем изменения ферментативной активности и конформационных параметров сократительных белков вызывают также и низкие температуры. Так, при замораживании изменяется скорость каталитических реакций и происходят изменения структуры и функции актомиозина, связанные с его АТФазной активностью [6, 14]. Однако степень обратимости этих процессов после холодового и теплового воздействий различна. Сведений о действии холода в температурном диапазоне, обеспечивающем хороший эффект при криотерапии ожогов, в доступной литературе мы не встретили.

Целью наших исследований явилось изучение динамики изменений концентрации общего белка и биологической активности актомиозина в скелетных мышцах в зоне ожога, криовоздействия и после холодового воздействия на ожоговую поверхность.

Методика исследования. Эксперименты проведены на 120 крысах линии Вистар весом 180—260 г. Ожоговую травму наносили по ранее описанному методу [8]. Криовоздействие осуществлялось парожидкостной струей азота на неповрежденную кожу и на ожоговую поверхность. Температура под кожей после нанесения ожога 66±5° С, при криовоздействии —52±4° С, после ожога с криовоздействием — —6±3° С. Актомиозин из поврежденной зоны мышц выделяли через 3 ч, а также на 1-е, 3-ьи, 7-е, 14-е и 21-е сут после нанесения температурной травмы. Концентрацию общего белка определяли по Лоури [13], АТФазную активность актомиозина — потенциометрическим методом [7].

Матеріал, захищений авторським правом

нутах (*2*), актомиозина в скелетных мышцах зоны температурного повреждения кожи крыс

3 сут		7 сут		14 сут		21 сут	
1	*2*	*1*	*2*	*1*	*2*	*1*	*2*
3	3	6	4	5	4	3	3
46.0	0,257	9,78	0,270	14,20	0,261	13,03	0,275
±4,59	±0,002	±0,980	±0,003	±0,342	±0,002	±0,770	±0,02
<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	>0,1	<0,1	>0,1	<0,1
<0,1	>0,1	<0,1	>0,1	>0,1	<0,1	>0,1	<0,1
>0,1	>0,1	<0,1	>0,1	>0,1	<0,1	>0,1	<0,1
3	3	7	4	5	4	4	3
58,13	0,261	17,34	0,266	14,22	0,284	13,85	0,301
±0,86	±0,002	±1,93	±0,02	+0,451	±0,005	±1,16	±0,04
<0,1	<0,1	>0,1	<0,1	>0,1	<0,1	>0,1	<0,1
<0,1	>0,1	<0,1	>0,1	>0,1	<0,1	>0,1	<0,1
<0,1	>0,1	>0,1	>0,1	>0,1	<0,1	>0,1	>0,1
3	33	7	4	5	4	4	3
41,53	0,261	15,60	0,265	14.38	0,272	13,77	0,295
±1,32	±0,001	±1,17	±0,002	±0,80	±0,002	±0,490	±0,003
<0,1	<0,1	>0,1	<0,1	>0,1	<0,1	>0,1	<0,1
>0,1	>0,1	<0,1	>0,1	>0,1	<0,1	>0,1	<0,1
<0,1	>0,1	>0,1	>0,1	>0,1	<0,1	>0,1	>0,1
—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—

ствием; P_3 — сравнение с холодовым лечением ожога.

Статистическая обработка результатов экспериментов проводилась в два этапа на УВК СМ-1. На первом этапе осуществлено парное сравнение средних выборок, содержащих результаты измерений белковой концентрации и АТФазной активности актомиозина при всех условиях эксперимента и контрольных выборок этих показателей, полученных на животных, не подвергавшихся воздействию. Сравнение осуществлялось по специальной программе и включало статистическую оценку принадлежности выборок к нормально распределенной генеральной совокупности, расчет выборочных средних и их 95%-ных доверительных интервалов, а также парные сравнения выборок непараметрическим методом Уилкоксона [5]. Применение этого метода оправдано тем, что 40% выборок не могут быть отнесены к нормально распределенным генеральным совокупностям и использование для сравнений критерия Стьюдента явилось бы неправомерным.

На втором этапе проводилась оценка влияния на оба используемых показателя двух качественных факторов: типа воздействия (на четырех уровнях — контроль без воздействия, ожог, кривовоздействие, ожог с криовоздействием) и срока после нанесения воздействия (на шести уровнях: 3 ч, 1 сут, 3 сут, 7 сут, 14 сут, 21 сут). Заключительный этап расчетов включал дисперсионный анализ полного двухфакторного эксперимента (по модели для постоянных факторов), а также множественные сравнения методом контрастов по Шеффе [12].

Обсуждение. Результаты проведенных исследований (таблица) показали, что происходит изменение концентрации общего белка и АТФазной активности актомиозина при всех видах термического воздействия, включая и холодовую терапию ожогов, уже через 3 ч после нанесения повреждений на кожу по сравнению с контролем. При этом по сравнению с контролем у животных, перенесших ожог, наблюдалось увеличение общего белка на 54,7%. При криовоздействии количество общего белка составляло 77,4% и при холодовом — 107% по сравнению с контролем. Максимальная концентрация общего белка в этот

Матеріал, захищений авторським правом

срок была после холодовой терапии ожога и достоверно отличалась от концентрации общего белка актомиозинового комплекса после ожога и криовоздействия.

Через 1 сут после ожоговой травмы и ожога с криовоздействием отмечалось снижение количества общего белка актомиозина по сравнению с контрольными данными соответственно на 22,7 и 23,3%. После криовоздействия в это время концентрация белков в актомиозине оставалась в пределах нормы.

На 3-ьи сут у опытных животных происходит повторное увеличение концентрации общего белка актомиозина по сравнению с его содержанием у интактных животных. Количество общего белка актомиозина у обожженных крыс составляло 289,8%, у крыс с охлаждением кожи — 365,4% и у животных с охлаждением ожогов — 261% по сравнению с контролем.

К 7-м сут содержание общего белка актомиозина снижалось на 38,5% у крыс с экспериментальным ожогом, оставалось выше нормы в прилежащих мышцах животных с холодовым повреждением кожи, превышая на 9,4% уровень контроля и приближаясь к норме у крыс с криотерапией ожога.

На 14-е и 21-е сут количество общего белка актомиозина в мышцах животных с ожогом оставалось сниженным и не достигало контрольного уровня к концу исследования, тогда как при холодовом повреждении и ожоге с последующим охлаждением этот показатель имеет тенденцию к восстановлению.

АТФазная активность актомиозина снижалась по сравнению с контролем спустя 3 ч после нанесения всех видов температурных воздействий. На 1-е сут показатели АТФазной активности были на 20,84% меньше контрольного уровня при ожоге, на 20,62% — при криовоздействии и на 20,87% меньше нормы при холодовом лечении ожога.

АТФазная активность оставалась сниженной во все сроки исследований, включая и 21-е сут, что свидетельствует о существенных изменениях биологической активности актомиозинового комплекса, ответственного за процесс мышечного сокращения. Наряду с этим нужно отметить увеличение АТФазной активности через 14 и 21 сут после криовоздействия и ожога с охлаждением, что, возможно, связано с обратимым характером повреждения скелетных мышц, вызываемого холодовым воздействием на кожный покров.

Выводы. Установленные изменения показателей содержания белка и АТФазной активности актомиозина в скелетных мышцах, расположенных под кожей, подвергавшейся различным температурным воздействиям, могут быть связаны как с развитием отека и дегидратацией ткани в ответ на температурные повреждения, так и с процессами разрушения и восстановления белковых структур.

Таким образом, повреждения кожи положительными и отрицательными температурами сопровождаются существенными нарушениями в предлежащих скелетных мышцах, выражающимися в изменениях показателей концентрации белка и АТФазной активности актомиозина.

1. *Александров В. Я.* Изучение изменения устойчивости растительных клеток к действию различных агентов в связи с задачами цитоэкологии.— В кн.: Клетка и температура среды. М. ; Л. : Наука, 1964, с. 98—104.
2. *Алтухов Ю. П.* Антигенный состав водно-солевых экстрактов из нормальных и подвергнутых температурному воздействию скелетных мышц лягушки.— В кн.: Теплоустойчивость клеток животных. М. ; Л. : Наука, 1965, с. 76—81.
3. *Браун А. Д., Несветаева Н. М., Фиженко Н. В.* О связи между устойчивостью клеток и тканей к повреждению и способностью белков к денатурации.— В кн.: Клетка и температура среды. М. ; Л. : Наука, 1964, с. 228—232.
4. *Васильева В. В., Ушаков В. Б.* Водорастворимые белки как наименее теплоустойчивая фракция клеточных белков.— Общ. механизмы клеточ. реакций на повреждающие воздействия, 1977, вып. 17, с. 126—127.
5. *Закс Л.* Статистическое оценивание.— М. : Статистика, 1976.— 598 с.
6. *Пушкарь Н. С., Белоус А. М.* Введение в криобиологию.— Киев : Наук. думка, 1975.— 343 с.

Матеріал, захищений авторським правом

7. *Ритов В. Б.* Влияние ацетилхолина и кофеина на функциональную активность фрагментированного саркоплазматического ретикулума.— Биохимия, 1971, 2, № 36, с. 393—400.
8. *Сандомирский Б. П., Пекарский Д. Е., Исаев Ю. И., Панков Е. Я., Волина В. В.*— Обоснование криохирургии термических ожогов в эксперименте.— Клин. хирургия, 1977, № 12, с. 3—7.
9. *Стабровская В. И., Браун А. Д.* Изменения белков и некоторых показателей повреждения скелетных мышц в ходе теплового воздействия.— Цитология, 1972, 14, № 10, с. 1253—1259.
10. *Стабровская В. И., Браун А. Д.* Изменения активности мышечных ферментов в процессе альтерации.— Общ. механизмы клеточ. реакций на повреждающие воздействия, 1977, вып. 17, с. 39—41.
11. *Ушаков Б. П.* Современное состояние вопроса о механизме теплового повреждения и причинах изменения теплоустойчивости клеток.— В кн.: Теплоустойчивость клеток животных. М. ; Л. : Наука, 1965, с. 5—54.
12. *Шеффе Г.* Дисперсионный анализ.— М. : Наука, 1980.— 512 с.
13. *Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Lewis Farr A., Randall R. J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent.— J. Biol. Chem., 1951, 193, N 1, p. 265—276.
14. *Traverś F., Hillaire D.* Cryoenzumological studies on Myosin Subfragment 1.— Eur. J. Biochem., 1979, 98, p. 293—299.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
15.10.81

УДК 57.043.57.536

В. Л. Бронштейн, Ю. А. Иткин, Г. Г. Шурда, П. Г. Исерович

МЕХАНИЗМ ПОВРЕЖДЕНИЯ МОЛОЧНОКИСЛОГО СТРЕПТОКОККА S. CREMORIS $T18_{15}$ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ

Известно, что сохранность микроорганизмов после замораживания возрастает с увеличением количества клеток в единице объема клеточной взвеси [5]. Существующие теоретические представления о механизмах разрушения клеток при замораживании не позволяют объяснить эту зависимость без привлечения предположения о том, что клетки выделяют в окружающую среду вещества, оказывающие криозащитный эффект. В настоящей работе на примере молочнокислого стрептококка S. cremoris $T18_{15}$ доказывается, что увеличение криоповреждения при уменьшении плотности суспензии связано с гипербарическим повреждением клеток, которые захватываются в кристаллы льда [3]. При захвате клетки в кристалле льда образуется замкнутое включение [3]. При замерзании жидкого включения во льду во включении развивается гидростатическое давление, величина которого может достичь $2 \cdot 10^3$ атм [2, 4].

Очевидно, что при большом количестве клеток в единице объема большое давление развиться не может, поскольку трещины в кристалле будут возникать между включениями, которые находятся на маленьком расстоянии друг от друга. В то же время при малой плотности клеток, когда содержащие клетки включения находятся на большом расстоянии друг от друга, во включениях будет развиваться большое гидростатическое давление, которое, как следует из результатов, изложенных в настоящей работе, и является причиной гибели клеток молочнокислого стрептококка S. cremoris $T18_{15}$.

Материалы и методы. Объектом исследования служил штамм молочнокислого стрептококка S. cremoris $T18_{15}$. Культуру бактерий выращивали в течение 15 ч на жидкой питательной среде, описанной в работе [1]. По окончании культивирования бактериальную суспензию нейтрализовали аммиаком до pH 6,8 и центрифугировали. Перед опытами бактериальная масса трижды отмывалась 0,15 М физиологическим раствором или дистиллированной водой (в зависимости от среды суспендирования). Из полученного бактериального концентрата готовили суспензии с нужным количеством клеток в единице объема и распределяли их по 1 мл в полиэтиленовые ампулы.

Матеріал, захищений авторським правом

Замораживание ампул проводили до температуры —196° С путем опускания их в жидкий азот (средняя скорость охлаждения около 400° С/мин) и со средней скоростью 4° С/мин.

Отогрев проводили с помощью водяной бани при 30° С.

Замораживание клеток в замкнутом объеме осуществлялось с помощью «ледовой бомбы» [4] (рис. 1). Полиэтиленовые ампулы с бактериальной суспензией помещались в сужающейся части «ледовой бомбы», затем полость «бомбы» доверху заполнялась дистиллированной водой и плотно закрывалась. При замораживании давление в «ледовой бомбе» достигает $2 \cdot 10^3$ атм [2, 4].

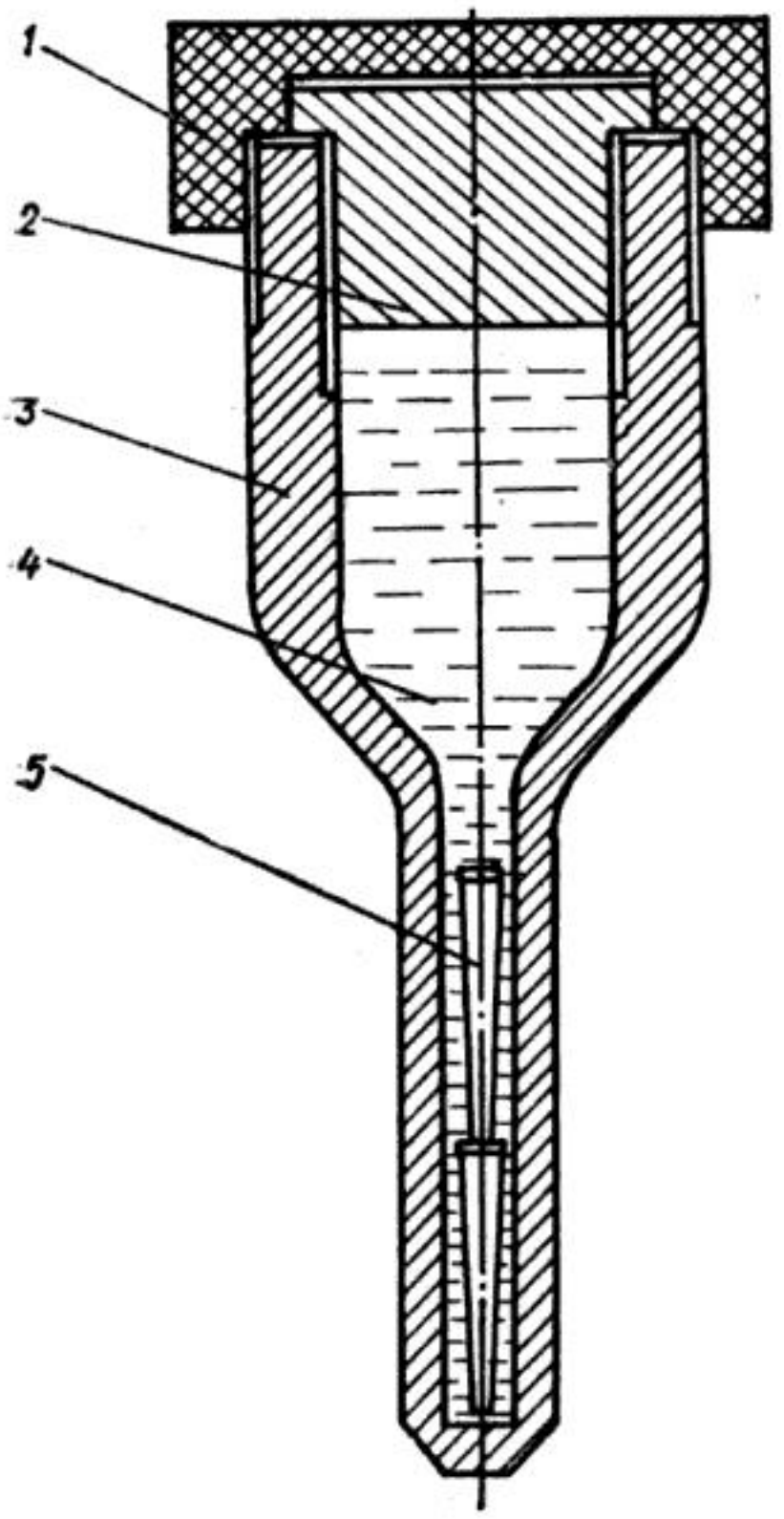


Рис. 1. Устройство «ледовой бомбы»:
1 — крышка; *2* — пробка; *3* — корпус; *4* — вода; *5* — ампулы.

Изучение совместного действия низких температур и гидростатического давления было проведено на установке (рис. 2). Содержащие бактерии полиэтиленовые ампулы емкостью 1 мл помещались в толстостенный металлический контейнер («бомбу»), в котором с помощью масляного компрессора создавалось давление. Контейнер охлаждали снаружи, опуская его в термостат с охлажденным спиртом.

Количество выживших особей определяли по количеству колоний после высева бактерий на агар с гидролизированным молоком.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что относительное количество клеток молочнокислого стрептококка S. cremoris $T18_{15}$, выживших после замораживания — отогрева, возрастает с увеличением их количества в единице объема суспензии. Причем этот эффект более выражен при замораживании бактерий в 0,15 М физиологическом растворе, чем в дистиллированной воде (рис. 3).

Количество бактерий, перенесших замораживание в замкнутом объеме, снижалось более чем в 1000 раз вне зависимости от плотности клеточной суспензии и среды суспендирования.

Изучение совместного действия гидростатического давления и низкой температуры показало (табл. 1), что разрушение клеток молочнокислого стрептококка S. cremoris $T18_{15}$ после 30 мин воздействия давлением $2 \cdot 10^3$ атм значительно больше при температуре —18° С, чем при температуре 18° С. При этом важно отметить, что при давлении $2 \cdot 10^3$ атм образование кристаллов льда в суспензии может начаться только при температуре ниже —20° С, поскольку давление снижает температуру замерзания воды [2]. Таким образом, гибель бактерий в этих экспериментах обусловлена исключительно действием повышенного давления.

Изложенные результаты показывают, что гидростатическое давление, которое возникает в содержащих клетки замкнутых включениях во льду, может явиться сильным фактором разрушения клеток при замораживании. Возможность сохранения почти всех клеток при замораживании молочнокислого стрептококка S. cremoris $T18_{15}$ с большим количеством клеток в единице объема суспензии при отсутствии криопротекторных веществ указывает на то, что повышенное гидростатическое давление является основным криоповреждающим фактором для этих бактерий.

Матеріал, захищений авторським правом

В пользу изложенного свидетельствует не только уменьшение криоповрежденности бактерий при увеличении их количества в 1 см^3, но и уменьшение их повреждения при быстром замораживании, которое, как известно, приводит к более мелкокристаллической структуре образующегося льда.

Чтобы окончательно убедиться в правильности выдвинутых представлений о механизме разрушения клеток молочнокислого стрепто-

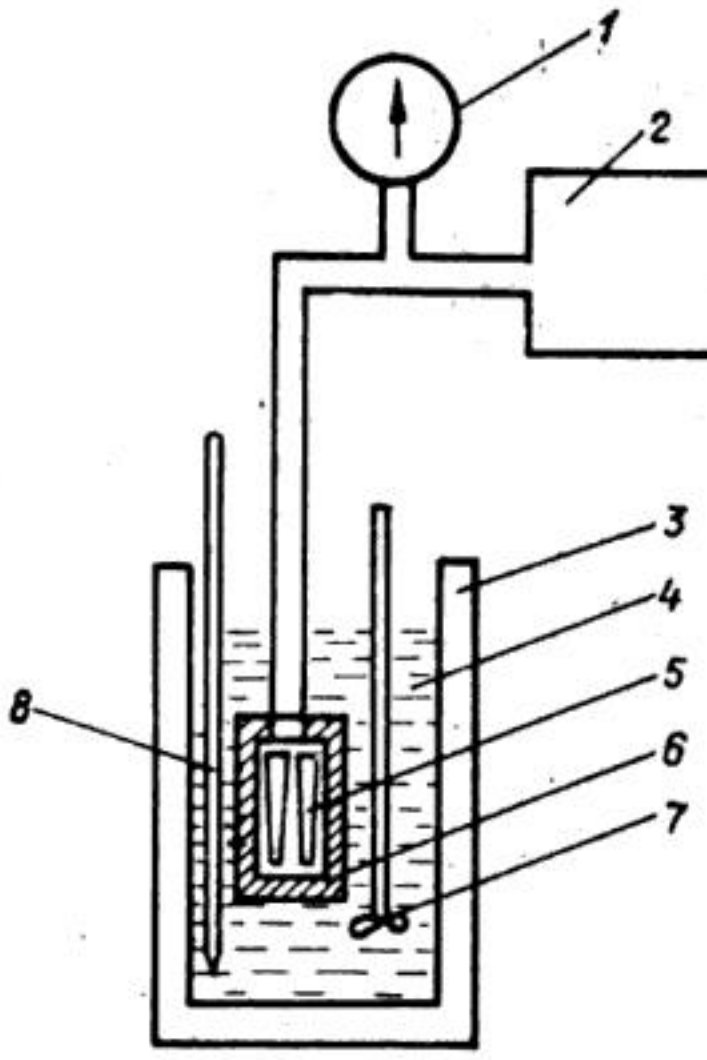


Рис. 2. Установка для изучения совместного действия низких температур и давления:

1 — манометр; *2* — компрессор; *3* — термостат; *4* — этиловый спирт; *5* — полиэтиленовые ампулы; *6* — металлический цилиндр; *7* — мешалка; *8* — термометр.

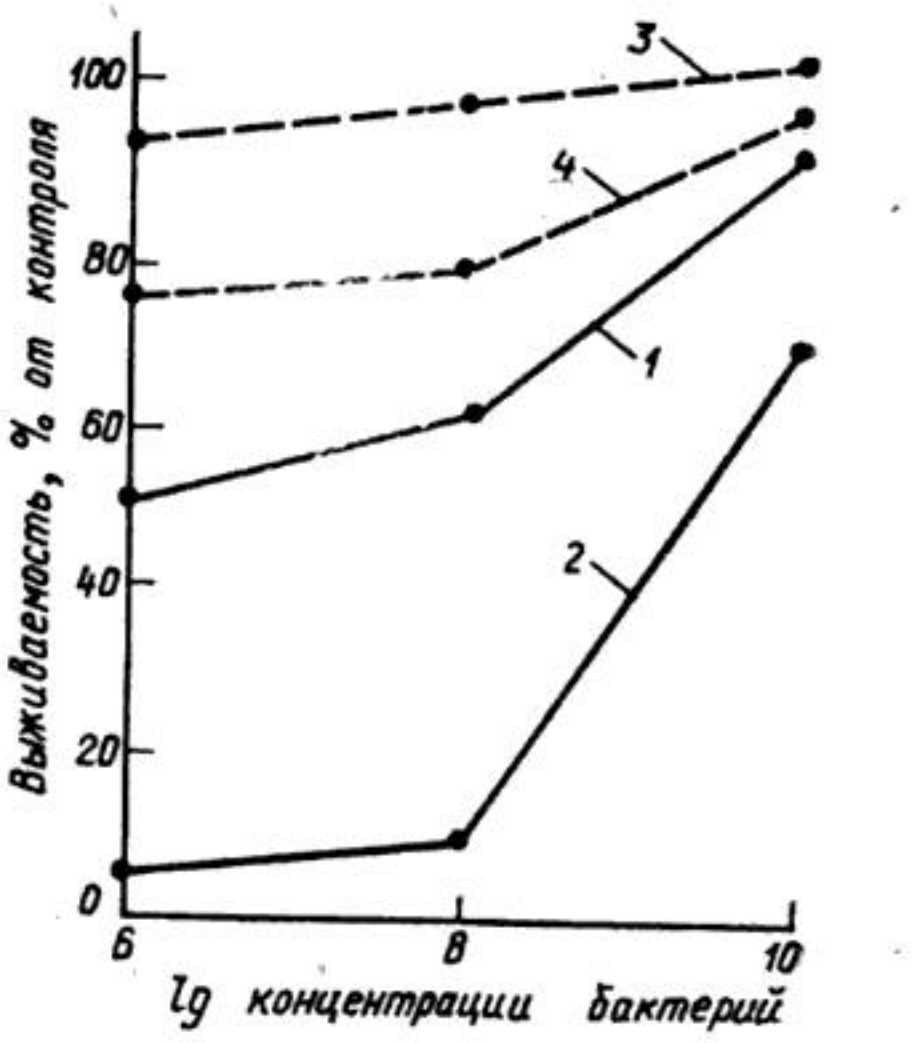


Рис. 3. Зависимость выживаемости бактерий S. cremoris $T18_{15}$ от концентрации при замораживании суспензии в 0,15 М физиологическом растворе со скоростями 400° С/мин (*1*) и 4° С/мин (*2*) и в дистиллированной воде со скоростями 400° С/мин (*3*) и 4° С/мин (*4*).

кокка S. cremoris $T18_{15}$ при замораживании, мы провели опыт, позволивший поставить эти представления в критические условия. Для этого бактерии суспендировались в двух разных объемах 0,15 М физиологического раствора, причем в один объем предварительно помещены сферические полистироловые гранулы диаметром $0{,}97 \pm 0{,}05$ мкм. Количество шариков в 1 мл было около 10^{10}. Результаты сохранности клеток молочнокислого стрептококка S. cremoris $T18_{15}$ после замораживания

Таблица 1. **Количество клеток молочнокислого стрептококка S. cremoris $T18_{15}$, сохранившихся после 30 мин воздействия давлением $2 \cdot 10^3$ атм**

Давление, атм	$t = 18°$ С	$t = -18°$ С
1	$(3{,}5 \pm 0{,}4) \cdot 10^{10}$	$(3{,}4 \pm 0{,}5) \cdot 10^{10}$
$2 \cdot 10^3$	$(2{,}3 \pm 0{,}6) \cdot 10^7$	$(6{,}2 \pm 0{,}7) \cdot 10^6$

Таблица 2. **Влияние присутствия латексных частиц на жизнеспособность клеток S. cremoris $T18_{15}$, замороженных со скоростями 4 и 400°/мин и быстро отогретых на водяной бане при 30° С**

Скорость охлаждения, °/мин	Присутствие латекса	Выживаемость, % от контроля
400	—	43
400	+	100
4	—	6
4	+	94

до —196° С в присутствии полистироловых шариков и без них представлены в табл. 2. После замораживания в присутствии полистироловых шариков клетки практически не повреждались. В то же время при замораживании бактерий без шариков со скоростью 400° С/мин погибало более половины клеток, а со скоростью 4° С/мин сохранялось не

Матеріал, захищений авторським правом

более одной десятой их общего количества, что согласуется с данными, представленными на рис. 3, поскольку исходная плотность суспензии составляла $3 \cdot 10^7$ клеток в 1 мл.

Таким образом, гидростатическое давление, возникающее в содержащих клетки включениях при замораживании, является сильным повреждающим фактором. Для клеток молочнокислого стрептококка S. cremoris $T18_{15}$ этот фактор является самым сильным из всех физико-химических факторов, действующих на клетки при замораживании.

1. *Банникова Л. С., Пятницына И. А., Казанцева Л. Н.* Сухие закваски на основе бактериального концентрата.— Молоч. пром-сть, 1961, № 11, с. 39—41.
2. *Бриджмен П. В.* Физика высоких давлений.— М. ; Л. : Изд-во иностр. лит., 1935.— 315 с.
3. *Иткин Ю. А., Бронштейн В. Л., Розанов Л. Ф.* Влияние структуры льда на процесс обезвоживания и внутриклеточную кристаллизацию при замораживании клеточной суспензии.— Криология и криомедицина, 1977, вып. 3, с. 35—40.
4. *Лазарев Б. Г., Кан Л.* Использование аномальных свойств воды при замерзании для получения высоких давлений.— Журн. эксперим. и теорет. физики, 1944, **14**, № 10/11, с. 439—440.
5. *Tanno Konzon.* An explanation for the cell concentration dependent survival of E. coli after freeze-thawing.— In: Society for cryobiology fifteanth annual meeting program and abstracts. Tokyo, 1978, abstr. 30.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
04.11.81

УДК 57.043 : 612.111.014.41

Г. С. Ишков, В. Л. Бронштейн

МЕТОД КРИОМИКРОСКОПИИ В ГРАДИЕНТЕ ТЕМПЕРАТУРЫ

Метод криомикроскопии в настоящее время нашел широкое применение в криобиологических исследованиях. Результаты, полученные этим методом, во многом способствовали развитию теоретических представлений о механизмах разрушающего действия замораживания на клетки. Недостатком классического метода криомикроскопии [1], применяющегося при изучении процесса замораживания клеточных взвесей, является трудность управления морфологической структурой растущих кристаллов льда. Единственным параметром управления при классическом методе криомикроскопии является скорость охлаждения. Это затрудняет изучение таких вопросов, как механическое взаимодействие растущих кристаллов льда с клетками, движение клеток в жидкой фазе под воздействием конвективных потоков, обезвоживание клеток, влияние начального переохлаждения на повреждение клеток при замораживании, повреждение клеток в период интенсивного плавления льда и других.

С целью расширения возможностей метода криомикроскопии нами была разработана градиентная криоприставка к микроскопу с блоком управления процессом охлаждения и отогрева. В литературе описаны различные устройства для программного охлаждения биологических объектов с непосредственным наблюдением процесса в микроскоп (криоприставки) [2—4]. Некоторые из этих устройств позволяют получить направленный градиент температур в образце [5, 6]. При разработке описываемой криоприставки была поставлена задача получения направленного градиента температур в образце с возможностью точно поддерживать его на заданном уровне, а при необходимости — плавно изменять в нужную сторону по заданной программе.

Для иллюстрации возможностей метода криомикроскопии в градиенте температуры нами с помощью описанной ниже криоприставки было проведено изучение механического взаимодействия эритроцитов человека с растущими кристаллами льда в модельном эксперименте.

Матеріал, захищений авторським правом

Материалы и методы. В проведенных экспериментах объектом являлась суспензия эритроцитов человека в растворах, содержащих соли NaCl и NH_4Cl при различных pH. Растворы приготавливались на бидистиллированной воде с исходной концентрацией растворенных веществ, не превышающей $3 \cdot 10^{-5}$ М.

