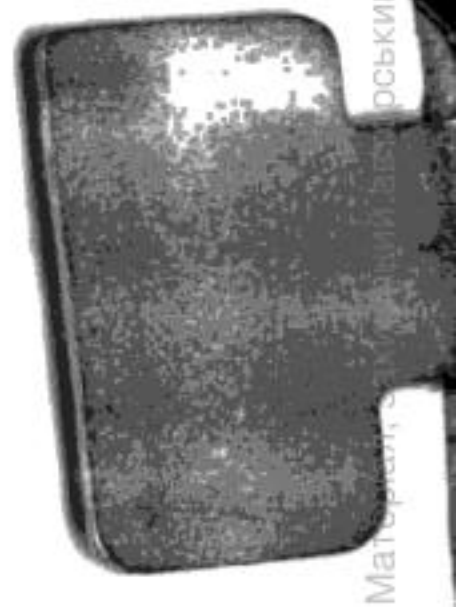
КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА

ЮМР

5

1979

Матеріал захищений авторським правом



Матеріал захищений авторським правом

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ

КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА

РЕСПУБЛИКАНСКИЙ МЕЖВЕДОМСТВЕННЫЙ СБОРНИК

Основан в 1975 г.

ВЫПУСК
5

КИЕВ «НАУКОВА ДУМКА» 1979

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043

В сборнике изложены результаты экспериментальных и теоретических исследований, посвященных механизмам криоповреждений и криозащиты биологических объектов. Освещены структурные и физико-химические особенности повреждения биологических систем на различных уровнях их организации при воздействии охлаждения и криопротекторов. Представлены статьи по математическому моделированию процессов криоповреждений, построения рациональных схем криогенной аппаратуры, используемой в биологии и медицине.

Рассчитан на широкий круг биологов и медиков, а также специалистов, разрабатывающих теоретические и прикладные аспекты низкотемпературной консервации биологических объектов.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

Редакция межведомственных сборников

К 50500-310 / М221(04)-79 425-79 4101000000

© Издательство «Наукова думка», 1979

Матеріал, захищений авторським право

УДК 57.043.577:576.347

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

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КРИОПОВРЕЖДЕНИЯ МЕМБРАННЫХ СТРУКТУР

Гипотезы о низкотемпературном повреждении клеток [5] значительно расширяют наши представления о значении скоростей замораживания и отогрева, роли физико-химических факторов, формирующихся при замораживании биосистемы при фазовом переходе вода — лед. Это позволило сформулировать двухфакторную гипотезу криоповреждений [47], теории «минимального объема» клетки [48], лиотропного действия солей [46] и сульфгидрильную гипотезу холодовой инактивации [42].

Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе криоповреждений клеток, согласно указанным выше гипотезам, во многом еще не ясны. Установлено, что при замораживании наблюдается потеря клетками липидов [14], хотя не вполне понятно, каким образом это реализуется. Поскольку структурная и функциональная интеграции клетки обеспечиваются прежде всего мембранами и ассоциированными с ними ферментами [4], любое воздействие, в том числе и охлаждение, вызывает в ней выраженные изменения их структуры и функции [27]. Поэтому следует считать, что мембранные структуры, которые ассоциированы в основном слабыми связями [34], являются весьма криолабильными и в первую очередь будут подвергаться обратимым либо необратимым повреждениям [17]. В связи с этим мы попытались рассмотреть последовательность молекулярных перестроек компонентов биомембран под воздействием низких температур с целью возможного создания интегральной схемы криоповреждения клетки.

В настоящее время установлено, что как плазматические, так и цитоплазматические мембраны клеток характеризуются структурной асимметрией [13, 23]. Учитывая различия в структурной организации плазматических и цитоплазматических мембран [23, 34, 41, 54], можно предположить наличие специфических черт в реакциях на снижение температуры для каждого типа мембран [42]. При этом в рамках обсуждаемой гипогезы криоповреждения мы предлагаем различать такие понятия, как нестабильность мембран при низких температурах и их криоповреждения. Нестабильность определяется фазовыми переходами и степенью изменений конформационной устойчивости компонентов мембраны в зоне низких околонулевых температур и зависит от физико-химических и структурных свойств самой мембраны [13, 15]. Криоповреждения мембраны определяются действием различных физико-химических факторов, формирующихся в зоне низких температур при вымерзании воды. Взаимосвязь между этими понятиями проявляется в том, что нестабильность мембраны сенсибилизирует ее к действию физико-химических факторов среды в зоне низких температур.

В интактных биологических мембранах интерпретация молекулярных эффектов, вызванных снижением температуры, затруднительна. Однако можно выделить следующие ключевые процессы, происходящие в мембране при ее охлаждении: фазовые переходы липидов из жидко-

Матеріал, захищений авторським правом

кристаллического состояния в состояние геля; образование кластеров липидов; латеральная сепарация липидов; агрегация мембранных белков; обратимые (или необратимые) конформационные изменения в белках. Комплексное влияние этих факторов в процессе охлаждения до субнулевых температур обусловливает нестабильность мембран в зоне низких температур и повышение чувствительности их к действию физико-химических факторов замораживания среды.

Процесс фазового перехода приводит к образованию весьма ригидной мембранной структуры, пластичность которой заметно отличается от состояния мембраны при физиологических температурах, когда жирнокислотные цепи липидов находятся в жидкокристаллическом состоянии, ассоциированном с повышенной конформационной подвижностью цепей [15, 39]. При температуре ниже фазового перехода в гель-фазе подвижность жирнокислотных цепей весьма ограничена и движение их анизотропно [57]. Температура перехода возрастает с увеличением длины жирнокислотных цепей и уменьшается с увеличением степени их ненасыщенности, а также зависит от химической природы полярной головки липидов [15]. Вместе с тем температура фазового перехода зависит от характера взаимодействия липидов с белками [52].

Процессы фазовых изменений липидов существенно различаются в мембранах субклеточных органелл и плазматических мембран клеток. Плазматические мембраны сильно обогащены холестерином [34], что снижает возможность резких фазовых переходов в них. Это является следствием специфического влияния холестерина на упаковку и гидратацию липидов в мембране [35]. В случае мембран субклеточных органелл фазовые изменения липидов начинаются при температуре +25°С и завершаются в температурной зоне — 20°С [11, 28]. Альвагер и Балькавадж [7] предположили, что именно фазовыми переходами липидов объясняется элиминация разных компонентов мембран «теней» митохондрий после их замораживания до —15°С, т. е. в условиях, когда действие различных физико-химических факторов среды, в частности солей, ограничено. Фазовые переходы влияют в первую очередь на пространственную упорядоченность мембран. Это обусловлено тем, что фазовые переходы приводят к перераспределению различных компонентов мембраны, т. е. лежат в основе таких процессов, как латеральная сепарация липидов и агрегация мембранных белков.

При охлаждении образуются кластеры липидов, что связано с так называемым предзамораживанием липидных бислоев [39, 40]. Подобное явление обусловлено расширением областей ближней упорядоченности при приближении температуры к точке замерзания. Кластеры представляют собой короткоживущие динамические образования соседних молекул, характеризующиеся координированным движением [40]. Ли [40] предполагает, что образование кластеров в мембранах при снижении температуры существенно влияет на липид-белковые взаимодействия и модифицирует активность ферментов.

Имеется значительное несоответствие между температурами изломов Аррениусовских кривых активности различных ферментов и температурами фазовых переходов липидов мембран [40]. Так, изломы кривых при охлаждении митохондрий наблюдаются в районе температур от +20 до +25°С, в то время как фазовые переходы липидов происходят в интервале температур от 0 до —15°С [11, 28]. Такое несоответствие можно объяснить различиями между температурами кластеризации окружающих ферменты липидов и температурами фазового перехода основной массы липидов.

При охлаждении мембран происходит фазовая сепарация липидов, обусловленная их латеральным движением в плоскости бислоя с образованием районов, обогащенных одинаковыми молекулами липидов

Матеріал, захищений авторським правом

[36, 37]. Фазовая сепарация липидов обусловлена в первую очередь неспособностью определенных липидов смешиваться в гель-фазе, однако это свойство к перемешиванию сохраняется в текущих, жидкокристаллических липидах. Филлипс [55] показал, что при замораживании смеси диолеиллецитина с насыщенными липидами до температуры ниже −22°С образуются две сегрегированные области — закристаллизованного диолеиллецитина и закристаллизованных областей насыщенных липидов.

Равновесие в гель-фазе при данной температуре может быть достигнуто диффузией в пределах гель-фазы или быстрым движением границы между областью геля и жидкокристаллической фазой [56]. Анализ фазовых диаграмм показал, что быстрое замораживание от температур выше начала фазового разделения липидов может привести к образованию твердого раствора без латерального разделения липидов. При медленном охлаждении в условиях равновесия при низких температурах формируется несколько фаз [36].

Многие данные свидетельствуют в пользу того, что фазовые переходы и фазовая сепарация липидов обусловливают нестабильность мембран вследствие образования дефектов структуры [6, 12]. Для того чтобы мембрана образовывала замкнутую поверхность, она должна иметь двухмерную искривленность. Наиболее простой способ сохранения искривленности мембран в гель-состоянии — наличие дислокации решетки и образование дефектов мембраны.

Согласно Линдену [43], в процессе фазового разделения липидов система претерпевает значительные термодинамические изменения, в первую очередь флуктуации по плотности в различных участках мембраны, обусловливающие значительное латеральное сжатие определенной микрозоны мембраны. Все это влияет на состояние соседнего участка таким образом, что вызывает формирование дефектной области между ними [43, 44]. Возникновение таких областей существенно повышает проницаемость мембраны для ионов и метаболитов на этом участке [12, 31].

Схематическое представление о структурных фазовых переходах липидов, сопровождающихся образованием кластеров и процессов латеральной сепарации, можно получить из рис. 1 и 2.

Экспериментальные данные [33] подтверждают, что увеличение проницаемости в липосомах, содержащих насыщенные липиды и некоторое количество ненасыщенных, связано главным образом с образованием «дефектной» области на границе между липидными доменами в различном фазовом состоянии. Существенной особенностью мембран с дефектами структуры, вызванными охлаждением, является их частичная способность к репарации в процессе «отжига» при температурах выше точки начала фазового перехода [6, 36]. Например, показано [6], что после замораживания мембран микобактерий до температуры —70°С возникали дефекты их структуры, сопряженные со снижением уровня окислительного фосфорилирования. В процессе «отжига» при температуре +50°С происходила частичная репарация структуры, сопровождающая восстановление исходного уровня окислительного фосфорилирования. Однако репарационные явления, выраженные в мембранах отдельных видов бактерий, присущи не всем видам клеток либо проявляются гораздо слабее [6].

Помимо фазовых переходов липидов, ведущих к образованию дискретных зон в процессе охлаждения мембран целого ряда клеток, в них происходит миграция мембранных белков и их агрегация в белковых доменах [28, 66]. Кроме того, завершение кристаллизации липидов сопровождается выдавливанием некоторых белковых комплексов из липидного матрикса [28], вследствие чего они могут изменять свои свойства и активность.

Матеріал, захищений авторським правом

Процесс агрегации белков сопряжен с латеральной сепарацией липидов в плоскости мембран [66]. Так, при охлаждении лимфоцитов в их ядерных мембранах белки «пронизывают» мембрану и «вымораживаются» из одного монослоя в противоположный, т. е. перпендикулярно плоскости мембраны [63], при этом устанавливается поперечная сегрегация белков [39]. Основной фактор, обусловливающий подобную направленность процесса, — асимметричное распределение холестерина, ограничивающего латеральную диффузию белков [21] и фазовую сепарацию липидов [34].

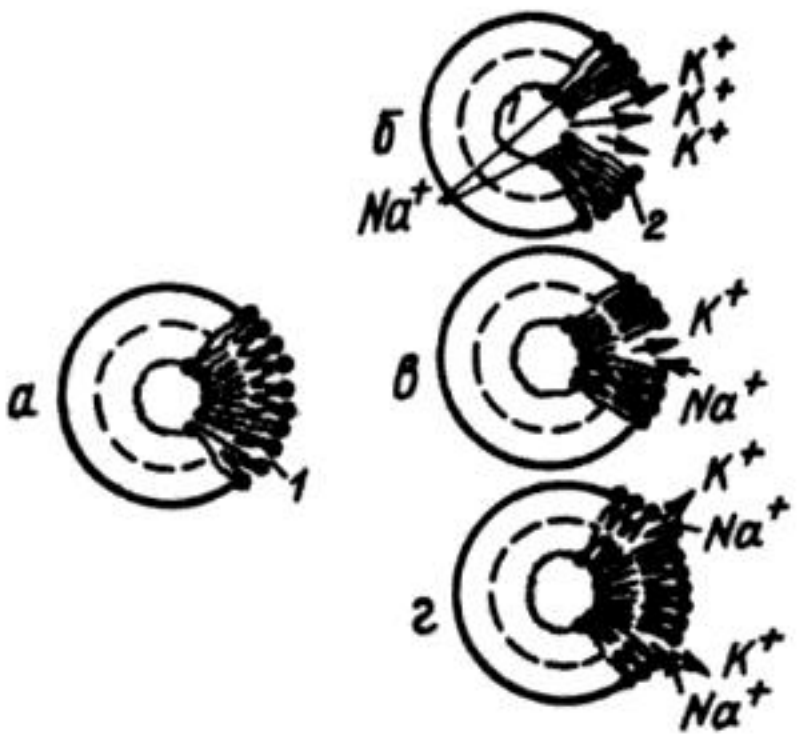


Рис. 1. Возможные варианты физико-химического состояния липидов и образования дефектов мембран при охлаждении:

а — жидкокристаллическое состояние липидного слоя мембраны; *б* — низкотемпературный фазовый переход фосфолипидного бислоя в твердокристаллическое состояние с образованием сквозного дефекта мембраны; *в* — частичный дефект мембраны за счет фазового перехода поверхностного слоя липидов; *г* — множественные частичные дефекты мембраны. Состояние липидов *1* — жидкокристаллическое; *2* — твердокристаллическое.

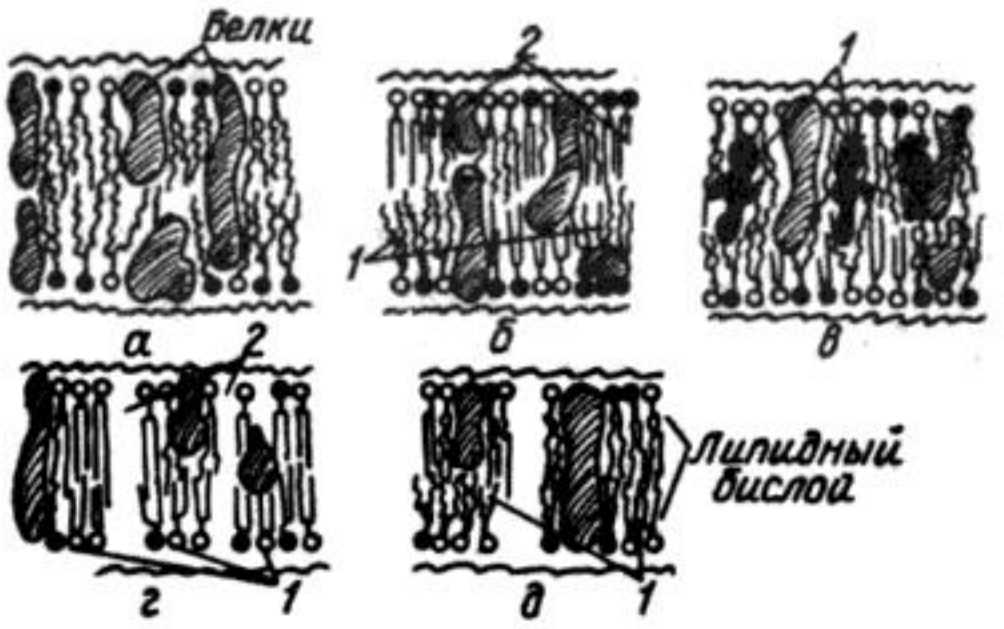


Рис. 2. Виды температурных фазово-структурных переходов липидов в мембранах и роль в этих процессах холестерина:

а — нативная мембрана; *б* — образование кластеров липидов, содержащих жидко- *(1)* и твердокристаллические *(2)* фазы; *в* — отсутствие фазовых переходов в мембране в местах локализации холестерина (*1*); *г* — латеральная сепарация липидов в мембране *(1)* и образование дефектных зон (*2*); *д* — образование микродоменов, обогащенных фосфолипидами вблизи белков *(1)*.