Замораживание препарата проводилось в два этапа. На первом этапе охлаждение велось со скоростью 1—2° С/мин со стабилизацией

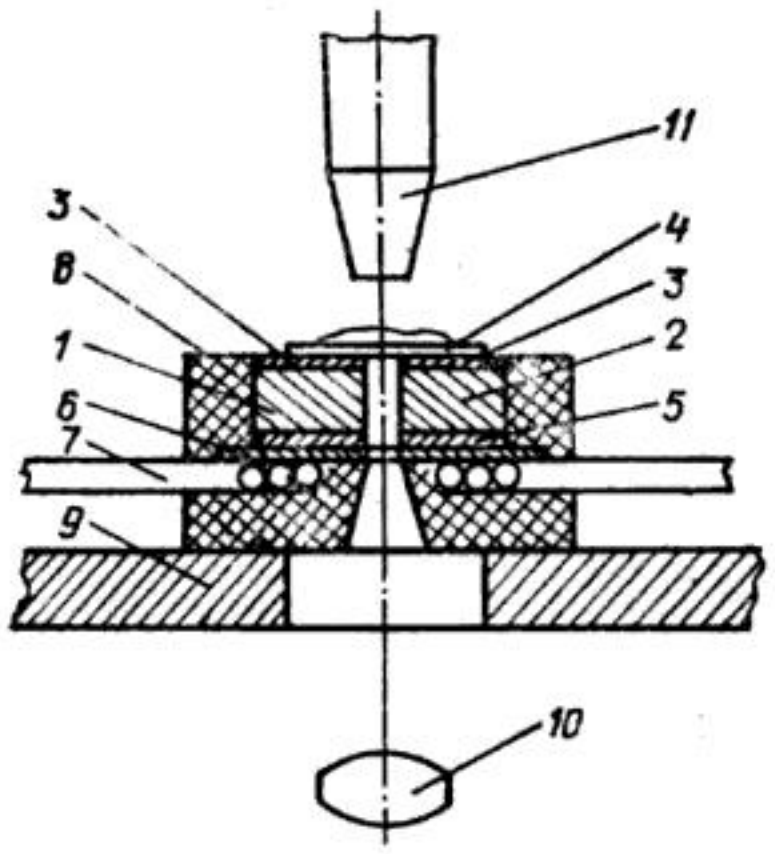


Рис. 1. Конструкция криокамеры:

1, *2* — термоэлементы; *3* — коммутационные пластины; *4* — предметное стекло; *5* — нижние коммутационные пластины; *6* — медный диск; *7* — теплообменник; *8* — теплоизолирующий корпус; *9* — предметный столик микроскопа; *10* — конденсор; *11* — объектив.

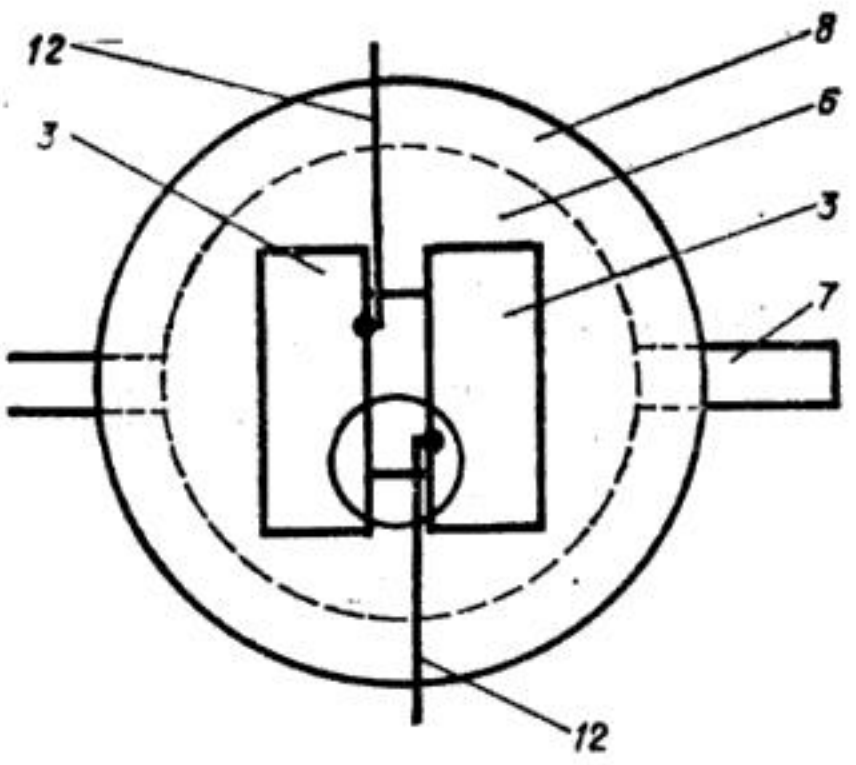


Рис. 2. Вид криокамеры сверху:

обозначения см. рис. 1; *12* — термопара.

градиента до образования льда в образце. После рекристаллизации мелкокристаллической структуры формируется достаточно ровный фронт раздела фаз, а затем образец замораживается с малой скоростью, необходимой для получения заданной скорости движения границы раздела фаз.

Градиент температур в криоприставке создавался с помощью двух охлаждающих пластинок с независимыми циклами регулировки температуры по заданным программам. Между этими пластинками на тонком плоскопараллельном кварцевом стекле помещается исследуемый препарат. При этом поперечный градиент температур определяется разностью температур охлаждающих пластинок и расстоянием между ними. Отличительной особенностью конструкции криоприставки является то, что охлаждающие пластинки служат одновременно коммутационными пластинами термоэлектрического охлаждающего элемента (термоэлемента). Каждый из этих термоэлементов включен в цепь усилителя постоянного тока, создающего в них электрический ток определенной величины и направления таким образом, чтобы в коммутационных пластинах термоэлемента выделялось или поглощалось тепло. Поддерживание температуры охлаждающих пластинок осуществляется замкнутым контуром регулирования с датчиком температуры в виде медь-константановой термопары, прикрепленной к коммутационной пластине термоэлемента. Охлаждение «горячих» спаев термоэлемента осуществляется посредством продувки жидкого хладагента (азота) через связанный с термоэлементами теплообменник. С целью достижения больших диапазонов регулировки температуры и скорости изменения температуры степень охлаждения «горячих» спаев термоэлементов регулируется дополнительной цепью управления путем изменения скорости подачи и температуры паров жидкого азота.

Криокамера состоит из двух термоэлементов (рис. 1 и 2), на верхние коммутационные пластины которых помещается тонкое предметное

Матеріал, захищений авторським правом

стекло из плавленого кварца *4*. Нижние коммутационные пластины имеют хороший тепловой контакт с медным диском *6* теплообменника. К нижней части диска прикреплена медная трубка *7*, свернутая в двойную спираль. Термоэлементы и теплообменник заключены в изолирующий корпус 8 с конусообразным сквозным отверстием в центре камеры. К охлаждающим пластинкам прикреплены дифференциальные медь-константановые датчики температуры *12*. «Теплые» спаи термопар под-

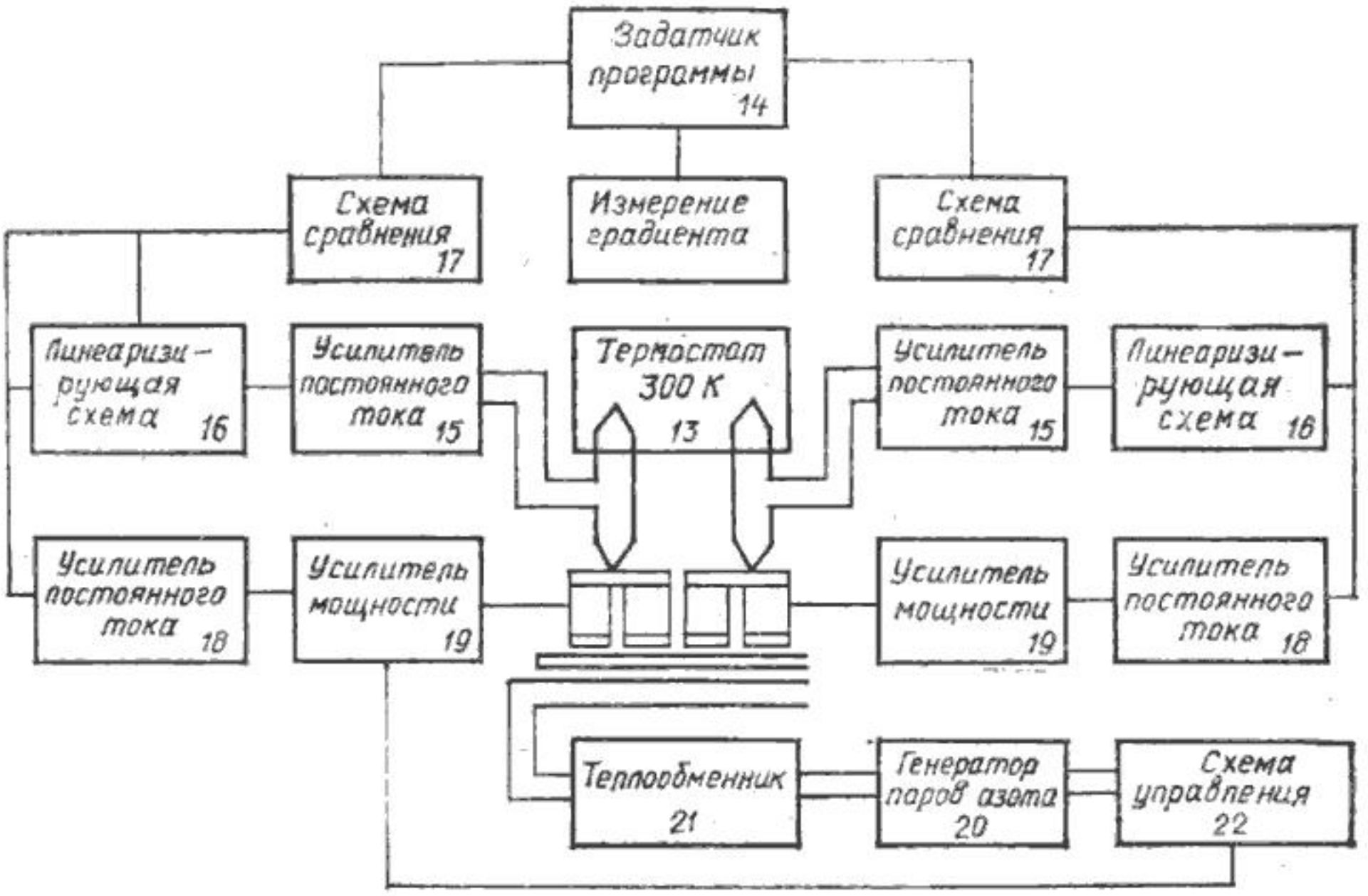


Рис. 3. Блок-схема устройства управления.

держиваются при постоянной температуре 36±0,2° С в электронном термостате *13* (рис. 3).

Для получения хорошего теплового контакта рабочего спая термопары с коммутационными пластинами и надежной их изоляции термопары прикрепляются посредством теплопроводящей пасты КПТ-8 и эпоксида ЭД-6.

Схема блока управления состоит из программного задатчика *14* и двух идентичных каналов регулирования температуры. В каждом канале имеются усилитель сигнала термопары *15*, схема компенсации нелинейности характеристики термопары *16*, схема сравнения *17*, усилитель сигнала ошибки *18* и мощный выходной усилитель, питающий термоэлементы *19*. Цикл управления температурой «горячих» спаев термоэлементов включает в себя генератор жидкого хладагента *20*, теплообменник *21* и схему управления *22*.

В исходном состоянии программный задатчик выдает на схему сравнения нулевой сигнал, при этом температура верхней коммутационной пластины поддерживается на уровне 36° С (температура термостата). При подаче от задатчика на схему сравнения некоторого сигнала в виде уровня напряжения, соответствующего охлаждению, на выходе усилителя *19* появится ток такой величины и направления, что в верхней коммутационной пластине термоэлемента поглощается тепло. Если сигнал рассогласования превышает некоторый уровень, определяемый характеристиками термоэлемента, срабатывает схема управления *22*, включающая генератор паров азота. Пары азота поступают по трубке *7* в камеру и охлаждают термоэлементы. По мере охлаждения последних сигнал рассогласования уменьшается и схема *22* выключает подачу азота.

Матеріал, захищений авторським правом

При поступлении от программного задатчика сигнала, соответствующего нагреванию, на выходе усилителя *19* появляется ток противоположного направления и в коммутационной пластине выделяется тепло. По мере увеличения сигнала рассогласования схема *22* включает теплообменник *21* и температура паров азота повышается.

Программный задатчик *14* генерирует сигналы на первый и второй контуры регулирования с некоторым смещением по уровню, которое и определяет задаваемый градиент температур в образце.

Таким образом, полный цикл регулирования состоит из трех составляющих: тонкой регулировки температуры первого и второго термоэлементов и общего контура регулировки температуры «горячих» спаев термоэлементов. Этим достигаются высокая точность поддержа-

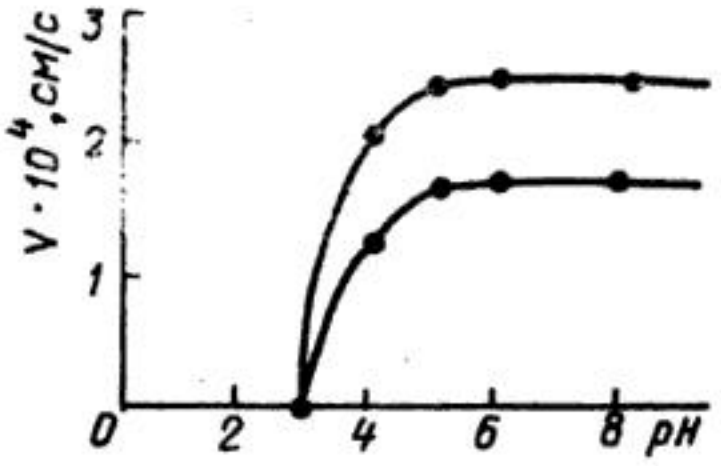


Рис. 4. Зависимость критического диапазона скоростей от pH при замораживании суспензии эритроцитов человека в изотоническом растворе NaCl. Градиент температуры 100° С/см.

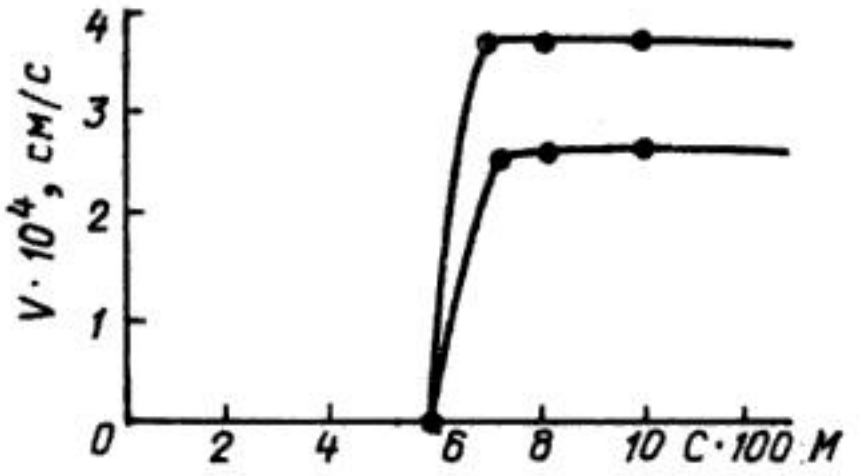


Рис. 5. Зависимость критического диапазона скоростей от концентрации соли NaCl в 0,1 М растворе NH_4Cl. Градиент температуры 100° С/см.

ния заданного режима охлаждения — отогрева и хорошая управляемость процессом движения фронта кристаллизации.

Измерены основные функциональные характеристики: диапазон температур +36 — —120 град., скорость изменения температуры 120° С/мин, регулируемый градиент температур ±20 град/мм, минимальная скорость движения фронта кристаллизации 0,25 мк/с.

Результаты и обсуждение. Было установлено, что растущие в среде, не содержащей криопротекторы, кристаллы льда способны отодвигать красные кровяные клетки человека. Скорости отодвижения клеток фронтом кристаллизации изменялись в пределах $0—4 \cdot 10^{-4}$ см/с в зависимости от состава, pH и осмотичности внеклеточного раствора. Захват эритроцитов в лед приводил к частичному или полному разрушению клеток. Визуально это выражалось в полном лизисе клеток или их обесцвечивании, т. е. в частичном превращении в тени после выхода гемоглобина. Если клетки отодвигались растущими кристаллами льда, то повреждение визуально не наблюдалось.

На первом этапе кристаллизации происходит интенсивное развитие кристаллической фазы как следствие большого начального переохлаждения воды в области холодной пластины. В результате часть клеток захватывается льдом на этапе его образования. Поэтому после рекристаллизационных изменений и формирования кристаллического фронта перед ним находится небольшая зона, где клетки уже побывали в контакте со льдом. Эти клетки захватывались кристаллами при скорости движения границы раздела фаз меньших $0{,}25 \cdot 10^{-4}$ см/м. На основании этих наблюдений мы предположили, что частично разрушенные эритроциты не отодвигались растущими кристаллами льда.

Поскольку граница между частично разрушенными на первом этапе кристаллизации и остальными клетками размыта, то при наблюдении процесса отодвижения наряду с хорошо отодвигаемыми льдом клетками наблюдается захват. Поэтому при изучении механического взаимодействия кристаллов льда с эритроцитами возможно выделить

Матеріал, захищений авторським правом

критический диапазон скоростей роста кристаллического фронта, в котором происходит переход от устойчивого отодвижения основной массы клеток к полному захвату всех клеток.

На рис. 4 представлена зависимость критического диапазона от pH при замораживании эритроцитов в изотоническом растворе NaCl. Из приведенной зависимости видно резкое снижение величины механического взаимодействия льда с клетками вблизи изоэлектрической точки для эритроцитов (pH около 2—3). Вблизи этих же значений pH наблюдался прогрессирующий во времени гемолиз эритроцитов, выдерживаемых при 20° С.

Как видно из рис. 5, область резкого уменьшения критической скорости также совпала с областью начала гипотонического гемолиза при уменьшении концентрации соли. Изложенное подтверждает предположение, что кристаллы льда слабо механически взаимодействуют с частично разрушенными эритроцитами.

Добавление криопротекторов глицерина и полиэтиленоксида с молекулярным весом 300 приводило к резкому уменьшению скорости движения эритроцитов льдом при замораживании. Уже при 3%-ной концентрации криопротекторов механическое взаимодействие клетка — кристалл льда визуально не наблюдалось.

Возможно, одним из механизмов защитного действия криопротекторов при замораживании является их способность предотвращать механическое разрушение клеток растущими кристаллами льда.

Таким образом, проведенные исследования, по нашему мнению, свидетельствуют о том, что криомикроскопия в градиенте температуры может явиться эффективным методом изучения некоторых актуальных вопросов криобиологии.

1. *Пушкарь Н. С., Белоус А. М., Иткин Ю. А. и др.* Низкотемпературная кристаллизация в биологических системах.— Киев : Наук. думка, 1977.— 243 с.
2. *Кравченко П. Н., Кузьмин А. А.* Термоэлектрическая приставка к световому микроскопу.— В кн.: Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических структур. Киев : Наук. думка, 1977, с. 112—113.
3. *Diller K. R., Gravalho E. G.* A cryomicroscope for the study of freezing and thawing processes in biological cells.— Cryobiology, 1971, **7**, N 4/6, p. 191—199.
4. *Gulup A. Z.* A microscope cold stage.— G. Microsc., 1975, **103**, N 2, p. 285—287.
5. *Körber G., Scheiwe M. W.* A modified freezing stage for microscopic observation of concentration gradients in aqueus dye solutions.— Cryobiology, 1979, **16**, N 6, p. 613—614.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
04.11.81

УДК 57.043 : 578.088

А. Н. Новиков, Т. Ф. Стрибуль

ДИЛАТОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РАСТВОРОВ КРИОПРОТЕКТОРОВ

Давление льда и его повреждающее действие на клетки при росте кристаллов являются установленным фактом [8].

При замораживании характерно изменение формы клеток при взаимодействии их с кристаллами льда. Это происходит при сужении каналов между ветвями дендритов. Деформация клеток льдом определяется механическим давлением льда на клетку, которое вызывает отодвижение клеток фронтом льда или захватом их в каналы и полости во льду [2, 6]. Однако оценить эффект чисто механического действия льда на клетку весьма трудно, так как в процессе замораживания клетки подвергаются еще и другим криоповреждениям.

Еще более сильным повреждающим фактором является внутриклеточная кристаллизация, которая вызывает нарушение протоплаз-

Матеріал, захищений авторським правом

матических структур клетки или даже растрескивание биомембран [2].

Установлено, что сохранению жизнеспособности клеток в результате криоконсервирования способствует аморфизация внутриклеточного содержимого с последующим переходом его при отогреве непосредственно в жидкое состояние [6]. Оценкой же степени аморфизации объекта может служить величина изменения объема его в момент фазового перехода вода — лед, определяемая дилатометрическим методом.

Дилатометрия — метод определения изменения длины или объема образца в зависимости от температуры [4, 7]. Классическая дилатометрия применяется для обнаружения изменения объема или длины при фазовом переходе. В литературе существует мало данных по исследованию дилатометрическим методом водных растворов, в частности, практически отсутствуют данные об изучении данным методом водных растворов криопротекторов. В связи с этим дилатометрическое исследование растворов криопротекторов становится актуальной задачей для понимания процессов, происходящих при криоконсервировании биообъектов.

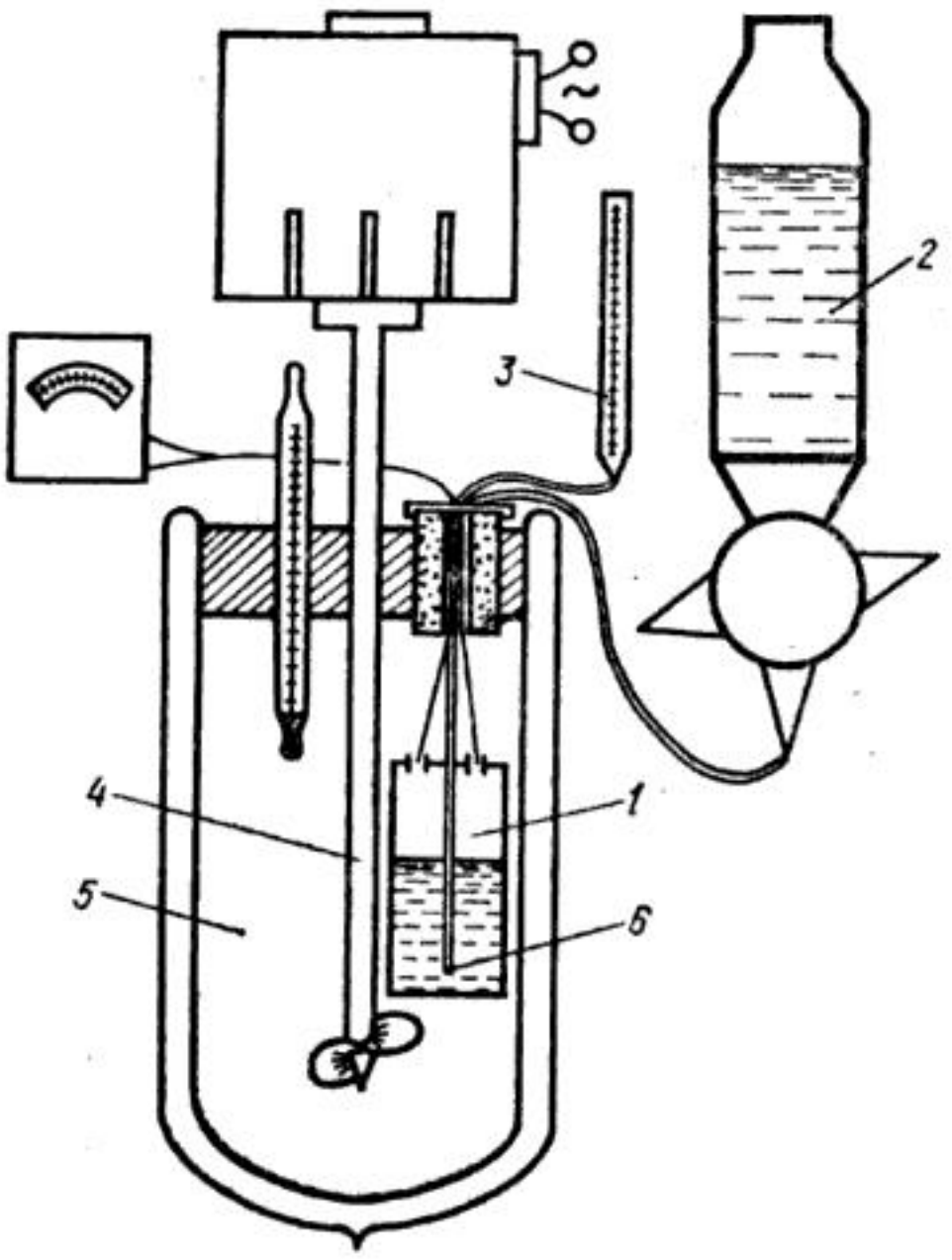


Рис. 1. Установка для дилатометрических исследований растворов.

Цель исследования. В настоящей работе изучено изменение объемов растворов ряда криопротекторов при фазовом переходе вода — лед с целью дифференцировки этих криопротекторов с точки зрения их влияния на образование аморфной структуры льда в замораживаемом объекте.

Объекты и методы исследования. Исследовался ряд проникающих (этиленгликоль, диметилсульфоксид, пропиленгликоль, глицерин, формамид, диэтилсульфоксид, диметилформамид, диметилацетамид, ацетамид, ПЭО-100) и непроникающих (ПЭО-400, ПЭО-1000, ПЭО-1500, ПЭО-3000, ПЭО-6000, ПЭО-20000, поливинилпиролидон) криопротекторов.

Проникающие криопротекторы были исследованы в концентрации 12,5%, а три из них — этиленгликоль, диметилсульфоксид, пропиленгликоль — в интервале концентраций от 5 до 45%. Для непроникающих криопротекторов концентрация была принята 10%, а для ПЭО-400 и ПЭО-1500 варьировалась от 5 до 35%.

Для исследования использовалась дилатометрическая установка (рис. 1), основными узлами которой являлись: *1* — толстостенный стальной сосуд с завинчивающейся крышкой, в который помещался исследуемый раствор, а сверху наливалась инертная жидкость — гептан. Заливался гептан в сосуд из резервуара *2* по тонкому шлангу. Второй шланг соединял стальной сосуд с микробюреткой *3*, по положению уровня гептана в которой судили о величине изменения объема раствора в сосуде. Охлаждение раствора производилось помещением стального сосуда в сосуд Дьюара *5*, наполненного инертной жидкостью, охлаждаемой жидким азотом до нужной температуры. Для выравнивания температуры по всему сосуду Дьюара жидкость в нем перемешивалась мешалкой *4*. Температура образца измерялась термопарой *6*.

Матеріал, захищений авторським правом

Результаты и обсуждение. Были проведены две серии экспериментов. Первая — по определению концентрационной зависимости относительного изменения объема при кристаллизации $\frac{\Delta V}{V}$ для трех проникающих криопротекторов (этиленгликоля, диметилсульфоксида, пропиленгликоля) (рис. 2) и двух непроникающих (ПЭО-400 и ПЭО-1500) (рис. 3).

Во второй серии экспериментов изучалась зависимость $\frac{\Delta V}{V}$ от вида криопротектора. Были исследованы десять проникающих криопротекторов в концентрации 12,5% (табл. 1) и семь непроникающих криопротекторов в 10%-ной концентрации (табл. 2).

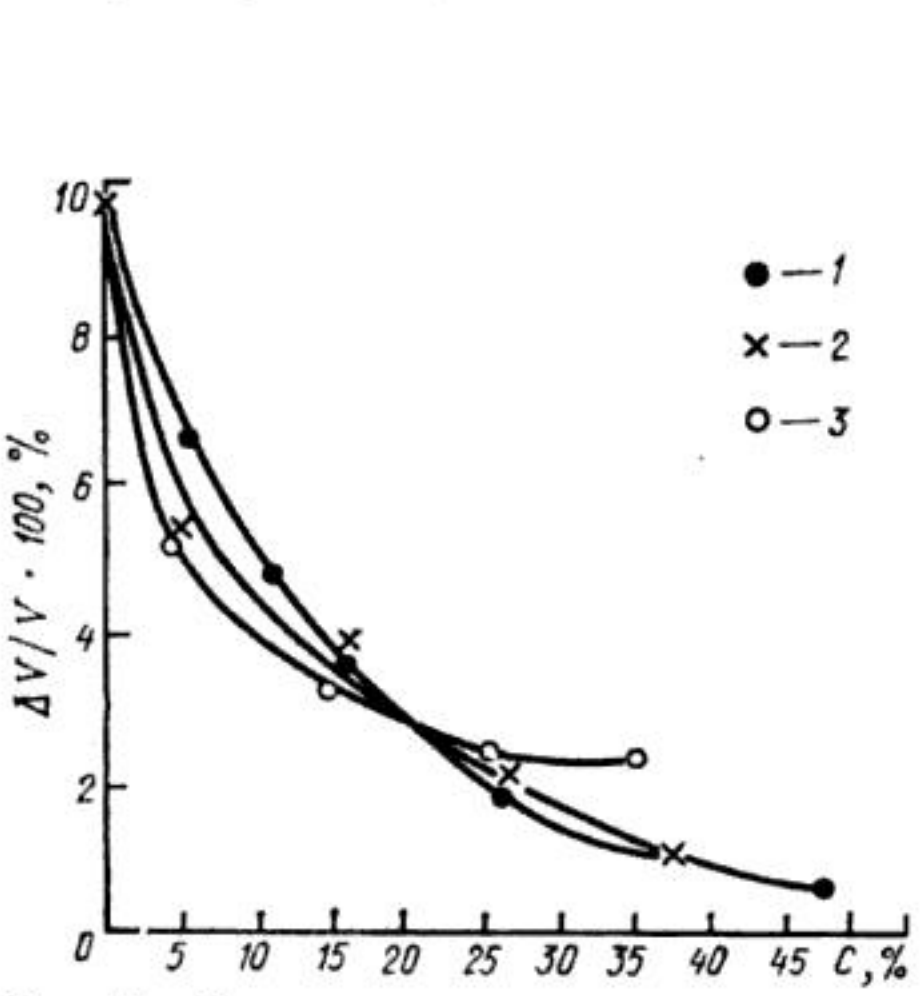


Рис. 2. Концентрационная зависимость относительного изменения объема при фазовом переходе вода — лед для растворов проникающих криопротекторов:
1 — этиленгликоль; *2* — диметилсульфоксид; *3* — пропиленгликоль.

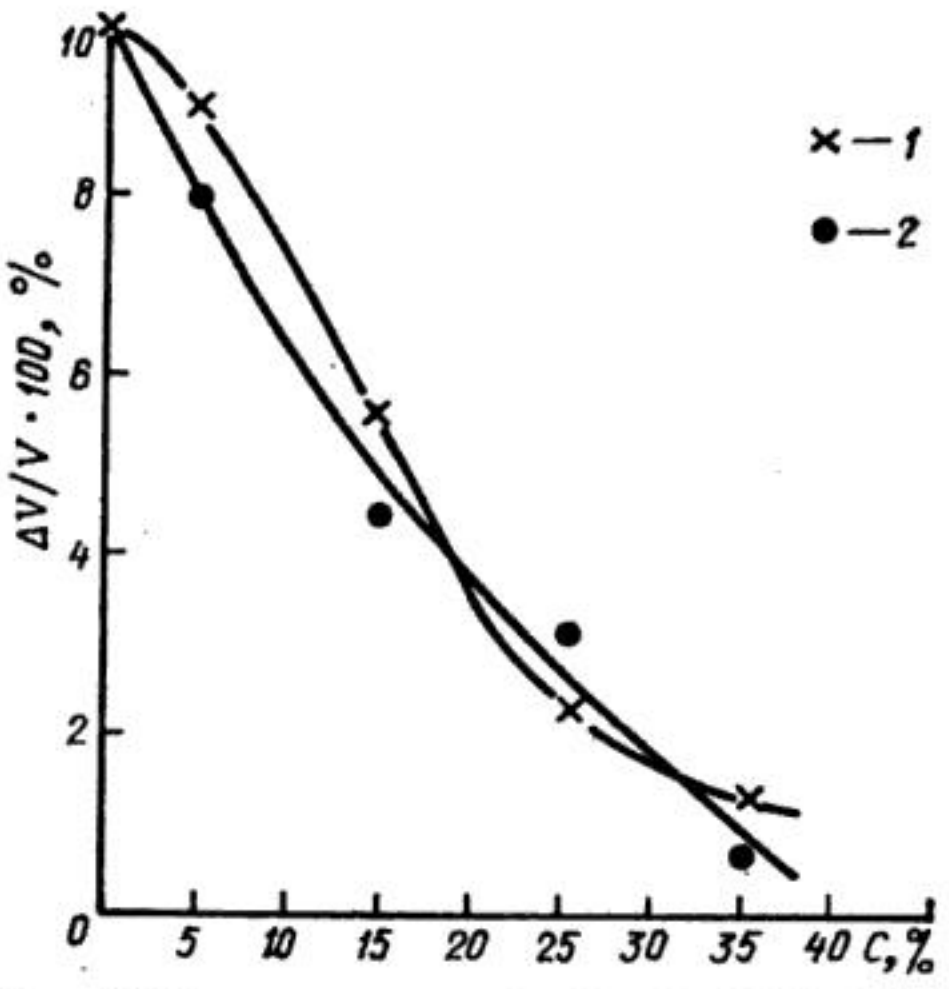


Рис. 3. Концентрационная зависимость относительного изменения объема при фазовом переходе вода — лед для растворов непроникающих криопротекторов:
1 — ПЭО-400; *2* — ПЭО-1500.

Естественно предположить, что изменение $\frac{\Delta V}{V}$ раствора при фазовом переходе происходит за счет свободной воды системы. Вода, связанная с криопротектором, не вносит вклада в это изменение. Ход кривых (см. рис. 2, 3) свидетельствует об уменьшении $\frac{\nabla V}{V}$ с ростом концентрации криопротектора в растворе. Причем для проникающих криопротекторов (см. рис. 2) резкое падение $\frac{\Delta V}{V}$ наблюдается для концентраций до 5%. Затем ход кривых приобретает более плавный характер.

Такие зависимости объясняются, по-видимому, тем, что при малых концентрациях криопротектора в растворе процесс гидратации его полный, так как в системе избыток воды.

При больших концентрациях характер $\frac{\Delta V}{V}$ меняется: угол наклона кривой к оси концентраций уменьшается. Это связано с тем, что в более концентрированных растворах фазовый переход происходит при более низких температурах, при которых возрастает скорость роста кристаллов льда, т. е. повышается энергия связи молекул воды в кристаллах льда, что способствует уменьшению гидратации молекул криопротекторов и приводит к увеличению $\frac{\Delta V}{V}$.

У непроникающих криопротекторов (см. рис. 3) зависимость $\frac{\Delta V}{V}$

Матеріал, захищений авторським правом

от концентрации в исследованном интервале концентраций имела практически линейный характер, особенно для высокомолекулярного ПЭО-1500, что можно объяснить однотипным характером связи всех реакционных групп молекул криопротектора с водой. Данные второй серии экспериментов (см. табл. 1, 2) позволяют оценить зависимость $\frac{\Delta V}{V}$ от строения молекулы криопротектора, рассчитать степень их гидратации n. Так, в ряду этиленгликоль — глицерин по мере увеличения количества гидроксильных радикалов, способных образовывать с водой водородные связи, возрастает степень гидратации молекулы криопротектора и соответственно уменьшается $\frac{\Delta V}{V}$.

Таблица 1. Относительное изменение объема $\frac{\Delta V}{V}$ и числа гидратации n растворов проникающих криопротекторов при фазовом переходе вода — лед

Криопротектор	$\frac{\Delta V}{V} \cdot 100$, %	n	
		Экспериментальные данные	Литературные данные
Этиленгликоль	6,95	2,3	2,08
Глицерин	3,8	4,89	4,04
ПЭО-100	3,24	5,35	3,66
Пропиленгликоль	3,63	5,03	2,97
Формамид	9,8	0	—
Ацетамид	7,9	1,52	2,88
Диметилформамид	4,56	4,26	0,94
Диметилацетамид	3,71	4,96	—
Диметилсульфоксид	4,47	4,34	3,19
Диэтилсульфоксид	3,17	5,41	—

Таблица 2. Относительное изменение объема $\frac{\Delta V}{V}$ и числа гидратации n растворов непроникающих криопротекторов при фазовом переходе вода — лед

Криопротектор	$\frac{\Delta V}{V} \cdot 100$, %	n (экспериментальные данные)	
		Молекула	Элементарное звено
ПЭО-400	4,76	5,12	0,62
ПЭО-1000	5,19	4,68	0,23
ПЭО-1500	6,66	3,18	0,11
ПЭО-3000	5,8	4,06	0,067
ПЭО-6000	6.82	3,01	0,027
ПЭО-20000	5,55	4,3	0,01
Поливинилпиролидон	7,1	2,73	—

Кроме водородных связей, вода может связываться криопротектором и другими силами, например, за счет образования клатратных гидратов, аналогичных известным газовым гидратам [1, 3]. Гидратообразующими радикалами в нашем случае могут быть радикалы $-CH_3$, $-C_2H_5$. С водой эти гидрофобные радикалы водородных связей не образуют. Это предположение подтверждает факт, что последовательное увеличение числа радикалов $-CH_3$ в криопротекторах формамид — ацетамид — диметилформамид — диметилацетамид приводит к уменьшению $\frac{\Delta V}{V}$. В ряду глицерин — пропиленгликоль появление радикала $-CH_3$ у пропиленгликоля также приводит к уменьшению $\frac{\Delta V}{V}$ по сравнению с глицерином. В ряду диметилсульфоксид — диэтилсульфоксид меньшее значение $\frac{\Delta V}{V}$ в растворе диэтилсульфоксида можно объяснить различной гидратообразующей способностью радикалов $-CH_3$ и $-C_2H_5$. Сравнение рассчитанных по значениям $\frac{\Delta V}{V}$ чисел гидратации с приведенными в литературе [5] показывает, что последние, как правило, ниже. Возможно, это отличие обусловлено различной температурой оценки гидратации: наши измерения проводились при температуре фазового перехода растворов криопротекторов, литературные данные — для температур 20° С. Не исключается и то, что оценка чисел гидратации по данным дилатометрии более чувствительна, учитывает и более слабые взаимодействия криопротектор — вода.

Матеріал, захищений авторським правом

В исследованном ряду непроникающих криопротекторов наблюдается тенденция увеличения $\frac{\Delta V}{V}$ и соответственно уменьшение гидратации молекул при увеличении молекулярного веса криопротектора. Объяснить это можно увеличением вероятности конформационных перестроек молекулы при увеличении ее молекулярного веса, приводящих к затруднению доступа молекул воды к способным гидратироваться радикалам.

На основании приведенных исследований можно сделать вывод о том, что дилатометрический метод может дать рекомендации к использованию криопротекторов с точки зрения их способности образовывать более или менее аморфизированную, определяемую величиной $\frac{\Delta V}{V}$, структуру воды в биообъекте при его криоконсервировании. Сделана попытка объяснить повышение аморфизации структуры растворов криопротекторов, содержащих гидрофобные радикалы $—CH_3$, $—C_2H_5$, возможностью образования их клатратных гидратов.

1. *Ахметов Н. С.* Неорганическая химия.— М. : Высш. школа, 1975.— 670 с.
2. *Лозина-Лозинский Л. К.* Очерки по криобиологии.— Л. : Наука, 1972.— 288 с.
3. *Маленков Г. Г.* Геометрия построек из молекул воды в структурах кристаллогидратов.— Журн. структур. химии, 1962, 3, № 2, с. 227—228.
4. *Пособие* к практическим занятиям по физико-химическому анализу.— М. : Высш. школа, 1969. 128 с.
5. *Пушкарь Н. С., Емец Б. Г., Калугин Ю. В. и др.* Гидратация криопротектантов.— Харьков, 1972.— 23 с.— (Препринт.).
6. *Пушкарь Н. С., Белоус А. М., Иткин Ю. А. и др.* Низкотемпературная кристаллизация в биологических системах.— Киев : Наук. думка, 1977.— 239 с.
7. *Уэндландт У.* Термические методы анализа.— М. : Мир, 1978.— 526 с.
8. *Шумаков В. И., Штенгольд Е. Ш., Онищенко Н. А.* Консервация органов.— М. : Медицина, 1975.— 250 с.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
30.09.81

II. КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

УДК 57.043

Л. И. Суханова, А. Г. Федотенков, Л. А. Данилова

КОНСЕРВИРОВАНИЕ КОСТНОГО МОЗГА МЕТОДОМ ПЕРЕОХЛАЖДЕНИЯ

В литературе имеется мало работ, в которых показано, что переохлаждение крови до температуры —8 — —12° С способствует удлинению срока ее сохранения в биологически полноценном состоянии [1, 3, 5]. Авторы этих исследований подчеркивают существенное значение состава переохлаждающих растворов, а в экспериментах Н. И. Калабухова [4] и И. Д. Шишкиной [6] показана роль медленного и равномерного охлаждения ткани или органов для получения более глубокого и стойкого состояния переохлаждения. Консервирование костного мозга методом переохлаждения представляет научный интерес, поскольку может способствовать удлинению сроков сохранения костного мозга в жизнеспособном состоянии по сравнению с положительными температурами. Работ, описывающих сохранение клеток костного мозга в переохлажденном состоянии, мы не встретили. В настоящей статье выбирался раствор, позволяющий сохранять взвесь клеток костного

Матеріал, захищений авторським правом

мозга при температуре —8 — —10° С в жидком переохлажденном состоянии.

Материалы и методы исследования. *Экспериментальные исследования с костным мозгом мышей линии* $(CBA \times C_{57}Bl)F_1$. Костный мозг заготавливали в стерильных условиях из бедренных костей забитого животного путем вымывания его консервирующим раствором. Полученную костномозговую взвесь фильтровали через нейлоновый фильтр системы для переливания крови, подсчитывали количество ядросодержащих элементов и их морфологическую сохранность. После этого взвесь клеток разливали в стерильные пенициллиновые флаконы и охлаждали со скоростью 1 или 0,5° С/мин. С помощью термопары, помещенной в контрольный образец, определяли температуру кристаллизации изучаемого раствора.

При изыскании консервирующего раствора для переохлаждения костного мозга использовали отечественные инфузионные среды: гемодез (6%-ный изотонический раствор ПВП), лактасол (солевой сбалансированный раствор, содержащий ионы K, Ca, Na, Mg), а также другие химические и биологические вещества (глицерин, сорбит, глюкозу, цитрат натрия, ЭДТУ Na_2, желатин).

В каждой серии опытов было несколько групп смертельно облученных мышей: 1) животные без трансплантации костного мозга — контроль облучения; 2) животные после трансплантации свежезаготовленного на изучаемых растворах костного мозга; 3) животные после трансплантации костного мозга, переохлажденного в изучаемых растворах до температуры —8° С в течение 1—3 сут. Облучение мышей проводили в дозе 1300 Р (при этом число эндогенных колоний не превышало 0,2 в селезенке).

Жизнеспособность костного мозга, свежезаготовленного и переохлажденного до температуры —8° С, исследовали с помощью метода суправитального окрашивания 1%-ным раствором эозина (морфологическая сохранность клеток) и с помощью метода клонирования кроветворной ткани в селезенке смертельно облученных мышей [7] с гистологическим исследованием структуры колоний. Этот метод позволяет учитывать сохранность стволовых гемопоэтических клеток, ответственных за восстановление кроветворения. При гистологических исследованиях структуры гемопоэтических колоний можно судить о способности стволовых клеток к дифференцировке и вызреванию в организме облученного реципиента.

Результаты экспериментов. Проведенные исследования показали, что переохлаждению изучаемых растворов (табл. 1), охлажденных со скоростью 1° С/мин, способствует не столько добавление отдельных компонентов, сколько их сочетание.

Как видно из табл. 1, добавление к гемодезу глицерина понижает температуру кристаллизации до —4 — —6° С по сравнению с исходной —3 — —4° С, а добавление глицерина в сочетании с желатином способствует понижению температуры кристаллизации раствора до —6 — —8° С. Аналогичные результаты были получены с растворами на основе лактасола. Оказалось, что сочетание глицерина с желатином или сорбита с желатином при добавлении к лактасолу оказывает одинаковый эффект — понижает температуру кристаллизации раствора до —5 — —7° С (по сравнению с исходной —2 — —3° С). Более заметное снижение температуры кристаллизации (до —6 — —9° С) наблюдалось при добавлении к лактасолу сочетания глицерина с сорбитом.

Следующий этап исследований был направлен на выявление влияния скорости охлаждения раствора на глубину переохлаждения. С этой целью изучаемые растворы охлаждали со скоростью 0,5° С/мин. Результаты этих исследований показали прямую зависимость между замедлением скорости охлаждения и понижением температуры кристаллизации. Так, раствор Г-34, охлажденный со скоростью 1° С/мин, имеет точку кристаллизации при температуре —6 — —8° С, этот же раствор,

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 1. **Зависимость начала кристаллизации растворов от их состава и скорости охлаждения**

Условное название раствора	Состав раствора	Точка кристаллизации, °С, раствора при охлаждении со скоростью	
		1° С/мин	0,5° С/мин
Г-1	Гемодез	—3 — —4	—4 — —6
Г-4	» 3,3%-ный глицерин	—4 — —6	—7 — —9
Г-34	Гемодез 3,3%-ный глицерин 1,0%-ный желатин	—6 — —8	—9 — —11
Т-1	Лактасол	—2 — —3	—3 — —5
Т-34	» 3,3%-ный глицерин 1,2%-ный желатин		
Л-35	Лактасол 1,2%-ный желатин 1,5%-ный сорбит	—5 — —7	—7 — —10
Л-54	Лактасол 3,3%-ный глицерин 1,5%-ный сорбит	—6 — —9	—9 — —11

охлажденный со скоростью 0,5° С/мин, имеет точку кристаллизации при —9 — —11° С (см. табл. 1).

Таким образом, проведенные исследования показали, что добиться более глубокого переохлаждения можно путем сочетания веществ, понижающих температуру кристаллизации, и с помощью более медленной скорости охлаждения.

Для того чтобы выбрать оптимальный раствор для сохранения костного мозга в переохлажденном состоянии, было проведено сравнительное изучение морфологической и функциональной сохранности клеток костного мозга. Морфологические исследования показали, что растворы на основе гемодеза оказывают более благоприятное действие на сохранность миелокариоцитов (табл. 2). Лучшим из этой группы раст-

Таблица 2. **Абсолютное количество, %, морфологически сохранных клеток костного мозга, переохлажденного до температуры —8° С ($M \pm m$) в различных растворах**

Срок консервирования костного мозга, сут	Г-1	Г-4	Г-34	Л-34	Л-35	Л-54
Свежезаготовленный	98,0±5	98,0±6	98,0±6	97,0±5	92,7±7	97,2±6
1	90,3±4	90,8±4	92,0±5	90,0±4	82,0±6	86,0±4
2	84,3±6	88,0±5	81,6±6	80,0±5	76,0±6	70,4±5
3	70,0±5	74,2±5	77,8±5	76,2±5	68,1±7	62,2±7
4	60,5±7	65,1±6	71,7±6	67.0±7	59,3±5	55,7±7
5	57,0±4	57,6±7	69,1±7	56.2±8	42,3±6	43,0±6
7	31.0±7	30,0±6	51,0±6	25,3±5	15,2±6	15,0±5

воров оказался раствор Г-34, содержащий гемодез, глицерин, желатин. В этом растворе на 5-е и 7-е сут определялось в среднем 69—51% морфологически сохранных клеток.

Среди растворов на основе лактасола лучшим оказался раствор Л-34, в состав которого входят глицерин и желатин. На 5-е сут хранения костного мозга в этом растворе оставалось 56,2% морфологически сохранных клеток (см. табл. 2).

На основании данных, полученных при исследовании морфологической сохранности переохлажденного костного мозга (табл. 2) и способности растворов к переохлаждению (см. табл. 1), для изучения сохранности стволовых клеток костного мозга были отобраны лучшие раство-

Матеріал, захищений авторським правом

ры на основе гемодеза (Г-34 и Г-4) и лактасола (Л-34 и Л-54). Жизнеспособность стволовых гемопоэтических клеток в этих растворах изучалась с помощью метода клонирования кроветворной ткани в селезенке смертельно облученных мышей. Костный мозг исследовали до переохлаждения и через 1,2 и 3 сут хранения в переохлажденном состоянии при температуре —8° С. Через 9 дней после трансплантации свежезаготовленного и переохлажденного мозга животных забивали, извлекали селезенки и подсчитывали в них количество колоний. За 100% принимали количество колоний, полученных от введения свежезаготовленного костного мозга.

Стволовые клетки костного мозга, переохлажденного до температуры —8° С, лучше всего сохраняются в растворах Г-34 и Д-34 (табл. 3). В состав того и другого раствора входят глицерин и желатин, которые, очевидно, оказывают благоприятное влияние на сохранность стволовых гемопоэтических клеток. Так, на 2-е сут хранения костного мозга в переохлажденных растворах Г-34 и Л-34 сохранность стволовых клеток достигала 30%, в то время как в двух других растворах (Г-4 и Л-54) она была значительно ниже — 7,5 и 14,3% (см. табл. 3).

Таблица 3. Сохранность, %, стволовых клеток костного мозга, переохлажденного до температуры —8° С ($M \pm m$) в различных растворах

Срок консервирования костного мозга, сут	Л-34 (лактасол, глицерин, желатин)	Л-35 (лактасол, глицерин, сорбит)	Г-4 (гемодез, глицерин)	Г-34 (гемодез, глицерин, желатин)
Свежезаготовленный	100	100	100	100
1	65,5±9	21,1±3	63,0±7	61,2±8
2	30,0±5	7,5±3	14,3±4	30,0±4

С целью изучения способности стволовых клеток переохлажденного костного мозга к дифференцировке и вызреванию в организме смертельно облученного реципиента проводили исследование структуры гемопоэтических колоний.

Гистологические исследования показали, что в лучших растворах Г-34 и Л-34 в 1-е сут зрелые колонии составляли 100%, т. е. как в свежезаготовленном костном мозге. На 2-е сут 85—95% колоний также были зрелыми, однако обычное соотношение (2 : 1 : 1) между видами колоний нарушалось за счет преобладания эритроцитарных колоний (14 : 5 : 2). В остальных переохлаждающих растворах (Г-1, Г-4, Л-35, Л-54) функция дифференцировки и вызревания сохранялась только 1 сут. На 2-е сут среди колоний зрелого типа наблюдалась редукция гранулоцитарного и мегакариоцитарного ростков, кроме того, была нарушена функция вызревания стволовых клеток: 80% составляли колонии индифферентного типа.

Таким образом, результаты исследований показали, что стволовые клетки костного мозга и их функция сохраняются в переохлажденном состоянии при температуре —8° С в течение 2 сут только в двух растворах: Г-34 и Л-34.

После анализа полученных данных можно сделать заключение, что добиться глубокого и стойкого состояния переохлаждения раствора можно путем сочетания веществ, понижающих температуру кристаллизации, и с помощью более медленной скорости охлаждения. Показано, что переохлаждение костного мозга до температуры —8° С незначительно удлиняет срок сохранения миелокариоцитов в жизнеспособном состоянии по сравнению с положительными температурами. Лучшему сохранению клеток костного мозга в состоянии переохлаждения способствует сочетание гемодеза с глицерином и желатином.

1. *Беляков А. Д.* Опыт консервирования крови при температуре ниже 0° С.— В кн.: Тез. докл. пленума Учен. Совета ЦОЛИПК. М., 1952, с. 16—17.
2. *Беляков А. Д.* Растворы для консервирования крови и тканей.— Вестн. хирургии им. Грекова, 1958, **81**, № 10, с. 11—14.

Матеріал, захищений авторським правом

3. *Гусев В. П.* Применение отрицательных температур для хранения крови в жидком переохлажденном состоянии : Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Л., 1974.— 21 с.
4. *Калабухов Н. И.* Спячка животных.— М. : Наука, 1946.— 130 с.
5. *Федорова Л. И.* Консервирование крови при температуре ниже 0° С : Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— М., 1960.— 21 с.
6. *Шишкина И. Д.* Влияние скорости охлаждения на процесс переохлаждения в изолированной селезенке мышей.— В кн.: Современные проблемы криобиологии и медицины. Киев : Наук. думка, 1975, с. 132—138.
7. *Till J. E., McCulloch E. A.* A direct measurement of the radiation sensitivity of normal bone marrow cells.— Rad. Res., 1961, **14**, N 2, p. 213—222.

Центральный научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови МЗ СССР

Поступила в редколлегию
23.10.80

УДК 57.043 : 612.111.014.41

И. А. Кочережская, В. И. Вишневский

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ЭКСПОЗИЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ С ПЭО-1500 НА РЕЗУЛЬТАТ ПОСЛЕДУЮЩЕГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ

Добавление внеклеточного криопротектора в суспензию эритроцитов приводит к изменению многих параметров клеток и среды [4]. В частности, это относится к изменению поверхностных свойств клеточных мембран и дегидратации эритроцитов. Полиэтиленоксиды, в том числе ПЭО-1500, являются поверхностно-активными веществами [5], которые специфически взаимодействуют с мембраной эритроцитов, уменьшая конформационную подвижность ее поверхностного слоя [2]. ПЭО с молекулярной массой 400 и выше способны изменять состояние липидной фазы мембраны [1]. В растворах ПЭО-1500 наблюдается потеря клеткой воды, степень которой зависит от осмотичности добавляемой среды [3].

Вопрос взаимодействия ПЭО-1500 с эритроцитами имеет два аспекта: во-первых, изменения, вызванные криопротектором в структуре клетки, должны способствовать сохранению ее целостности в процессе низкотемпературного консервирования [6] и, во-вторых, они должны быть обратимыми.

Задачей настоящего исследования явилось выяснить, как сказываются последствия взаимодействия ПЭО-1500 с эритроцитами на этапе подготовки к замораживанию на степень их повреждения при низкотемпературном консервировании в условиях различной концентрации криопротектора и клеток в среде замораживания.

Методика эксперимента. Изучали влияние экспозиции эритроцитов в водных растворах ПЭО-1500 10-, 15-, 20- и 40%-ной концентрации. Эритроциты донорской крови, стабилизированной гемоконсервантом № 7б, центрифугировали 15 мин при 2500 об/мин, затем смешивали в объемном отношении 1 : 1 с ПЭО-1500 указанных концентраций, pH 7,0 ± 0,2. После 15 мин экспозиции образцы центрифугировали при тех же условиях, надосадочную жидкость снимали (уровень гемолиза не превышал 60 мг/%). Полученные концентрированные суспензии эритроцитов замораживали с добавлением 5-, 10-, 15-, 20- и 40%-ных водных растворов ПЭО-1500 до получения средних объемных концентраций клеток 60 и 20%. Замораживание осуществляли в стальных контейнерах объемом 12 мл непосредственным погружением в жидкий азот (— 196° С). Оттаивание образцов проводили в термостатируемой бане при 42° С.

Таким образом, получали четыре серии образцов, в которых эритроциты, экспонированные в одной из исследуемых концентраций ПЭО-1500, замораживались в различных условиях, определяемых концентрацией криопротектора и клеток.

Матеріал, захищений авторським правом

Степень повреждения эритроцитов после замораживания — оттаивания оценивали по процентному гемолизу, определяемому непосредственно в среде замораживания. Каждое значение гемолиза соответствует среднему по результатам замораживания эритромассы четырех доноров.

Результаты и их обсуждение. При перенесении эритроцитов, экспонированных с ПЭО-1500 различных концентраций, в среду замораживания в ней происходит изменение концентрации криопротектора за счет двух процессов. Во-первых, в межклеточном пространстве центрифугированных эритроцитов остается некоторое количество среды экспозиции. Во-вторых, эритроциты, дегидратированные в больших концентрациях криопротектора во время предобработки, при помещении в более низкие концентрации ПЭО-1500 будут отбирать воду из среды до установления осмотического равновесия. Это приводит к увеличению концентрации криопротектора в среде замораживания. И наоборот, набухшие во время предобработки в 10%-ном ПЭО-1500 эритроциты в больших концентрациях криопротектора разбавят среду замораживания за счет дегидратации. Поскольку скорость обмена воды для эритроцитов велика (порядка 10^{-2} с), осмотическое равновесие успевает установиться до замораживания.

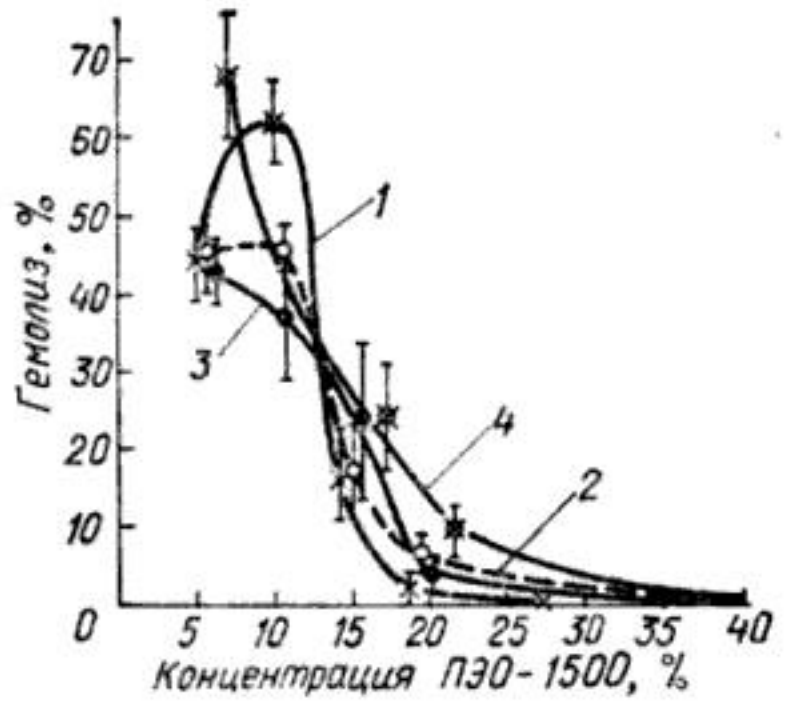


Рис. 1. Зависимость степени повреждения эритроцитов от концентрации ПЭО-1500 в среде замораживания при различных условиях экспозиции с ПЭО-1500 (объемная концентрация эритроцитов в среде замораживания 60%). Концентрация ПЭО-1500 при экспозиции: *1* — 10%; *2* — 15%; *3* — 20%; *4* — 40%.

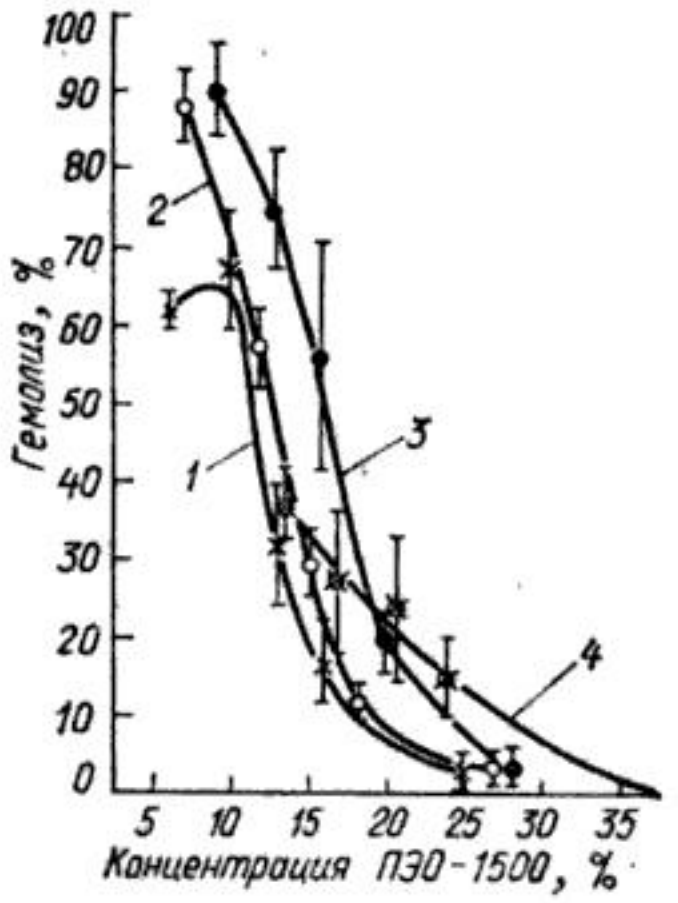


Рис. 2. Зависимость степени повреждения эритроцитов от концентрации ПЭО-1500 в среде замораживания при различных условиях экспозиции с ПЭО-1500 (объемная концентрация эритроцитов в среде замораживания 20%). Концентрация ПЭО-1500 при экспозиции:

Результаты исследования представлены на рис. 1 и 2. На оси абсцисс указаны значения концентрации ПЭО-1500 в среде замораживания с учетом перераспределения воды между эритроцитами и средой до установления осмотического равновесия.

При замораживании суспензий с объемной концентрацией эритроцитов 60% (см. рис. 1) степень повреждения эритроцитов определяется концентрациями криопротектора в среде замораживания и незначительно зависит от концентрации ПЭО-1500 во время предобработки. Увеличение концентрации криопротектора при замораживании от 7 до 18% приводит к резкому уменьшению гемолиза от 90 до 10—25%, который снижается до 5% при увеличении до 28% концентрации криопротектора в среде. При этом существенно не отличаются значения гемолиза для образцов, предварительно экспонированных с 10-, 15- и 20%-ным

Матеріал, захищений авторським правом

ПЭО-1500 (см. рис. 1, кривые *1—3*). Некоторое повышение уровня гемолиза при экспозиции с 20%-ным криопротектором, по-видимому, связано с повышением объемной концентрации клеток в среде замораживания по сравнению с экспозицией в 10- и 15%-ном ПЭО-1500, так как 20%-ный ПЭО-1500 приводит к более значительной дегидратации эритроцитов и при одинаковом объемном разведении со средой замораживания в этом случае в суспензию попадает большее количество клеток, объем которых увеличивается в среде с более низким содержанием криопротектора (рис. 1, кривая *3*).

Предобработка эритроцитов в 40%-ном ПЭО-1500 не снижает степени повреждения эритроцитов. Некоторое повышение гемолиза в этом случае, вероятно, можно связать со скрытым нарушением целостности мембраны при экспозиции в большой концентрации поверхностно-активного вещества, что увеличивает чувствительность эритроцитов к действию низких температур (рис. 1, кривая *4*).

Различие в результат замораживания эритроцитов при низких концентрациях ПЭО-1500 (6%) вносит только экспозиция с 10%-ным криопротектором. При этом уровень гемолиза снижается более чем на 20% по сравнению с эритроцитами, выдержанными до замораживания в 15- и 20%-ном ПЭО-1500.

Уменьшение концентрации эритроцитов в замораживаемой суспензии до 20% снижает общий уровень повреждения клеток и изменяет характер зависимости его от концентрации криопротектора во время предобработки (см. рис. 2).