Иная картина наблюдается в объединенных холестерином мембранах. В наружной мембране митохондрий агрегация белков начинается при температуре +8°С и становится максимальной при температуре −6°С, в то время как во внутренней мембране начало агрегации белков наблюдается при температуре −8°С с максимумом при −13°С [28]. Когда температура мембраны снижается до температуры фазового перехода, параметр упорядоченности липидов и, соответственно, степень влияния белковых молекул возрастают. Почти ничего не известно о том, в какой степени агрегация белков влияет на нестабильность мембраны в зоне низких температур. Однако тот факт, что белки мембраны стабилизированы в первую очередь липидами, дает основание предполагать, что белки полярной области мембраны более уязвимы к повреждающему действию низкотемпературных факторов, по сравнению с белками, интеркалированными в липидный (гидрофобный матрикс [29].

Влияние температуры на структуру мембран в значительной степени зависит от вклада так называемых слабых связей или слабых взаимодействий, в частности гидрофобных [31]. Известно, что сила гидрофобных взаимодействий увеличивается с повышением температуры и уменьшается при охлаждении среды [10]. Это имеет важное значение в связи с тем, что ослабление гидрофобных взаимодействий при низких температурах отражается прежде всего на стереохимической

Матеріал, захищений авторським правом

специфичности специализированных участков мембраны, включающих мультиферментные комплексы, системы ионного транспорта, рецепторные зоны мембран и т. д. Ослабление гидрофобных взаимодействий в мембране с понижением температуры предполагает модификацию вицинальной воды, локализованной в микроструктурах мембраны. В процессе замораживания отмечены два типа изменений в поверхностной (вицинальной) воде. Первый: ассоциированные с замораживанием высококооперативные процессы, захватывающие большое количество молекул воды, и изменение ее структуры [20]. Наиболее существенная особенность вицинальной воды — наличие структурных переходов при 45, 30 и 15°С [20].

Второй тип температурных изменений — кооперативные эффекты— наблюдаются на поверхности раздела лед — вода [19]. Имеются прямые доказательства того, что фазовые переходы вицинальной воды и ее элиминирование — один из факторов холодового шока клеток [44].

Низкотемпературная дегидратация, особенно при глубоком замораживании, может непосредственно отразиться на целостности мембраны, поскольку мембраносвязанная вода имеет фундаментальное значение в поддержании структуры мембраны [16, 57]. Так, количество воды, гидратирующей липиды, зависит от природы и ориентации полярной головки липидов и насыщенности жирнокислотных цепей [35]. Установлено, что с полярной головкой лецитина может быть прочно связано 6—10 молекул воды, не замерзающих даже при температуре —100°С [25]. Эксперименты по гидратации липидов свидетельствуют о том, что имеется несколько типов структуры воды, связанной с мембраной [23]. При снижении температуры изменяется гидратация полярных головок (при температуре фазового перехода) [57].

Подробное исследование характера гидратации липидов при замораживании различных мембранных структур [63] показало, что, в отличие от белков, в определенных температурных зонах происходят резкие изменения степени гидратации липидов. В процессе замораживания однослойных везикул из фосфатидилхолина до температуры −35°С гидратация менялась при −7 и −25°С, а также при —25 и −35°С. Подобная закономерность наблюдалась и для смешанных везикул из фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина [30]. Молекулы лецитина и фосфатидилэтаноламина имеют одинаковое число молекул воды в главной оболочке [30], однако лецитиновая фаза более стабильна при охлаждении. При охлаждении максимально гидратированной фазы вода — фосфатидилэтаноламин до температур ниже фазового перехода система быстро превращается в кристаллический коагель и свободную воду, в то время как охлаждение водно-лецитиновой фазы приводит к образованию стабильного геля [30]. При низких температурах это, очевидно, определенным образом влияет на стабильность плазматических мембран клеток, в которых лецитин сосредоточен в основном на внешней стороне липидного бислоя [30]. Присутствие холестерина увеличивает гидратацию полярных групп липидов, что существенным образом влияет на динамику низкотемпературной дегидратации мембран, обогащенных холестерином. В этом случае дегидратация полярных областей молекул будет менее выраженной по сравнению с мембранными структурами с небольшим содержанием холестерина.

Многие исследователи сходятся во мнении, что высокие концентрации электролитов, формирующиеся в зоне низких температур при вымерзании основной массы чистой воды, являются одним из важнейших факторов криоповреждения мембранных структур клетки [46—48].

В целом можно выделить два существенно различающихся объяснения механизмов криоповреждения биомембран высокими концентрациями электролитов: 1) повышение концентрации электролитов приводит к осмотическому сжатию (шринкеджу) клетки, и при достижении

Матеріал, захищений авторським правом

клеткой определенного минимального объема происходят коллапс мембраны и ее разрыв [48; 49]; 2) высокие концентрации электролитов способны непосредственно влиять на мембрану, что приводит к нарушению ее структурной целостности и химической модификации компонентов [46]. Процесс осмотического сжатия клеток относится прежде всего к эритроцитам, и при рассмотрении его следует различать две стороны: изменение структуры мембран клеток, подвергнутых инкубации в условиях высокой гиперосмолярности при температурах от +25 до +37°С и затем охлажденных до температуры 0°С и ниже, а также изменение структуры мембраны при низких температурах и изменение объема среды вследствие кристаллизации внеклеточной воды с одновременным повышением концентрации солей вне клетки и оттоком внутриклеточной воды.

Первый процесс — это так называемый термальный шок эритроцитов, второй лежит в основе концепции, выдвинутой Мериеном [48] и постулирующей наличие определенного минимального объема, до которого клетка может дегидратироваться без повреждения мембраны. Эритроциты подвергаются термальному шоку только в условиях гиперосмолярности [24, 26, 49], а клетки и субклеточные организмы с низким содержанием холестерина — только в изоосмотических условиях [29]. Инкубация при постоянной температуре в интервале от +25 до +37°С в условиях повышенной гиперосмолярности не влияет существенно на структуру мембран [24, 49]. Это свидетельствует о том, что фактором, сенсибилизирующим клетку к высокой осмолярности среды при термическом шоке, является снижение температуры и нестабильность мембраны при околонулевых и субнулевых температурах.

Подобным же образом следует изучать и процесс осмотического сжатия клетки в зоне низких температур, что позволит рассматривать оба процесса, учитывая нестабильность различных типов мембран. В последней работе Меримен [48] показывает, что гиперосмолярность может непосредственно влиять на мембрану, а уменьшение клеточного объема — явление вторичное. При уменьшении объема, как и при фазовых переходах, предполагается единый механизм создания мембранного стресса — латеральное сжатие липидного бислоя. Объединение двух процессов может стать единым механизмом повреждения эритроцитов только при условии термотропизма эритроцитарных мембран.

В интактной мембране эритроцитов наблюдается асимметрия текучести — более ригидный наружный слой и более жидкий внутренний [60]. Различия текучести мембраны эритроцитов обусловлены преимущественной локализацией холестерина на внешней стороне бислоя, сетью белков, сформированной спектрином, миозиноподобных и актиноподобных полипептидов, которые взаимодействуют с интегральными белками мембраны [23]. Эти два компонента — важные факторы, обусловливающие стабильность либо нестабильность мембран эритроцитов.

Различными методами исследования показано наличие термотропизма в мембранах эритроцитов [58] и подтверждено развитие в них слабокооперативных переходов и дискретных температурных зон, в которых происходит кооперативный фазовый переход. Процесс фазового перехода сопровождается модификационными и конформационными изменениями мембранных белков. Поскольку в мембранах эритроцитов значительная часть липидов не связана с холестерином, фазовые переходы происходят не во всей мембране, а в микроскопических доменах. Более тщательные исследования [58] показали, что главный фазовый переход липидов эритроцитарной мембраны происходит не при температуре +18°С, а в интервале температур от +10 до —20°С с максимумом при —8°С. Фазовые переходы в эритроцитарной мембране могут быть объяснены, если допустить наличие истощенных по холестерину участков мембраны.

Матеріал, захищений авторським правом

Таким образом, различие в термотропизме плазматических мембран и мембран с малым содержанием холестерина заключается в том, что фазовые переходы в первом типе мембран происходят только в микродоменах, окружающих белки, что обусловливает взаимовлияние липидов образованных доменов и белковой решетки на стабильность мембраны.

Фазовые переходы в мембранах второго типа носят выраженный кооперативный характер и охватывают всю мембрану.

Следовательно, фазовые переходы в мембранах разного типа тесно связаны с уровнем их гидратации, содержанием холестерина и физико-химическим составом углеводородных цепей, формирующих гидрофобную зону липидного бислоя.

Существенным является то, что фазовые переходы в мембранах начинаются еще в досубнулевой зоне, что в совокупности с модификацией воды лабилизирует мембрану за счет ослабления гидрофобных взаимодействий. Однако процесс дальнейшей лабилизации мембран усиливается особенно резко при замораживании системы в диапазоне температур от 0 до —30°С, когда в результате фазового перехода вода — лед формируются дополнительные физико-химические факторы (усиление дегидратации, гипоксии, изменение pH и ионной силы раствора, повышение концентрации солей, поляризация граней кристаллов льда и т. д.).

Указанные факторы кроме структурных изменений вызывают биохимическую модификацию компонентов мембраны, которые могут носить уже необратимый характер. Это прежде всего проявляется в снижении количества основных фракций фосфолипидов (рис. 3) и деградации их до моно- и диглицеридов, интенсификации процессов перекисного окисления липидов [1—3] (рис. 4). Деградация фосфолипидов до моно- и диглицеридов в различных биологических объектах — растительных клетках [5], дрожжах [61], эритроцитах [14] — имеет большое значение, способствуя образованию труднорастворимого комплекса диглицерид — белок, что может привести к изменению клеточной мембраны и нарушению жизнеспособности клеток в целом после оттаивания.

Появление значительного количества свободных жирных кислот (СЖК) в биоматериале можно трактовать как низкотемпературную активацию фосфолипазы A_2, которая активировалась в мембранах митохондрий в зависимости от скорости замораживания. Так, быстрое замораживание не вызывало активации этого фермента, однако способствовало образованию моно- и диглицеридов. Медленное замораживание вызывало более глубокие изменения в липидном компоненте из-за активации фосфолипазы A_2, что способствовало гидролизу биополимеров до низкомолекулярных фрагментов и СЖК, количество которых увеличивалось параллельно активированию фермента.

Кроме основных фосфолипидов претерпевает изменение и другой липидный компонент мембран — холестерин и его эфиры [1]. Поскольку лецитин — фактор, определяющий физиологическую стабильность и проницаемость биомембран, и находится он в эквимолярном комплексе с холестерином [56], нарушение этого соотношения может увеличивать проницаемость и снижать стабильность мембраны. Потерю холестерина можно объяснить процессами интенсификации перекисного окисления липидов. Имеется значительное количество работ, свидетельствующих об интенсификации процессов перекисного окисления липидов, особенно в мембранных структурах, содержащих значительное количество полиненасыщенных жирных кислот [3, 14, 18]. Установлено, что холестерин способен легко окисляться по свободнорадикальному типу, особенно в присутствии СЖК. Активация фосфолипазы A_2 и накопление значительного количества СЖК вследствие гидролиза фосфолипи-

Матеріал, захищений авторським правом

дов могут явиться пусковым процессом окисления холестерина после низкотемпературного воздействия [1, 14].

Следует отметить, что перекисные продукты могут негативно влиять как на липиды, так и на белки. В последнем случае возможны инактивации ферментов, которые содержат SH-группы, образование различных комплексов и полимерных продуктов с окисленными липидами, что снижает стабильность и увеличивает проницаемость мембра-

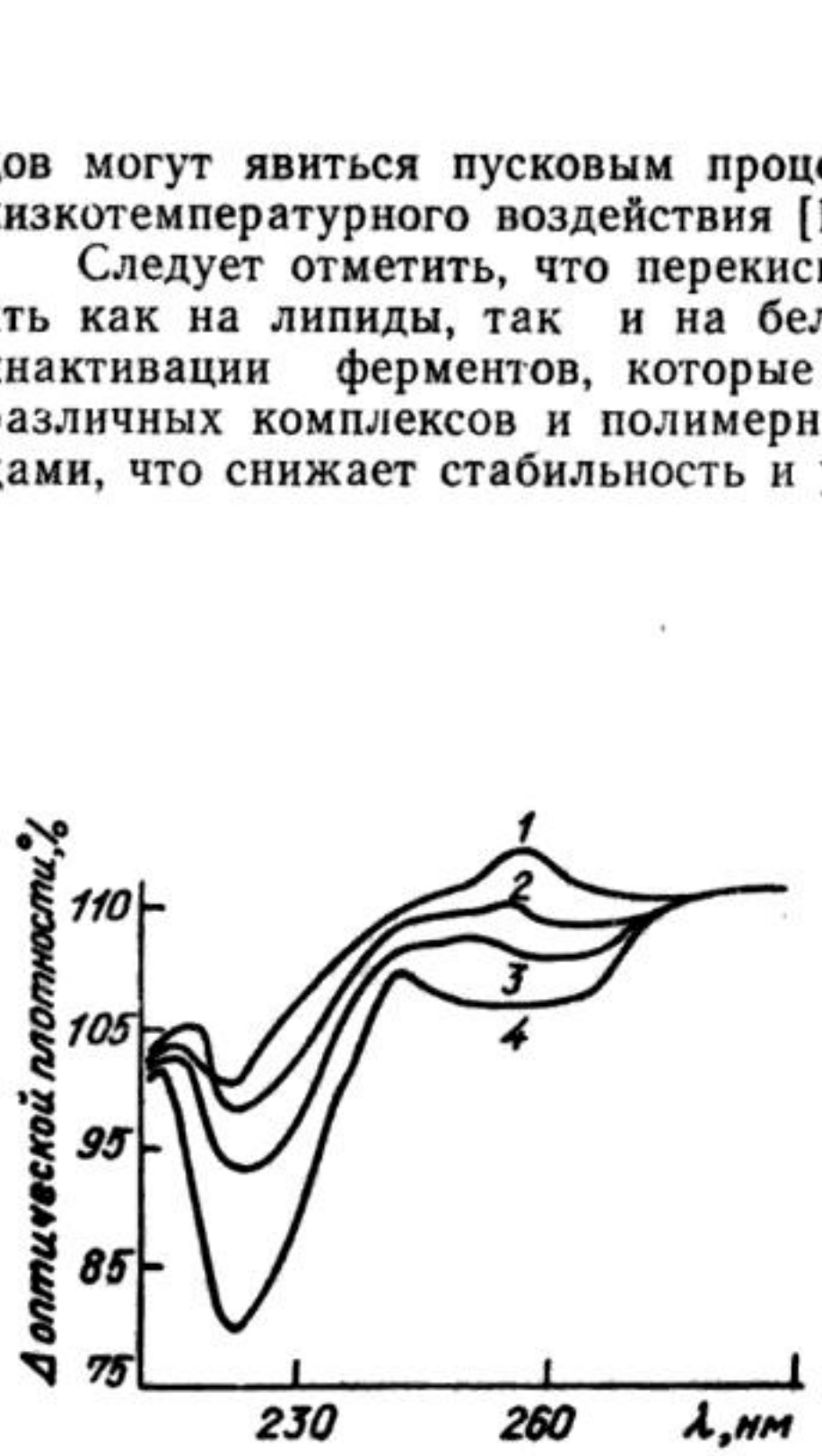


Рис. 3. Характер *n*-гептановых спектров липидов мембран митохондрий, подвергнутых замораживанию в различные сроки после отогрева:

1 — сразу после отогрева; *2* — через 3 мин; *3* — через 15 мин; *4* — через 35 мин. 230 нм — промежуточные продукты перекисного окисления, 260 нм — конечные продукты перекисного окисления.