Замораживание в 5%-ном криопротекторе для эритроцитов, выдержанных с 10-, 15-, и 20%-ным ПЭО-1500, характеризуется одинаковым уровнем гемолиза в пределах 44 ± 5%. Повышение концентрации ПЭО-1500 при замораживании до 10% вызывает различную реакцию образцов, предварительно экспонированных с разными концентрациями криопротектора, причем для выдержанных в 10%-ном ПЭО-1500 эритроцитов наблюдается повышение гемолиза, в 15%-ном уровень остается прежним, а для экспонированных в 20%-ном ПЭО-1500 — в среднем снижается, что указывает на положительное влияние повышения концентрации криопротектора при экспозиции.

Дальнейшее повышение концентрации ПЭО-1500 в среде замораживания снижает различия в степени повреждения эритроцитов при этих концентрациях криопротектора во время экспозиции.

Предварительная выдержка эритроцитов в 40%-ном ПЭО-1500 вносит отличия в характер зависимости степени повреждения эритроцитов от концентрации криопротектора при замораживании. При низких концентрациях ПЭО-1500 (7%) уровень гемолиза превышает соответствующие значения для экспонированных в 10-, 15- и 20%-ном ПЭО-1500 эритроцитов. Повышение концентрации криопротектора в среде замораживания до 15—35% приводит к снижению степени повреждения эритроцитов, однако она больше, чем в случае предобработки в более низких концентрациях ПЭО-1500.

Выводы. Результат замораживания эритроцитов в средах с большими концентрациями ПЭО-1500 (20—40%) не зависит ни от концентрации криопротектора в среде экспозиции, ни от концентрации клеток в замораживаемой суспензии. Это свидетельствует об оптимальном значении применяемых при замораживании концентраций криопротектора с точки зрения кристаллизационных процессов, развивающихся в среде при понижении температуры. Влияние последних сказывается при использовании сред замораживания с недостаточным содержанием криопротектора (до 20%), что накладывает повышенные требования на состояние клеток, определяемое изменениями в их структуре, вызванными экспозицией с ПЭО-1500, и их концентрацию. Наиболее существенно условия предобработки сказываются при замораживании разбавленных суспензий эритроцитов. Экспозиция эритроцитов в 40%-ном ПЭО-1500 в целом повышает их чувствительность к низким температурам.

Матеріал, захищений авторським правом

1. *Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П., Белоус А. М.* Взаимодействие полиэтиленоксидов с искусственными фосфолипидными и митохондриальными мембранами.— Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 7—9.
2. *Иванов Л. И., Гаврилова И. И., Моисеев В. А.* Исследование действия низких температур и криопротекторов на структуру мембран эритроцитов методом спиновых меток.— В кн.: Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических структур. Киев : Наук. думка, 1977, с. 39—40.
3. *Кулешова Л. Г., Розанов Л. Ф.* Изучение взаимодействия эритроцитов человека с криопротекторами и солями.— Криобиология и криомедицина, 1980, вып. 7, с. 40—44.
4. *Пушкарь Н. С., Белоус А. М., Иткин Ю. А., Вишневский В. И., Розанов Л. Ф.* Низкотемпературная кристаллизация в биологических системах.— К. : Наук. думка, 1977.— 242 с.
5. *Топчиева И. Н.* Применение полиэтиленгликоля в биохимии.— Успехи химии, 1980, 49, вып. 3, с. 494—517.
6. *Шраго М. И., Бредихина Л. П., Лубяный В. Г.* О повышении устойчивости клеток к повреждению под влиянием криопротекторов.—В кн.: Общие механизмы клеточных реакций на повреждающие воздействия. Л., 1977, с. 175—176.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
01.10.81

УДК 57.043 : 612.7.041.4.083.3

Н. А. Волкова, Б. П. Сандомирский

ОРГАННОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА

Долгосрочное хранение кожи человека, необходимой для клиники, обеспечивается ее криоконсервированием с использованием различных криопротекторных веществ (глицерин, диметилсульфоксид, полиэтиленоксид молекулярной массой 400 — ПЭО-400). При этом на различных этапах криоконсервации проявляется действие повреждающих факторов, к числу которых относится как сам криопротектор, так и низкие температуры. Однако пути функционального и структурного восстановления кожи после действия этих повреждающих факторов освещены недостаточно. Для представления об уровне биологической сохранности клеточных и тканевых потенций деконсервированной кожи перспективным является органное культивирование, позволяющее оценить структурно-функциональное состояние объекта на основании архитектоники, роста, пролиферации, дифференцировки (кератинизации) эксплантатов. Методы погружного культивирования дают возможность судить преимущественно об элементарных клеточных функциях кожи, тогда как специфическое свойство этой тканевой системы — способность к вертикальной миграции кератинизирующихся эпидермоцитов — может быть охарактеризовано только в условиях органного культивирования.

Материал и методы исследования. Материалом исследования послужили дермо-эпидермальные лоскуты от девяти трупов мужского пола возраста 54—71 года, взятые через 5—6 ч после скоропостижной смерти. После иссечения до эксплантации в органную культуру кожные лоскуты находились в таких условиях: 1) хранение при 4° С на протяжении 18—24 ч в сухих стеклянных флаконах; 2) хранение при 4° С на протяжении 18—21 ч с последующим погружением на 3 ч в 15%-ный раствор ПЭО-400, охлаждение со скоростью 25—35° С/мин, хранение в низкотемпературном банке, отогрев на водяной бане 40° С; 3) хранение при 4° С на протяжении 18—24 ч в сухих стеклянных флаконах, замораживание со скоростью 400° С/мин, хранение в низкотемпературном банке, отогрев на водяной бане 40° С.

Низкотемпературное хранение замороженных кожных лоскутов производили в жидком азоте в течение 6—7 сут.

Культивирование образцов, измельченных до 1,5—2,0 мм², вели на фильтрах НА по методу Е. А. Лурия [3]. Жидкая питательная среда включала 70% среды 199, 10% телячьей эмбриональной сыворотки,

Матеріал, захищений авторським правом

10% нормальной человеческой сыворотки IV (AB) группы, 10% куриного эмбрионального экстракта и была дополнена из расчета 400 мг глюкозы, 10 мг аскорбиновой кислоты, 20 мг *l*-глютамина, по 50 единиц пенициллина и стрептомицина на 100 мл среды. Газовая фаза — воздух, обогащенный 5% CO_2.

Фиксацию материала осуществляли на 2-, 3-, 5-, 7-, 10-, 12-, 14- и 16-е сут культивирования в 96° этаноле в течение 1 ч. Исследовали

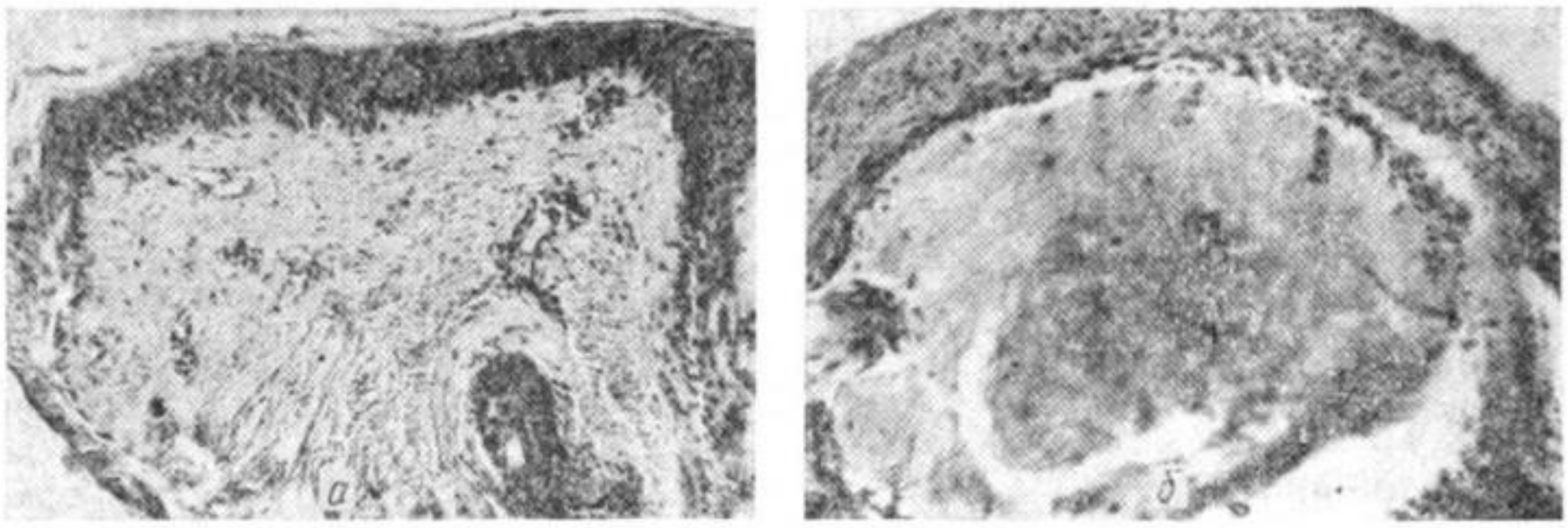


Рис. 1. Эксплантаты трупной кожи с гипотермическим хранением в течение 24 ч:

а — 2-е сут культивирования; миграция эпителиальных клеток, уплощение слоя шиповатых клеток; *б* — 14-е сут культивирования; многорядность эпиболийного слоя, паракератоз; участки некроза росткового слоя. Гематоксилин-эозин, × 100.

гистологические срезы эксплантатов и тотальные препараты фильтров, окрашенные гематоксилин-эозином. Всего в культуре изучено 394 эксплантата.

Результаты исследования. Исходный материал представлял собой лоскуты, состоящие из эпидермиса типичного строения, сосочкового и части сетчатого слоев дермы. При культивировании эпидермис таких лоскутов проявлял признаки развития. Уже на 2-е сут наблюдалась миграция эпителиальных клеток из резаного края по поверхности дермы до поддерживающего фильтра, сопровождавшаяся истончением эпидермиса. В слое шиповатых клеток появлялись рассеянные пикнотичные клетки, поверхность эпидермиса была покрыта слоем зернистых клеток (рис. 1, *а*). На 3-и сут миграция эпителиальных клеток продолжалась вплоть до образования капсулы вокруг дермы. По мере дифференцировки клеток, формирующих эпиболийный слой, ядра их приобретали сферическую форму и пикнотизировались. В исходном эпидермисе продолжались процессы дистрофии в шиповатых клетках, увеличивались межклеточные щели в слое базальных клеток, обнаруживавших способность к митотическому делению. К 5-м сут дистрофические изменения в шиповатых клетках нарастали, поверхностные слои этих клеток демонстрировали резкую оксифилию и были покрыты тонким новообразованным в процессе паракератоза роговым слоем. В течение второй недели культивирования происходило постепенное ослабление дермо-эпидермальной связи до локального некроза Мальпигиева слоя (рис. 1, *б*), а также наблюдалась склонность отдельных участков дермы к базофилии при сохранении рисунка коллагеновых волокон. В дальнейшем к 16-м — 18-м сут отмечались ослабление межклеточных связей в эпидермисе и локальные изменения тинкториальных свойств дермы.

Формирование выроста из эксплантата на миллипоровый фильтр наблюдали уже со 2-х сут культивирования: на фильтре отмечены эпителиальные клетки, образующие компактные структуры вокруг эксплантата. К 5-м сут величина выроста увеличивается, к концу недели это — огромный пласт эпителиальных клеток под эксплантатом и вокруг него. По ходу пласта видна миграция фибробластических клеточных элементов, образующих характерные «потоки».

При дальнейшем культивировании отмечены процессы миграции и

Матеріал, захищений авторським правом

пролиферации выселяющихся клеточных популяций, на 14-е сут наблюдается превосходящий в несколько раз размеры эксплантата эпителиально-фибробластический монослой, активность пласта регистрируется и на 16-е — 18-е сут.

Развитие эксплантатов кожных лоскутов, экспонированных до замораживания 3 ч в 15%-ном растворе ПЭО-400 в растворе Хенкса, а затем замороженных до —196° С со скоростью 25—35° С/мин и отогретых после хранения, в течение первых 5 сут культивирования демон-

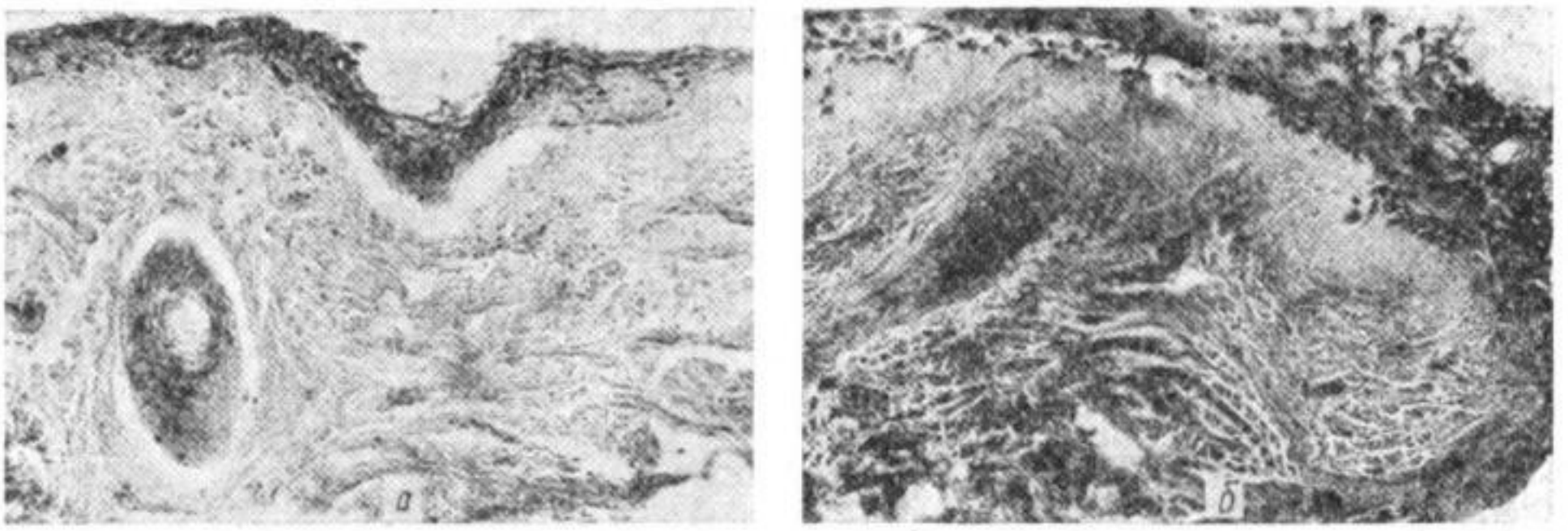


Рис. 2. Эксплантаты криоконсервированной трупной кожи (18 ч гипотермического хранения, 3 ч контакта с 15%-ным раствором ПЭО-400, замораживание со скоростью 25—35° С/мин):

а — 3-ьи сут культивирования; дистрофические изменения в эпидермисе и дерме; *б* — 14-е сут культивирования; реэпителизация. Гематоксилин-эозин, × 100.

стрировало деструктивные процессы, наблюдавшиеся преимущественно в эпидермисе. На протяжении первых 2—3 сут большинство эпидермальных ядер было некротизировано (рис. 2, *а*). При сохранении размеров и формы клеток и их ядер наблюдались повышенная эозинофилия цитоплазмы и крайне слабая базофилия ядер, содержимое которых превратилось в светло-сиреневую тень. Кроме кариолиза, видны явления кариорексиса и пикноза отдельных ядер. На этом фоне в составе эпидермиса имелись клетки, состояние ядер которых мало отличалось от контроля. Подобная же картина наблюдалась в составе эпителиальной выстилки дериватов кожи: наряду с множеством погибших выявлены клетки типичного строения с характерным окрашиванием. Эозинофилия поверхностных слоев эпидермиса была выражена сильнее, чем глубоких. Эпидермис частично отделен от дермы. Последняя имела хорошо сохраненные волокнистые структуры с мало измененными клеточными элементами.

К 5-м сут культивирования эпидермис на большем протяжении был отделен от дермы, при этом практически все ядра в нем лизированы, а окраска — выраженно оксифильная. Линия отторжения неровная, на поверхности базальной мембраны — единичные базальные клетки, выглядящие неизмененными. Состояние волокнистых структур дермы удовлетворительное.

В конце первой — начале второй недели культивирования наблюдалось активное размножение эпителиальных клеток, происходящих в основном из эпителиальной выстилки концевых отделов дериватов кожи и в виде пласта распространяющихся по поверхности дермы (рис. 2, *б*). Пласт был выполнен из крупных светлых полигональных клеток с большим округлым ядром, содержащим несколько ядрышек. На 10-е сут он иногда достигал высоты шести-семи клеток, вертикальная анизотропия была не выражена. Заметна тенденция эпителия не только к распространению вширь по поверхности дермы, но и склонность к образованию небольших воронкообразных выростов в дермы.

В течение второй недели культивирования наблюдалось активное заселение эпителиальными клетками эпидермальной поверхности дермы, которая к 14-м сут была покрыта вновь развившимся эпителием. Одно-

Матеріал, захищений авторським правом

временно с этим наиболее глубокие слои, обнаруживающие тенденцию к врастанию в дерму, сменялись одним-двумя слоями уплощенных клеток, поверхностнее которых лежали полигональные клетки с пикнотичными ядрами. Параллельно выявлялась тенденция эпителиальных клеток к миграции по плоскости среза дермы. В дерме обнаружена тенденция к локальной базофилии волокнистых структур. В последующем происходило незначительное усиление описанных процессов, однако ни полное обрастание дермы эпителиальными клетками, ни формирование рогового слоя не наблюдались.

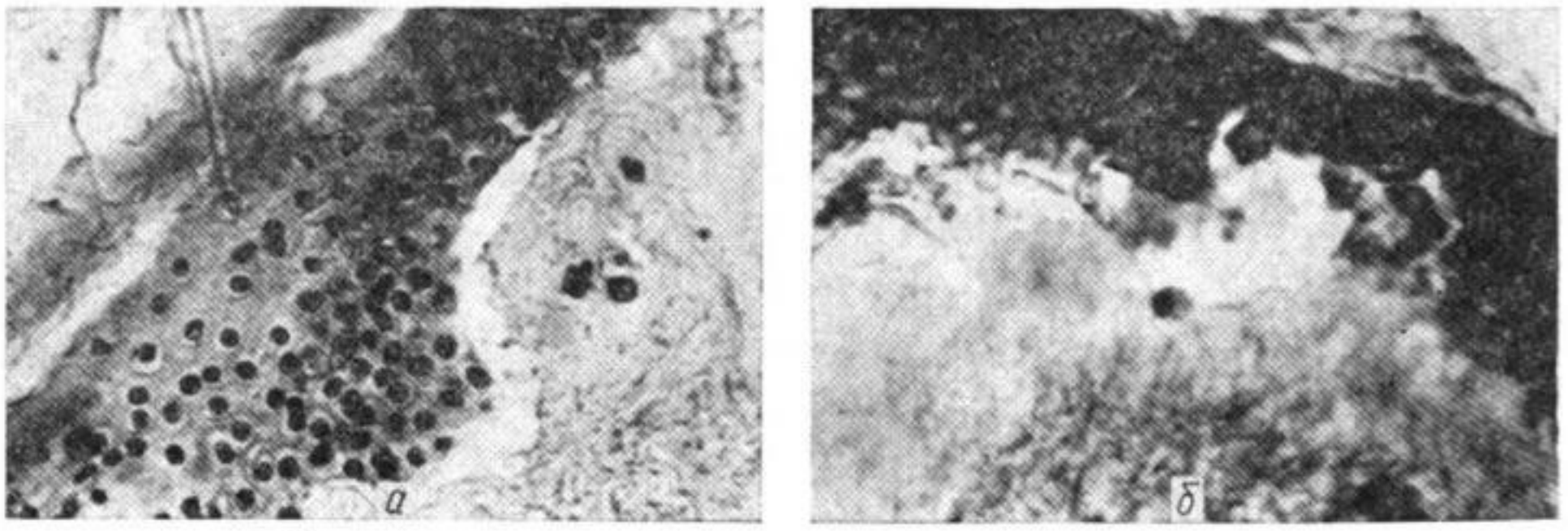


Рис. 3. Эксплантаты криоконсервированной трупной кожи (24 ч гипотермического хранения, замораживание со скоростью 400° С/мин):

а — 2-е сут культивирования; резкий пикноз ядер всех слоев эпидермиса, участки отрыва эпидермиса от дермы; *б* — 5-е сут культивирования; некроз эксплантата. Гематоксилин-эозин, × 100.

Изучение миграции клеточных элементов на поддерживающий фильтр обнаружило только на 10-е сут прикрепившиеся эпителиальные клетки, с 12-х сут наблюдалось выселение фибробластических клеточных элементов.

Кожа, подвергавшаяся действию низких температур прямым погружением в жидкий азот без предварительной обработки криопротектором, сохраняла после оттаивания на водяной бане морфологическое строение, близкое к строению исходного материала.

При помещении в условия органной культуры на 2-е сут в эксплантатах отмечены резкий пикноз и выраженная базофилия сферических ядер всех слоев эпидермиса, исключая зернистые клетки, а также усиление оксифилии цитоплазмы (рис. 3, *а*). Обращают на себя внимание участки, где образовалась щель между эпидермисом и дермой, причем границы отрыва эпидермиса неровные. В дерме обнаруживается деструкция части клеточных элементов.

На 3-ьи сут наблюдали некоторое ослабление базофилии гиперхромных ядер при общем уменьшении размеров клеток. Отмечено значительное разнообразие в состоянии ядер: мозаично располагались пикнотичные гиперхромные сферические, пикнотичные с ослабленной базофилией, ядра в состоянии кариорексиса и практически лизированные, имеющие вид теней. В дерме также происходило разрушение ядер. Заметно расширились щели между эпидермисом и дермой.

На 5-е сут эпидермис практически отделен от дермы, ядра клеток в нем почти все лизированы, ядра клеточных элементов дермы также подверглись деструкции.

Наблюдение за эксплантатами в течение 7—14 сут показало углубление деструктивных процессов: эозинофильный безъядерный эпидермис отделился от разволокненной дермы с погибшими клеточными элементами (рис. 3, *б*).

Обсуждение полученных результатов. Сопоставление морфологии нативных лоскутов трупной кожи и лоскутов, криоконсервированных под защитой 15%-ного раствора ПЭО-400 и без криопротектора, показало, что трупная кожа человека, отогретая после хранения в жидком азоте, гистологически мало отличима от исходной ткани. В процессе

Матеріал, захищений авторським правом

культивирования этого материала выявляются значительные различия в состоянии и развитии эксплантатов в зависимости от тех процедур, которым подвергался материал на этапах консервации. Трупная кожа, служившая исходным материалом для замораживания, активно развивалась в течение срока исследования; наблюдавшиеся в эксплантатах изменения (переход к паракератозу, миграция эпителиальных клеток, тинкториальные свойства) свидетельствовали о прогрессивном характере развития этих эксплантатов до 10—12 сут, после чего дистрофические изменения нарастали. Формирование клеточного пласта вокруг эксплантата на миллипоровом фильтре со 2-х сут характеризуется появлением эпителиальных клеток, с 7-х сут пласт дополнен фибробластическими элементами и увеличивается количественно в течение срока исследования.

Криоконсервированная под защитой 15%-ного раствора ПЭО-400 трупная кожа в течение первой недели культивирования имела признаки деструкции эпидермиса, а затем наступал период регенерации сохранившихся камбиальных клеток, приводивший к эпителизации поверхности дермы. При этом проявлялась тенденция эпителия к вертикальной миграции и образованию многослойной структуры и эпиболии. Изучение поддерживающих миллипоровых фильтров только с 10-х сут обнаружило единичные эпителиальные клеточные элементы, проявляющие тенденцию к формированию эпителиального пласта. Выселение фибробластов наблюдалось с 12-х сут.

При культивировании кожи, охлажденной с высокими скоростями без криопротекции, признаков прогрессивного развития не обнаружено. Наблюдались только процессы аутолиза в имевших механические повреждения эксплантатах. На миллипоровых фильтрах клеточные элементы обнаружены не были.

Особый интерес вызывают результаты культивирования кожных лоскутов, экспонированных перед замораживанием 3 ч в растворе ПЭО-400, которые продемонстрировали при гибели значительного большинства дифференцированных клеточных элементов эпидермиса способность у сохранившихся клеток к репарации и регенерации, наступавших после недельного периода деструктивных изменений. После деструкции, финалом которой является отторжение некротизированной части эпидермиса, наступает фаза активного роста и пролиферации сохранившихся клеточных элементов, локализованных в концевых отделах дериватов кожи и, возможно, рассеянных по базальной мембране жизнеспособных эпидермальных клеток. Пролиферативная стадия восстановительного процесса отодвинута почти на 7-е сут от начала культивирования, что свидетельствует о наличии периода адаптации деконсервированного кожного лоскута. Если пролиферация эпителиальных клеток обнаруживается на 7-е сут, то фибробластические элементы появляются на фильтре на 12-е сут (при культивировании материала, взятого после экспозиции с криопротектором без замораживания,— на 3-и и 7-е сут соответственно), что позволяет определить удлинение латентной фазы в 4—5 сут.

На основании изучения плазмированных культур человеческой и крысиной кож, замороженных до —196° С под защитой ДМСО, показано, что при удачном выборе метода консервации латентная фаза может быть сведена к периоду адаптации, свойственному нативной коже [4]. Сходные данные получены при культивировании нативной и криоконсервированной под защитой 15%-ного раствора ПЭО-400 донорской кожи человека [1]. Напротив, при тканевом культивировании консервированной без защитных веществ при —79° С кожи обнаружена латентная фаза длительностью от 5—7 до 20—50 сут [2]. Разница в протяженности адаптационного периода свидетельствует о существенных отличиях в интенсивности и уровне падения обменных процессов и зависит, видимо, от количества и характера накопленных промежуточных метаболитов или периода времени, необходимого для реадаптации неко-

Матеріал, захищений авторським правом

торых энзимов [5]. Представляется вероятным, что длительность латентной фазы роста в культуре деконсервированной после различных способов замораживания — отогрева кожи существенно зависит от конкретных условий криоконсервирования и культивирования. Очевидно, что, помимо времени, необходимого для адаптации нативных пережи-вающих тканей и клеток к новым условиям существования, необходим дополнительный период, в течение которого процессы, вызванные действием факторов низкотемпературного консервирования, приведут к гомеостазу биологического объекта на новом уровне. Возобновление цепи ферментативных реакций и физиологических функций происходит неодновременно с оттаиванием, и это удлиняет период адаптации [2].

На основании приведенных данных, приняв во внимание многофакторность повреждения низкими температурами, вряд ли представляется возможным теоретически определить длительность латентной фазы после криоконсервации. Возможно, оптимальным является действительно подбор таких условий консервации, при которых деконсервированная кожа растет максимально сходно с нативной, хотя удлинение латентной фазы роста при эксплантации деконсервированной ткани выглядит достаточно обоснованным и отражает одно из биологических свойств такого материала.

Следовательно, изучаемый биологический объект в процессе замораживания — отогрева подвергается значительным структурно-функциональным изменениям, проявляющимся при культивировании. Если охлаждение до азотных температур производили без применения защитных веществ, деконсервированная ткань полностью теряет способность к восстановлению как элементарных, так и специфических функций в культуре. Применение замораживания со скоростью охлаждения 25—35° С/мин под защитой 15%-ного раствора ПЭО-400 обеспечивает сохранность некоторых функциональных свойств базальных эпидермоцитов выстилки концевых отделов дериватов кожи: после периода отторжения некротизированной верхней части эпидермиса наблюдается активная пролиферация эпидермоцитов, приводящая к эпителизации обнаженной поверхности дермы и формированию многослойной структуры. Это является доказательством сохранности после криоконсервации элементарных клеточных свойств эпидермоцитов — способности к пролиферации, росту и миграции. При вертикальной миграции эпидермоцитов (в норме являющейся процессом сложной дифференцировки, завершающейся ороговением) в культивированной деконсервированной ткани не проявляются убедительные признаки кератинизации. Возможно, причиной недостаточности такой тканеспецифической функции эпидермальных клеток, как способность к ороговению, являются повреждения в процессе криоконсервации.

1. *Волкова Н. А., Сандомирский Б. П., Бронштейн В. Л., Панков Е. Я.* Оценка криоконсервирования кожи методом органной культуры.— Ортопед. травматология, 1978, № 1, с. 58—60.
2. *Лівшиць В. Л.* Анабіотична консервація шкіри і гомопластика її при опіках.— К. : Здоров'я, 1970.— 196 с.
3. *Лурия Е. А., Пьянченко И. Е.* Культивирование лимфатических узлов морских свинок в органных культурах на среде с гомологичной сывороткой.— Бюл. эксперим. биологии и медицины, 1967, № 6, с. 81—84.
4. *Athreya B. H., Grimes E. L., Lehr H. B. et al.* Differential susceptibility of epithelial cell and fibroblasts of human to freese injury. Report on an improved method for storage of human skin at —196° C.— Cryobiology, 1969, 5, N 4, p. 262—269.
5. *Paul J.* Cell and tissue culture.— Edinburg — London : Livingstone, 1960.— 320 p.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
06.10.81

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043.547.422 : 618

В. Ф. Карташов, М. М. Гучок

О БЕЗОПАСНОСТИ МАЛЫХ ДОЗ ПОЛИЭТИЛЕНОКСИДА-1500 В ПЕРИОД БЕРЕМЕННОСТИ

Полиэтиленоксиды (ПЭО) широко применяются в современной медицинской и фармацевтической практике [5, 10]. В последнее время показано, что ПЭО обладают рядом важных биологических свойств, обусловливающих возможность и необходимость их парэнтерального введения в организм человека. Так, достаточно высокая криозащитная активность ПЭО со средней молекулярной массой 1500 [10, 13] и низкая его токсичность [3, 17] определили возможность его использования в качестве криопротектора для низкотемпературного консервирования эритроцитов человека, не требующего отмывания перед введением размороженных клеток в организм [9]. Кроме того, выраженная способность ПЭО-1500 понижать внутриглазное давление открывает определенные перспективы его применения в офтальмологической практике [1]. Использование размороженных эритроцитов вместе с криопротектором и ПЭО-1500 в офтальмологической клинике перспективно и в практике лечения беременных женщин.

Однако в доступной нам литературе не удалось найти сведений об изучении эмбриотоксической и тератогенной активности ПЭО-1500. Известные данные Смит и др. [16] о том, что ПЭО-1500 при длительном его введении внутрь не вызывает существенного нарушения в развитии потомства белых крыс, приводя лишь в больших дозах к некоторому (до 9%) снижению веса молодых животных, и сведения о незначительной (менее 2%) всасываемости ПЭО-1500 из желудочно-кишечного тракта [15] не позволяют судить о влиянии ПЭО-1500 на внутриутробное развитие плода. Вместе с тем известно, что окись этилена (исходный продукт синтеза ПЭО) вызывает нарушения в хромосомном аппарате клетки, оказывает мутагенное действие на соматические и половые клетки [2], а также обладает тератогенной активностью при внутривенном введении мышам в дозе 150 мг/кг [14].

Все это явилось основанием для настоящего исследования, посвященного изучению влияния малых доз ПЭО-1500 на внутриутробное развитие плода.

Методы исследования. Опыты проведены на беспородных белых крысах — самках массой 200—250 г. Для получения крыс с точно установленным сроком беременности к самкам на ночь подсаживали самцов в соотношении 3 : 1. На утро вагинальные мазки самок окрашивали по Романовскому и исследовали микроскопически. Обнаружение сперматозоидов в мазке на фоне микроскопической картины стадии эструс считали критерием первого дня беременности (ДБ). В течение всего эксперимента беременные самки содержались на обычной диете вивария по одной в клетке.

Животные были разделены на две группы. Самкам опытной группы ежедневно в течение всей беременности вводили ПЭО-1500 в дозе 1/20 ЛД-50 (0,58 г/кг) в виде 20%-ного раствора, приготовленного на 0,9%-ном растворе хлористого натрия. Контрольным крысам в том же режиме вводили соответствующие объемы физиологического раствора. В ходе исследования животных систематически взвешивали и следили за их общим состоянием.

В конце беременности (на 20-й ДБ) крыс забивали путем декапитации под легким эфирным наркозом. При вскрытии подсчитывали число желтых тел беременности в обоих яичниках, число мест имплантации в матке, количество жизнеспособных и мертвых плодов и число резорбций. Предимплантационную гибель определяли по разности между количеством желтых тел беременности и мести имплантаций в процентах

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 1. **Характеристика эмбриотропного**

Серия опытов	Число желтых тел беременности	Число мест имплантации	Количество резорбций			
			до имплантации		после имплантации	
			абсолютное	% к числу желтых тел	абсолютное	% к числу имплантаций
ПЭО-1500 ($n = 13$)	141 / 10,85 ±0,53	128 / 9,85	13 / 1,00	9,22 ±4,07	8 / 0,62	6,25 ±2,32
p	>0,1	—	—	>0,5	—	>0,5
0,9%-ный NaCl ($n = 11$)	123 / 11,18 ±0,61	111 / 10,09	12 / 1,09	9,76 ±4,37	9 / 0,82	8,11 ±2,32

Примечание. Над чертой дроби — общее число, под чертой — из расчета на одну самку.

от общего числа желтых тел. Постимплантационную гибель зародышей вычисляли по количеству резорбированных и мертвых плодов в процентах от числа имплантаций. Общую эмбриональную смертность рассчитывали по Малашенко и Егорову [8].

Жизнеспособные плоды тщательно осматривали под стереоскопическим микроскопом МБС-2 с целью выявления внешних аномалий, определяли краниокаудальные размеры плодов. Плаценты и плоды взвешивали.

Половину плодов каждого помета фиксировали в жидкости Буэна с последующим исследованием состояния внутренних органов плодов методом Уилсона в модификации Дыбана [6]. Остальные плоды фиксировали в 95%-ном спирте с дальнейшим изучением скелета на тотальных препаратах плодов, окрашенных ализариновым красным «С» по Доусону в модификации Дыбана [6]. При помощи стереомикроскопа измеряли длину участков окостенения в диафизах длинных трубчатых костей и подсчитывали число оссифицированных позвонков, ребер, костей пясти и плюсны, участков окостенения грудины.

Полученные данные обработаны статистически по Стьюденту—Фишеру.

Результаты и их обсуждение. Для изучения опасности развития эмбриотоксического и тератогенного эфекта при введении ПЭО-1500 в организм больного в эксперименте на крысах нами была выбрана доза, приблизительно соответствующая количеству криопротектора, вводимого реципиенту на 1 кг веса при однократной трансфузии 250 мл деконсервированной эритроцитной взвеси. Такой выбор дозы для тестирования эмбриотропного действия препарата отвечает рекомендациям ВОЗ [11]. Поскольку в настоящее время наиболее оптимальной схемой тестирования принято считать длительное введение препарата в период эмбриогенеза [12], мы в качестве режима воздействия в опыте выбрали ежедневное внутрибрюшинное введение ПЭО-1500 в указанной выше дозе на протяжении всего периода беременности.

Данные вскрытия самок на 20-й ДБ представлены в табл. 1. Сравнение числа желтых тел беременности в яичниках показывает, что самки опытной и контрольных групп обладали одинаковой способностью к зачатию. Из приведенных в таблице данных видно, что введение ПЭО-1500 в данном режиме не приводило к увеличению пред- и постимплантационной гибели плодов, а также общей эмбриональной смертности или уменьшению массы и размеров плодов и массы плаценты по сравнению с контролем. Сопоставляя эти данные с показателями изменения живого веса крыс в течение всей беременности (табл. 2) и учитывая тот факт, что на протяжении всего эксперимента по общему состоянию животные опытной группы не отличались от контрольных, можно считать,

Матеріал, захищений авторським правом

действия ПЭО-1500

Число жизнеспособных плодов	Число мертвых плодов	Общая эмбриональная смертность	Средняя масса плода, г	Средняя длина плода, см	Средняя масса плаценты, г
120 9,23	0	14,89 ±3,93	2,96 ±0,09	3,55 ±0,04	0,620 ±0,01
—	—	>0,5	>0,5	>0,5	>0,5
102 9,27	1 0,09	17,07 ±4,77	3,00 ±0,09	3,52 ±0,04	0,619 ±0,03

что ПЭО-1500 при введении в данном режиме не оказывает выраженного общетоксического действия на организм беременных крыс. Эти данные согласуются со сведениями о том, что длительное введение ПЭО-1500 в данной дозе в организм животных не вызывает морфофункциональных изменений [3, 4, 7].

Таблица 2. **Динамика веса (% от начального) беременных крыс при введении ПЭО-1500**

Серия опытов	День			
	1-й	7-й	14-й	20-й
ПЭО-1500 (n = 13) p	100 (240,0±6,18 г) >0,5	105,3 ±1,15 >0,1	108,9 ±1.41 >0,25	125,6 ±4,29 >0,5
0,9%-ный NaCl (n = 11)	100 (237,8±8,71 г)	103,0 ±0,64	107.4 ±1,46	127,2 ±1,39

При осмотре нативных плодов под бинокулярным стереомикроскопом внешних аномалий развития не обнаружено.

Изучение состояния внутренних органов фиксированных плодов методом Уилсона также не выявил морфологических отклонений от нормы.

Данные изучения тотальных препаратов плодов методом Доусона, приведенные в табл. 3, позволяют заключить, что ПЭО-1500 в данных

Таблица 3. **Показатели оссификации скелета плодов после введения ПЭО-1500 беременным крысам**

Серия опытов		ПЭО-1500 (n = 62)	p	0,9%-ный NaCl (n = 40),
Количество	Позвонки	31,81 ±0,39	>0,5	32,08 ±0,40
	Пары ребер	13,0 ±0	>0,5	13,0 ±0
	Участки окостенения грудины	3,92 ±0,30	>0,5	3,78 ±0,38
	Кости пясти	2,87 ±0,16	>0,1	3,20 ±0,11
	Кости плюсны	3,13 ±0,18	>0,1	3,48 ±0,12
Длина кости, мм	Плечевая	2,82 ±0,09	>0,5	2 85 ±0,09
	Локтевая	2 85 ±0,10	>0,5	2,87 ±0,10
	Лучевая	2,20 ±0,07	>0,5	2,23 ±0,07
	Бедренная	2,17 ±0,09	>0,5	2,14 ±0,09
	Большая берцовая	2,23 ±0,09	>0,5	2,30 ±0,09
	Малая берцовая	2,22 ±0,09	>0,5	2,17 ±0,11

Матеріал, захищений авторським правом

условиях опыта не вызывал изменения степени и характера оссификации скелета плодов.

Следовательно, полученные данные позволяют сделать вывод о том, что ПЭО-1500 при ежедневном парэнтеральном введении крысам в дозе 1/20 ЛД-50 (0,58 г/кг) в течение всей беременности не оказывает повреждающего действия на развитие плода и организм самки.

Необходимо, однако, отметить, что отсутствие эмбриотоксического и тератогенного эффекта ПЭО-1500, установленное в примененных условиях опыта, еще не позволяет достаточно полно обосновать безопасность введения этого препарата в организм в период беременности, из чего следует необходимость дальнейшего изучения особенностей протекания антенатального развития плода в условиях введения ПЭО в организм во время беременности.

1. *Бездетко П. А.* Экспериментальное исследование влияния полиэтиленоксида-1500 на внутриглазное давление.— Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8, с. 75—79.
2. *Вредные* вещества в промышленности.— Л.: Химия, 1976.— Т. 1. 590 с.
3. *Гучок М. М., Верховский Б. А., Козлова В. Ф. и др.* О токсичности полиэтиленоксида-1500.— В кн.: Тез. докл. 3-го съезда фармакологов УССР, Винница, 1977, с. 52—54.
4. *Гучок М. М., Верховский Б. А., Мазалов В. К. и др.* О влиянии полиэтиленоксида молекулярного веса 1500 на функцию печени и свертываемость крови.— Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 71—73.
5. *Дашевская Б. И., Глузман М. Х., Бодня В. М.* Полиэтиленоксиды и их применение в фармации.— Обзор. информ. / ЦБНТИ; М-во мед. пром-сти. Сер. Хим.-фармац. пром-сть, 1974, вып. 2, с. 5—27.
6. *Дыбан А. П., Баранов В. С., Акимова И. М.* Основные методические подходы к тестированию тератогенной активности химических веществ.— Архив анатомии, гистологии и эмбриологии, 1970, **59**, № 10, с. 89—100.
7. *Козлова В. Ф., Гучок М. М., Щетинский И. М., Верховский Б. А.* Патоморфологическая оценка влияния криопротектора — полиэтиленоксида молекулярного веса 1500 — на организм животных.— Криобиология и криомедицина, 1978, вып. 4, с. 68—71.
8. *Малашенко А. М., Егоров И. Е.* Доминантные летали у инбредных мышей под действием этиленимина.— Генетика, 1967, № 3, с. 59—68.
9. *Пушкарь Н. С., Шраго М. И., Бредихина Л. П. и др.* А. с. 560613 (СССР). Способ консервирования эритроцитов.— Опубл. в Б. И., 1977, № 21.
10. *Пушкарь Н. С., Шраго М. И., Белоус А. М., Калугин Ю. В.* Криопротекторы.— Киев : Наук. думка, 1978.— 201 с.
11. *Принципы* испытания лекарственных средств на тератогенность.— Женева : ВОЗ, 1968.— 23 с.— (Докл. науч. группы ВОЗ. Сер. техн. докл.; № 364).
12. *Смольникова Н. М., Голованова И. В., Пройнова В. А., Скосырева А. М.* К вопросу об оценке влияния лекарственных средств на эмбриогенез.— В кн.: Тез. докл. Всесоюз. учред. конф. по токсикологии. М., 1980, с. 130.
13. *Шраго М. И.* О криозащитном действии полимеров окиси этилена на эритроциты человека при глубоком замораживании : Автореф. дис. ... д-ра биол. наук.— Харьков, 1971.— 32 с.
14. *La Borde J. B., Kimmel C. A.* The teratogenicity of ethylene oxide administered intravenously to mice.— Toxicol. Appl. Pharmacol., 1980, **56**, N 1, p. 16—22.
15. *Shaffer C. B., Critchfield F. H.* The absorption and excretion of the solid polyethylene glycols ("Carbowax" compounds).— J. Amer. Pharmacol. Assoc. Sci. Ed., 1947, **36**, N 5, p. 152—157.
16. *Smyth H. F., Carpenter Ch. P., Shaffer C. B.* The toxicity of high molecular weight polyethylene glycols; chronic oral and parenteral administration.— J. Amer. Pharmacol. Assoc. Sci. Ed., 1947, **36**, N 5, p. 157—160.
17. *Smyth H. F., Carpenter Ch. P., Well C. S.* The toxicology of the polyenthylene glycols.— J. Amer. Pharm. Assoc. Sci. Ed., 1950, **39**, N 6, p. 349—354.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
04.11.81

Матеріал, захищений авторським правом

III. КРИОМЕДИЦИНА

УДК 57.043

В. М. Чередниченко, П. А. Бездетко, Ю. Л. Станиславский

ОПЫТ ЛЕЧЕНИЯ ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ ВЕК С ПОМОЩЬЮ УНИВЕРСАЛЬНОЙ КРИООФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКОЙ УСТАНОВКИ УМ-14

Методы криохирургии и криотерапии в последние годы получили широкое применение в офтальмологии. В свою очередь это послужило дальнейшим стимулом к конструированию и производству все более технически совершенной, простой и надежной в обращении криоофтальмологической аппаратуры. За рубежом криоофтальмологические установки серийно производятся многими фирмами [5—7]. Выбор отечественной офтальмологической криотехники пока весьма ограничен [1—3]. Физико-техническим институтом низких температур АН УССР в содружестве с кафедрой офтальмологии Украинского института усовершенствования врачей разработана универсальная криоофтальмологическая установка УМ-14 [4], работающая от двух стандартных 10-литровых баллонов с закисью азота. Комплект из пяти сменных криоинструментов позволяет с помощью установки УМ-14 производить различные криоманипуляции на глазном яблоке и его придатках: криоэкстракцию катаракты, криопексию отслойки сетчатой оболочки, криоциклотермию, криодеструкцию новообразований век, конъюнктивы, роговицы, сосудистой и сетчатой оболочек. Конструкция аппарата обеспечивает широкий диапазон рабочих температур (от 0 до —80° С), быстрый выход в режим охлаждения и почти мгновенное отмораживание. Криоинструмент помещается на объект криовоздействия до охлаждения, благодаря чему значительно упрощается техника криоманипуляций.

В Харьковской офтальмологической клинической больнице № 14 им. проф. Л. Л. Гиршмана в процессе апробации криоустановки УМ-14 проведено лечение 127 больных, в том числе 29 с доброкачественными новообразованиями век: ангиомами, папилломами, фибромами.

С гемангиомами век наблюдалось 14 больных. У всех гемангиомы были врожденными. Капиллярная гемангиома была у девяти больных. ветвистая — у одного, кавернозная — у четырех. Для криотерапии мы считали показанными гемангиомы с поверхностным расположением и небольшими (2—10 мм) размерами. Возраст больных — от 2 мес до 6 лет. Локализация гемангиом характеризовалась преимущественным их расположением в наружной половине века. Только у двух больных гемангиомы располагались в области ресничного края.

При выборе метода криовоздействия мы руководствовались общепринятыми в отечественной и зарубежной практике рекомендациями [1, 7]. Температура рабочей части криоинструмента —80° С, длительность аппликации 30 с, число криоаппликаций определялось размерами гемангиомы и составляло от одной до 15—20 в один сеанс. Количество сеансов — от одного до пяти с интервалом 5—7 дней. Хорошие непосредственные результаты (исчезновение гемангиомы с образованием нежного атрофического рубца) получены у 11 больных. У двух больных отмечено уменьшение размеров опухоли. Лишь у одного больного криоаппликации аппаратом УМ-14 не дали эффекта и в дальнейшем была произведена операция. Отдаленные результаты прослежены у 10 больных со сроком наблюдения до 6 мес. Рецидивов новообразования не было.

Следует отметить удобство и простоту обращения с аппаратом УМ-14. Криоаппликатор создавал строго локальное замораживание без

Матеріал, захищений авторським правом

повреждения соседних здоровых тканей. Возможность быстрого отмораживания инструмента позволила во всех случаях избежать повреждений сосудов и кровотечений. Наличие в аппарате регулировки степени охлаждения криоинструмента обеспечивало в каждом случае воспроизводимость условий криовоздействия.

15 больным криоаппликации аппаратом УМ-14 произведены по поводу папиллом кожи и ресничного края век. У 10 больных были единичные, у пяти — множественные папилломы. Показанием к криовоздействию послужило широкое основание папиллом, а также их расположение на ресничном крае, что при других методах лечения (иссечение, диатермокоагуляция) привело бы к рубцовой деформации века. Для криовоздействия на папилломатозные образования наконечник криоинструмента охлаждался до —80° С, продолжительность каждой аппликации — от 10 до 20 с. Количество аппликаций от 5 до 10 в один сеанс.

У пяти больных после первого же сеанса криовоздействия наступило отторжение папилломатозной ткани с последующим образованием нежного рубчика. Семи больным потребовалось от двух до пяти сеансов, трем больным с твердыми папилломами на плотной соединительнотканной основе произведено более пяти повторных криоаппликаций. В итоге у всех леченых больных наступило полное клиническое выздоровление с хорошим функциональным и косметическим эффектом.

Простота работы с криоустановкой УМ-14 побудила нас применить ее для лечения контагиозного моллюска у детей. Всего проведено 22 наблюдения над больными в возрасте от 2 до 16 лет. Криоаппликации производились криоинструментом с диаметром рабочей части наконечника 2 мм, температура криовоздействия — —60°, —80° С, продолжительность 10—15 с. У всех больных после одной-двух криоаппликаций наступило выздоровление. Рецидивов заболевания не было отмечено на протяжении последующего шестимесячного наблюдения.

Опыт работы с универсальной криоофтальмологической установкой УМ-14 показал, что ее с успехом можно использовать для лечения различных доброкачественных новообразований век в амбулаторных условиях.

1. *Абрамов В. Г., Артамонов В. П.* Применение холода в офтальмологии.— Ярославль : Верх.-Волж. кн. изд-во, 1973.— 150 с.
2. *Кандель Э. И.* Криохирургия.— М. : Медгиз, 1974.— 234 с.
3. *Коленко Е. А.* Термоэлектрические охлаждающие приборы.— Л. : Наука, 1967.— 283 с.
4. *Муринец-Маркевич Б. Н., Осипов В. Я., Чередниченко В. М.* А. с. 718100 (СССР). Криохирургическая установка.— Опубл. в Б. И., 1980, № 8.
5. *Amoils S. P.* The joule Thompson Retinal cryopencils.— Arch. Ophthal., 1968, 80, N 1, p. 128—131.
6. *Matthaus W., Krantz H.* Kryotherapie in der Augen Heilkunde.— Dresden, 1973.— 202 S.
7. *Moreau P. G., Haut J.* Cryoophtalmologie.— Paris, 1971.— 724 p.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,
Харьковская офтальмологическая
клиническая больница № 14
им. проф. Л. Л. Гиршмана

Поступила в редколлегию
30.10.81

УДК 57.043.618.146—08 : 615.832+612.014

В. Н. Запорожан, О. В. Хаит, А. Б. Рикберг, Э. А. Бакай

КРИОУЛЬТРАЗВУКОВАЯ ТЕРАПИЯ ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ШЕЙКИ МАТКИ

Опыт применения холода в различных областях медицины дает основание считать криогенный метод лечения одним из наиболее универсальных, а такие его свойства, как безболезненность, бескровность, ми-

Матеріал, захищений авторським правом

нимальная травматичность и т. п., определяют его высокую эффективность [4, 10, 11]. Так, применение криохирургии в гинекологии значительно расширило возможности последней, в частности при лечении патологических процессов шейки матки [2, 5, 9, 11]. Однако наряду с достоинствами имеются и определенные ограничения метода, связанные с неполной девитализацией отдельных клеток после однократного криовоздействия, трудностью прогноза площади крионекроза, так как последняя всегда меньше площади зоны замораживания [3, 12, 13]. Также необходимо отметить, что скорость регенерации тканей после криовоздействия, например, на шейку матки незначительно превышает таковую после других методов лечения, в частности диатермокоагуляции, а срок полной эпителизации достаточно велик (от 4 до 12 недель в зависимости от глубины и распространенности зоны криодеструкции) [2, 4, 11].

В настоящее время появились экспериментальные и ограниченные клинические данные о возможности усиления криоповреждения патологически измененных тканей путем комбинированного применения двух физических факторов — низких температур и ультразвука малой интенсивности, причем последний применялся как до основного воздействия, так и на стадиях замораживания и оттаивания.

Одновременно установлено, что при предварительном озвучивании ткани ультразвуком скорость образования некроза повышается [6, 8].

Целью настоящего исследования явилось изучение возможности потенцирования криоповреждения ультразвуком, различных методик комбинированного криоультразвукового воздействия, величины деструкции и скорости регенерации тканей в зависимости от примененной методики воздействия при лечении патологии шейки матки.

Под нашим наблюдением находилось 150 женщин в возрасте от 18 до 50 лет (средний возраст $28{,}1 \pm 0{,}3$ года), страдавших предраковыми заболеваниями шейки матки, которые нами были классифицированы как эктопия, зона превращения, лейкоплакия и основа лейкоплакии, посткоагуляционный синдром, эктропион, гипертрофия и деформация шейки матки. Всем больным диагноз был установлен после простой и расширенной кольпоскопии. Сорока восьми женщинам дополнительно была осуществлена прицельная биопсия шейки матки с последующим морфологическим исследованием биоптата. В результате гистологического исследования кольпоскопический диагноз был подтвержден в 43 случаях. У пяти больных наряду с участками железисто-папиллярной псевдоэррозии были выявлены очаги утолщения эпителия с небольшими дозами кератинизации, различная степень активности базальных клеток, что свидетельствует о развитии эпителиальной атипии. Средняя длительность заболевания с момента обнаружения — $2{,}8 \pm 0{,}4$ года. Ранее лечились традиционными методами 97 (64,6%) женщин, из них тампонами и ванночками — 65 (43,3%), диатермокоагуляцией — 21 (14%), тампонами с последующей диатермокоагуляцией — девять (6%), двум больным (1,3%) хирургическим путем удаляли полипы шейки матки. Жалобы на бели предъявляли 63 (42%), на боли внизу живота и в области поясницы — 10 (0,7%), на сочетание болей и белей — 15 (10%), на контактные кровомазания — 24 (16%). У остальных 48 (32%) патология шейки матки была выявлена при профосмотре, жалоб больные не предъявляли. Хроническим воспалением придатков страдала 61 (40,6%) больная, кондилломами вульвы — три (2%), оперированы по поводу фибромиомы матки — две (1,3%), по поводу кисты яичника — одна (0,7%). Менструальный цикл не был нарушен у 134 (89,4%) больных, находились в менопаузе — две (1,3%), у двух (1,3%) не было менструаций вследствие ампутации матки по поводу миомы, у 12 (8%) наблюдались нарушения менструального цикла. В анамнезе 93 (62%) женщин — роды и аборты, 29 (19,3%) — рожали, но абортов не делали, 19 (12,7%) не беременели (предохранялись), девять (6%) сделали по одному аборту.

Матеріал, захищений авторським правом

Из общего числа больных 120 были подвергнуты комбинированному криоультразвуковому воздействию, а 30 — изолированному криогенному.

Из 120 больных 30 больным проводилось комбинированное воздействие с предварительным озвучиванием тканей перед замораживанием, 30 — одновременное криоультразвуковое, 30 — одновременное криоультразвуковое с последующим озвучиванием в фазе оттаивания и 30 больным ультразвук применяли до,. во время и по окончании криогенного воздействия. Во всех группах равномерно распределялись больные с перечисленными выше видами патологии.

Операции осуществлялись инструментом, позволяющим производить криогенное и ультразвуковое воздействие.

В качестве хладагента использовали жидкий азот (температура —196° С). Для озвучивания использовали ультразвуковые колебания интенсивностью 0,3 Вт/см² в непрерывном режиме.

Больную укладывали в гинекологическое кресло, шейку матки обнажали в зеркалах. Проводили простую и расширенную колькоскопию. Ультразвуковой излучатель обрабатывали вазелином для создания контактной среды. Поверхность инструмента приводили в соприкосновение с шейкой матки таким образом, что криозонд погружался в цервикальный канал на глубину 6 мм. Включали вакуумный отсос, подсоединенный к зонду, чем достигался полный контакт инструмента и ткани. На этом все подготовительные мероприятия заканчивались.

Воздействие проводили по одной из следующих методик: 1 — предварительное озвучивание патологически измененных тканей в течение 3 мин, интервал — 3 мин, криовоздействие — 4 мин; 2 — одновременное криоультразвуковое воздействие в течение 4 мин, т. е. озвучивание тканей на стадии замораживания; 3 — одновременное криоультразвуковое воздействие в течение 4 мин с последующим озвучиванием замороженной ткани в течение всего периода оттаивания (6 мин); 4 — предварительное озвучивание патологически измененной ткани в течение 3 мин, интервал 3 мин, одновременное криоультразвуковое воздействие в течение 4 мин и озвучивание замороженной ткани в течение всего периода оттаивания.

Изолированное криогенное воздействие проводили тем же криоультразвуковым инструментом, без включения ультразвукового генератора в течение 4 мин.

В послеоперационном периоде проводили простую и расширенную кольпоскопию на 1-е, 3-ьи, 7-е, 14-е, 21-е и 45-е сут. Учитывали диаметр образовавшегося струпа, который измеряли специально изготовленным на базе штангель-циркуля инструментом, точность измерения которого 0,1 мм, по ранее применявшейся методике [4], а также внешний вид струпа, время его образования и отторжения, время завершения эпителизации. Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики. Достоверность различий полученных данных определяли по таблицам Стьюдента—Фишера.

Как известно, деструктивный эффект при криовоздействии вызывается суммарным действием замораживания — оттаивания (образование вне- и внутриклеточных кристаллов льда, их перегруппировка и рост в процессе кристаллизации) и результатом последствий сосудистого стаза, а также других реактивных явлений [4, 10, 11]. Влияя на отдельные звенья процесса криоповреждения, возможно вызвать усиление последнего. Предполагается, что при криоультразвуковом воздействии реализуется ряд механизмов, определяющих большую степень повреждения, чем при изолированном криогенном [6—8]. Усиление степени криодеструкции может быть связано с влиянием ультразвука на зарождение и рост кристаллов и образование мелкодисперсной кристаллической структуры (реализуется в основном на этапе замораживания), возможна интенсификация рекристаллизации в ультразвуковом поле (наиболее существенно на этапе оттаивания). Имеют также значение сенсибили-

Матеріал, захищений авторським правом

зация клеток к ультразвуку и задержка включений защитных реакций на криовоздействие (наибольшее влияние оказывает при предварительном озвучивании тканей).

В результате клинических исследований было установлено, что в группе больных, состоящей из 30 женщин, которым проводилось изолированное криогенное воздействие, крионекроз сформировался на 3-и — 4-е сут, по форме зона деструкции соответствовала зоне замораживания, диаметр ее составлял 22,0 ± 0,5 мм. Полная эпителизация тканей шейки матки наступала через 6,5 ± 0,5 недель.

При криоультразвуковом воздействии диаметр зоны замораживания, как и при изолированном криогенном, был равен 30 мм. Некроз формировался на 2-е — 3-ьи сут послеоперационного периода, диаметр его составлял 30,0 ± 1,0 мм. Таким образом, при всех режимах комбинированного воздействия диаметры зон замораживания и последующего крионекроза практически совпадали, что является результатом усиления криоповреждения по поверхности.

Установлено, что глубина некроза, образующегося после замораживания ткани, изменялась в зависимости от примененной методики воздействия. Через 30—50 мин после окончания операции начинается отек. Ткань становится цианотичной, блестящей, происходит выпотевание тканевой жидкости. Все эти процессы, вероятно, связаны с параличем нервных окончаний, повышением сосудистой проницаемости. В результате повреждения тканей и нарушения сосудистой стенки в кровь поступает небольшое количество тканевой жидкости, а вместе с ней и тканевого фактора липидной природы, что влечет за собой цепь биохимических реакций, вызывающих превращение фибриногена в фибрин [1, 12]. Поверхность шейки матки покрывается белой эластичной пленкой, состоящей, как показали наши морфологические исследования, из белка и фибрина. Толщина последней косвенно зависит от объема поврежденной ткани и степени деструкции. Как уже отмечалось, на 2-е — 3-ьи сут послеоперационного периода формируется струп, который отторгается в более ранние сроки, если некроз захватывает только эпителий и поверхностные слои подлежащей ткани, и в более поздние, если некроз проникает в глубоколежащие слои. После комбинированного криоультразвукового воздействия с предварительным озвучиванием образуется белый эластичный струп, который отторгается самостоятельно на 6-е — 8-е сут одномоментно. Регенерация эпителия идет от периферии к центру. В результате одновременного криоультразвукового воздействия струп образуется несколько массивней, отторгается одномоментно на 10-е — 14-е сут. Наиболее глубоко повреждающими оказываются режимы, при которых озвучивание происходит как в период замораживания, так и в период оттаивания. В этих случаях образующийся струп массивный, бугристый, зеленоватого цвета со специфическим некротическим запахом, плотно припаян к подлежащей ткани. Отторгается некротическая ткань по частям. Регенерация плоского эпителия происходит под струпом с последующим отторжением его по периферии.

Сроки регенерации представлены в таблице, из которой следует, что в результате применения режима с предварительным озвучиванием скорость регенерации достоверно увеличивается по сравнению с таковой при других режимах, а также при изолированном криогенном воздействии. Аналогичная картина наблюдается и при одновременном воздействии низкими температурами и ультразвуком. В этом случае скорость регенерации выше, чем при криовоздействии, а также при применении ультразвука в фазах замораживания и оттаивания. Применение последних режимов не вызывает значительного ускорения регенерации, что связано, вероятно, с их выраженным деструктивным эффектом.

Анализ результатов лечения больных с доброкачественными образованиями шейки матки показал, что пяти больным, страдавшим распространенной как по поверхности, так и в глубину формой патологии

Матеріал, захищений авторським правом

Сроки регенерации тканей шейки матки после криогенного и криоультразвукового воздействий

Методика воздействия	Количество больных	Сроки регенерации (недели) $M \pm m$	Достоверность различий p
Изолированное криовоздействие	30	6,5±0,5	
Предварительное озвучивание тканей (3 мин) с последующим криовоздействием через 3 мин	30	3,5±0,3	$p_{1-2}<0{,}001$
Одновременное криоультразвуковое воздействие	30	4,5±0,3	$p_{1-3}<0{,}01$
Одновременное криоультразвуковое воздействие с последующим озвучиванием в фазе оттаивания	30	5,6±0,4	$p_{2-4}<0{,}001$
Предварительное озвучивание, одновременное криоультразвуковое воздействие с последующим озвучиванием в фазе оттаивания	30	5,0±0,2	$p_{1-5}<0{,}01$ $p_{2-5}<0{,}001$

(папиллярная эктопия и лейкоплакия), потребовалось повторное воздействие в связи с невозможностью одновременного промораживания всего патологического очага при однократном криовоздействии.

У трех больных, которым производилось комбинированное воздействие с предварительным озвучиванием тканей ультразвуком, а у четырех — после криогенного воздействия наблюдалось неполное излечение таких видов патологии, как посткоагуляционный синдром и зона превращения. Излечение наступило после повторного криоультразвукового воздействия, причем применили методику с озвучиванием тканей на стадиях замораживания и оттаивания. Отдаленные результаты (через 1,5 года) лечения больных продемонстрировали стойкое выздоровление. Рецидивов заболевания не наблюдалось.

Таким образом, анализ проведенных исследований показал, что в результате применения криоультразвукового воздействия образуется более обширная и глубокая зона некроза, чем после изолированного криогенного. Применение ультразвука в сочетании с низкими температурами оказывает также влияние на скорость репаративных процессов в сторону сокращения сроков регенерации. В зависимости от патологии шейки матки, а также от распространенности процесса возможно применение различных методик комбинированного воздействия, что позволит сократить сроки и повысить эффективность лечения.