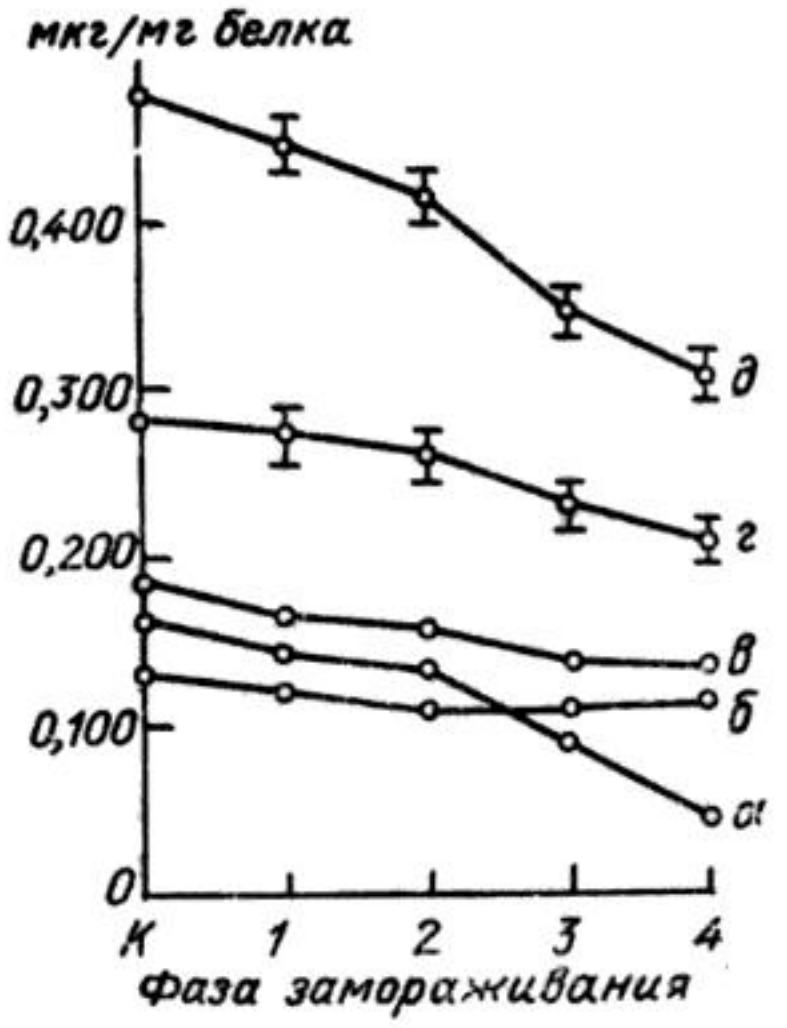


Рис. 4. Снижение содержания отдельных фракций фосфолипидов мембран митохондрий после замораживания до различных температур:

1 — температурная область, соответствующая началу фазового перехода; *2* — температурная зона вымораживания свободной воды системы (середина процесса кристаллизации); *3* — температурная область завершения фазового перехода системы; *4* — эвтектическая зона; *а* — холестерин; *б* — инозитолфосфатид; *в* — кардиолипин; *г* — ЭАФ; *д* — лецитин.

ны. Вместе с тем появление в гидрофобной области мембран гидроксилов и других полярных продуктов окисления ненасыщенных жирных кислот (НЖК) может привести к образованию дополнительных водных и ионных каналов, что существенно нарушает транспорт и осмотическую резистентность клетки.

При анализе данных по структурным изменениям мембран возникает вопрос об обратимости или необратимости этих процессов. Исходя из того, что мембрана нестабильна, можно предположить, что репарация дефектов структуры возможна только при температурах выше начала фазовых переходов, т. е. в районе +37°С и выше.

Как видно, наиболее значительные нарушения структуры мембраны, обусловливающие необратимость криоповреждений, очевидно, связаны с потерей мембранного материала и химической модификацией компонентов мембраны непосредственно в самой мембране.

Итак, в процессе охлаждения можно выделить три основных уровня нарушений, вызывающих повреждение мембраны: 1) термодинамический — проявляющийся в ослаблении гидрофобных взаимодействий при снижении температуры, а также фазовых переходах липидов, что обусловливает нестабильность мембран; 2) физико-химический — проявляющийся в изменении pH [51], повышении концентрации электроли-

Матеріал, захищений авторським правом

тов [49], действии осмотических факторов [48], процессах рекристаллизации [24], формирования потенциала замораживания [19] и т. д.; 3) биохимический — проявляющийся в окислении SH-групп белков [42], активации фосфолипаз [1, 8, 9], развитии перекисного окисления липидов [14] и т. д.

Совершенно очевидно, что при низкотемпературном воздействии имеет место определенная последовательность событий, начальным звеном которых является термодинамическая нестабильность мембраны, а завершающим — биохимическая модификация ее структуры.

Вторая важная сторона влияния нестабильности мембраны — резкое возрастание проницаемости через дефектные участки при охлаждении. Так, снижение температуры приводит к резкому возрастанию проницаемости для ионов K^+ [65]. Сопоставляя эти данные с данными о динамике термального шока эритроцитов, можно сделать вывод, что утечка ионов K^+ — фундаментальное следствие нестабильности мембраны и является одним из факторов криоповреждений.

Таким образом, при охлаждении мембран имеется определенная температурная «зона нестабильности», верхняя граница которой — температура начала фазовых переходов. В пределах каждой зоны нестабильности имеется «максимум» определенной температуры, когда количество липидов в жидкокристаллическом состоянии равно количеству липидов в состоянии геля. В этой точке количество «дефектных» участков между разными фазами будет наивысшим и свойства мембраны резко изменятся. Можно предположить, что низкотемпературная нестабильность биологических мембран существенно понижает устойчивость клетки к действию осмотических факторов. При этом повреждения могут быть следствием деформации мембраны при изменении клеточного объема и ее разрыва по дефектным участкам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Білоус А. М., Бондаренко В. А., Бондаренко Т. П.* Біохімічні зміни фосфоліпідного складу біомембран під впливом низьких температур. — Вісн. АН УРСР, 1977, № 9, с. 54—64.
2. *Бондаренко Т. П., Білоус А. М.* Зміни ліпідного складу мембран мітохондрій після дії низької температури. — Укр. біохім. журн., 1977, **49**, № 2, с. 30—33.
3. *Бондаренко В. А., Лемешко В. В., Білоус А. М.* Вплив різних режимів заморожування-відтавання на хемілюмінесцеацію печінки щурів. — Укр. біохім. журн., 1975, **47**, № 6. с. 743—746.
4. *Поликар А.* Поверхность клетки и ее микросреда. — М. : Мир, 1975. — 108 с.
5. *Пушкарь Н. С., Белоус А. М.* Введение в криобиологию. — Киев : Наук. думка, 1975. — 343 с.
6. *Aithal H. N., Kair V. K., Brodia A. F.* Alteration of mi cobacterium phlei membrane structure by freezing and thawing; reversal by heating. — Arch. Biochem. and Biophys., 1975, **168**, N 1, p. 122—132.
7. *Aivăger T., Balcavage W. X.* Nanosecond fluorescence decay study of mitochondria and mitochondrial membranes. — Biochem. and Biophys. Res. Communs, 1974. **58**, N 4, p. 1039—1046.
8. *Araki T.* Freezing injury in mitochondrial membranes. I. Susceptible components in oxidation systems of frozen and thawed liver mitochondria. — Cryobiology, 1977, **14**, N 2, p. 144—150.
9. *Araki T.* Inactivation of mitochondrial 2-oxoglutarate dehydrogenase complex as a result of phospholipid degradation induced by freeze-thawing. — Biochim. et biophys acta, 1977, **496**, N 3, p. 532—546.
10. *Ben-Naim A.* Hydrophobic interaction and structural changes in the solvent. — Biopolymers, 1975, **14**, N 7, p. 1337—1355.
11. *Blazyk J. F., Steim J. M.* Phase transitions in mammalian membranes. — Biochim. et biophys. acta, 1972, **266**, N 9, p. 737—741.
12. *Block M. C., Van Deenen L. L. M., De Grier J.* The effect of cholesterol incorporation on the temperature dependence of water permeation through lipisomal membranes prepared from phosphatidylcholines. — Biochim. et biophys. acta, 1977, **464**, N 3, p. 509—518.
13. *Bretscher M. S.* Some general principles on membrane structure. — In: Cell surface development. New York : Acad. press, 1974, p. 17—27.

Матеріал, захищений авторським правом

14. *Brockhuyse R. M.* Long-term storage of erythrocytes for quantitation analyses of lipids. — Clin. chim. acta, 1974, **52**, N 1, p. 53—58.
15. *Chapman D.* Phase transitions and fluidity characteristics of lipids and cell membranes. — Quart. Revs Biophys., 1975, **8**, N 2, p. 185—235.
16. *Cooke R., Kuntz I.* The properties of water in biological systems. — Ann. Rev. Biophys. and Bioeng., 1974, **3**, p. 95—126.
17. *Daw A., Farrant J., Morris G. J.* Membrane leakage of solutes after thermal shock or freezing. — Cryobiology, 1973, **10**, N 2, p. 126—133.
18. *Deenen L. L. M., Gier J., Demel R. A. et al.* Lipid—lipid and lipidprotein interaction in model systems and membranes. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1975, **264**, p. 124—141.
19. *Drost-Hansen W.* Phase transitions in biological systems: manifestations of cooperative processes in vicinal water. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1973, **204**, N 1, p. 100—108.
20. *Drost-Hansen W.* Structure and functional aspects of interfacial (vicinal) water as related to membrane and cellular system. — Colloq. int. CNRS, 1976, N 1, p. 177—186.
21. *Edidin M.* Two-dimensional diffusion in membranes. — In: Transplantation on the cellular level. Cambridge, 1974, p. 1—14.
22. *Elgsaeter A., Shotton D. M., Branton D.* Intramembrane particle aggregation in erythrocyte ghosts. II. The influence of spectrin aggregation. — Biochim. et biophys. acta, 1976, **426**, N 1, p. 101—122.
23. *Emmelot P., Von Hoeven R. P.* Phospholipid unsaturation and plasma membrane organization. — Chem. and Phys. Lipids, 1975, **14**. N. 3, p. 236—246.
24. *Farrant J., Morris G. J.* Thermal shock and dilution shock as the causes of freezing injury. — Cryobiology, 1973, **10**. N 2, p. 134—140.
25. *Gottlieb A. M., Englefield P. T., Lange Y.* Water-lecithin binding in lecithin-water lamellar phases at 20°C. — Biochim. et biophys. acta, 1973, **307**, N 2, p. 444—451.
26. *Green F. A., Jung C. Y.* Cold-induced hemolysis in a hypertonic milieu. — J. Membrane Biol., 1977, **33**, N 3-4, p. 249—262.
27. *Haard N. F.* Membrane structure and cellular death in biological tissue. — J. Food Sci., 1972, **37**, N 4, p. 504—512.
28. *Hackenbrock C. R., Höchli M., Chau R. M.* Calorimetric and freeze fracture analysis of lipid phase transitions and lateral translational motion of intramembrane particles in mitochondrial membranes. — Biochim. et biophys. acta, 1976, **455**, N 2, p. 466—484.
29. *Haest C. W. M., Verkleij A. J., Gier J. et al.* The effect of lipid phase transition on the architecture of bacterial membranes. — Biochim. et biophys. acta, 1974, **356**, N 1, p. 17—26.
30. *Hauser H.* The conformation of the polar group of lecithin and lisolecithin. — J. Colloid and interface Sci., 1976, **55**. N 1, p. 85—93.
31. *Hochachka P. W.* Basic strategies and mechanisms of enzyme adaptation to temperature. — In: Effect of temperature on ectothermic organisms. Berlin, 1973, p. 69—81.
32. *Inglefield P. T., Lindblom K. A., Gottlieb A. M.* Water binding and mobility in the phosphatidylcholine (cholesterol) water lamellar phase. — Biochim. et biophys. acta, 1976, **419**, N 1, p. 196—205.
33. *Inoue K.* Permeability properties of liposomes prepared from dipalmitoyllecithin, dimyristoyllecithin, egg lecithin, rat liver lecithin and beef brain sphingomyelin. — Biochim. et biophys. acta, **339**, N 2, p. 390—402.
34. *Jain M. K.* Role of cholesterol in biomembranes and related systems. — In: Current topics in membranes and transport. New York, 1975, vol. 6, p. 1—7.
35. *Jendrasiak G. L., Mendible J. C.* The effect of the phase transition and electrical conductivity of phospholipids. — Biochim. et biophys. acta, 1976, **424**, N 2, p. 133—148.
36. *Kleeman W., McConnel H. M.* Lateral phase separation in Escherichia coli membranes. — Biochim. et biophys. acta, 1974, **345**, N 2, p. 220—230.
37. *Kruijff B., Gullis P. R., Radda G. K.* Differential scanning calorimetry and ^{31}P NMR studies on sonicated and unsonicated phosphatidylcholine liposomes. — Biochim. et biophys. acta, 1975, **406**, N 1, p. 6—20.
38. *Lawaczeck R., Blackman R., Kainosho M.* Ion permeation across the bilayer of annealed phosphatidylcholine vesicles at elevated temperatures. Concentration dependence and the micelle bilayer dynamic equilibrium. — Biochim. et biophys. acta, 1977, **468**, N 3, p. 411—422.
39. *Lee A. G.* Functional properties of biological membranes: a physical-chemical approach. — Progr. Biophys. and Mol. Biol., 1975, **29**, N 1, p. 3—56.
40. *Lee A. G., Birdsall N. J. M., Metcalfe J. C. et al.* Clusters in lipid bilayers in the interpretation of thermal effects in biological membranes. — Biochemistry, 1974, 13, N 18, p. 3699—3705.
41. *Lenaz G.* Lipid-protein interactions in the structure of biological membranes. — Sub—Cellul. Biochem., 1974, **3**, N 3, p. 167—248.
42. *Levitt J.* A sulfhydrye-disulfide hypothesis of frost injury and resistance in plants. — J. Theor. Biol., 1962, **3**, N 2, p. 355—391.
43. *Linden C. D., Wright L., McConnel H. M., Fox C. F.* Lateral phase separations in membrane lipids and the mechanism of sugar transport in Escherichia coli. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, **70**, N 5, p. 2271—2275.

Матеріал, захищений авторським правом

44. *Linden C. D., Keith A. D., Fox C. F.* Correlations between fatty acid distribution in phospholipids and the temperature dependence of membrane physical state. — J. Supramol. Struct., 1973, **1**, N 3, p. 523—534.
45. *Lippert J. L., Peticolas W. L.* Laser Raman investigation of the effect of cholesterol on conformational changes in dipalmitoyllecithin multilayers. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, **68**, N 7, p. 1572—1576.
46. *Lovelock J. E.* Physical instability and thermal shock in red cells. — Nature, 1954, **173**, N 4406, p. 659—661.
47. *Mazur P., Leibo S. P., Chu E. H. Y.* A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissueculture cells. — Exp. Cell. Res., 1972, **71**, N 2, p. 345—355.
48. *Meryman H. T., Williams R. J., Douglas M. St. J.* Freezing injury from «solution effect» and its prevention by natural or artificial cryopreservation. — Cryobiology, 1977, **14**, N 3, p. 287—302.
49. *Morris G. J.* Lipid loss and haemolysis by thermal shock: lack of correlation. — Cryobiology, 1975, **12**, N 3, p. 192—201.
50. *Op den Kamp J. A. F., Gier J., Van Deenen L. L. M.* Hydrolysis of phosphatidylcholine lipisomes by pancreatic phospholipase A2 at the transition temperature. — Biochim. et biophys. acta, 1974, **345**, N 2, p. 253—256.
51. *Orii Y., Iizuka T.* Change in effective pH of salt of freezing as evidenced by altered reactivities of heme towards carbonyl reagents. — J. Biochem., 1975, **77**, N 5, p. 1123—1126.
52. *Papahadjopoulos D., Moscarello M., Eylar E. H., Isac T.* Effect of proteins on thermotropic phase transitions of phospholipid membranes. — Biochim. et biophys. acta, 1975, **401**, N 3, p. 317—335.
53. *Pascher I.* Molecular arrangements in sphingolipids. Conformation and hydrogen bonding of ceramide and their implication on membrane stability anl permeability. — Biochim. et biophys. acta, 1976, **455**, N 2, p. 433—451.
54. *Phillips M. C., Ladbrooke B. D., Chapman D.* Molecular interactions in mixed lecithin systems. — Biochim. et biophys. acta, 1970, **193**, N 1, p. 35—44.
55. *Phillips M. C., Finer E. D.* The stoichiometry and dynamics of lecithin-cholesterol clusters in bilayer membranes. — Biochim. et biophys. acta, 1974, **356**, N 1, p. 199—206.
56. *Salsbury N. J., Chapman D.* Physical studies of phospholipids. VIII Nuclear magnetic resonance studies of dicyl-L-phosphatidylcholines (lecithin). — Biochim. et biophys. acta, 1968, **163**, N 2, p. 314—324.
57. *Schneider M. J. T., Schneider A. S.* Water in biological membranes: adsorption isotherms and circular dichroism as a function hydration. — J. Membrane Biol.. 1972, **9**, N 2, p. 127—140.
58. *Shiga T., Suda T., Maeda N.* Spin label studies on the human erythrocytes membrane. Two sites and two phases for fatty acid spin labels. — Biochim. et biophys. acta, 1977, **466**, N 3, p. 231—244.
59. *Shimshick E. J., McConnel N. M.* Lateral phase separation in phospholipid membranes. — Biochemistry, 1973, **12**, N 5, p. 2351—2360.
60. *Singer S. J.* The molecular organization of membranes. — Ann. Rev. Biochem., 1974, **43**, N 6, p. 805—833.
61. *Scuzu H.* The phospholipid degradation and cellular injury caused by freeze-thawing of freeze-drying of yeast. — Cryobiology, 1973, **10**, N 5, p. 427—431.
62. *Swartz H. M.* Effect of oxygen on freezing damage. — Cryobiology, 1970, **6**, N 6, p. 546—551.
63. *Tayler R. P.* Nuclear magnetic resonance studies of amphiphile hydration. — Arch. Biochem. and Biophys., 1976, **173**, N 3, p. 596—602.
64. *Verma S. P., Wallacn F. H.* Effect of mellitin on thrmotropic lipid state transitions in phosphatidylcholine liposomes. — Biochim. et biophys. acta, 1976, **426**, N 4, p. 616—623.
65. *Willis J. S.* The possible roles of cellular K for survival of cells at low temperature. — Cryobiology, 1972, **9**, N 5, p. 351—367.
66. *Wunderlich F., Ronai A., Speth V., Blume A.* Thermotropic lipid clustering in tetrahymena membranes. — Biochemistry, 1975, **14**, N 7, p. 3730—3735.
67. *Zimmer Ch., Luck G.* Conformation and reactivity of DNA. VI. Circular dichroism studies of salt-induced conformational changes of DNAs of different base composition. — Biochim. et biophys. acta, 1974, **361**, N 1, p. 11—32.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
05.05.77

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043

Ф. Р. Виноград-Финкель, Л. И. Федорова, Н. В. Семенова

УСОВЕРШЕНСТВОВАННЫЕ РАСТВОРЫ ДЛЯ РЕСУСПЕНДИРОВАНИЯ РАЗМОРОЖЕННЫХ ЭРИТРОЦИТОВ ПОСЛЕ ИХ ДЕГЛИЦЕРИНИЗАЦИИ

Размороженные эритроциты применяются для трансфузий по тем же показаниям, что и консервированные при положительной температуре (2—4°С). На данном этапе наибольшее применение в практике криозащиты эритроцитов находят глицериновые растворы.

Разработанный в Центральном научно-исследовательском институте гематологии и переливания крови метод замораживания эритроцитов с 15% глицерина (конечная концентрация) и хранения их при ультранизких температурах (—196°С) обеспечивает восстановление не менее 90% клеток даже после 10 лет их хранения в жидком азоте [4]. Доказан высокий процент их посттрансфузионной выживаемости in vivo (в среднем около 90% для свежеобработанных размороженных эритроцитов) и лечебная эффективность трансфузий криоконсервированных эритроцитов. Однако помехой для более широкого применения их в клинике является установленное в большинстве стран ограничение срока использования для переливания размороженных эритроцитов (24 ч) с момента их оттаивания из-за увеличения гемолиза при дальнейшем хранении суспензии этих клеток при температуре 4°С и опасения бактериального загрязнения. Удлинение даже на несколько дней срока хранения в полноценном состоянии оттаянных — отмытых эритроцитов будет иметь большое значение для внедрения криоконсервированных эритроцитов в лечебную практику.

В связи с продолжающимся увеличением потребности клиник в размороженных эритроцитах мы предприняли исследования для изыскания условий, при которых размороженные деглицеринизированные эритроциты будут длительно сохраняться при положительных температурах без значительных структурных и функциональных изменений. Особенно важно сохранить в клетках высокий уровень кислородно-транспортной функции. Задача эта остается весьма сложной, если учесть механизм повреждения эритроцитов, подвергнувшихся замораживанию. Накоплено много экспериментальных данных, подтверждающих гипотезу, что причиной прогрессирующего гемолиза в размороженно-отмытых эритроцитах, сохраняемых в дальнейшем при температуре 4°С, является наличие в мембране скрытых повреждений [4, 9, 13, 14, 17]. Эти повреждения отмечены на молекулярном уровне и развиваются в результате потери части фосфолипидов и структурных изменений белков мембраны, происходящих при замораживании и оттаивании и приводящих к распаду белково-липидных комплексов. Последнее нарушает ее нормальную полупроницаемость к мелким молекулам, что сопровождается выходом калия и коллоидно-осмотическим набуханием мембраны клеток, а также приводит к образованию в ней дефектов и выходу крупных молекул — гемоглобина [2, 5].

В литературе все шире дискутируются сроки годности размороженных эритроцитов для переливания. Имеется тенденция к расширению этого срока на основании накопленного положительного клинического опыта и определения приживаемости эритроцитов. Так, для эритроцитов, взвешенных в сахарозно-фосфатном растворе № 8-в, мы ограничивали первоначально допустимый срок их хранения шестью днями с момента оттаивания исходя из того, что 24-часовая посттрансфузионная приживаемость эритроцитов (меченных ^{51}Cr) составляла в эти сроки по нашим данным не менее 70% числа перелитых [16]. Одна-

Матеріал, захищений авторським правом

ко из-за прогрессирующего при хранении гемолиза эритроциты переливались не позднее 48 ч. Имеются сообщения об успешных переливаниях 324 доз размороженных эритроцитов, хранившихся в растворе 8-в при температуре 4°С от 1 до 7 сут, больным в клинике ортопедии и травматологии по различным показаниям [1]. Пепер с соавторами [12] сообщил о переливаниях более 150 доз эритроцитарной взвеси, хранившейся при температуре 4°С в течение пяти дней в растворе АСД, больным с почечной недостаточностью и анемией без осложнений. 24-часовая приживаемость равнялась 93% для однодневно хранившихся и 89% — для пятидневно хранившихся эритроцитов. Батон и соавторы [10] считают, что деглицеринизированные эритроциты после трех дней хранения при температуре 4°С вполне обеспечивают эффективность переливаний, производимых в клинике. Мир с соавторами [11] переливал эритроциты, взвешенные в солевом растворе с добавлением глюкозы и фосфата в первые пять дней после оттаивания, и отмечает, что лизис клеток в эти сроки небольшой и трансфузии переносятся хорошо. Лишь для хранения более пяти дней эритроциты должны быть помещены в среду, более эффективную, чем солевая.

В то же время Валери отмечал, что размороженные эритроциты, хранившиеся при температуре 4°С в растворе аналогичного состава, пригодны для трансфузий не более чем через три дня, несмотря на то что еще на седьмой день хранения приживаемость их удовлетворительная. Но в этот период значительно снижается очень важная функция — кислородно-транспортная [15]. Он рекомендует перед трансфузией снимать надстой и переливать только эритроцитарную массу независимо от срока хранения ее после размораживания и отмывания.

По данным некоторых авторов, скрытые повреждения клеточной мембраны эритроцитов могут быть частично обратимы или уменьшены при воздействии на клетки определенными низкомолекулярными веществами, которые, взаимодействуя с поверхностными белками мембраны, стабилизируют нативную конформацию ее молекул и, таким образом, предотвращают или замедляют переход латентных повреждений в явные, приводящие к гемолизу [13, 14, 17].

Учитывая эти предпосылки, а также данные наших предварительных исследований и целесообразность введения в суспендирующий раствор коллоидных добавок, нами были испытаны разные полимерные препараты и, главным бразом, те, которые получили применение в клинике [4].

В наших опытах замораживались эритроциты, полученные из крови, заготовленной на глюкозо-цитратном растворе № 7-б и растворе цитроглюкофосфат (табл. 1). Быстрое охлаждение и длительное хранение осуществлялись в жидком азоте. Деглицеринизация производилась методом трехкратного разведения растворами маннита в снижающихся концентрациях и затем — серийного центрифугирования. Отмытая эритроцитарная масса смешивалась со взвешивающим раствором в равных объемах (до конечного показателя гематокрита 40%). Критериями для характеристики степени сохранности эритроцитов в опытах с различного состава растворами являлись: концентрация свободного гемоглобина во взвеси отмытых эритроцитов; морфологическая картина; уровень АТФ и 2,3-ДФГ в эритроцитах.

Исследования проводились до замораживания, тотчас после оттаивания-отмывания и ежедневно в течение срока хранения. Контролем во всех сериях служил разработанный нами и применяемый в практике для взвешивания размороженных эритроцитов сахарозо-фосфатно-солевой раствор ЦОЛИПК-N-8-в и солевой — 0,9%-ный раствор хлористого натрия.

В первой серии опытов использовались взвешивающие растворы, содержащие на солевой основе (0,9% хлористого натрия) коллоидные

Матеріал, захищений авторським правом

вещества: декальцинированный желатиноль (до конечной концентрации в эритроцитной взвеси 4%), реополиглюкин (до конечной концентрации 4%), плазму гомологичную (эритроциты: плазма =1:1). Эти опыты показали, что добавление испытанных коллоидов и плазмы к солевым растворам не замедляет гемолиза: после трех дней хранения концентрация свободного гемоглобина достигает 300—400 мг%. Ана-

Таблица 1

Содержание 2,3-ДФГ и АТФ в первые сутки после размораживания эритроцитов ($n=6$)

Исследуемый компонент, мкМ/г Нв	Раствор № 7-б*			Раствор „цитроглюкофосфат"**		
	до замораживания	после отогрева и отмывания	через 24 ч	до замораживания	после отогрева и отмывания	через 24 ч
2,3-ДФГ	9±0,53	8,1 ±0,34	6,5 ±0,29	9,7 ±0,65	8,6 ±0,58	7,3 ±0,53
АТФ	2,12±0,21	2,66±0,18	2,25±0,18	2,43±0,66	2,69±0,35	1,94±0,11

* Цитрат натрия 2,0; глюкоза 3,0; дистиллированная вода до 100 мл; pH 5,0.
** Лимонная кислота 1,0; глюкоза 3,0; «тринатрийфосфат 0,75»; дистиллированная вода до 100,0; едкий натр до pH 5,7.
Соотношение в пробах раствор — кровь 20 : 80 мл.

логичные результаты получены в 0,9%-ном солевом растворе. В растворе № 8-в концентрация гемоглобина не превышала 195 мг%.

Во второй серии опытов эритроциты смешивали в отношении 1 : 1 с комбинированными растворами, состоящими из смеси равных объемов раствора № 8-в и коллоидных растворов (декальцинированная желатиноль, реополиглюкин, гемодез и полиглюкин). В этой серии конечные концентрации коллоидных веществ во взвеси эритроцитов были вдвое меньше. Однако включение половинного количества сахарозо-фосфатно-солевого раствора № 8-в несколько уменьшало показатели свободного гемоглобина в первые два дня. Но на третий день хранения количество свободного гемоглобина достигало 300 мг%. Лишь в контрольных взвесях эритроцитов с раствором № 8-в и со смесью растворов № 8-в и 7-б (глюкозо-цитратного) в равных объемах свободный гемоглобин составлял около 200 мг%.

В третьей серии опытов основу взвешивающего раствора составлял № 8-в, в который добавляли либо альбумин (конечная концентрация в эритроцитной взвеси 2,5%), либо плюроник «проксанол» (конечная концентрация 1%) и декальцинированный желатиноль (конечная концентрация 1,2%). В этой группе опытов гемолиз во взвеси отмытых эритроцитов на третий день наблюдения был невысокий: в среднем с проксанолом 80 мг%, с декальцинированным желатинолем 110, с альбумином 150 мг%, в контрольном растворе № 8-в — 175 мг%.

Таким образом, из числа испытанных суспендирующих растворов с добавлением в раствор № 8-в полимерных коллоидных препаратов лучшие результаты по показателям гемолиза получены с проксанолом, декальцинированным желатинолем, альбумином. Но проксанол пока не стандартный препарат, а альбумин дефицитен. Наиболее доступным и испытанным в клинике является декальцинированный желатиноль. Помимо замедления гемолиза превосходство его заключается в том, что декальцинация желатиноля предотвращает неблагоприятное действие кальция на структуру мембраны. Кроме того, декальцинированный желатиноль, как реополиглюкин в другом испытанном нами суспендирующем растворе, обладает высокими реологическими свойствами. К тому же он обладает выраженным дезагрегирующим и гиповискозным действием [7, 8]. В его состав включили вещества, обеспечивающие клетки метаболитами для их длительного хранения, — аденин и инозин — и

Матеріал, захищений авторським правом

условно назвали раствором № 16 (табл. 2). Этот раствор мы избрали для усовершенствования и более широкого изучения. Решающими критериями при выборе раствора для взвешивания размороженных эритроцитов служили, помимо величины гемолиза как показателя морфологической полноценности эритроцитов, также биохимические параметры — уровень АТФ, ответственной за их жизнеспособность, и 2,3-ДФГ, коррелирующие с кислородно-транспортной функцией клеток.

Таблица 2

Уровни АТФ и 2,3-ДФГ в эритроцитах, размороженных-отмытых и взвешенных в растворе № 16 при различных сроках хранения при температуре +4°С

Состав взвешивающего раствора № 16 ЦНИИГПК	Номер опыта	Дни хранения при температуре 4°С после оттаивания	АТФ, мкМ/г, Нв		2,3—ДФГ, мкМ/г, НВ	
			до замораживания	после оттаивания и хранения при температуре 4°С	до замораживания	после оттаивания и хранения при температуре 4°С
Сахароза, 7,0 NaCl, 0,3 $Na_2HPO_4 \times$ $\times 12H_2O$, 0,2 $NaH_2PO_4 \times$ $\times 2H_2O$, 0,1 Аденин, 0,140 Инозин, 0,268 Желатиноль декальцинированный, 8%-ный 80 мл (Вода до 100 мл)	3 4 7 5 6 14 15	12 6 7 7 6 4 3	1,70 2,50 2,00 1,50 1,80 2,00 2,20	1,41 2,90 4,56 4,80 4,13 5,77 0,24	6,54 7,00 6,80 7,00 8,57 6,66 8,00	5,70 14,30 9,20 14,96 12,90 12,00 15,60

Данные исследований содержания АТФ и 2,3-ДФГ в размороженно-отмытых эритроцитах, взвешенных в испытанных нами восьми вариантах суспендирующих растворов, показали лучшие результаты после трех дней хранения при температуре 4°С в следующих растворах (табл. 3); в растворе № 8-в уровень АТФ сохраняется на 75% к исходному (до замораживания), а 2,3-ДФГ — на 50%; в смеси растворов № 8-в и реополиглюкина (в равных соотношениях) АТФ сохраняется в эригроцитах на 71,6% и 2,3-ДФГ — на 75%; в растворе с добавлением проксанола АТФ и 2,3-ДФГ сохраняются соответственно на 84 и 92%. Однако, как было показано, для практики раствор этот еще не может быть предложен; в растворе № 8-в с добавленными в него инозином, аденином и декальцинированным желатинолем АТФ и 2,3-ДФГ сохраняются выше уровня до замораживания на 35—45% (см. рисунок). Этот раствор (№ 16) заслуживает особого внимания, поскольку в нем сохраняют еще на пятый—седьмой день уровни АТФ и 2,3-ДФГ значительно более высокими, чем исходные. В некоторых опытах эти показатели почти удваиваются в указанные сроки (см. табл. 3, опыты 4 и 5). В отдельных опытах на 12-й день сохраняется уровень 2,3-ДФГ до 87% исходного. При этом замедляется процесс деструкции клеток, улучшается их морфологическая сохранность, что связано с увеличением уровня АТФ, богатой макроэргическими соединениями, ответственными за поддержание энергетического потенциала клетки. Показатели свободного гемоглобина в супернатанте с раствором № 16 постоянно ниже, чем в растворе № 8-в без указанных добавок. В связи с включением во взвешивающий раствор метаболитов гликолиза — аденина и инозина — увеличивается в среднем на 10% также 24-часовая посттрансфузионная выживаемость эритроцитов. Это было установлено в ранее проведенных исследованиях приживаемости размороженных эритроцитов, взвешенных в сахарозо-глюкозо-цитратном растворе [6]. По этим дан-