1. *Грищенко В. И.* Гипотермия и криохирургия в акушерстве и гинекологии.— М.: Медицина, 1974.— 280 с.
2. *Запорожан В. Н.* Определение соотношения зон замораживания и деструкции при локальном криовоздействии на биологические ткани.— В кн.: Новая медицинская техника, медицинские изделия и их испытания. М., 1976, с. 261—267.
3. *Запорожан В. Н.* Криогенный метод лечения некоторых заболеваний шейки матки: Автореф. дис... канд. мед. наук.— Одесса, 1976.— 29 с.
4. *Запорожан В. Н.* Обоснование методики лечебного криогенного воздействия на шейку матки.— Акушерство и гинекология, 1977, № 7, с. 48—51.
5. *Иванов И. И., Заремба́ский Р. А., Коровкин Б. Ф. и др.* Введение в клиническую биохимию.— Л.: Медицина, 1969.— 494 с.
6. *Рикберг А. Б.* К вопросу об использовании сочетанного воздействия низких температур и ультразвука в онкологии.— В кн.: Тез. докл. 2-й Всесоюз. конф. «Ультразвук в физиологии и медицине». Ульяновск, 1975, с. 92—95.
7. *Рикберг А. Б., Трушкевич Л. И.* О возможностях усиления криоповреждения.— В кн.: Механизмы криоповреждения и криопротекции биологических структур. Киев, 1976, с. 116—118.
8. *Шенталь В. В., Календо Г. С., Птуха Т. П.* Потенцирование криодеструкции биологической ткани ультразвуком.— Probl. techn. med., 1977, 8, N 3/4, p. 213—218.
9. *Cahan W. G.* Cryosurgery of the Uterus: Description of Techniques and Potential Application.— Amer. J. Obstet. Wynec., 1964, 88, N 3, p. 410—414.
10. *Cooper J. S.* Cryosurgery in Oncology.— Fed. Proc., 1965, 24, N 2, pt 3, p. 236—240.
11. *Creasman W. T.* Efficacy of cryosurgical Treatment of Severe Cervical Intraepithelial Neoplasia.— Obstet. and Gynecol., 1973, N 41, apr., p. 501—506.

Матеріал, захищений авторським правом

12. *Rand R. W., Rinfert A. P., von Leden H.* Cryosurgery.— Springfield, 1968.
13. *Zacarian S. A.* Cryosurgery of tumors of the skin and oral cavity.— Springfield, 1973.

Одесский медицинский институт
им. Н. И. Пирогова МЗ УССР

Поступила в редколлегию
24.06.81

УДК 57.043.612.017.1 : 616—006.832.9

А. А. Цуцаева, Г. Г. Юрченко, Н. Н. Попов,
Т. Н. Воскобойникова, Л. П. Водолажская

НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНИТЕТА ПРИ КРИОХИРУРГИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Целью настоящей работы явилось изучение влияния криохирургического метода лечения на некоторые показатели иммунологического статуса онкологических больных. Были исследованы Т- и В-системы иммунитета до и после криохирургического вмешательства.

Наблюдение проведено на шести больных: на четырех — с диагнозом рак шейки матки клинической стадии $I/II_a/T_1N_oM_oG$; на одном — с диагнозом рак слепой кишки, клиническая стадия $3/II_a/T_3N_oP_3G_2$ и на одном — с диагнозом рак сигмовидной кишки, клиническая стадия $3/II_a/T_3N_oP_4G_1$. Гистологически у гинекологических больных обнаружен плоскоклеточный рак, у больных с поражением кишечника — аденокарцинома. Возраст гинекологических больных был 24—38 лет, больных с опухолью кишечника — 54 и 57 лет. Во всех случаях с целью субоперационной абластики удаление опухоли производилось после предварительного замораживания ее. Для замораживания использовали криодеструктор АКУ-01 производства ФТИНТ АН УССР.

У гинекологических больных применяли аппликатор с диаметром 7 мм при температуре наконечника —190° С, время замораживания составляло 3—4 мин. Замораживание опухоли толстого кишечника производили аппликатором с диаметром наконечника 36 мм, температура наконечника была —180° С, экспозиция охлаждения — 7 мин.

У гинекологических больных через двое суток после замораживания опухоль удаляли по общепринятому методу Вертгейма — Губарева. Удаление опухоли кишечника производили обычным методом сразу же после замораживания. Все больные были выписаны с клиническим выздоровлением в местном процессе, с хорошим самочувствием, состояние больных в течение всего срока наблюдения (5—7 мес) не ухудшалось.

В предоперационный и послеоперационный периоды, спустя 2 недели, 1, 2, 3 и 6 мес после операции, изучали следующие иммунологические показатели: способность лимфоцитов периферической крови к бласттрансформации под влиянием ФГА, способность образовывать Е- и ЕАС-розетки, в сыворотке крови определяли уровень иммуноглобулинов классов *A, M,* G, L [2]. О бласттрансформирующей активности лимфоцитов судили по уровню включения ^{3}H-тимидина [1]. Индекс стимуляции высчитывали по формуле:

$$И_с = \frac{О - Ф}{К - Ф},$$

где О — количество импульсов в 1 мин в стимулированной культуре; К — та же величина в нестимулированной культуре; Ф — значение фона прибора.

До операции бласттрансформирующая активность лимфоцитов на ФГА четырех больных была значительно ниже нормы (индекс стимуляции был равен 18,1; 52; 26,3; 20,1). У двух больных — в пределах нормы (индекс стимуляции 150; 100). После криообработки опухоли и

Матеріал, захищений авторським правом

операции происходило либо быстрое восстановление бласттрансформирующей активности лимфоцитов к норме, либо вначале наблюдалось некоторое ее снижение с последующим постепенным восстановлением (рис. 1). Показателей нормы она достигала спустя 1—3 мес после операции.

Количество Е-розеткообразующих клеток (Е-РОК) до операции у пяти больных было ниже нормы, у одного больного — в пределах нормы

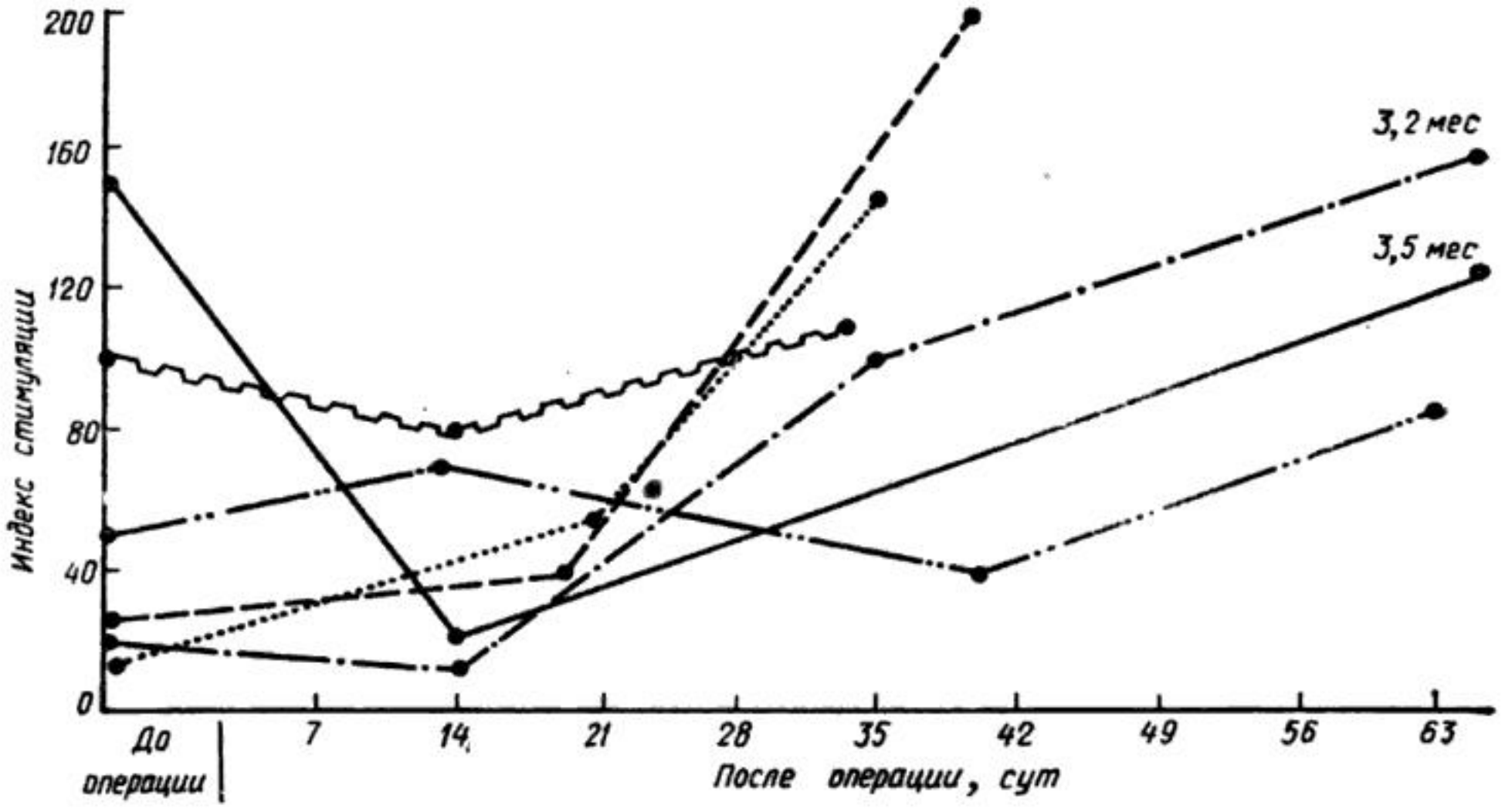


Рис. 1. Бласттрансформирующая активность лимфоцитов периферической крови онкобольных на ФГА до и после криохирургического лечения.

(рис. 2). Криообработка опухоли и операция у одной группы больных вызывали достоверное повышение числа Е-РОК, у второй группы — кратковременное снижение, которое быстро сменялось восстановлением количества Е-РОК. Этот показатель у оперированных больных достигал значений нормы в течение 2—3 мес.

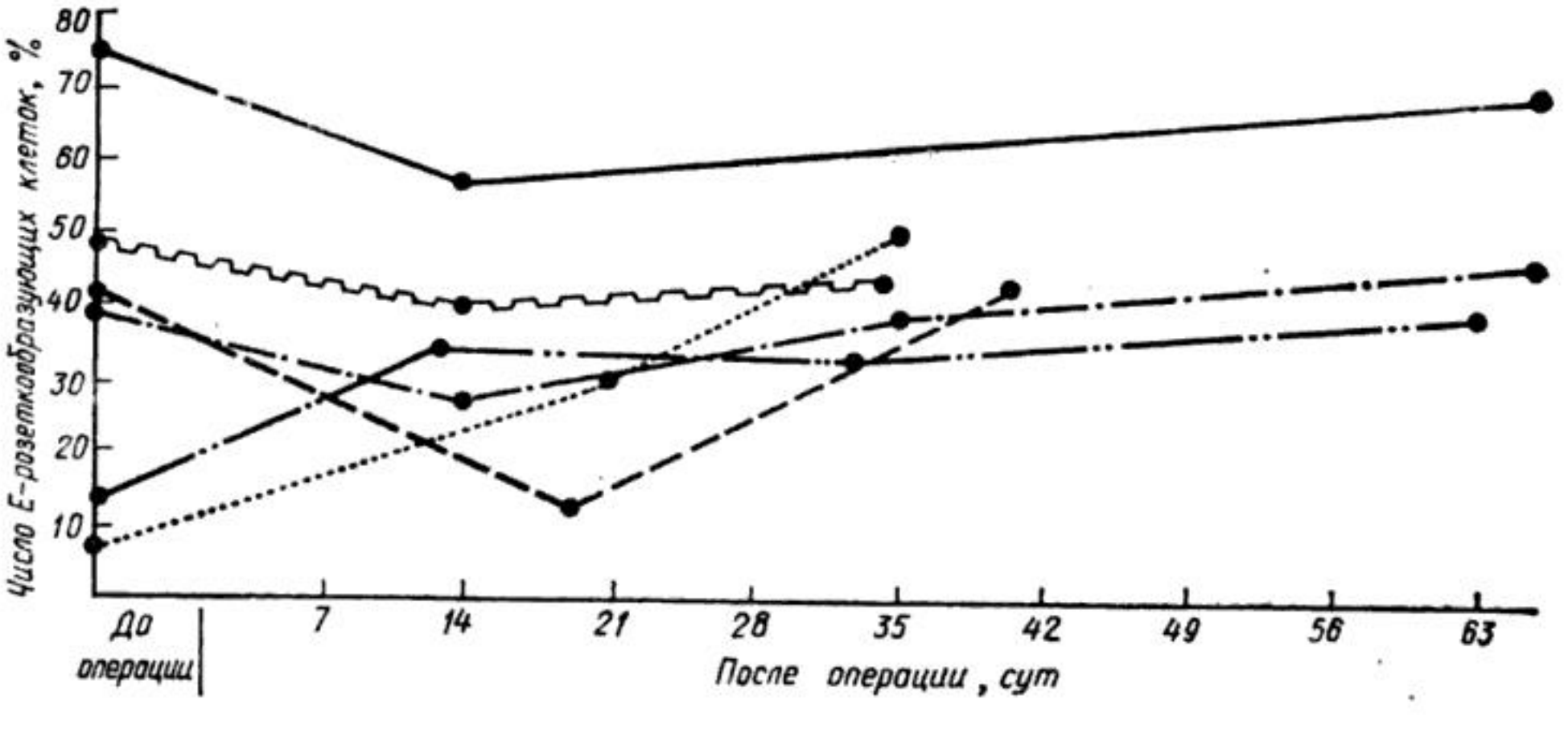


Рис. 2. Число *Е*-розеткообразующих клеток в периферической крови онкобольных до и после криохирургического лечения.

Количество ЕАС-розеткообразующих клеток (ЕАС-РОК) и уровень иммуноглобулинов *A, M,* G, *L* у больных до и после операции находились в пределах нормы. Достоверных изменений эти показатели в процессе лечения не претерпевали.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что у наблюдавшихся онкологических больных в определенной степени подав-

Матеріал, захищений авторським правом

лен клеточный иммунитет и сохранен гуморальный. Применение криохирургического метода в комплексной терапии онкологических больных способствует восстановлению Т-клеточной системы иммунитета и не сказывается на показателях гуморального иммунитета.

1. *Баранова Ф. С.* Свойство термо- и кислотостабильного ингибитора сериновых протеаз из сыворотки крови тормозить трансформацию лимфоцитов, стимулированных митогенами.— Бюл. эксперим. биологии и медицины, 1978, № 5, с. 569—573.
2. *Чередеев А. Н.* Количественная и функциональная оценка Т и В систем иммунитета у человека.— В кн.: Т и В системы иммунитета. М:, 1976, с. 124—160. (Итоги науки и техники / ВИНИТИ. Общ. вопр. патологии; Т. 4).

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
08.10.81

УДК 57.043 : 616.127—005.8 : 616.832.2

Г. А. Бабийчук, С. Е. Гальченко, В. С. Марченко, В. Ф. Тарасов

ТЕМПЕРАТУРНЫЕ ГРАДИЕНТЫ ОРГАНИЗМА ЖИВОТНОГО ПРИ КРАНИО-ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ

В настоящее время в отечественной и зарубежной литературе встречается большое количество работ, посвященных расшифровке механизмов патофизиологического обоснования применения метода кранио-церебральной гипотермии при лечении различных заболеваний организма [1—6, 8]. Установлено, что каждый уровень гипотермии соответствует определенным сдвигам нейро-гуморальной регуляции [7]. В этой связи представляется важным обосновать оптимальные границы охлаждения, допустимую величину температурных градиентов конкретно для каждого заболевания и состояния организма.

С этой целью было проведено изучение распределения температурных градиентов и динамики снижения температуры тела животного в процессе кранио-церебральной гипотермии. Опыты проведены на 25 кроликах породы шиншилла.

В I серии экспериментов в устройство для охлаждения головы (шлем) подавался хладоагент (пары азота) с температурой —10° С. Во II серии температура в шлеме была —20° С. В III серии экспериментов температура в шлеме понижалась до —40° С.

До охлаждения животным вводили внутримышечно промедол в дозе 0,005 мг на 1 кг массы, внутривенно — тиопентал натрия в дозе 50 мг/кг и оксибутират натрия из расчета 300 мг/кг массы. Температура тела животного измерялась каждые 15 мин в шести точках (грудная полость, брюшная полость, спинной отдел позвоночника, левая подмышка, левое бедро, прямая кишка) медь-константановыми термопарами с помощью потенциометра Р-363-3 кл. 0,005 с точностью 0,1 ± 0,05° С. Температура головного мозга измерялась на глубине 2; 10; 15 мм, что соответствовало коре, лимбическим структурам и гипоталамусу головного мозга. Для измерения температуры использовались медь-константановые термопары диаметром 0,15 мм.

Во всех опытах характерным было синусоидальное колебание температуры с периодом около 1 ч с общей тенденцией к снижению. Максимальная амплитуда колебаний температуры наблюдалась в коре головного мозга животных I серии экспериментов и достигала 5° С. Минимальным колебаниям была подвержена ректальная температура, максимальная амплитуда которой достигала 1° С.

При температуре хладоагента —40° С максимальная амплитуда колебаний температуры коры головного мозга составила 3,5° С, а ректальной — 0,7° С. Во всех опытах выявлены следующие закономерности: чем дальше находится точка измерения температуры от головы, чем

Матеріал, захищений авторським правом

ниже температура хладоагента и чем глубже гипотермия, тем меньше амплитуда колебаний температуры. В отдельных опытах при температуре хладоагента —10° С отмечалось повышение температуры ядра тела в первые 0,5 ч гипотермии на 0,5—0,8° С с последующим ее снижением. При других температурах хладоагента повышения температуры тела не наблюдалось. Время снижения ректальной температуры при гипотермии от нормальной до 30° С варьирует для отдельных животных и составило 1,5—4; 1,25—3,75 и 1—3,5 ч при температурах хладоагента

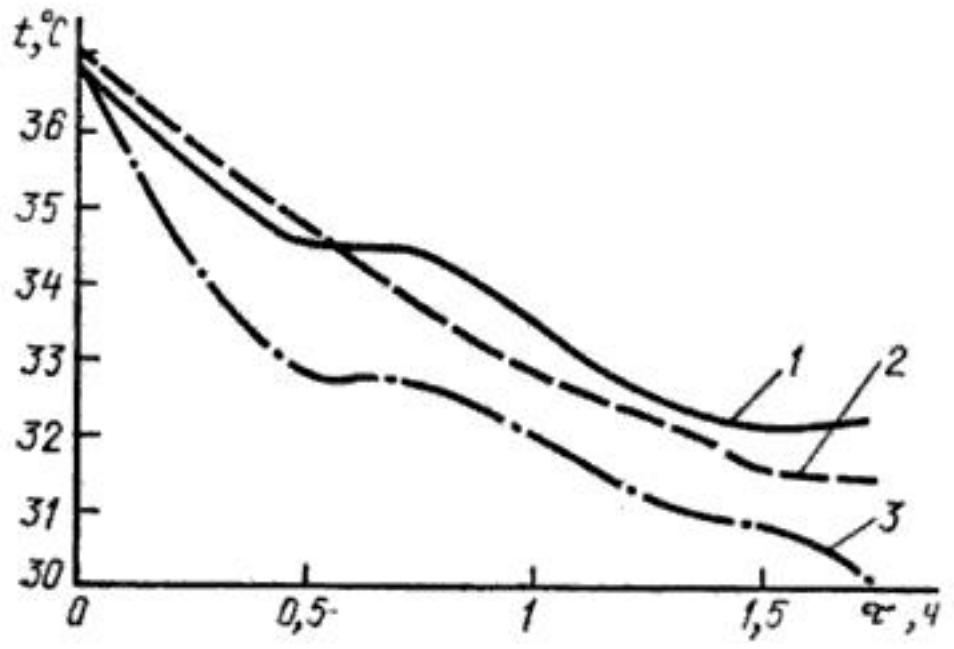


Рис. 1. Динамика снижения ректальной температуры животных при кранио-церебральной гипотермии. Температура хладоагента:
1 — —10° С; *2* — —20° С; *3* — —40° С.

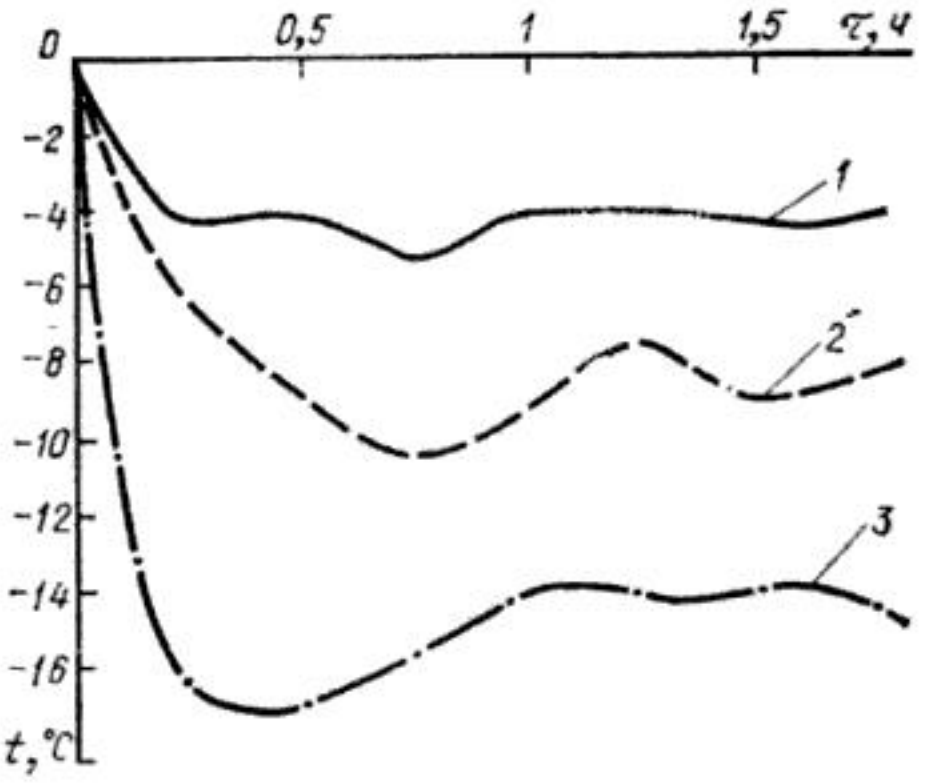


Рис. 2. Температурные градиенты коры головного мозга относительно ректальной температуры при кранио-церебральной гипотермии. Температура хладоагента:
1 — —10° С; *2* — —20° С; *3* — —40° С.

—10, —20 и —40° С соответственно. Во всех опытах скорость снижения температуры тела животного была наибольшей в первые 15—30 мин гипотермии, а затем уменьшалась.

На рис. 1 приведены усредненные по каждой серии экспериментов графики изменения температуры тела животных. Установлено, что при всех трех режимах охлаждения температура коры головного мозга не опускалась ниже 16° С при стабилизированной подаче хладоагента. Из графиков видно, что уменьшение температуры хладоагента увеличивают скорость падения температуры тела в первые 0,5 ч, но в дальнейшем скорости становятся почти одинаковыми и сохраняются на протяжении всей гипотермии. В связи с этим градиенты температур головного мозга и ректальной оказываются тем больше, чем ниже температура хладоагента. На рис. 2 приведены усредненные по каждой из трех серий экспериментов градиенты температур коры головного мозга относительно ректальной температуры. Как видно из рисунка, скорость роста градиента температур максимальна в первые 15—30 мин гипотермии. Затем рост градиента температур прекращается и наблюдается тенденция к незначительному его уменьшению. Максимальная величина градиента и максимальная скорость роста градиента температур между структурами головного мозга и ядром тела наблюдались при подаче хладоагента с температурой —40° С. Скорость падения температуры коры головного мозга уменьшалась тем раньше, чем ниже температура хладоагента (см. рис. 2).

Из рис. 1 и 2 видно, что падение температуры коры головного мозга, величина градиентов температур коры относительно ректальной пропорциональны температуре подаваемого хладоагента.

Таким образом, проведенные эксперименты свидетельствуют об определенной закономерности снижения температуры и взаимоотношений градиентов между головным мозгом и ядром организма в зависимости от интенсивности охлаждения. Практически безынерционное регулирование температуры хладоагента дает возможность управлять ско-

Матеріал, захищений авторським правом

ростью снижения температуры головного мозга, глубиной гипотермии, а также поддерживать температурные градиенты на безопасном для организма уровне. Выявленная пропорциональность падения температуры коры головного мозга и величины температурных градиентов в организме позволяют применять не только опробованные режимы охлаждения, но и охлаждение с другими температурами хладоагента. С другой стороны, проведенные исследования показали необходимость постоянного контроля за температурным состоянием организма с целью оперативного управления ходом гипотермии. Ход снижения температуры организма животного в процессе охлаждения имеет синусоидальный характер с отклонением температуры от средней в пределах 2—2,5° С на протяжении всего эксперимента.

Полученные результаты дали возможность получить температурные характеристики различных участков тела в зависимости от температуры хладоагента, что дает возможность выбора скорости охлаждения организма при конкретных показаниях к применению кранио-церебральной гипотермии.

1. *Андреева Л. М., Голицина И. И.* Влияние искусственного охлаждения мозга на сократительную функцию миокарда.— Науч. докл. высш. школы. Биол. науки, 1974, № 3, с. 34—37.
2. *Волколаков Я. В., Лацис А. Т.* Глубокая гипотермия в кардиохирургии детского возраста.— Л. : Медицина, 1977.— 152 с.
3. *Мурский Л. И.* Кранио-церебральная гипотермия (в эксперименте).— М. : Медицина, 1975.— 245 с.
4. *Пионтковский Г. И., Осипова Г. В.* Состояние сократительной функции сердца в острый период экспериментальной ишемии при различных режимах кранио-церебральной гипотермии.— Механизмы терморегуляции, 1975, вып. 5, с. 108—111.
5. *Пионтковский Г. И.* Рентгенохимографическая оценка сократительной функции миокарда в условиях кранио-церебральной гипотермии.— Механизмы терморегуляции, 1975, вып. 5, с. 49—53.
6. *Пономарев Ю. Е.* Усвоение сердцем режимов разной частоты стимуляции при кранио-церебральной гипотермии.— В кн.: Междунар. конф. по возраст. и эксперим. кардиологии. Владимир, 1968, с. 315—319.
7. *Чепкий Л. П., Трещинский А. И.* Лечебная гипотермия.— Киев : Здоров'я, 1969.— 203 с.
8. *Щербакова Е. И., Русских А. П.* Метаболизм миокарда при экспериментальном инфаркте.— В кн.; Экспериментальный инфаркт в условиях гипотермии. Владимир, 1974, вып. 3, с. 153—162.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
03.11.81

УДК 57.043.615.832.9.032.91

Г. А. Бабийчук, И. И. Соснова

ОСОБЕННОСТИ ЭЛЕКТРОКАРДИОГРАФИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ КРАНИО-ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ

В современной физиологии и медицине известен способ эффективного повышения устойчивости организма к кислородному голоданию, заключающийся в снижении температуры тела и уменьшении тем самым уровня обмена веществ [1—3]. Экспериментальными и клиническими исследованиями было показано защитное действие пониженной температуры тела при различных состояниях сердечно-сосудистой системы, сопровождающихся гипоксией, при операциях на мозге, сердце, магистральных сосудах и т. д. [7, 9, 10]. Литературные данные свидетельствуют о том, что наиболее благоприятный эффект оказывает так называемая умеренная гипотермия [4—6, 8].

Представляется весьма важным и интересным проследить эффект воздействия гипотермии на миокард с целью обоснования применения данного метода в кардиологии. Целью работы было изучение изменений

Матеріал, захищений авторським правом

электрокардиографических показателей в условиях кранио-церебральной гипотермии для получения информации о состоянии сократительной способности и метаболических процессах в миокарде.

Методика работы. Кранио-церебральная гипотермия проводилась с помощью аппарата для программного охлаждения (отогрева) головного мозга и других участков тела человека и животного. Аппарат создан в Опытном производстве Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР. В качестве хладоагента использовали жидкий азот. В состояние гипотермии животное вводили в течение 1—1,5 ч. Ректальную температуру 32—30° С поддерживали в течение 1 ч, после чего производился самоотогрев животных.

Эксперименты проведены на 55 кроликах породы шиншилла с массой тела 2—2,5 кг, в возрасте 6—7 мес. Перед проведением кранио-церебральной гипотермии кроликам внутривенно вводили тиопентал натрия в дозе 50 мг/кг и оксибутират натрия из расчета 300 мг/кг массы, внутримышечно — промедол в дозе 0,005 мг/кг. Ректальная температура контролировалась электротермометром.

Электрокардиограмма регистрировалась на аппаратах «Полиграф» НФ-925 и «Биос» до проведения кранио-церебральной гипотермии, в период охлаждения (при снижении температуры тела на каждый градус) и после окончания сеанса гипотермии. Статообработка проведена по непараметрическим критериям Уилкоксона на ЭВМ.

Результаты и их обсуждение. Для оценки изменений ЭКГ выработаны нормативы электрокардиографических показателей у контрольной группы животных. В контрольной группе было обследовано 56 интактных кроликов. Материалы подвержены статистической обработке. Длительность интервалов электрокардиограммы у интактных животных составила: PO — 0,061 ± 0,004 с; QS — 0,040 ± 0,006 с; QT — 0,156 ± ± 0,007 с; R—R — 0,236 ± 0,005 с; частота сердцебиений — 277 ± 14,0 в 1 мин.

Как свидетельствуют полученные данные, ритм сердечной деятельности претерпевает существенные изменения в динамике гипотермии; в начале он очень лабилен — урежается при понижении температуры

Среднее значение длительности отдельных элементов электрокардиограммы у кроликов в процессе гипотермии и частота сердцебиений

Показатель		Ректальная температура, °С							
		37	36	35	34	33	32	31	30
Среднее значение длительности, с	PQ	0,062	0,067	0,052	0,075	0,080	0,075	0,070	0,083
	QS	0,023	0,023	0,027	0,030	0,030	0,027	0,025	0,023
	QT	0,163	0,143	0,150	0,140	0,130	0,148	0,130	0,220
	R—R	0,225	0,243	0,238	0,298	0,430	0,308	0,365	0,340
Частота сердцебиений в 1 мин		238	246	280	205	150	201	175	195

тела до 36° С, затем учащается при температуре тела 35° С, после чего происходит постепенное его урежение (таблица). Время проведения возбуждения по предсердиям и желудочкам постепенно удлиняется, достигая наибольшей длительности при ректальной температуре 30° С (0,083 с при норме 0,061 ± 0,004). Внутрижелудочковая проводимость

Матеріал, захищений авторським правом

по мере охлаждения организма удлинялась до температуры тела 33—34° С, в последующем интервал QS укорачивался и при температуре тела 30° С был равен таковому при 37° С. Это говорит о том, что при более длительном охлаждении организма до температуры тела 30—32° С внутрижелудочковая проводимость имела тенденцию к нормализации.

Длительность электрической систолы в условиях гипотермии отличалась постепенным удлинением с незначительными колебаниями при температуре тела 32—33° С в сторону укорочения, а затем постепенным увеличением (0,220 при норме 0,156 ± 0,007 с). Систолический показатель, как правило, был больше нормы.

Выводы. Полученные нами данные особенностей электрокардиограммы при умеренной кранио-церебральной гипотермии у кроликов свидетельствуют о лабильности ритма сердечной деятельности, процессов возбуждения и проводимости миокарда. Следовательно, гипотермия не оказывает разрушительного действия на такие основные функции сердца, как возбудимость и проводимость, а ставит их в функционально выгодные условия.