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 3

Уровни АТФ и 2,3-ДФГ в оттаянных эритроцитах, взвешенных в испытанных растворах в отношениях 1:1

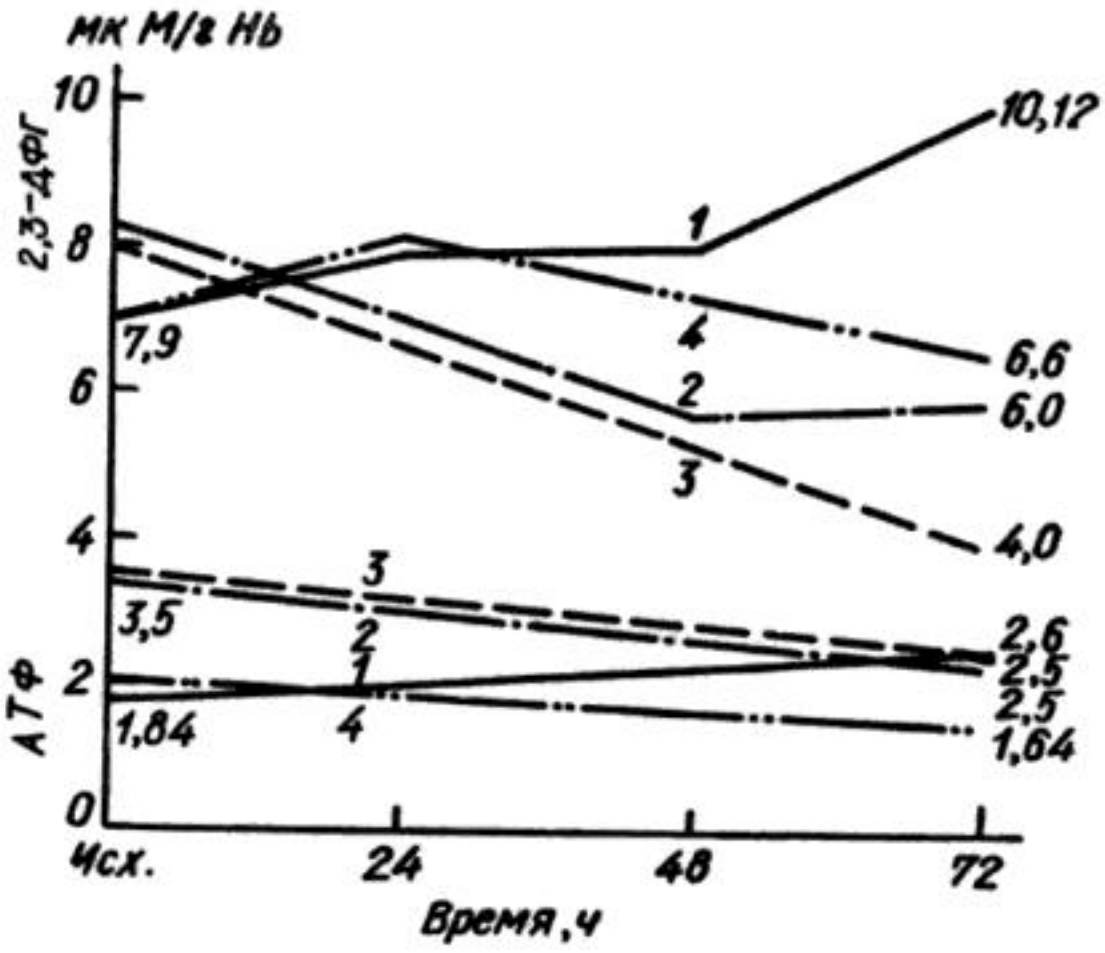
№ п/п	Раствор №8-в	АТФ, мкмоль/г Нв			2,3—ДФГ, мкмоль/г Нв		
		исходный до замораживания	три дня, температура 4°С	% к исходному	исходный до замораживания	три дня, температура 4°С	% к исходному
1	С декальцинированным желатинолем, аденином и инозином (№ 16)	1,84 ± 0,35	2,50 ± 0,70	136	7,09 ± 1,01	10,12 ± 4,78	143
2	С проксанолом (сополимер полиэтиленоксида с полипропиленоксидом, ср. м. м.* 8000)	1,84 ± 0,35	1,64 ± 1,06	84	7,09 ± 1,01	6,50 ± 1,35	92
3	С реополиглюкином (декстран, ср. м. м. 40 000)	3,50 ± 0,65	2,50 ± 0,95	71,6	8,10 ± 0,80	6,00 ± 1,30	75
4	С гемодезом (1 : 1) 6%-ный поливинилпирролидон, ср. м. м. 12 000	3,50 ± 0,65	2,01 ± 0,75	60	8,10 ± 0,80	5,30 ± 1,28	65,4
5	С 5%-ным раствором альбумина (1 : 1)	2,00 ± 1,35	0,74 ± 0,20	37	7,61 ± 0,95	4,67 ± 0,80	62
6	С полиглюкином (1 : 1) — декстраном, ср. м. м. 70 000	3,50 ± 0,65	2,50 ± 0,95	71,58	10,0 ± 0,80	3,60 ± 1,20	44,5
7	Контроль (р-р № 8-в, сахароза — 7,0; $NaCl$ — 0,3; $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ — 0,2; $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ — 0.1; вода — до 100 мл	3,50 ± 0,65	2,60 ± 0,95	75	8,10 ± 0,80	4,00 ± 1,23	50
8	С глюкозо-цитратным раствором № 7-б (1 : 1) (контроль)	3,50 ± 0,65	2,50 ± 0,95	75	8,10 ± 0,80	3,50 ± 1,32	43,2

* Ср. м. м. — средняя молекулярная масса.

Матеріал, захищений авторським правом

ным, размороженные эритроциты, меченные ^{51}Cr, взвешенные в растворе без добавления метаболитов, выживают через 24 ч в среднем на 88% числа перелитых, а после хранения от пяти до девяти дней — на 72%, тогда как эритроциты, взвешенные в том же растворе, с инозином и аденином, перелитые в день отмывания, приживают на 94%, а после хранения от пяти до девяти дней — на 81%.

Приведенные данные позволяют прийти к заключению, что применение сахарозо-фосфатно-солевого раствора № 8-в, препятствующего коллоидно-осмотическому набуханию клеток, совместно с некоторыми высокомолекулярными полимерами, взаимодействующими с поверхностными белками мембраны, отдаляет гемолиз размороженных эритроцитов при хранении.



Уровнь АТФ и 2,3-ДФГ в эритроцитах, взвешенных в эффективных растворах.

Раствор № 8-в с добавленным и декальцинированным желатинолем (2,4%) или реополиглюкином в равных соотношениях, пригоден для хранения при температуре 4°С размороженных отмытых эритроцитов до трех дней, поскольку он обеспечивает поддержание жизнеспособности и кислородно-транспортной функции в эти сроки на высоком уровне. Раствор № 8-в без указанных добавок, замедляющий гемолиз, поддерживающий до 75% уровень АТФ и до 50% уровень 2,3-ДФГ, также позволяет расширить срок пригодности размороженных эритроцитов для переливания до трех дней.

При необходимости хранения взвеси оттаянных эритроцитов более длительный срок пригодным может считаться раствор ЦНИИГПК № 16, так как благодаря содержанию в его составе стимуляторов гликолиза он обеспечивает метаболизм эритроцитов и высокий уровень кислородно-транспортной функции на более длительные сроки (пять — семь и более дней) наряду с замедлением гемолиза. В случае значительного содержания свободного гемоглобина показано удаление супернатанта из взвеси эритроцитов перед переливанием, что относится ко всем срокам хранения размороженных эритроцитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Агафонова А. И., Быков А. П., Жукова Ю. В.* Применение в травматолого-ортопедической практике трансфузий размороженных эритроцитов, хранившихся после оттаивания при 4° до 7 дней. — Пробл. гематологии и переливания крови, 1976, № 9, с. 19—21.
2. *Белоус А. М.* Исследование молекулярной организации и функций биологических мембран при воздействии низких температур. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и медицины, Киев ; Наук. думка, 1974, с. 5—8.
3. *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.
4. *Виноград-Финкель Ф. Р., Федорова Л. И., Кудряшова Л. И. и др.* — Теоретические и практические аспекты проблемы хранения размороженных эритроцитов в условиях положительных температур. — Пробл. гематологии и переливания крови, 1975, № 9, с. 3—8.

Матеріал, захищений авторським правом

5. *Грек А. М., Луговой В. И., Бондаренко Т. П., Морозов И. А.* Исследование некоторых структурных особенностей мембран эритроцитов при замораживании. — В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. Киев : Наук. думка, 1974, с. 43—44.
6. *Гинзбург Ф. Г., Сухова А. Г., Тальская И. Н.* Усовершенствование растворов для хранения оттаянных эритроцитов при 4—6°. — В кн.: Тр. XII Междунар. конгр. по переливанию крови. М.: Медицина, 1972, с. 173—175.
7. *Мельникова В. Н., Михнович Е. П., Кузьмин В. А. и др.* Сравнительная оценка функциональных свойств эритроцитов различных гематрансфузионных сред. — Пробл. гематологии и переливания крови, 1977, № 6, с. 11—16.
8. *Михнович Е. П.* Влияние различных плазмозамещающих растворов на вязкость плазмы, реакцию оседания и морфологию эритроцитов. — Пробл. гематологии и переливания крови, 1976, № 2, с. 53—56.
9. *Шрago М. И., Карева Л. В., Бредихина Л. П.* О гемолизирующем и противогемолитическом действии криопротекторов. — В кн.: Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических структур. Киев : Наук. думка, 1976, с. 95—99.
10. *Button L. M., Kevu S. V., Jacobson M. S.* The clinical use of cells after extended storage. — Transfusion, 1976, **16**, N 5, p. 519.
11. *Myhre B. A., Schott R., Nakasako J.* Studies on increasing the 4°C storage time of frozen-thawed red cells. — In: XIV congr. Int. soc. blood transfusion. Helsinki, 1975. Abstr, p. 39—42.
12. *Pepper D. S., Allan A., Tavisha J., Cash J.* A convenient low cost liquid nitrogen frosen blood bank. — In: XIV congr. Int. soc. blood transfusion. Helsinki, 1975, Abstr., p. 48—53.
13. *Pribor D. B.* Osmotic hemolysis contrasted witr freeze-thaw hemolysis. — Cryobiology, 1971, N 8, p. 14—24.
14. *Pribor D. B.* PVP contrasted with dextran and a multifactor theory of cryoprotection. — Cryobilogy, 1974, N 11, p. 60—72.
15. *Valery C. R.* Cryobiology overview of red cells preservation: Achivements and prospective. — In: Clinical uses of frozen-thawed red blood cells/Ed. J. A. Griep. New York : Acad. press, 1976, p. 64—112.
16. *Vinograd-Finkel F. R.* Cryobiological aspects of long term blood storage. — In: Proc. XII Int. congr. blood transfusion. Moskow; Basel : Karger, 1971, p. 271—283.
17. *Woolgar A. E.* Hemolysis of human red cells by freezing and thawing in solutions containing polyvinilpyrrolidone. — Cryobiology, 1974, **11**, N 1, p. 52—59.

Центральный научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови МЗ СССР

Поступила в редколлегию 06.06.77

УДК 37.043.557.2:531.62:577.95:536.7

Е. А. Гордиенко, Ю. А. Иткин

ВАРИАЦИОННЫЙ ПРИНЦИП НЕРАВНОВЕСНОЙ ТЕРМОДИНАМИКИ

Отправным пунктом при выводе уравнений неравновесной термодинамики являются локальные уравнения баланса массы, импульса и энергии, которые для n-компонентной гидротермодинамической среды, между компонентами которой протекают R химических реакций, имеют вид

$$\rho \dot{c}_k = -\operatorname{div} J_k + m_k, \quad k = 1, 2, \ldots, n, \tag{1}$$

$$\rho \dot{V}_\alpha = -\sum_\beta \frac{\partial}{\partial x_\beta} \sigma_{\alpha\beta} + \sum_k \rho_k F_{k\alpha}, \quad \alpha, \beta = 1, 2, 3, \tag{2}$$

$$\rho \dot{e} = -\operatorname{div} J_e, \tag{3}$$

где ρ — плотность среды; $\dot{c}_k$ — массовая концентрация k-го компонента; J_k — плотность потока k-го компонента; m_k — скорость изменения массы k-го компонента в единице объема за счет химических реакций; $\dot{V}_\alpha$ — декартовы компоненты скорости v; x_α — декартовы координаты;

Матеріал, захищений авторським правом

$F_{k\alpha}$ — декартовы координаты силы F_k, действующей на единицу массы k-го компонента; $\sigma_{\alpha\beta}$ — компоненты тензора давления; e — полная энергия единицы массы, складывающаяся из кинетической энергии $\frac{1}{2}\sum_k c_k V_k^2$, потенциальной энергии ψ и внутренней энергии u, V_k — скорость k-го компонента; I_e — плотность потока энергии. В работе [1] подчеркивается, что эти уравнения необходимо рассматривать как определения потока или источника экстенсивной величины, если один из них задан. Обычно, однако, определяющий характер уравнений баланса игнорируется — одновременно задаются и потоки и источники.

Другой исходный пункт термодинамики необратимых процессов — предположение о том, что хотя полная система и не находится в равновесном состоянии, тем не менее в каждой ее макроскопической точке остается справедливым уравнение состояния и формула Гиббса

$$\dot{s}-T^{-1}\left(\dot{e}+P\dot{v}-\sum_k \mu_k \dot{c}_k\right)=0, \tag{4}$$

где s — удельная энтропия, T — температура, P — давление, v — удельный объем, μ_k — химический потенциал k-го компонента. Справедливость гипотезы локального равновесия (4), сильно ограничивающей область применения полученных с ее помощью результатов, в рамках макроскопической теории не рассматривается.

Подстановка (1) — (3) в (4) приводит к локальной форме уравнения баланса энтропии

$$\rho\dot{s}=-\operatorname{div} J_s+\sigma_s, \tag{5}$$

где J_s — плотность потока энтропии; σ_s — производство энтропии. Поскольку в замкнутых системах энтропия никогда не убывает,

$$\sigma_s\geqslant 0, \tag{6}$$

$$\sigma_s=\sum_a J_a X_a, \tag{7}$$

где I_a представляют собой плотности потоков, обусловленных теплопроводностью, диффузией, вязким трением и химическими реакциями, а X_a — сопряженные с ними термодинамические силы. Так как в равновесии потоки и силы, связанные со всеми указанными процессами, исчезают, то при малом отклонении от равновесия связь между потоками и силами оказывается линейной и однородной:

$$J_a=\sum_b L_{ab}X_b. \tag{8}$$

Кинетические коэффициенты L_{ab} подчиняются неравенствам, вытекающим из условия (6):

$$L_{aa}\geqslant 0, \quad (L_{ab}+L_{ba})^2\geqslant 4L_{aa}L_{bb}, \ldots \tag{9}$$

и, кроме того, удовлетворяют соотношениям взаимности

$$L_{ab}=L_{ba} \quad (a\neq b). \tag{10}$$

Доказательство (10) основано на симметрии уравнений механики, которыми описывается детальное движение частиц системы в отсутствие внешнего магнитного поля по отношению к изменению знака времени [2]. Феноменологического вывода соотношений взаимности нет [1].

Матеріал, захищений авторським правом

Далее описывается схема вывода уравнений неравновесной термодинамики континуальных многокомпонентных сред, которая в отличие от традиционной опирается на уравнения баланса массы, импульса и энергии только как на определения.