1. *Бобров Н. И., Ломов О. П., Тихомиров В. П.* Физиолого-гигиенические аспекты акклиматизации человека на севере.— Л. : Медицина, 1979.— 184 с.
2. *Иванов К. П.* Об основных принципах регуляции температурного гомеостаза.— Физиол. журн. СССР им. Сеченова, 1979, 65, № 11, с. 1553—1561.
3. *Майстрах Е. В.* Неспецифические сенсорные и эндокринные механизмы терморегуляции при остром охлаждении организма.— Физиол. журн. СССР им. Сеченова, 1979, 65, № 11, с. 1582—1589.
4. *Мурский Л. И.* Глубокая кранио-церебральная гипотермия.— Владимир, 1978.— 111 с.
5. *Осипова Г. В.* Зависимость изменений сердечно-сосудистой системы от степени глубины гипотермии.— В кн.: Экспериментальная возрастная кардиология. Владимир, 1971, ч. 2, с. 103—105.
6. *Покровский В. М., Шейх-Заде Ю. Р., Абрабарчук Г. С.* Экстракардиальная и внутрисердечная регуляция деятельности сердца при охлаждении.— В кн.: Тез. науч. сообщ. XII съезда Всесоюз. физиол. о-ва им. И. П. Павлова. Тбилиси, 1975, с. 260—261.
7. *Романов Ф. Н., Вельховер Е. С.* Коррекция церебральных нарушений при операциях на открытом сердце в условиях умеренной гипотермии.— Груд. хирургия, 1980, № 1, с. 33—36.
8. *Чибуновский В. Б., Цибанева Н. Г., Чернов В. К., Эренбург Г. А.* Влияние углубленной гипотермии (20° С) на функции миокарда.— В кн.: Экспериментальная и возрастная кардиология. Владимир, 1971, ч. 2, с. 136—138.
9. *Auzai N.* Surgical management of patent ductus arterioans under hypothermia, extracorporeal circulation and circulatory arrest.— Jap. J. Thorac. Surg., 1976, 29, p. 467—470.
10. *Bailey L. L., Takcuchi J., William W. G.* Surgical management of congenital cardiovascular anemalies with the use of profound hypothermia and circulatory affest. Analysis of 180 consecutive cases.— J. Thorac. and Cardiov. Surg., 1976, 71, N 4, p. 485—492.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
15.09.81

IV. КРИОГЕННАЯ ТЕХНИКА

УДК 57.043

А. Н. Новиков, С. Т. Олейник, Г. С. Ишков, Е. Ф. Копейка

ЛАБОРАТОРНАЯ УСТАНОВКА ДЛЯ ОТРАБОТКИ РЕЖИМОВ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ В ЭЛЕМЕНТАРНЫХ ОБЪЕМАХ

Современный уровень развития криобиологии не позволяет по характеристикам биообъектов теоретически выбрать оптимальную криозащитную среду и режимы криоконсервирования. Поэтому при разра-

Матеріал, захищений авторським правом

ботке методов криоконсервирования биообъектов в основном используются экспериментальные данные, полученные методом проб.

Существующая замораживающая аппаратура предусматривает выбор программ замораживания в контейнерах различной емкости (1—500 мл) [1]. Отработка программ замораживания и отогрева в контейнерах сопряжена с большим расходом биоматериала, компонентов криозащитных сред, значительной трудоемкостью эксперимента. Кроме того, оптимальные программы криоконсервирования варьируют в зависимости от размера контейнера, его материала, формы, типа замораживающей аппаратуры. Причина этого — наличие температурного градиента в объеме контейнера при его охлаждении или нагреве. Учитывая это, рационально было бы отрабатывать режимы криоконсервирования на биоматериале, моделирующем элементарный объем контейнера, затем полученные данные переносить на определенный вид контейнера с известным температурным градиентом по объему при различных скоростях охлаждения — отогрева.

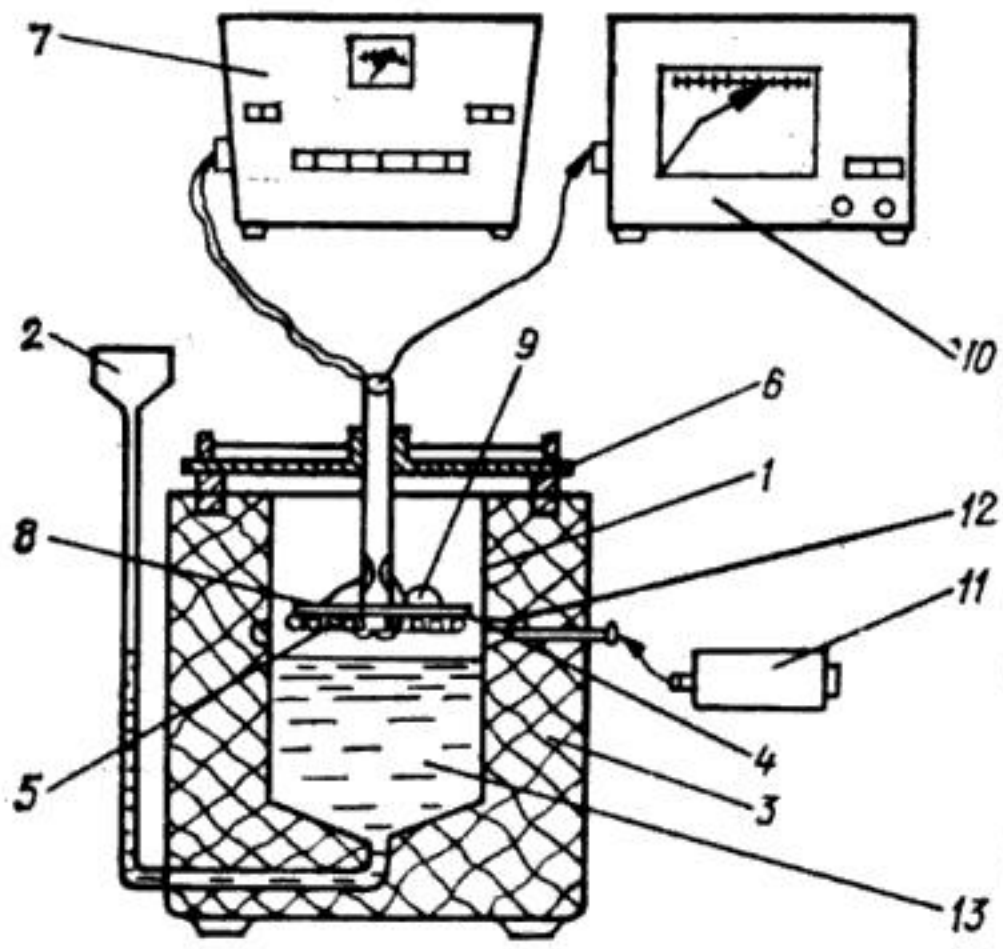


Рис. 1. Принципиальная схема установки.

В таком случае выбор оптимального режима криоконсервирования биоматериала свелся бы к решению задачи по расчету режима охлаждения — отогрева контейнера, максимально приближающегося к оптимальному. Требования к выбору размера, геометрической формы и способа криоконсервирования элементарного объема можно представить следующими условиями: 1) размеры элементарного объема должны быть минимальными, но обеспечивающими достаточное количество биоматериала для оценки его жизнеспособности; 2) геометрическая форма элементарного объема должна характеризоваться минимальной величиной температурного градиента, возникающего при его охлаждении — отогреве; 3) теплообмен между элементарным объемом и окружающей средой должен быть равномерным по его поверхности; 4) условия протекания фазового перехода вода — лед в элементарном объеме должны быть идентичны таковым в большом объеме. Прежде всего это касается начала процесса фазового перехода вода — лед, так как известно, что в малых объемах вещества начало этого процесса замедляется и значительно варьирует.

Учитывая эти требования, в качестве элементарного объема нами выбраны капли объемом 0,02—0,2 мл, наносимые на теплопроводную подложку с гидрофобной поверхностью. Для управления началом фазового перехода вода—лед, а конкретно для устранения переохлаждения, применялось инициирование охлажденных до температур замерзания капель частицами инея.

Экспериментальная проверка показала, что градиент температур при охлаждении таких капель на подложке по объему капель не превышает 0,1—0,5° С. Переохлаждение капель, инициированных таким способом, снижается практически до 0° С. Для реализации варьирования скоростей охлаждения—отогрева капель биоматериала и снятия их переохлаждения нами разработана и апробирована лабораторная установка для отработки режимов криоконсервирования биообъектов в элементарных объемах. Основные принципы, заложенные в установке, такие: 1) источник холода — пары открытой поверхности азота с температурой —100 — —120° С, нагрев подложки производится электронагревателем с автоматически регулируемой мощностью; 2) снятие переохла-

Матеріал, захищений авторським правом

ждения охлажденных капель биоматериала осуществляется частицами инея, образующимися при вводе влажного воздуха в зону с температурой ниже —150° С.

На установке (рис. 1) металлический корпус *1* емкостью 200 мл заполняется жидким азотом через воронку *2* примерно наполовину. Теплоизоляция корпуса *1* — порошковый пенопласт *3* с толщиной слоя примерно 3 см. Теплопроводная подложка *4* выполнена из листовой меди толщиной 0,4 мм. Верхняя поверхность ее полирована и покрыта гидрофобным слоем кремнийорганического полимера ГКЖ-94. На нижней поверхности подложки смонтирован нагреватель *5* из медной проволоки в виде плотно прилегающих друг к другу витков спирали. В прозрачной крышке *6* предусмотрен залив труднозамерзающей жидкости (например, этиловый спирт) для предотвращения запотевания и, следовательно, обеспечения возможности наблюдений за каплями при криоконсервировании визуально или микроскопически. Для автоматического управления режимами замораживания — отогрева использовался электронный блок *7*, регулирующий мощность нагревателя *5* по показаниям термопары *8*, вмонтированной в подложку. Для оценки изменения температуры капель биообъекта в одну из них предусмотрен ввод термопары *9* с выходом на самопишущий потенциометр *10*. Образование частиц инея для снятия переохлаждения капель осуществлялось подачей влажного воздуха насосом *11* в кольцевой распылитель *12*, находящийся над уровнем азота в зоне с температурой примерно —120° С. Образовавшиеся частицы инея потоками испаряющегося азота выносились в верх корпуса и, попадая в охлажденные до температур замерзания капли, вызывали в них льдообразование.

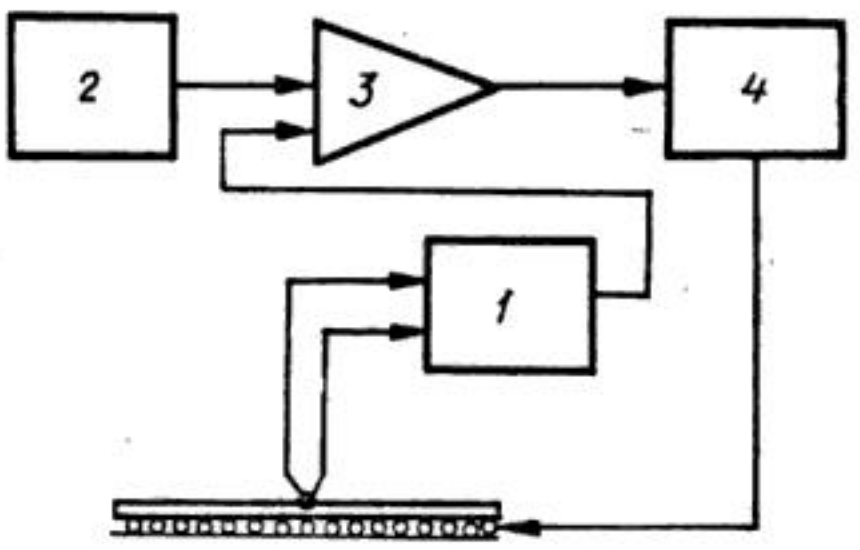


Рис. 2. Схема блока управления.

Электронный блок управления режимом замораживания—отогрева (рис. 2) состоит из усилителя-самописца Н399 *1*, электронного задатчика температуры *2*, схемы сравнения *3* и тиристорного регулятора мощности *4*. Блок построен по принципу статистического регулятора и работает следующим образом. Усиленный сигнал с термопары (см. рис. 1, *8*) пропорционально температуре подложки поступает на схему сравнения *3*. Там он сравнивается с сигналом задатчика программы *2*, который вырабатывает напряжение, скорость изменения которого регулируется в зависимости от заданной программы. Задатчик *2* выполнен по схеме емкостного интегратора на операционном усилителе. Напряжение, пропорциональное рассогласованию сигналов датчика и задатчика, управляет работой тиристорного регулятора мощности *4*, который нагружен нагревателем подложки. Нагреватель компенсирует потери тепла в той степени, которая определяется сигналом задатчика.

Нанесение биоматериала на подложку осуществлялось обычной пипеткой, диаметр носика которой определял размер капель. Замораживание по программе проводилось до температуры —70 — —80° С, затем — погружение подложки с замершими каплями в жидкий азот. Программное размораживание проводилось после поднятия подложки над уровнем азота. Полирование и гидрофобизирование поверхности подложки обеспечивало легкое отделение пинцетом замерзших капель биоматериала и перенос их в низкотемпературное хранилище.

Основные характеристики разработанной установки: 1. Диапазон варьирования скоростей охлаждения 0,1 ± 0,04 — 30 ± 0,5° С/мин. 2. Диапазон варьирования скоростей нагрева 0,3 ± 0,05 — 35 ± 0,5°С/мин. 3. Возможность стабилизации температуры в диапазоне 20— —65° С с точностью ± 0,07° С/мин. 4. Возможность изменения скорости охлаждения и нагрева допускается в диапазоне температур 20— —70° С.

Матеріал, захищений авторським правом

5. Практически полное устранение переохлаждения капель биоматериала. 6. Вариация объема гранул биоматериала — 0,02—0,25 мл. 7. Количество одновременно криоконсервируемого биоматериала — до 2,5 мл. 8. Расход азота при эксперименте — 300 мл/ч. Недостатком разработанной установки является отсутствие стерильности при криоконсервировании. В принципе этот недостаток может быть устранен при использовании стерильного жидкого азота и воздуха, подаваемого в установку для образования частиц инея.

Выводы. 1. Выбраны объем и геометрическая форма элементарного объема биоматериала для отработки режимов криоконсервирования. 2. Разработана лабораторная установка для отработки режимов криоконсервирования биологических объектов в элементарных объемах, позволяющая варьировать в автоматическом режиме скорости замораживания и отогрева в широком диапазоне, проводить процесс фазового перехода вода—лед идентично таковым в больших объемах.

1. *Пушкарь Н. С., Белоус А. М.* Введение в криобиологию.— Киев : Наук. думка, 1975.— 343 с.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
15.09.81

УДК 57.043.576.3 : 535.822.1.535.24

А. П. Белоножко, Б. А. Скорняков

О РАБОТЕ НА ДВУХЛУЧЕВОМ СКАНИРУЮЩЕМ ЦИТОСПЕКТРОФОТОМЕТРЕ МУФ-5 С ПРИМЕНЕНИЕМ ОДНОВОЛНОВОГО МЕТОДА ДВУХ ПЛОЩАДЕЙ И ДВУХВОЛНОВОГО МЕТОДА ФОТОМЕТРИЧЕСКИХ ИЗМЕРЕНИЙ

Фотометрические измерения в цито- и гистологических исследованиях за последние годы нашли широкое распространение в экспериментальной практике. Количество проводимых измерений резко увеличилось, а требования, предъявляемые к их точности, стали выше. Для измерений применяются различные приборы отечественного и зарубежного производства. Каждый из них имеет свои конструктивные особенности, которые порой ограничивают выбор метода измерений, а рекомендуемые методики не всегда удовлетворяют экспериментаторов. Отмеченное в полной мере относится к распространенным методам фотометрирования на установке МУФ-5.

МУФ-5 — микроскоп ультрафиолетовый, конструкция которого предусматривает проведение фотометрических измерений биологических объектов в видимой и ультрафиолетовой областях спектра с использованием следующих методов измерений: 1) фотометрирование поля, площадь которого больше площади объекта; 2) фотометрирование плаг-методом; 3) фотометрирование с помощью сканирования объекта относительно светового зонда.

Перечисленные методы измерений достаточно подробно описаны в литературе [3, 5, 7].

Для увеличения количества проводимых на МУФ-5 измерений могут быть использованы одноволновой метод двух площадей и двухволновой метод.

Одноволновой метод двух площадей предложен для фотометрирования мазков и отпечатков тканей [4, 8, 11], а двухволновой — для более универсального использования [1—3, 7, 9, 10, 12—15]. Однако существующие методические указания рассчитаны на работу с приборами, регистрирующими величину пропускания. А так как конструкция МУФ-5 рассчитана на регистрацию величины оптической плотности фо-

Матеріал, захищений авторським правом

тометрируемого объекта, необходимо, прежде всего, от имеющихся для этих методов формул расчета количества хромофора в объекте перейти к соотношениям, включающим величины, которые регистрирует прибор МУФ-5.

Для одноволнового метода двух площадей примем за основу известную формулу для расчета количества хромофора [4, 11]:

$$mk = \ln\left(\frac{1}{T_1}\right)\frac{1-T_i}{1-T_1}S_i, \tag{1}$$

где mk — количество хромофора в биообъекте; T_1 — пропускание объекта, определенное плаг-методом; T_i — пропускание объекта, измеренное при условии, что площадь фотометрируемого поля полностью закрывает объект, т. е. $S_i > S_1$. Учитывая, что оптическая плотность с пропусканием связана соотношением $D = -\ln T$, перейдем от величин пропускания T_1 и T_2 в формуле (1) к величинам оптических плоскостей D_1 и D_i, в результате чего получим следующие выражения:

$$mk = \frac{1-e^{-D_i}}{1-e^{-D_1}}D_1S_i = \frac{1-e^{D_i}}{1-e^{D_1}}e^{D_1-D_i}D_1S_i. \tag{2}$$

Для двухволнового метода известную формулу для определения количества хромофора [9, 10] по аналогии с предыдущим преобразуем в выражение, в котором измеряемой величиной является оптическая плотность. Это выражение имеет следующий вид:

$$mk_1 = S\left(\frac{D_2}{\gamma(1-\gamma)} - \frac{\gamma D_1}{1-\gamma}\right), \tag{3}$$

где $\gamma = \frac{k_2}{k_1}$; k_1 и k_2 — удельные коэффициенты поглощения на двух выбранных длинах волн; D_1 и D_2 — оптические плотности объекта, измеренные на тех же длинах волн.

Ошибка этого метода не превышает 5% при условии, что отношение удельных коэффициентов для выбранных длин волн заключено в пределах $0{,}2 \leqslant \gamma \leqslant 0{,}8$. Чаще всего этим методом пользуются, выбирая длины волн так, что $\gamma = 0{,}5$; в этом случае формула принимает вид

$$mk_1 = S(4D_2 - D_1), \tag{4}$$

что особенно удобно для расчетов значения содержания хромофора в объекте.

Приведенные формулы расчета позволяют практически реализовать обсуждаемые методы фотометрирования при работе на приборе МУФ-5. Конкретные методики измерений и ход расчета предлагаются следующие.

Одноволновой метод. Для проведения измерений выбирается длина волны, которая должна находиться в области максимума спектра поглощения исследуемого хромофора. С целью уменьшения ошибки, связанной с рассеиванием света в объекте, измерения следует проводить в максимуме спектра поглощения объекта. Для этого плаг-методом снимается спектр поглощения хромофора и выбирается длина волны, соответствующая максимуму поглощения, и монохроматор прибора настраивается на выбранную длину волны.

Следующей операцией является градуировка самописца в единицах оптической плотности для выбранной длины волны. Пользуясь набором стандартных ослабителей и таблицами или графиками зависимости оптической плотности стандартных ослабителей от длины волны проходящего света для выбранной λ, строится график $l = f(D)$, где l — отклонение пера самописца. По графику рассчитывается коэффициент $\alpha = \mathrm{ctg}\varphi$, где φ — угол наклона градуировочной прямой, тогда D — всегда определяется при измерениях из соотношения $D = \alpha l$. Необходимо выбрать положение оптического клина рабочей ветви так, чтобы на ленте самописца при смене зондов четко фиксировались нулевые линии.

Матеріал, захищений авторським правом

В процессе измерения необходимо соблюдать требование обязательного полного перекрытия проекций светового зонда фотометрируемого объекта. При переходе на зонд меньшего диаметра его проекция на плоскость препарата должна располагаться в центральной части объекта.

Для измерения поглощения света объектом необходимо поместить его под большим световым зондом и произвести измерение в режиме «фотометрирование в точке», записав отклонение пера самописца. Затем следует повторить эту операцию, поменяв зонд и поместив его в центральную точку объекта. Измеряя отклонение пера самописца от соответствующих нулевых линий, необходимо определить величины l_1 и l_i и по ним рассчитать D_1 и D_i. Величину S_i определяют по заранее составленной таблице для выбранного сочетания зонд—объектив. Значение количества хромофора в объекте вычисляется по формуле (2), которую можно преобразовать в выражение

$$mk = \frac{1-e^{-\alpha l_i}}{1-e^{-\alpha l_1}} \alpha l_1 S_i = \frac{1-e^{\alpha l_i}}{1-e^{\alpha l_1}} e^{\alpha (l_1 - l_i)} \alpha l_1 S_i, \quad (5)$$

что исключает необходимость отдельного вычисления величин, указанных выше.

Двухволновой метод. Перед проведением измерений выбирают рабочие длины волн. Для этого плаг-методом снимается спектр поглощения объекта. Определяется длина волны, соответствующая максимуму поглощения, λ_1 и λ_2 из условия $D_2 = \gamma D_{max}$, что соответствует выбранному для данного ряда измерений γ. При $\gamma = 0{,}5$ λ_1 соответствует D_{max}, а $\lambda_2 - D_2 = 0{,}5 D_{max}$.

Для уменьшения ошибки за счет рассеяния света объектом желательно выбирать λ_2 на правом склоне кривой спектра поглощения. Однако в связи с применением в МУФ-5 фотоумножителя ФЭУ-39А с низкой чувствительностью в красной области λ_2 выбирается на левом склоне кривой либо следует заменить фотоумножитель на ФЭУ-15.

Как описывалось выше, для двух длин волн строятся градуировочные графики и по ним рассчитываются коэффициенты $\alpha = \operatorname{ctg} \varphi$ и $\beta = \operatorname{ctg} \psi$, соответствующие градуировочным прямым для λ_1 и λ_2. Сочетание зонда и объектива должно обеспечивать полное закрытие фотометрируемого объекта проекций зонда. Положение оптического клина рабочей ветви подбирается таким образом, чтобы на рабочих длинах волн в режиме фотометрирования в точке на самописце регистрировались четкие нулевые линии.

Фотометрирование объекта осуществляют поочередно на рабочих длинах волн. По отклонению пера самописца от нулевых линий определяют l_1 и l_2 и рассчитывают $D_1 = \alpha l_1$ и $D_2 = \beta l_2$. Величину S определяют по таблице согласно выбранному сочетанию зонд — объектив.

Количество хромофора в объекте вычисляют по формуле (3), а в случае $\gamma = 0{,}5$ — по формуле (4), которые могут быть преобразованы в выражения

$$mk_1 = S\left(\frac{\beta l_2}{\gamma(1-\gamma)} - \frac{\gamma \alpha l_1}{1-\gamma}\right), \quad (6)$$

$$mk_1 = S(4\beta l_2 - \alpha l_1), \quad (7)$$

что исключает вычисление D_1 и D_2.

Таким образом, изложенное позволяет предложить для широкого использования в экспериментальной практике одноволновой метод двух площадей и двухволновой метод фотометрирования биообъектов на цитоспектрофотометре МУФ-5, что дает возможность повысить производительность измерений при удовлетворительной погрешности.

1. *Белоножко А. П., Колегаев М. Д.* О возможности применения двухволнового метода фотометрических измерений на двухлучевом сканирующем цитоспектрофотометре МУФ-5.— Цитология и генетика, 1976, 10, № 2, с. 163—166.

Матеріал, захищений авторським правом

2. *Белоножко А. П.* Применение одноволнового метода двух площадей для цитофотометрии мазков и отпечатков тканей при работе на установке МУФ-5.— Цитология, 1978, **20**, № 2, с. 236—238.
3. *Бродский В. Я.* Трофика клетки.— М. : Наука, 1966.— 235 с.
4. *Гарма А., Корно Р.* Одноволновой метод двух площадей, применяемый для фотометрии мазков и отпечатков тканей.— В кн.: Введение в количественную цитохимию. М. : Мир, 1969, с. 196—201.
5. *Зандриттер В.* Методы и результаты количественных цитохимических исследований.— В кн.: Введение в количественную цитохимию. М. : Мир, 1969, с. 139—154.
6. *Либерман Л. Н.* Выбор оптимальных условий цитофотометрии на микроспектрофотометре МУФ-5.— Цитология, 1967, **9**, № 5, с. 616—618.
7. *Менделькоп М. Л.* Адсорбционная фотометрия: сравнение различных методов исследования структурирования объектов и двухволновой метод.— В кн.: Введение в количественную цитохимию. М. : Мир, 1969, с. 167—177.
8. *Селиванова Р. В., Архипов М. В.* Одноволновой метод двух площадей и возможности его применения для цитофотометрии различных объектов.— Цитология, 1974, **16**, № 11, с. 1436—1439.
9. *Шерудило А. И., Бродский В. А.* Микрофотометрическое определение количества поглощающего вещества в негомогенных объектах.— Оптика и спектроскопия, 1961, № 11, с. 266—267.
10. *Шерудило А. И.* Цитофотометрия в видимой области спектра.— Изв. СО АН СССР. Сер. мед.-биол., 1964, **12**, № 3, с. 145—152.
11. *Garcia U. M.* A one-wavelength, two-area method in microspectrophotometry for pure amplitude objects.— J. Histochem., Cytochem., 1965, **13**, N 2, p. 161—167.
12. *Mendelsohn M. L.* The two-wavelength method of microspectrophotometry. I. A microspectrophotometer and tests on model systems.— J. Biophys. and biochem. Cytol., 1958, **4**, N 3, p. 407—414.
13. *Mendelsohn M. L.* A two-wavelength method in microspectrophotometry. II. A set of tubles to facilitate calculations.— J. Biophys. and Biochem. Cytol., 1958, **4**, N 3, p. 415—424.
14. *Ornstein L.* The distributional error in microspectrophotometry.— Lab. Invest., 1952, **1**, N 1, p. 250—262.
15. *Patau K.* Absoption microspectrophotometry of irregularshaped objects.— Chromosoma, 1952, **5**, N 2, p. 341—362.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
05.11.81

Матеріал, захищений авторським правом

СОДЕРЖАНИЕ

I. Теоретическая и экспериментальная криобиология

Гусева Н. Р., Луговой В. И. Проблема продления сроков хранения размороженных эритроцитов: усовершенствование ресуспендирующих растворов . . . 3

Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П., Бабийчук Л. А. Температурозависимые изменения структуры эритроцитов. Сообщение 1. Роль ионов и фазовых переходов в индукции процессов криогемолиза 13

Кулешова Л. Г., Худяков Г. А. Повреждения клеток почек сирийского хомяка при замораживании 24

Петренко А. Ю. Влияние скорости замораживания и отогрева на активность дыхательной цепи митохондрий печени крыс 29

Гусакова Н. Е., Сандомирский Б. П., Хайкин Р. К. Состояние сократительных белков скелетных мышц при температурных повреждениях кожи 31

Бронштейн В. Л., Иткин Ю. А., Шурда Г. Г., Исерович П. Г. Механизм повреждения молочнокислого стрептококка S. cremoris $T18_{15}$ при замораживании 35

Ишков Г. С., Бронштейн В. Л. Метод криомикроскопии в градиенте температуры 38

Новиков А. Н., Стрибуль Т. Ф. Дилатометрическое исследование растворов криопротекторов 42

II. Криоконсервирование биологических объектов

Суханова Л. И., Федотенков А. Г., Данилова Л. А. Консервирование костного мозга методом переохлаждения 46

Кочережская И. А., Вишневский В. И. Влияние условий экспозиции эритроцитов с ПЭО-1500 на результат последующего замораживания 50

Волкова Н. А., Сандомирский Б. П. Органное культивирование криоконсервированной кожи человека 53

Карташов В. Ф., *Гучок М. М.* О безопасности малых доз полиэтиленоксида-1500 в период беременности 59

III. Криомедицина

Чередниченко В. М., Бездетко П. А., Станиславский Ю. Л. Опыт лечения доброкачественных новообразований век с помощью универсальной криоофтальмологической установки УМ-14 63

Запорожан В. Н., Хаит О. В., Рикберг А. Б., Бакай Э. А. Криоультразвуковая терапия доброкачественных заболеваний шейки матки 64

Цуцаева А. А., Юрченко Г. Г., Попов Н. Н., Воскобойникова Т. Н., Водолажская Л. П. Некоторые показатели иммунитета при криохирургическом лечении онкологических больных 69

Бабийчук Г. А., Гальченко С. Е., Марченко В. С., Тарасов В. Ф. Температурные градиенты организма животного при кранио-церебральной гипотермии 71

Бабийчук Г. А., Соснова И. И. Особенности электрокардиографических показателей у экспериментальных животных в условиях кранио-церебральной гипотермии 73

IV. Криогенная техника

Новиков А. Н., Олейник С. Т., Ишков Г. С., Копейка Е. Ф. Лабораторная установка для отработки режимов криоконсервирования биологических объектов в элементарных объемах 75

Белоножко А. П., Скорняков Б. А. О работе на двухлучевом сканирующем цитоспектрофотометре МУФ-5 с применением одноволнового метода двух площадей и двухволнового метода фотометрических измерений 78

Матеріал, захищений авторським правом

CONTENTS

I. Theoretical and Experimental Cryobiology

Guseva N. R., Lugovoy V. I. Problem of Storage Extension for Thawed Erythrocytes: Improvement of Resuspending Solutions 3

Belous A. M., Bondarenko V. A., Bondarenko T. P., Babiychuk L. A. Temperature-Dependent Changes in Erythrocyte Structure. Communication I. Role of Ions and Phase Transitions in the Induction of Cryohemolysis Process 13

Kuleshova L. G., Khudyakov G. A. Damage of Kidney Cells in Golden Hamster During Freezing 24

Petrenko A. Yu. Effect of Cooling and Thawing Rates on the Respiratory Chain Activity in the Rat Liver Mitochondria 29

Gusakova N. E., Sandomirsky B. P., Khaikin R. K. Condition of Contractile Proteins in Skeletal Muscles Under Temperature Damages of Skin 31

Bronstein V. L., Itkin Yu. A., Shurda G. G., Iserovich P. G. Mechanism of Lactic Acid Streptococcus S. cremoris $T18_{15}$ Damage During Freezing 35

Ishkov G. S., Bronstein V. L. Method of Cryomicroscopy in Temperature Gradient 38

Novikov A. N., Stribul T. F. Dilatometric Study of Cryoprotector Solutions . . . 42

II. Cryopreservation of Biological Systems

Sukhanova L. I., Fedotenkov A. G., Danilova L. A. Cryopreservation of Bone Marrow by Supercooling 46

Kocherezhskaya I. A., Vishnevsky V. I. Effect of Conditions of Erythrocyte Exposure to PEO-1500 on Results of Subsequent Freezing 50

Volkova N. A., Sandomirsky B. P. Organ Cultivation of Human Cryopreserved Skin 53

Kartashov V. F., Guchok M. M. Safe Usage of Low PEO-1500 Doses During Pregnancy 59

III. Cryomedicine

Cherednichenko V. M., Bezdetko P. A., Stanislavsky Yu. L. Experience of Benign Palpebra Tumour Treatment by Means of the Universal Cryoophthalmologic УМ-14 Installation 63

Zaporozhan V. N., Khait O. V., Rikberg A. B., Bakay E. A. Cryoultrasonic Therapy of Cervix Uteri Benign Diseases 64

Tsutsaeva A. A., Yurchenko G. G., Popov N. N., Voskoboinikova T. N., Vodolazhskaya L. P. Some Immunity Indices During Cryosurgical Treatment of Oncologic Patients 69

Babiychuk G. A., Galchenko S. E., Marchenko V. S., Tarasov V. F. Temperature Gradients of Animal Organism During Craniocerebral Hypothermia 71

Babiychuk G. A., Sosnova I. I. Peculiarities of Electrocardiographic Indices in Experimental Animals Under Conditions of Craniocerebral Hypothermia . . . 73

IV. Cryogenic Technique

Novikov A. N., Oleinik S. T., Ishkov G. S., Kopeika E. F. A Laboratory-Scale Device for Developing Rates of Biological System Cryopreservation in Elementary Units 75

Belonozhko A. P., Skornyakov B. A. Operation with Two-Beam Scanning МУФ-5 Cytospectrophotometer Using One-Wave Method of Two Areas and Two-Wave Method of Photometric Measurements 78

Матеріал, захищений авторським правом

КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА
Выпуск 12

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

Редактор *Л. Н. Паньшина.* Художественный редактор *В. И. Мелашенко*
Технический редактор *И. Н. Лукашенко.*
Корректор *Н. А. Луцкая*

Информ. бланк № 5472

Сдано в набор 28.02.82. Подп. в печ. 13.01.83. БФ 01608. Формат 70×108/16. Бум. типогр. № 1.
Лит. гарн. Выс. печ. Усл. печ. л. 8,05. Усл. кр.-отт. 8,58. Уч.-изд. л. 8,74.
Тираж 1000 экз. Заказ № 2—1509. Цена 1 руб. 30 коп.