Рассмотрим условия термодинамического равновесия компонентной среды. В случае сохранения момента количества движения имеем

$$T^{-1}=\text{const}, \quad T^{-1}(\mu_k+\psi_k)=\text{const}, \quad T^{-1}v_k=\text{const},$$

$$T^{-1}\sum_j \nu_{kj}\mu_j=0, \quad k=1, 2, \ldots, n, \tag{11}$$

откуда следуют локальные условия равновесия

$$\frac{\partial}{\partial t}T^{-1}=0, \quad T^{-1}\frac{\partial}{\partial t}(\mu_k+\psi_k)_T=0,$$

$$T^{-1}\frac{\partial}{\partial t}V_k=0, \quad \operatorname{div} v_k=0, \tag{12}$$

$$\nabla T^{-1}=0, \quad T^{-1}(\nabla\mu_k+\nabla\psi_k)=0,$$

$$T^{-1}\operatorname{grad} v_k=0, \quad \sum_j \nu_{kj}\mu_j/T=0. \tag{13}$$

Соотношение Гиббса (4) выполняется при квазистатических термодинамически обратимых процессах, если нарушаются лишь условия (11), но условия (12) выполняются. При необратимых же процессах выполняется не (4), а неравенство

$$L=\dot{s}-T^{-1}\left(\dot{e}+P\dot{v}-\sum_k \mu_k\dot{c}_k\right)>0, \tag{14}$$

где L зависит теперь не только от термодинамических сил, фигурирующих в (12).

Заметим, что гипотеза локального равновесия (4) обычно применяется для описания неравновесных процессов на том основании, что большие отклонения от статистического равновесия в каждой малой части в целом неравновесной системы исключаются за счет диссипативных процессов в ней [3]. Необратимые процессы возникают в результате отклонения от квазистатичности и ведут к ее уменьшению. Предполагая, что указанное отклонение минимально, выразим это свойство в форме локального вариационного принципа

$$L=\min, \tag{15}$$

необходимым условием которого является

$$\delta L=0, \tag{16}$$

или

$$\delta\left[\dot{s}-\tilde{\dot{s}}-T^{-1}\left(\dot{e}+P\dot{v}-\sum_k \mu_k\dot{c}_k\right)+\tilde{T}^{-1}\left(\tilde{\dot{e}}+\tilde{P}\tilde{\dot{v}}-\sum_k \tilde{\mu}_k\tilde{\dot{c}}_k\right)\right]=0, \tag{17}$$

где волной отмечены величины, относящиеся к какому-либо произвольному квазистатическому процессу. Поскольку при таком процессе вы-

Матеріал, захищений авторським правом

полняется (4), вариационный принцип в форме (17), конечно, полностью эквивалентен принципу (16). Неопределенность в выборе квазистатического процесса в (17) можно устранить, полагая

$$u=\tilde{u},\quad v_k=\tilde{v}_k,\quad v=\tilde{v},\quad c_k=\tilde{c}_k. \tag{18}$$

Тогда (17) упрощается:

$$\delta\Big[\ \dot{s}-\tilde{\dot{s}}-(T^{-1}-\tilde{T}^{-1})\dot{e}-(T^{-1}P-\tilde{T}^{-1}\tilde{P})\dot{v}+ \\ +\sum_k\ (T^{-1}\mu_k-\tilde{T}^{-1}\tilde{\mu}_k)\dot{c}_k\Big]=0. \tag{19}$$

Можно, конечно, вместо (18) принять

$$T=\tilde{T},\quad \mu_k=\tilde{\mu}_k,\quad P=\tilde{P},\quad v_k=\tilde{v}_k, \tag{20}$$

что приводит к эквивалентному принципу

$$\delta\Big\{\dot{s}-\tilde{\dot{s}}-\tilde{T}^{-1}(\dot{e}-\tilde{\dot{e}})+\tilde{P}(\dot{v}-\tilde{\dot{v}})-\sum_k\ [\mu_k(\dot{c}_k-\tilde{\dot{c}}_k)]\Big\}=0. \tag{21}$$

Исходя из формы (21) нетрудно установить физический смысл построенного вариационного принципа. Для этого рассмотрим выражение для вероятности флуктуации в элементарной части $d\Omega$ в целом замкнутой системы [2]:

$$w=A\ \exp\Delta s_{\text{п}}, \tag{22}$$

где $\Delta s_{\text{п}}$ — отклонение энтропии всей системы от своего наибольшего возможного значения при флуктуации,

$$\Delta s_{\text{п}}=s-\tilde{s}-\tilde{T}^{-1}(e-\tilde{e})-\tilde{T}^{-1}\tilde{P}(v-\tilde{v})+\sum_k\ \tilde{T}^{-1}\tilde{\mu}_k(c_k-\tilde{c}_k), \tag{23}$$

где температура T, давление P и химические потенциалы μ_k среды, окружающей выделенную часть системы, считаются неизменными. Поэтому

$$\frac{d}{dt}\Delta s_{\text{п}}=L=L-\tilde{L}. \tag{24}$$

Полагая, что флуктуации в различных частях системы $d\Omega$ в каждый момент времени не коррелируют одна с другой, для вероятности флуктуации в объеме Ω находим

$$w_\Omega=A\ \exp\int_\Omega\ \Delta s_{\text{п}}d\Omega. \tag{25}$$

Известно [2], что W определяется как предел отношения $\Delta t/\mathrm{T_o}$, где Δt — часть полного времени, в течение которого выделенная подсистема находится на соответствующем данному макроскопическому состоянию участке фазового пространства, при неограниченном увеличении полного времени T_0. Рассматривая промежутки времени, значительно бóльшие по сравнению с теми, на протяжении которых существует времен-

Матеріал, захищений авторським правом

ная корреляция, для вероятности флуктуации на конечном промежутке времени получим

$$w_{\Omega,\Delta t}=A\exp\iint L d\Omega dt. \tag{26}$$

Таким образом, физический смысл принципа (16), интегральным аналогом которого является

$$\iint L d\Omega dt=\min, \tag{27}$$

состоит в следующем: минимум функционала соответствует наиболее вероятному пути эволюции системы при заданном изменении во времени гидротермодинамических параметров на ее границе. При этом макроскопическое описание кинетических процессов, вытекающих из принципа (27), оказывается не детерминистским, а вероятностным. Несмотря на то что реальные процессы отклоняются от описываемых принципом (27), отклонения эти незначительны ввиду экспоненциального характера зависимости вероятности (26) от минимизируемой величины.

Поскольку по смыслу производства энтропии

$$\dot{\rho s}-\dot{\tilde{\rho}}\dot{\tilde{s}}\Big|_{e=\tilde{e},\ v=\tilde{v},\ c_k=\tilde{c}_k}=\sigma_s, \tag{28}$$

(19) и (21) можно представить в виде

$$\delta\left\{\sigma_s-(T^{-1}-\tilde{T}^{-1})\left[\rho\dot{u}+\rho\frac{d}{dt}\sum_k c_k(v_k^2/2+\psi_k)\right]-\right.$$

$$\left.-(T^{-1}P-\tilde{T}^{-1}\tilde{P})\operatorname{div}v+\sum_k(T^{-1}\mu_k-\tilde{T}^{-1}\tilde{\mu}_k)\rho\dot{c}_k\right\}=0, \tag{29}$$

$$\delta\left\{\sigma_s-\tilde{T}^{-1}(\rho\dot{u}-\dot{\tilde{\rho}}\dot{\tilde{u}})-\tilde{T}^{-1}\tilde{P}(\rho\dot{v}-\dot{\tilde{\rho}}\dot{\tilde{v}})+\right.$$

$$\left.+\sum_k\tilde{T}^{-1}(\tilde{\mu}_k+\psi_k)(\rho\dot{c}_k-\dot{\tilde{\rho}}\dot{\tilde{c}}_k)-\sum_k\tilde{T}^{-1}v_k(\rho_k\dot{v}_k-\dot{\tilde{\rho}}_k\dot{\tilde{v}}_k)\right\}=0. \tag{30}$$

Из (29) следует, что в стационарном состоянии, при котором параметры, его характеризующие, в каждом элементе массы остаются неизменными во времени,

$$\delta\sigma_s=0. \tag{31}$$

Поэтому, разлагая $\sigma_s(\tilde{T},\ \tilde{\mu}_k,\ \tilde{P},\ \tilde{V}_k)$ в окрестности стационарного состояния в ряд по термодинамическим силам с учетом (31), получаем

$$\sigma_s=\frac{1}{2}\sum_{a,b}\frac{\partial^2\sigma_s}{\partial X_a\partial X_b}X_aX_b, \tag{32}$$

где X_a — термодинамические силы,

$$\nabla T^{-1},\quad T^{-1}(\nabla\mu_k+\nabla\psi_k)_T,\quad T^{-1}\operatorname{grad}v_k,\quad \sum_k\nu_{kj}\mu_jT^{-1}. \tag{33}$$

Матеріал, захищений авторським правом

Уравнения Эйлера — Лагранжа, соответствующие вариационному принципу (27), имеют вид

$$\frac{d}{d\vec{r}}\frac{\partial L}{\partial \nabla \Gamma_m}+\frac{d}{dt}\frac{\partial L}{\partial \dot{\Gamma}_m}-\frac{\partial L}{\partial \Gamma_m}=0, \tag{34}$$

где

$$\Gamma_m=\{T^{-1},\ T^{-1}(\mu_k+\psi_k),\ T^{-1}v_k\}, \tag{35}$$

Около стационарного состояния, учитывая (32), находим

$$\rho\dot{u}=-\frac{d}{d\vec{r}}\sum_b\frac{\partial^2\sigma_s}{\partial\nabla T^{-1}\partial X_b}X_b-P\operatorname{div}v-$$

$$-T^2\sum_k\frac{\partial}{\partial T}\left(\frac{\mu_k}{T}\right)\rho\dot{c}_k-\rho\frac{d}{dt}\left[\sum_k c_k(v_k^2/2+\psi_k)\right]; \tag{36}$$

$$\rho\dot{c}_k=-\operatorname{div}\sum_b\frac{\partial^2\sigma_s}{\partial T^{-1}[\nabla\mu_k+\nabla\psi_k]_T\partial X_b}X_b+\frac{\partial\sigma_s}{\partial(T^{-1}\mu_k)}; \tag{37}$$

$$\frac{d}{dt}(\rho_k v_k)=-c_k\nabla P-\rho_k[\nabla\mu_k+\nabla\psi_k]_{P,T}-$$

$$-\frac{d}{d\vec{r}}\sum_b\frac{\partial^2\sigma_s}{\partial(T^{-1}\operatorname{grad}v)\partial X_b}X_b. \tag{38}$$

Сравнивая (36)—(38) с определениями (1)—(3), находим линейные феноменологические уравнения неравновесной термодинамики (8) с коэффициентами, зависящими от параметров состояния (35), и соответствующие источники массы, энергии и импульса: $m_k=\sum_j\sum_l\sum_m L_{lj}\times$ $\times\nu_{jk}\nu_{lm}\frac{\mu_m}{T}$ — изменение массы k-го компонента за счет химических реакций в единице объема в единицу времени; $-\frac{d}{dt}\left[\sum_k\rho_k(v_k^2/2+\right.$ $\left.+\psi_k)-P\operatorname{div}v-T^2\sum_k\frac{\partial}{\partial T}\left(\frac{\mu_k}{T}\right)\rho\dot{c}_k\right]$ источник внутренней энергии, учитывающий превращение механической энергии в тепловую, работу системы над внешней средой и тепло, выделяющееся при химических реакциях и растворении; $-\sum\rho_k\nabla\psi_k$ — источник импульса.

В случае изотропной среды кинетические коэффициенты могут быть либо скалярными функциями гидротермодинамических параметров состояния, либо векторами, пропорциональными скоростям. Поэтому для изотропной среды уравнения (7) упрощаются и в соответствии с (36) — (38) принимают вид

$$J_u=L_{uu}\nabla(1/T)+\sum_i(L_{ui}/T)[\nabla\mu_k+\nabla\psi_k]_T, \tag{39}$$

Матеріал, захищений авторським правом

$$J_k = L_{ku}\nabla(1/T) + \sum_i (L_{ki}/T)\,[\nabla\mu_k + \nabla\psi_k]_T, \tag{40}$$

$$\sigma_{\alpha\beta} = P\delta_{\alpha\beta} + \sum_k (L_{v_k v_i}/T)\,(\mathrm{grad}\, v_k)_{\alpha\beta}, \tag{41}$$

$$m_k = \sum_j \sum_l \sum_m L_{lj}\nu_{jk}\nu_{lm}\frac{\mu_m}{T}. \tag{42}$$

Коэффициенты L_{ab} симметричны по индексам как вторые производные по силам (33) от производства энтропии. Достаточные условия минимальности функционала (27) совпадают с требованиями (9).

Уравнение движения k-го компонента среды находим с помощью (27), принимая в качестве термодинамической силы и учитывая связь

$$\rho\dot{c}_k = -\mathrm{div}\,\rho_k(v_k - v) + m_k, \tag{43}$$

которая является определением импульса этого компонента [4]:

$$\rho_k \frac{d}{dt}(v_k - v) = -\rho_k(\nabla\mu_k)_{P,T} + \sum_i (f_{ki}/T)(v_i - v) - v_k\frac{d}{dt}\rho_k. \tag{44}$$

Когда ускорением индивидуальных компонентов в системе центра масс можно пренебречь, (44) можно рассматривать как аналог уравнений (40). При этом матрица коэффициентов сопротивления f_{ki}/ρ_i совпадает с матрицей, обратной матрице коэффициентов проводимости L_{ki}.

Вариационный принцип (27) позволяет получить в окрестности стационарного состояния нелинейные феноменологические уравнения, если в разложении (32) удержать члены более высокого порядка:

$$\sigma_s = \frac{1}{2}\sum_a \sum_b \frac{\partial^2\sigma_s}{\partial X_a \partial X_b} X_a X_b + \sum_a \sum_b \sum_c L_{abc} X_a X_b X_c, \tag{45}$$

где коэффициенты, очевидно, удовлетворяют соотношениям взаимности высшего порядка

$$\frac{1}{6}\frac{\partial^3\sigma_s}{\partial X_a \partial X_b \partial X_c} = L_{abc} = L_{acb} = L_{bac} = \ldots \tag{46}$$

При сильных ограничениях (27) совпадает с вариационным принципом, предложенным И. Дьярмати [1] и с принципом минимального производства энтропии [5]. Принцип (27) тесно связан и с методом локального потенциала [3], имея при этом ряд принципиальных отличий.

Физико-математический аппарат неравновесной термодинамики позволяет на едином и адекватном языке описать разнообразные явления и процессы, составляющие цикл низкотемпературного консервирования биологических объектов: тепломассоперенос через биологические мембраны, зародышеобразование, рост и перестройку льда, механическое взаимодействие клеток с кристаллами и т. д. В дальнейшем мы надеемся получить с помощью вариационной техники динамические соотношения на движущихся границах раздела фаз, уравнения тепломассопереноса через прерывные термодинамические системы, ясную физическую интерпретацию коэффициентов, характеризующих тепломассообмен клеток с окружающей их средой, а также построить универсальную физико-математическую модель изолированной клетки и ткани.

Матеріал, захищений авторським правом

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Дьярмати И.* Неравновесная термодинамика. — М. : Мир. 1974. — 304 с.
2. *Ландау Л. Д., Лифшиц Е. М.* Статистическая физика. — М. : Наука. 1976. — 583 с.
3. *Гленсдорф П., Пригожин И.* Термодинамическая теория структуры, устойчивости и флуктуаций. — М. : Мир, 1973. — 280 с.
4. *Ландау Л. Д., Лифшиц Е. М.* Механика сплошных сред. — М. : Гостехиздат, 1953. — 795 с.
5. *Гроот де С., Мазур П.* Неравновесная термодинамика. — М. : Мир, 1964. — 456 с.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
06.07.77

УДК 57.043

А. В. Зинченко, В. А. Моисеев

ИССЛЕДОВАНИЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫХ ФАЗОВЫХ ПЕРЕХОДОВ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ ПЭГ-400 КАЛОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Цель настоящей работы — исследование методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) фазовых переходов в водных растворах ПЭГ-400 различных концентраций в интервале температур от —160 до 0°С. Знание этих данных важно при разработке методов низкотемпературного консервирования биологических объектов.