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

Отпечатано с матриц Головного предприятия РПО «Полиграфкнига, Киев, Довженко, 3
во Львовской областной книжной типографии, 290000, Львов, Стефаника, 11. Зак. 3115.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043 : 612.111

Проблема продления сроков хранения размороженных эритроцитов: усовершенствование ресуспендирующих растворов / Гусева Н. Р., Луговой В. И.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 12, с. 3—13.

Обзор посвящен проблеме хранения размороженных-деглицеринизированных эритроцитов при низких положительных температурах. Удлинение допустимых сроков сохранения деконсервированных клеток в функционально-полноценном, жизнеспособном состоянии представляет собой один из возможных путей расширения практического использования криоконсервированных эритроцитов. Основное внимание уделено вопросам создания и усовершенствования растворов для ресуспендирования размороженных-отмытых клеток. Анализируются как современные представления о причинах прогрессирующего гемолиза в деконсервированных эритроцитах, так и основные практические способы повышения эффективности взвешивающих сред. Конкретные успехи, достигнутые в этом отношении, рассмотрены с точки зрения наиболее целесообразных направлений дальнейших исследований по разработке методов продления сроков хранения размороженных эритроцитов при 4° С.

Библиогр.: 80 назв.

УДК 57.043.577.347

Температурозависимые изменения структуры эритроцитов. Сообщение 1. Роль ионов и фазовых переходов в индукции процессов криогемолиза / Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П., Бабийчук Л. А.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 12, с. 13—24.

Охлаждение эритроцитов от 37 до 0° С в присутствии 1,2 М NaCl или 0,86 М сахарозы сопровождается явлением так называемого «холодового шока», выходом ионов K^+ и гемоглобина. Детальный анализ экспериментального материала свидетельствует о том, что в основе этого явления лежат фазовые переходы липидов. Различия, которые наблюдаются при охлаждении клеток в среде, содержащей электролиты (NaCl) и неэлектролиты (сахароза), можно объяснить осмотическими эффектами воды и ионов хлорида. Критической температурной областью холодового гемолиза эритроцитов является $+10 — +15$° С, что, по-видимому, связано с полиморфным превращением фосфатидиэтаноламина. Истощение клеток по АТФ делает их более устойчивыми к охлаждению в гипертонических условиях. Предполагается, что наблюдаемые эффекты обусловлены изменением белкового цитоскелета клетки при изменении ее формы и динамическими перестройками структуры мембраны.

Ил. 6. Библиогр.: 41 назв.

УДК 57.043 : 548.0 : 661.073.585.

Повреждения клеток почек сирийского хомяка при замораживании / Кулешова Л. Г., Худяков Г. А.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 12, с. 24—28.

Криомикроскопически изучен характер повреждений клеток почек сирийского хомяка в зависимости от программ охлаждения и концентрации глицерина во внеклеточной среде. Дана классификация первичной кристаллической структуры, образующейся при фазовом переходе. Показано, что повреждение клеток наступает в результате действия двух основных факторов: 1) внутриклеточной кристаллизации и 2) дегидратации и сопутствующих ей явлений. Степень вклада в суммарный процент поврежденных клеток каждого из них определяется физико-химическими условиями замораживания.

Ил. 7. Библиогр.: 6 назв.

УДК 57.043.577.1 : 576.347 : 615.014.41

Влияние скорости замораживания и отогрева на активность дыхательной цепи митохондрий печени крыс / Петренко А. Ю.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 12, с. 29—31.

Представлены результаты исследований активности электроно-транспортной цепи митохондрий после замораживания в сочетании с быстрым и медленным отогревом митохондрий. Показано, что в процессе замораживания — оттаивания уменьшается активность дыхательной цепи, вследствие отделения от внешней поверхности внутренней мембраны цитохрома С. После замораживания и медленного отогрева изменения функциональной активности митохондрий выражены в большей степени, чем после быстрого отогрева.

Ил. 2. Табл. 1. Библиогр.: 5 назв.

УДК 57.043

Состояние сократительных белков скелетных мышц при температурных повреждениях кожи / Гусакова Н. Е., Сандомирский Б. П., Хайкин Р. К.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 12, с. 31—35.

Изучали содержание общего белка и АТФазной активности в скелетных мышцах крыс после нанесения ожога (66 ± 5° С), холодового воздействия (-52 ± 4°) и ожога с последующим криовоздействием (-6 ± 3°) в сроки 3 ч, 1; 3; 7; 14; 21 сут. Выявлены изменения изученных показателей и положительное влияние охлаждения обожженной кожи.

Табл. 1. Библиогр.: 14 назв.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043.57.536

Механизм повреждения молочнокислого стрептококка S. cremoris $T18_{15}$ при замораживании / Бронштейн В. Л., Иткин Ю. А., Шурда Г. Г., Исерович П. Г.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 12, с. 35—38.

Экспериментально показано, что повреждение клеток молочнокислого стрептококка S. cremoris $T18_{15}$ при замораживании уменьшается с увеличением количества клеток в 1 мл суспензии. Выдвинута гипотеза, которая объясняет эту зависимость повреждением бактерий в результате действия большого гидростатического давления, возникающего в замкнутых включениях во льду. Экспериментально обосновано, что гипербарическое повреждение является основным при замораживании бактерий S. cremoris $T18_{15}$.

Ил. 3. Табл. 2. Библиогр.: 5 назв.

УДК 57.043 : 612.111.014.41

Метод криомикроскопии в градиенте температуры / Ишков Г. С., Бронштейн В. Л.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 12, с. 38—42.

Описана конструкция криоприставки к оптическому микроскопу с блоком программного управления процессом охлаждения — отогрева клеточных суспензий в градиенте температуры. Приведены результаты экспериментов по механическому взаимодействию растущих кристаллов льда с эритроцитами человека. Установлены критические скорости перемещения фронта кристаллизации, при которых происходит захват эритроцитов в лед, в зависимости от состава среды. Обсуждаются возможности и преимущества метода криомикроскопии в градиенте температуры по сравнению с обычным методом криомикроскопии.

Ил. 5. Библиогр.: 5 назв.

УДК 57.043 : 578.088

Дилатометрическое исследование растворов криопротекторов / Новиков А. Н., Стрибуль Т. Ф.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 12, с. 42—46.

Изучено изменение объемов растворов ряда проникающих (этиленгликоль, глицерин, пропиленгликоль, ПЭО-100, формамид, ацетамид, диметилформамид, диметилацетамид, диметилсульфоксид, диэтилсульфоксид) и непроникающих (ПЭО-400, ПЭО-1000, ПЭО-1500, ПЭО--3000, ПЭО-6000, ПЭО-20000, поливинилпирролидон) криопротекторов при фазовом переходе вода — лед. Концентрация проникающих криопротекторов — 12,5%, непроникающих — 10%. Относительное изменение объема раствора криопротектора при его замерзании убывает с ростом концентрации раствора в пределах концентраций от 5 до 45%. Высказано предположение о том, что наблюдаемые зависимости определяются гидратацией молекул криопротекторов и их строением.

Ил. 3. Табл. 2. Библиогр.: 8 назв.

УДК 57.043

Консервирование костного мозга методом переохлаждения / Суханова Л. И., Федотенков А. Г., Данилова Л. А.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып, 12, с. 46—50.

С целью изыскания консервирующей среды для сохранения костного мозга в переохлажденном состоянии при температуре — 8° С разработаны два раствора на основе отечественных кровезаменителей лактасола и гемодеза: Г-34, содержащий гемодез, глицерин, желатин, средний цитрат натрия и ЭДТУ Na_2, и Л-34, содержащий лактасол, глицерин, желатин, средний цитрат натрия и ЭДТУ Na_2. Эти растворы обеспечивают сохранение миелокариоцитов в течение 5—7 сут и сохраняют стволовые клетки костного мозга, переохлажденного до —8° С, в течение 2 сут. При этом стволовые гемопоэтические клетки сохраняют способность к дифференцировке и вызреванию в организме облученного реципиента. Показано, что добиться глубокого и стойкого состояния переохлаждения раствора можно путем сочетания веществ, понижающих температуру кристаллизации, и более медленной скорости охлаждения.

Табл. 3. Библиогр.: 7 назв.

УДК 57.043 : 612.111.014.41

Влияние условий экспозиции эритроцитов с ПЭО-1500 на результат последующего замораживания / Кочережская И. А., Вишневский В. И.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 12, с. 50—53.

Изучали влияние экспозиции эритроцитов в водных растворах ПЭО-1500 10-, 15-, 20- и 40%-ной концентрации на этапе подготовки к замораживанию на степень их повреждения при низкотемпературном консервировании в условиях различной концентрации криопротектора и клеток в среде замораживания. Наиболее существенно условия экспозиции оказываются при замораживании разбавленных суспензий эритроцитов в низких концентрациях криопротектора.

Ил. 2. Библиогр.: 6 назв.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043 : 612.7.041.4.083.3

Органное культивирование криоконсервированной кожи человека / Волкова Н. А., Сандомирский В. П.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 12, с. 53—58.

Исследовано морфофункциональное состояние деконсервированных дермо-эпидермальных лоскутов трупной кожи в условиях органного культивирования. Установлено, что трехчасовая экспозиция с криопротектором 15%-ного раствора ПЭО-400 перед замораживанием со скоростью 25—35° С/мин обеспечивает сохранность части базальных эритроцитов, способных к пролиферации и формированию многослойной структуры. Отсутствие криопротекторов даже при высоких скоростях замораживания (400° С/мин) приводит к утрате способности эпидермиса к восстановлению; при культивировании в кожном лоскуте отмечены деструктивные процессы.

Ил. 3. Библиогр.: 5 назв.

УДК 57.043.547.422 : 618

О безопасности малых доз полиэтиленоксида-1500 в период беременности / Карташов В. Ф., Гучок М. М. — Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 12, с. 59—62.

Эмбриотропное действие полиэтиленоксида-1500 (ПЭО-1500) в дозе, рекомендованной для его клинического применения в качестве криопротектора при низкотемпературном консервировании эритроцитов человека (1/20 ЛД-50 — 0,58 г/кг), было исследовано в эксперименте на беспородных белых крысах. Вещество в данной дозе вводили ежедневно парэнтерально в течение всей беременности. Об эмбриотоксическом действии судили по данным вскрытия самок на 20-й день беременности. Тератогенный эффект изучали методами Уилсона и Доусона. Показано, что ПЭО-1500 в данных условиях опыта не оказывал повреждающего влияния на развитие плодов и не вызывал выраженного общетоксического действия на организм самок.

Табл. 3. Библиогр.: 17 назв.

УДК 57.043

Опыт лечения доброкачественных новообразований век с помощью универсальной криофтальмологической установки УМ-14 / Чередниченко В. М., Бездетко П. А., Станиславский Ю. Л.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 12, с. 63—64.

Представлены результаты лечения 29 больных с доброкачественными новообразованиями век (гемангиомы — 14 чел., папилломы — 15 чел.) и 22 больных контагиозным моллюском методом локальных криоаппликаций с помощью универсальной криофтальмологической установки УМ-14. У всех больных наступило клиническое выздоровление с хорошим функциональным и косметическим эффектом. Указывается на удобство обращения с аппаратом УМ-14, который с успехом можно использовать для лечения различных доброкачественных новообразований век в амбулаторных условиях.

Библиогр.: 7 назв.

УДК 57.043.618.146—08 : 615.832+612.014

Криоультразвуковая терапия доброкачественных заболеваний шейки матки / Запорожан В. Н., Хаит О. В., Рикберг А. Б., Бакай Э. А.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 12, с 64—69.

Изучена возможность применения комбинированного криоультразвукового воздействия для лечения патологии шейки матки, а также величина деструкции и скорости регенерации тканей в зависимости от примененной методики воздействия. Установлено, что в результате применения криоультразвукового воздействия образуется более обширная и глубокая зона некроза, чем после изолированного криогенного. Применение ультразвука в сочетании с низкими температурами оказывает также влияние на скорость репаративных процессов в сторону сокращения сроков регенерации. В зависимости от вида патологии шейки матки, а также от распространенности процесса возможно применение различных методик комбинированного воздействия, что позволит сократить сроки и повысить эффективность лечения.

Табл. 1. Библиогр.: 13 назв.

УДК 57.043.612.017.1 : 616—006.832.9

Некоторые показатели иммунитета при криохирургическом лечении онкологических больных / Цуцаева А. А., Юрченко Г. Г., Попов Н. Н., Воскобойникова Т. Н., Водолажская Л. П.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 12, с. 69—71.

Представлены показатели Т- и В-системы иммунитета до и после криохирургического лечения онкологических больных, четырех — с диагнозом рак шейки матки, одного больного с диагнозом рак слепой кишки и одного — с диагнозом рак сигмовидной кишки. Установлено, что у наблюдавшихся больных в определенной степени подавлен клеточный иммунитет и сохранен гуморальный иммунитет. Применение криохирургического метода в комплексной терапии онкологических больных способствует восстановлению реактивности Т-системы иммунитета и выздоровлению в местном процессе.

Ил. 2. Библиогр.: 2 назв.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043 : 616.127—005.8 : 616.832.9

Температурные градиенты организма животного при кранио-церебральной гипотермии / Г. А. Бабийчук, С. Е. Гальченко, В. С. Марченко, В. Ф. Тарасов.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 12, с. 71—73.

Изучены динамика снижения температуры животных и температурные градиенты в организме при кранио-церебральной гипотермии. Исследования проведены при температурах хладоагента — 10° С, —20° С и —40° С. Выявлена прямо пропорциональная зависимость падения температуры коры головного мозга и величины температурных градиентов в организме от температуры хладоагента. Получены усредненные характеристики снижения температуры тела и температурных градиентов в организме при различных температурах хладоагента.

Ил. 2. Библиогр.: 8 назв.

УДК 57.043.615.832.9.032.91

Особенности электрокардиографических показателей у экспериментальных животных в условиях кранио-церебральной гипотермии / Бабийчук Г. А., Соснова И. И.— Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 12, с. 73—75.

Приведены данные электрокардиографических показателей у животных (кроликов) в норме и при проведении кранио-церебральной гипотермии. Описана длительность отдельных элементов электрокардиограммы при гипотермии и у интактных животных. При умеренной гипотермии отмечается лабильность сердечного ритма, процессов возбуждения и проводимости миокарда. Сделан вывод о том, что в условиях умеренной кранио-церебральной гипотермии такие функции миокарда, как возбудимость и проводимость, находятся в функционально выгодных условиях.

Табл. 1. Библиогр.: 10 назв.

УДК 57.043

Лабораторная установка для отработки режимов криоконсервирования биологических объектов в элементарных объемах / Новиков А. Н., Олейник С. Т., Ишков Г. С., Копейка Е. Ф.— Криобиология и криомедицина, 1983, ывп. 12, с. 75—78.

Предлагается отработку режимов криоконсервирования проводить на объемах биоматериала, моделирующих элементарный объем контейнера. Разработана лабораторная установка для отработки режимов криоконсервирования биологических объектов в элементарных объемах, позволяющая варьировать в автоматическом режиме скорости замораживания и отогрева в широком диапазоне, проводить процесс фазового перехода вода — лед идентично таковому в больших объемах.

Ил. 2. Библиогр.: 1 назв.

УДК 57.043.576.3 : 535.822.1 : 535.24

О работе на двухлучевом сканирующем цитоспектрофотометре МУФ-5 с применением одноволнового метода двух площадей и двухволнового метода фотометрических измерений / Белоножко А. П., Скорняков Б. А. Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 12, с. 78—81.

Дано описание новых модификаций одноволнового метода двух площадей, применяемого при фотометрии мазков и отпечатков тканей, и двухволнового метода фотометрических измерений при работе на установке МУФ-5, обоснованы преимущества этих методов, приведены конкретные методические указания по работе, оценены возможные ошибки измерений.

Библиогр.: 15 назв.

UDC 57.043 : 612.111

Problem of Storage Extension for Thawed Erythrocytes: Improvement of Resuspending Solutions / Guseva N. R., Lugovoy V. I.— Kriobiologiya i kryiomeditsina, 1983, iss, 12, p. 3—13.

The review is devoted to the problem of thawed-deglyceroled erythrocytes storage at low positive temperatures. Main attention is paid to the problems of creating and improving solutions for resuspending thawed-washed cells. Both modern views of reasons of progressing hemolysis in deconserved erythrocytes and main practical methods for increasing suspending medium efficiency are analyzed. Concrete success achieved in this field is discussed from the standpoint of the most expedient directions of further investigations in development of methods for storage extension of thawed erythrocytes at 4° C.

Refs: 80 titles

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 57.043.577.347

Temperature-Dependent Changes in Erythrocyte Structure. Communication I. Role of Ions and Phase Transitions in the Induction of Cryohemolysis Process / Belous A. M., Bondarenko V. A., Bondarenko T. P., Babiychuk L. A.— Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 12, p. 13—24.

Erythrocyte cooling from 37 to 0° C in the presence of 1.2 M NaCl or 0.86 M sucrose is accompanied by the so-called phenomenon of "cold shock", by K^+ ions and hemoglobin outcome. A detailed analysis of the experimental material gives evidence that this phenomenon is based on the phase transitions of lipids. Differences observed during cell cooling in medium which contains electrolytes (NaCl) and nonelectrolytes (sucrose) may be explained by osmotic effects of water and chloride ions. The critical temperature of erythrocytes cold hemolysis is 10—15° C, which is probably due to the polymorphic conversion of phosphatidiethanolamine. Cells exhaustion for ATP makes them more stable to cooling under hypertonic conditions. It is supposed that the effects observed are due to changes in the cell protein cytoskeleton under variations in the cell form and due to dynamic rearrangements in the membrane structure.

6 figs. Refs: 41 titles

UDC 57.043 : 548.0 : 661.073.585

Damage of Kidney Cells in Golden Hamster During Freezing / Kuleshova L. G., *Khudyakov G. A.*— Kriobiologya i kriomeditsina, 1983, iss. 12, p. 24—28.

The character of golden hamster kidney cell damage depending on the programmes of cooling and glycerol concentration in an extracellular medium is studied microscopically. The initial crystal structure formed after phase transition is classified. It is shown that cell damage is a result of two main factors: intracellular crystallization and dehydration with accompanying phenomena. The part of each of them in the total percentage of damaged cells is determined by physicochemical conditions of freezing.

7 figs. Refs: 6 titles

UDC 57.043. : 577.1 : 576.347 : 615.014.41

Effects of Cooling and Thawing Rates on the Respiratory Chain Activity in the Rat Liver Mitochondria / Petrenko A. Yu.— Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 12, p. 29—31.

The paper presents results of studies in the activity of mitochondria electron transport chain after freezing in combination with quick and slow thawing. It is shown that during the freezing-thawing process the activity of the respiratory chain decreases due to cytochrome C separation from the outer surface of the inner membrane. After freezing and slow thawing the changes in the functional activity of the mitochondria are more pronounced than after quick thawing.

2 figs. 1 table. Refs: 5 titles

UDC 57.043

Condition of Contractile Proteins in Skeletal Muscles Under Temperature Damages of Skin / Gusakova N. E., Sandomirsky B. P., Khaikin R. K.— Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 12, p. 31—35.

Content of total protein and ATP activity are studied in skeletal muscles of rats after inflicting of the burn ($66 \pm 5°$), exposure to cold ($-52 \pm 4°$) and burn with further cryoeffect ($-6 \pm 3°$) 3 hours, 1, 3, 7, 14, 21 days after. Changes in the studied indices and positive effect of the burned skin cooling are revealed.

1 table. Refs: 14 titles

UDC 57.043.57.536

Mechanism of Lactic Acid Streptococcus S. cremoris $T18_{15}$ Damage During Freezing / Bronstein V. L., Itkin Yu. A., Shurda G. G., Iserovich P. G.— Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 12, p. 35—38.

It is shown experimentally that damage of lactic acid streptococcus S. cremoris $T18_{15}$ cells during freezing decreases with an increase of the cell quantity in 1 ml of suspension. A hypothesis is advanced which explains this dependence by the bacterium damage due to high hydrostatic pressure arising in closed inclusions in ice. It is proved experimentally that hyperbarical damage is the main thing during freezing of S. cremoris $T18_{15}$ bacteria.

3 figs. 2 tables. Refs: 5 titles.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 57.043 : 612.111.014.41

Method of Cryomicroscopy in Temperature Gradient / Ishkov G. S., Bronstein V. L.— Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 12, p. 38—42.

The paper deals with a design of a cryoattachment to the optical microscope with the programme control unit for the process of cell suspension cooling-thawing in a temperature gradient. Results of experiments on mechanical interaction of growing ice crystals with human erythrocytes are given. Critical crystallization front movement velocities under which the erythrocyte capture by the ice occurs are determined depending on the environmental composition. Possibilities and advantages of the cryomicroscopical method in a temperature gradient are discussed in comparison with the conventional method of cryomicroscopy.

5 figs. Refs: 5 titles

UDC 57.043 : 578.088

Dilatometric Study of Cryoprotector Solutions / Novikov A. N., Stribul T. F.— Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 12, p. 42—46.

Changes in volumes of some cryoprotector solutions are studied during water-ice phase transition. The cryoprotector solution volume increase during cryopreservation is shown as one of damage factors during intracellular and extracellular crystallization. Some penetrating and nonpenetrating cryoprotectors are studied. The dependence of relative changes in the cryoprotector solution volume during its freezing on concentration and type of cryoprotector is estimated.

3 figs. 2 tables. Refs: 8 titles

UDC 57.043

Cryopreservation of Bone Marrow by Supercooling / Sukhanova L. I., Fedotenkov A. G., Danilova L. A.— Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 12, p. 46—50.

With the purpose of preserving supercooled bone marrow at —8° C two supercooling solutions are developed on the basis of the native blood substitutes — hemodese and lactasole: G-34 containing hemodese, glycerol, gelatin, medium sodium citrate and EDTA Na_2 and L-34 containing lactasole, glycerol, gelatin, medium sodium citrate and EDTA Na_2. These solutions provide preservation of myelokaryocytes for 5-7 days and preserve stem cells of bone marrow supercooled up to —8° C for two days. Stem haemopoietic cells retain their capacity for differentiation and maturing in the organism of the irradiated recipient. It is shown that a deep and stable condition of a supercooled solution may be achieved by combination of substances decreasing the crystallization temperature and a slower cooling rate.

3 tables. Refs: 7 titles

UDC 57.043 : 612.111.014.41

Effect of Conditions of Erythrocyte Exposure to PEO-1500 on Results of Subsequent Freezing / Kocherezhskaya I. A., Vishnevsky V. I.— Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 12, p. 50—53.

It is studied how erythrocyte exposure to PEO-1500 aqueous solutions of 10, 15, 20, and 40% concentration during preparation for freezing affects the degree of erythrocyte damage during low-temperature preservation under conditions of different concentration of cryoprotector and cells in the freezing medium. The exposure conditions are mostly manifested during freezing of diluted erythrocyte suspensions in low concentrations of cryoprotector.

2 figs. Refs: 6 titles

UDC 57.043 : 612.7.041.4.083.3

Organ Cultivation of Humon Cryopreserved Skin / Volkova N. A., Sandomirsky B. P.— Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 12, p. 53—58.

A morphofunctional state of frozen-thawed dermoepidermal grafts of dead skin is studied under conditions of organ cultivation. It was stated that 3-hour exposure to 15% solution of PEO-400 cryoprotector before freezing at a rate of 25-35° C/min provides preservation of a part of basal epidermocytes capable to proliferate and to form a multilayer structure. Absence of cryoprotectors even under high rates of freezing (400° C/min) leads to the loss of epidermis ability to regeneration. Destructive processes were observed in the skin graft during cultivation.

3 figs. Refs: 5 titles

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 57.043.547.422 : 618

Safe Usage of Low PEO-1500 Doses During Pregnancy / Kartashov V. F., Guchok M. M — Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 12, p. 59—62.

The embryotropic effect of PEO-1500 in dosage recommended for its clinical usage as a cryoprotector during low-temperature preservation of human erythrocytes (1/20 LD-50 — 0.58 g/kg) was investigated in the experiment with mongrel albino rats. The mentioned dose of the substance was injected parenterally during the whole pregnancy period. The embryotoxic effect was analyzed after female rats autopsy on the 20th day of pregnancy. The teratogenic effect was investigated by the Wilson and Dowson methods. It was shown that under given experimental conditions PEO-1500 had no destructive effect on the embryo development and induced no expressed general toxic action on the organism of pregnant female rats.

3 tables. Refs: 17 titles

UDC 57.043

Experience of Benign Palpebra Tumour Treatment by Means of the Universal Cryoophthalmologic Installation УМ-14 Installation / Cherednichenko V. M., Bezdetko P. A., Stanislavsky Yu. L.— Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 12, p. 63—64.

The paper presents results of treatment of 29 patients with benign palpebra tumours (hemangioma — 14 persons, papilloma — 15 persons) and 22 patients with molluscum contagiosum by the local cryoapplication method using the universal cryoophthalmologic УМ-14 installation. All the patients got clinical recovery with a good functional and cosmetic result. The УМ-14 installation is convenient in usage and may be successfully applied for treating various benign palpebra tumours under ambulatory conditions.

Refs: 7 titles

UDC 57.043.618.146-08 : 1 615,832 + 612.014

Cryoultrasonic Therapy of Cervix Uteri Benign Diseases / Zaporozhan V. N., **Khait O. V., Rikberg A. B., Bakay E. A.**— Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 12, p. 64—69.

Combined cryosupersonic therapy was studied from the standpoint of its application for treatment of cervix uteri pathology. The degree of destruction and tissue regeneration rate are estimated depending on the methods of treatment. It is stated that after cryosupersonic treatment the formed necrosis zone is wider and deeper than after isolated cryogenic treatment. The application of supersound in combination with low temperatures affects the rate of repair processes and decreases the time of regeneration. It is possible to apply different methods of combined treatment depending on the type of cervix uteri pathology and spread of the process. This will decrease the time of treatment and increase its efficiency.

1 table. Refs: 13 titles

UDC 57.043.612.017.1 : 616—006.832.9

Some Immunity Indices During Cryosurgical Treatment of Oncologic Patients / Tsutsaeva A. A., Yurchenko G. G., Popov N. N., Voskoboinikova T. N., Vodolazhskaya L. P.— Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 12, p.69—71.

The paper presents T- and V-indices of immunity before and after a cryosurgical treatment of oncologic patients: 4 — with cervix uteri carcinoma, 1 — with caecum carcinoma and 1 — with colon sigmoideum carcinoma. It is determined that all the patients had a depressed cell immunity and preserved humoral immunity. The use of a cryosurgical method in complex therapy of oncologic patients restore reactivity of T-system of immunity and promote recovery in local process.

2 figs. Refs: 2 titles

UDC 57.043: 616 27—005.8: 616 832.9.

Temperature Gradients of Animal Organism During Craniocerebral Hypothermia / Babiychuk G. A., Galchenko S. E., Marchenko V. S., Tarasov V. F.— Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 12, p. 71—73.

Dynamics of temperature drop in animals and temperature gradients in the organism were studied during craniocerebral hypothermia. The studies were made at a coolant temperature of —10° C, —20° C, and —40° C. A direct proportion dependence is revealed for the brain cortex temperature drop and temperature gradient value in the organism on the coolant temperature. The average characteristics are obtained for the drop in the body temperature and temperature gradients in the organism at different coolant temperatures.

2 figs. Refs: 8 titles.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 57.043.615.832.9.032.91

Peculiarties of Electrocardiographic Indices in Experimental Animals Under Conditions of Craniocerebral Hypothermia / Babiychuk G. A., Sosnova I. I.— Kriobiologia i kriomeditsina, 1983, iss. 12, p. 73—75.

Electrocardiographic parameters are presented for animals (rabbits) in normal state and under craniocerebral hypothermia. The duration of certain electrocardiogram elements under hypothermia and in intact animals is described. A moderate hypothermia is distiguished by lability of cardiac rhythm and myocardium excitation and conduction processes. A conclusion is made that under moderate craniocerebral hypothermia such myocardium functions as excitation and conduction are under functionally advantageous conditions.

1 table. Refs: 10 titles

UDC 57.043

A Laboratory-Scale Device for Developing Rates of Biological System Cryopreservation in Elementary Units / Novikov A. N., Oleinik S. T., Ishkov G. S., Kopeika E. F.— Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 12, p. 75—78.

It is suggested to develop cryopreservation rates using the biomaterial volumes which simulate elementary unit of a container. The laboratory-scale device is designed for developing the rates of biological system cryopreservation in elementary units. It permits a wide-range automatic variation of cooling and thawing rates and conduction of water-ice phase transition identical to that in big volumes.

2 figs. Refs: 1 title

UDC 57.043.576.3 : 535.822.1 : 535.24

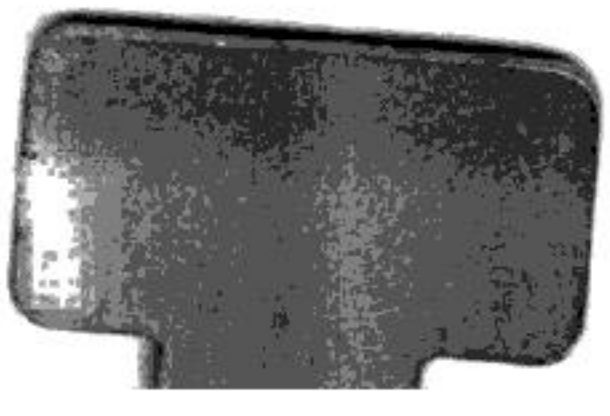
Operation with Two-Beam Scanning МУФ-5 Cytospectrophotometer Using One-Wave Method of Two Areas and Two-Wave Method of Photometric Measurements / Belonozhko A. P., Skornyakov B. A.— Kriobiologiya i kriomeditsina, 1983, iss. 12, p. 78—81.

New modifications are described of a one-wave method of two areas used for photometry of smears and tissue prints and a two-wave method of photometric measurements in operation with the МУФ-5 unit. Advantages of these methods are proved with concrete procedure and operation instructions given. Possible mistakes of the measurements are evaluated.

Refs: 15 titles

Матеріал, захищений авторським правом





Матеріал, захищений авторським правом

Цена 1 руб. 30 коп.

НАУКОВА ДУМКА

Криобиология и криомедицина, 1983, вып. 12, 1—92

Матеріал захищений авторським правом