Измерения проведены на изготовленном нами дифференциальном сканирующем калориметре, в основу конструкции которого заложены известные принципы, разработанные Кальве [2] (рис. 1).

Внутри массивного медного блока *1* в двух полостях *2* и *3* установлены термочувствительные элементы *4* и *5*, представляющие собой медные тонкостенные стаканы, окруженные батареями из 1 000 медь-константановых термопар. Один из термочувствительных элементов используется в качестве рабочей ячейки микрокалориметра, а другой служит при этом в качестве «свидетеля», компенсирующего внешние тепловые возмущения. Медный корпус *6* выполняет роль теплового экрана. Калориметр помещен в камеру *7* с теплоизоляцией из пенопласта *10*. В верхней крышке *8* имеется плотно закрываемое отверстие *9* для заливки жидкого азота.

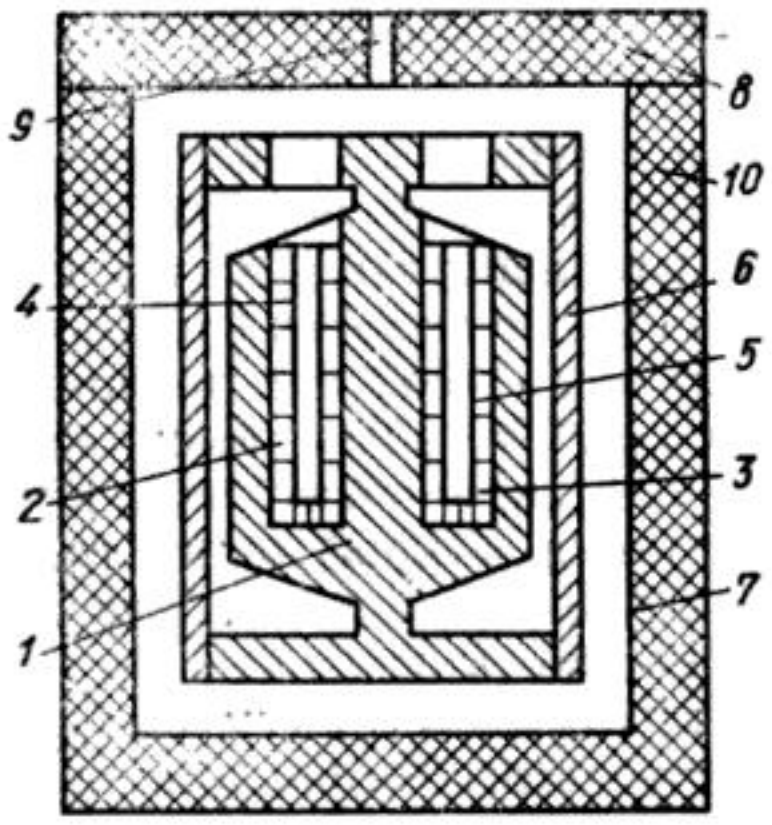


Рис. 1. Схема устройства микрокалориметра.

Для приготовления образцов использовали ПЭГ-400 (Австрия) и дистиллат. Поскольку известно, что в системе H_2O—ПЭГ-400 равновесие устанавливается медленно [1], для получения однородных смесей растворение ускоряли нагреванием их до 40—50°С либо выдерживали при комнатной температуре в течение нескольких дней.

Образцы весом 2—5 г помещали в ячейку микрокалориметра и охлаждали калориметрический блок до температуры —196°С подачей жидкого азота в камеру *7*. Вследствие тепловой инерции массивного блока время охлаждения системы от комнатной температуры до —196°С составляло примерно 15 мин. После прекращения подачи азота температура калориметрического блока повышалась за счет естественного теплопритока извне. Скорость отогрева, таким образом, была нелиней-

Матеріал, захищений авторським правом

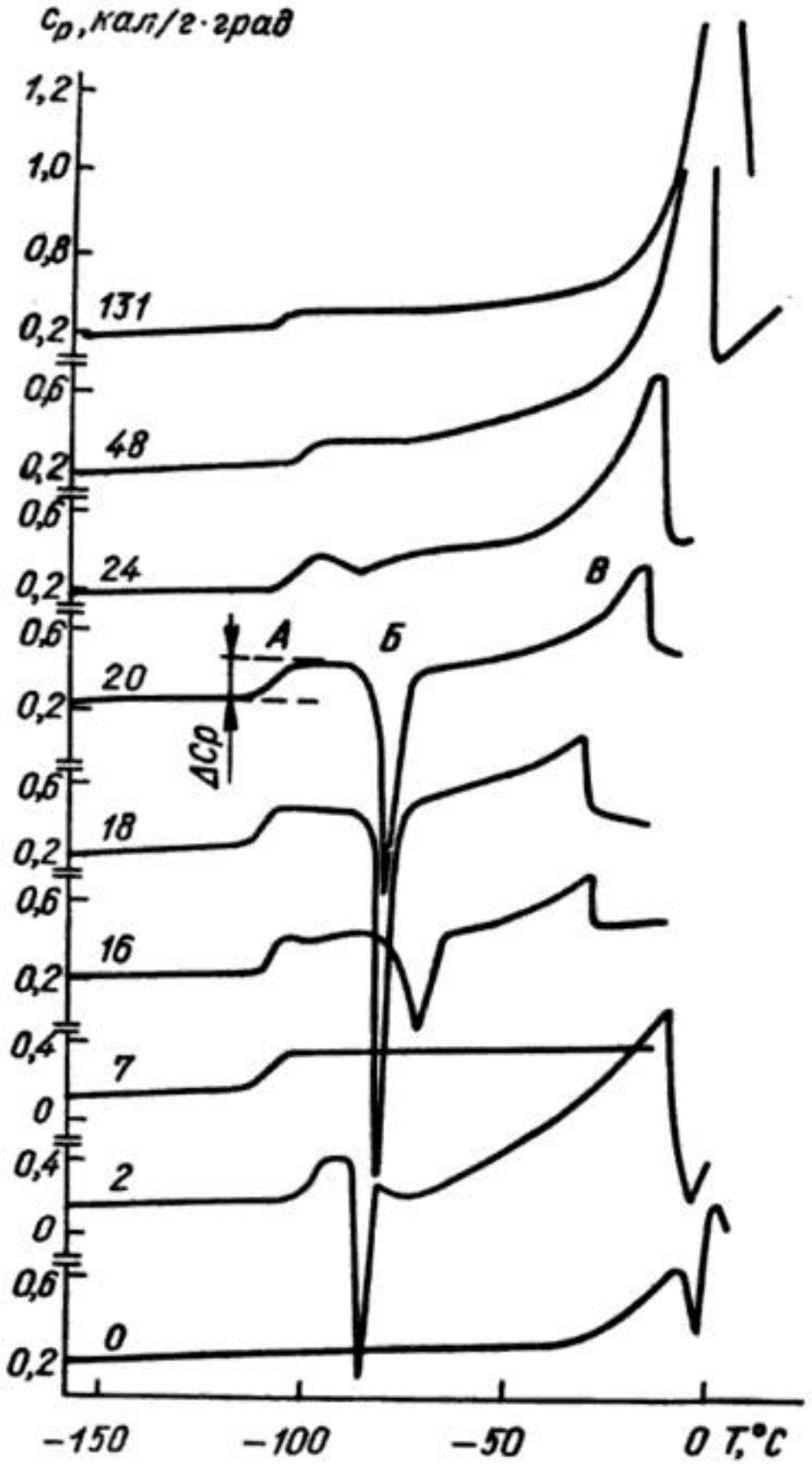


Рис. 2. Температурная зависимость теплоемкости водных смесей ПЭГ-400:

А — изгиб кривой, характеризующий процесс стеклоперехода: *Б* — экзотермический максимум, соответствующий процессу рекристаллизации при повышении температуры в системе; *В* — эндотермический минимум, характеризующий процесс плавления. Цифрами возле кривых обозначены концентрации смесей, выраженные как количество мол. H_2O на мол. ПЭГ-400.

ной и изменялась по экспоненциальному закону от 0,295° в 1 мин при —196°С до 0,04° в 1 мин 0°С.

Тепловые эффекты в процессе отогрева сопровождались появлением ЭДС на выходе термочувствительных элементов, величина которой пропорциональна тепловой мощности. Сигнал от термочувствительных элементов усиливался прибором Ф116/11 и регистрировался на ленте шестиканального потенциометра ЭПП-09, на которой одновременно записывалась температура блока, измеренная медь-константановой термопарой. Используя эти данные, находили удельную теплоемкость образца в процессе отогрева по формуле [5]

$$c_p = P \Big/ \frac{dT}{dt}, \qquad (1)$$

где P — тепловая мощность, $\frac{dT}{dt}$ — скорость изменения температуры. (Полученные данные см. на рис. 2).

Стеклопереход. Существование скачка теплоемкости, связанного со стеклопереходом при отогреве замороженных смесей, зависит от их концентрации и происходит только в увлажненных образцах. В безводном ПЭГ-400 это явление нами не наблюдалось.

Тот факт, что при стеклопереходе отсутствует экстремум на кривой зависимости $c_p = f(T)$, указывает на то, что это явление имеет характер фазового перехода II рода [4].

Величина скачка теплоемкости Δc_p при стеклопереходе меняется в зависимости от концентрации смеси. В области малых влагосодержаний она увеличивается с ростом влажности от нуля до значения примерно 0,2 кал/г·град при 18—20 мол. H_2O на мол. ПЭГ-400 и далее уменьшается по мере роста влажности. При концентрации 188 мол. H_2O на мол. ПЭГ-400 стеклопереход не регистрировался на использованном нами приборе.

Температурный интервал стеклоперехода составляет примерно 20°С и лежит в области от —100° до —120°С. Систематической зависимости температуры стеклоперехода от концентрации мы не наблюдали. Последнее обстоятельство обусловлено, по-видимому, тем, что стеклообразное состояние вещества носит релаксационный метастабильный характер [6] и зависит от скорости охлаждения.

Матеріал, захищений авторським правом

Кристаллизация переохлажденной смеси. Дальнейшее повышение температуры вызывает в некоторых случаях резкое изменение удельной теплоемкости, обусловленное экзотермическим процессом в системе. Мы наблюдали это явление в диапазоне концентраций 14 мол. H_2O на мол. ПЭГ-400 — 24 мол. H_2O на мол. ПЭГ-400 и при концентрации 2 мол. H_2O на 1 мол. ПЭГ-400. В последнем случае отмечен наиболее узкий по температурному интервалу пик (примерно 5°С). При влажности 24 мол. H_2O на мол. ПЭГ-400 пик рекристаллизации растянут на интервал температур около 20°С (см. рис. 2).

Полученные закономерности — отражение межмолекулярных взаимодействий в системе. Известно, например, что наиболее прочные водородные связи молекул H_2O с концевыми гидроксильными группами имеют место при составе смеси 2 мол. H_2O на мол. ПЭГ-400 [1]. Как видно из рис. 2, при этой концентрации система особенно подвержена переохлаждению. При увеличении влагосодержания смеси водородные связи молекул H_2O образуются с гидрофильными центрами другого типа — с атомами кислорода звеньев полимера. Эти водородные связи, согласно данным литературы [1], наиболее прочны в том случае, когда на каждый атом кислорода приходится две молекулы H_2O. В случае ПЭГ-400 такая ситуация реализуется при концентрации 16 мол. H_2O на мол. ПЭГ-400. На рис. 2 видно, что в этом интервале концентраций склонность к переохлаждению снова повышается.

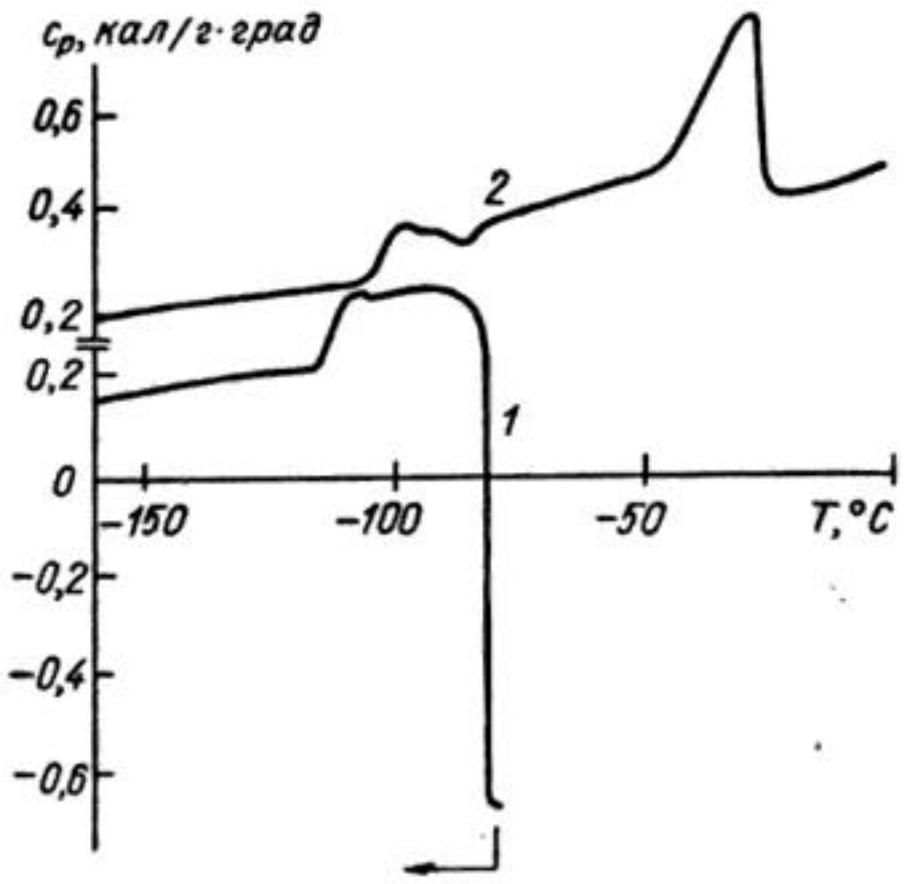


Рис. 3. Зависимость формы кривой $c_p = f(T)$ от термической предыстории образца:

1 — отогрев образца от —196°С без предварительной термической обработки; *2* — отогрев от —196°С после термической обработки: охлаждения до —196°С, нагрева до температуры кристаллизации переохлажденной смеси (—81,5°С) и повторного охлаждения до —196°С.

Для получения сведений о природе явлений стеклоперехода (область *А*) и рекристаллизации (область *Б*) исследовали влияние термической предыстории раствора на вид зависимости $c_p = f(T)$. С этой целью образец влажностью 18 мол. H_2O на мол. ПЭГ-400 подвергли термической обработке: после охлаждения до температуры —196°С отогрев вели до температуры, при которой в системе начинается экзотермический переход. В момент максимума экзотермичности (—81,5°С) провели повторное охлаждение раствора до —196°С, как показано на рис. 3 (кривая *1*). При последующем отогреве пика рекристаллизации мы не наблюдали, стеклопереход наступил при более высокой температуре и имел меньшую амплитуду Δc_p (см. рис. 3, кривая *2*). Эти изменения — следствие необратимого характера кристаллизации в течение первого отогрева. Часть вещества, находившегося при низких температурах в стеклообразном состоянии, кристаллизуется в процессе отогрева вследствие уменьшения вязкости и увеличения молекулярной подвижности.

Аналогичные результаты получены авторами работы [7] при исследовании плазмы крови.

Исследуя безводный ПЭГ-400 при указанных скоростях охлаждения и отогрева, мы не наблюдали стеклопереход и рекристаллизацию из переохлажденного состояния (области *А* и *Б* на кривой $c_p = f(T)$. Это согласуется с данными авторов работы [3], которые на примере этиленгликоля, ди- и триэтиленгликоля установили, что по мере роста

Матеріал, захищений авторським правом

молекулярного веса склонность безводных гликолей к кристаллизации снижается. Для ПЭГ-400 указанное свойство, по-видимому, еще более четко выражено.

Плавление. Эндотермический эффект плавления на зависимостях $c_p = f(T)$ для исследованных систем, как видно из рис. 2, носит размытый характер. Наблюдается широкий температурный интервал предплавления при больших количествах ПЭГ в системе.

С увеличением влагосодержания температурный интервал предплавления сужается. Температура максимума эндотермичности при плавлении зависит от концентрации и достигает минимального значения при влагосодержаниях 16—18 мол. H_2O на мол. ПЭГ-400. По мере дальнейшего увеличения количества ПЭГ-400 температура плавления снова повышается. Эти данные свидетельствуют о том, что состав эвтектической смеси ПЭГ-400 — H_2O представляет собой систему, лежащую в интервале концентраций 16—18 мол. H_2O на мол. ПЭГ-400, которая соответствует, вероятно, наиболее прочным водородным связям молекул воды с молекулами ПЭГ-400.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Зинченко В. Д., Манк В. В., Моисеев В. А., Овчаренко Ф. Д.* Исследование межмолекулярных взаимодействий в системе вода — полиэтиленгликоль. — Коллоид. журн., 1976, **38**, № 1, с. 44—50.
2. *Кальсе Э., Прат А.* Микрокалориметрия. — М.: Изд-во иностр. лит., 1963. — 477 с.
3. *Керча Ю. Ю., Липатов Ю. С.* Низкотемпературные переходы в некоторых мономерных и олигомерных гликолях и эфирогликолях. — В кн.: Синтез и физико-химия полиуретанов. Киев: Наук. думка, 1967, с. 120—125.
4. *Ландау Л. Д., Лифшиц Е. М.* Статистическая физика. — М.: Наука, 1976. — Т. 1. 583 с.
5. *Мревлишвили Г. М.* Термодинамические свойства биополимеров в спиральном и клубковом состояниях в интервале температур 4°—400°К. — Биофизика, 1977. 22, № 1, с. 180—191.
6. *Пономарев И. Ф.* Стеклообразное состояние и расстеклование. — Изв. Том. технол. ин-та, 1923, **44**, № 1, с. 42—44.
7. *Simatos D., Faure M., Bonjour E., Couach M.* The physical state of water at low temperatures in plasma with different water contents as studies by differential thermal analysis and D. S. C. — Cryobiology, 1975, **12**, N 3, p. 202—208.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
03.02.77

УДК 57.043

Л. К. Лозина-Лозинский

К ВОПРОСУ О ТЕРМИНАХ И ПОНЯТИЯХ В КРИОБИОЛОГИИ

Как самостоятельная биологическая дисциплина криобиология выделилась относительно недавно — во второй половине XX ст. Это можно объяснить тем, что изучение влияния и действия низких и сверхнизких температур на биологические объекты приобрело очень большое значение в связи с использованием особого состояния живых систем, допускающего длительное хранение благодаря понижению метаболических процессов до минимума или их полному прекращению. Понимание механизмов устойчивости и повреждений, связанных с действием отрицательных температур, стало необходимым при разработке многих вопросов медицины, животноводства, растениеводства, экологии и других областей науки.

Начало криобиологии было заложено в экологических и физиологических исследованиях прошлого столетия, ставивших своими задачами выяснить условия зимовок животных и растений и их устойчи-

Матеріал, захищений авторським правом

вость к крайне низким температурам. В связи с этим возникла проблема холодового анабиоза. В первой половине XX столетия большое внимание уделялось холодоустойчивости насекомых в связи с необходимостью прогнозировать массовое размножение вредителей сельского хозяйства. В период мировой войны и в последующие годы криобиологические исследования приобретают особенно большое значение для медицины. Прежде всего встали вопросы низкотемпературной консервации крови, тканей и органов в хирургии, а также онкологии. Большое распространение приобрели методы хранения спермы домашних животных в практике животноводства. В связи с разнообразием медико-биологических дисциплин, использующих низкие и сверхнизкие температуры, криобиологические понятия и терминология получали различное толкование. Цели, которые ставит перед собой криобиология, также нуждаются в уточнении.

Поэтому своевременно поставить вопрос о криобиологической терминологии, как, например, в статье [14]. Следует отметить, что авторы в своем предварительном сообщении осветили этот вопрос шире, чем он представлен в заглавии. Важность вопроса о криобиологических понятиях следует также из того, что он специально поднимался на симпозиумах и на Международном конгрессе по замораживанию в 1973 г.

При обсуждении криобиологических понятий, с нашей точки зрения, необходимо придерживаться некоторых традиционных (классических) представлений и определений, взятых из исторического наследия биологических наук и физики как основы естествознания.

1. **Предмет криобиологии.** В последнее время даже в специальной литературе, у нас и за рубежом (например, в журнале *«Cryobiology»*) к криобиологии относят такие явления, как искусственная гипотермия и спячка гомойотермных животных; состояния организмов, клеток, ферментов при температурах ниже той нормы, при которой они обычно существуют и функционируют, независимо от степени охлаждения. Иначе говоря, в «криобиологических» работах нередко речь идет о явлениях и состояниях живых систем при положительных температурах, при которых нет ни замерзания, ни переохлаждения. Согласиться с таким расширением предмета криобиологии нельзя. Лежащий в основе термина криобиологии и других явлений корень «крио» (греч.) обозначает не только понятие «холод», но и прежде всего слова мороз, лед, т. е. понятия, связанные с температурой от 0°С и ниже. Отсюда возникли термины: криогенный, криоскопический, криоскоп, криогидрат, криолиз, криосфера, криохирургия и т. д., которые всегда имеют в виду температуры только отрицательные, обозначают связь с замерзанием, замораживанием, т. е. изменением фазного состояния воды, и с переохлаждением. Под переохлаждением следует понимать жидкое состояние воды, биологических растворов ниже точки их замерзания, точное определение которого дается физиками. Первым ученым, исследовавшим переохлаждение у животных, следует считать П. И. Бахметьева [1]. Нами и другими биологами неоднократно использовался этот термин в соответствующем физическом смысле; последнее точное определение дано в статье [15]. Но термин «переохлаждение» применяется также по отношению к совершенно другим явлениям, таким, как охлаждение тела ниже нормы у гомойотермных животных и человека в физиологии и медицине, и не связано с охлаждением до 0°С и ниже. Лишь особые, редко встречающиеся явления гипотермии, когда у животных, способных к зимней спячке, удавалось восстановить жизнедеятельность после переохлаждения или частичного замораживания органов, например, у молодых летучих мышей [1, 5] и золотистого хомячка [21, 23], следует отнести к криобиологическим. Обычная гипотермия рассматривается в соответствующих разделах физиологии и экологии (если речь идет о животных) или медицины (в случае патологического

Матеріал, захищений авторським правом

состояния человека) [6, 12, 13, 17, 18] и не включается в криобиологические монографии (например, «*Cryobiology*» под редакцией Г. Меримена).

Не всякое изучение влияния холода на организм относится к области криобиологии. Принятые в экологии понятия холодоустойчивости и психрофилии передают широкое отношение организмов и среды и могут относиться как к экологии (в естественной среде), так и к криобиологии, в зависимости от того, идет ли речь о действии температур ниже их жизненного оптимума или о температурах отрицательных, вызывающих глубокий гипобиоз или анабиоз.

2. **Криоповреждения.** Повреждения, вызываемые охлаждением и замораживанием, разнообразны и многочисленны и в настоящее время вряд ли их можно точно классифицировать. Вначале хотелось бы их разделить на две группы: 1. Истинные повреждения, вызывающие необратимые нарушения в клетках, которые можно назвать криодеструкциями (к ним относится криолиз). 2. Обратимые нарушения или изменения, которые не только повреждают клетку и организм, но повышают его устойчивость. Можно предложить называть их «криоальтерациями». Криодеструкции и криоальтерации не всегда специфичны, поскольку на многие агенты и клетки они реагируют однозначно.

Одной из причин повреждений, вызываемых холодом, является температурный шок. Природа шока точно не установлена, и под этим термином нередко подразумевают разные явления. Холодовой шок вызывается резкой сменой температуры — от положительной до максимального переохлаждения. По мнению одних авторов, смена температур приводит к прямому разрушению (деструкции) клетки. Другие считают, что при резком понижении температуры ниже 0°С нарушается структура мембран клетки в результате изменения их проницаемости и осмотических процессов и наступает повреждение или гибель клетки. Эта точка зрения, подтвержденная рядом исследований, представляется нам более правильной.

3. **Охлаждение, замерзание, замораживание.** Если под *охлаждением* понимают любое понижение температуры, то под глубоким охлаждением обычно имеют в виду понижение температуры биологического объекта до экстремальных температур, к которым следует относить необычные или отсутствующие в естественных условиях на Земле. Границей глубокого охлаждения от неглубокого предлагаем считать температуру, близкую к температуре твердой углекислоты (—78,6°С). Практически температуры ниже этой не бывает на Земле даже в Антарктиде (за редким исключением).

Замерзание, согласно физическим понятиям, обозначает процесс, связанный с кристаллизацией воды, и его следует применять в криобиологии, не распространяя на субъективное ощущение холода. Замораживание также указывает на процесс кристаллизации жидкости, но происходящий под определенным воздействием человека (например, холодильные машины). Главное содержание понятия *замораживания* и *замерзания* заключается в переходе воды из жидкой фазы в твердую. Поэтому неправильно употребление в советской и иностранной литературе выражения «глубокое замораживание» или «deep freezing». Нельзя глубоко или неглубоко превращать жидкую воду в лед, так же как нельзя глубоко заморозить кусок твердого вещества, не содержащего воду или другую жидкость, его можно только охладить до любой температуры.

4. **Холодоустойчивость, морозоустойчивость, зимостойкость.** В этих терминах предпочтительно в качестве основы употреблять слово устойчивость, чем стойкость, так как принято говорить об устойчивости живых организмов, а не об их стойкости. Термин *холодоустойчивость* более общий, чем другие, и характеризует устойчивость к температурам

Матеріал, захищений авторським правом

ниже тех, при которых протекает нормальная или активная жизнедеятельность. *Морозоустойчивость* — более частичное определение устойчивости к температурам ниже 0°С в природе и широко употребляется в растениеводстве и сельскохозяйственной метеорологии. *Зимостойкость* — еще более узкое определение устойчивости растений к сезонным изменениям климата.

5. **Критерии жизнеспособности в криобиологии.** Определение жизнеспособности клеток, тканей и органов после замораживания, оттаивания, а также после глубокого охлаждения без замерзания представляет значительные трудности [14]. Правильно указывалось, что жизнеспособность разных биологических объектов определяется различными критериями исходя из их способности к возобновлению тех или иных функций, и при этом перечислялся ряд критериев. Кроме этих критериев часто можно положиться на изменения в клетках, выявляемых при микроскопических исследованиях с помощью прижизненных окрасок, люминесценции, по движению цитоплазмы и ряду других признаков. Несомненно, что в будущем станут особенно перспективными методы измерения жизнеспособности по проницаемости и другим свойствам мембран. Последние, по-видимому, прежде всего реагируют на воздействия отрицательных температур и играют наиболее важную роль в изменении жизнеспособности.

Среди физиологических критериев жизнеспособности и жизнедеятельности в условиях холода необходимо выделить характер и интенсивность дыхания во время и после охлаждения. На криоальтерации указывают изменения интенсивности поглощения кислорода и повышение дыхательного коэффициента. Однако надо иметь в виду возможность повышения поглощения кислорода за счет освобождения ферментов в убитой клетке и за счет развития микроорганизмов после криолиза. Существуют и многие другие физиологические и биохимические методы определения состояния клеток и тканей.

6. **Криоконсервация и криоконсервирование.** Нельзя не согласиться с данными литературы [2, 7], что консервация и консервирование — разные понятия. А. Ф. Бродский под консервированием понимает процесс (метод, средства) длительного хранения органов и тканей, при котором максимально сохраняется анатомо-морфологическая структура, снижаются аутолитические процессы (в отдельных случаях антигенность), не накапливаются токсические продукты обмена. Но автор не считает, что консервированные ткани и органы являются живыми[1]. В этом понимании биологическое значение консервирования сводится к нулю, так как мертвые клетки уже не представляют никакой ценности. Нужно согласиться с А. Ф. Бродским в одном: *консервирование* есть процесс сохранения биопродуктов, а не живых клеток. В таком понимании консервирование (как метод) соответствует определению, данному в «Словаре иностранных слов» [16]. Наоборот, сохранение, или презервация, живых объектов при отрицательных температурах при пониженной жизнедеятельности (гипобиоз) можно назвать *криоконсервацией.*

Консервация, ее надежность определяются не только степенью охлаждения, способами и температурой замораживания объектов, свойствами криопротекторов, но и особенностями различных живых систем. Консервация достигается у них при разных температурах, поэтому не следует криоконсервацию ограничивать определенными температурами. Исходя из этих соображений мы предлагаем в криобиологии пользоваться только термином *криоконсервация,* а термин *криоконсервирование* употреблять для хранения неживых биообъектов.

---

[1] А. Ф. Бродский [2] противоречит себе, указывая на то, что при этом происходит накопление продуктов обмена (т. е. наблюдается жизнедеятельность) (с. 102).

Матеріал, захищений авторським правом

7. **К вопросу о классификации состояний живых объектов при низких температурах.** Этот вопрос находится в тесной связи с понятиями жизнеспособности, криоконсервации и криоконсервирования. Зимнюю спячку правильнее относить лишь к состоянию теплокровных животных с переменной температурой тела (гетеротермных), при околонулевых температурах в определенных эколого-физиологических условиях. При отсутствии замерзания или переохлаждения спячка не является предметом криобиологии, хотя и относится к смежной области экологии и физиологии, связанной с гипотермией и проблемой гомеостаза.

Шмидт [19] придерживается классификации Эйзентраута [20], который справедливо разделяет «спячку» на три группы: 1) *зимнее окоченение холоднокровных животных,* вызываемое низкими температурами (это еще не спячка. — *Л. Л.); 2) настоящая зимняя спячка теплокровных животных,* связанная с изменением температуры тела и другими приспособлениями; 3) *зимний покой теплокровных животных,* зимующих в берлогах и норах без настоящей спячки. Состояние пойкилотермных животных в течение зимовки относится к явлениям зимнего или холодового покоя, иногда особого состояния — диапаузы (у насекомых и клещей).

Все эти, большей частью приспособительные, явления в биологии животных и растений относятся к более общему понятию гипобиоза, который, в частности, наблюдается и возникает при отрицательных температурах.

За спячкой (зимней и летней) следует сохранять специфические адаптивные явления прогрессивного характера, выработанные в процессе эволюции [6] у некоторых млекопитающих и связанные со сложной физиологической перестройкой многих функций, в том числе эндокринной системы, обусловленной изменением условий существования в течение годового жизненного цикла.

Под настоящим анабиозом мы подразумеваем состояние организмов и клеток, при котором полностью обратимо прекращены все физиологические процессы (обмен веществ). Такое жизнеспособное состояние иногда противопоставляют живому. В этом случае состояние анабиоза будет соответствовать неживому или мертвому, что не может считаться научным положением, так как из неживого состояния, или мертвого (необратимого), невозможен переход в живое и жизнедеятельное состояние [1].

При анабиозе структура живой системы на клеточном и молекулярном уровнях не нарушена необратимо, а потому в ней сохранилась способность к метаболизму и вообще к жизнедеятельности; именно это позволяет говорить, что анабиоз — не только свойство живого, но и характеризуется как особое состояние жизни [3, 4, 9 — 11].

В клетках при анабиозе, несмотря на прекращение метаболизма, могут протекать некоторые физические и физико-химические процессы, даже при сверхнизких температурах, без участия жидкой воды и газов. Они могут нарушить (обратимо или необратимо) тонкие структуры живых объектов и понизить их жизнеспособность. Такие повреждения влияют на мало известные состояния после окончания анабиоза (постанабиоз). Так, после глубокого охлаждения могут возникать своеобразные состояния, наблюдавшиеся нами у насекомых, характеризуемые слабым поглощением кислорода, дыхательным коэффициентом выше единицы при отсутствии других признаков жизнедеятельности и отмирания в течение нескольких недель. Чаще такое состояние кончается гибелью, реже — восстановлением жизнедеятельности [11].

---

[1] Возможность перехода неживого вещества в живое пропагандировалась в свое время О. Лепешинской; как известно, эта точка зрения признана ненаучной.

Матеріал, захищений авторським правом

Другое промежуточное состояние (кратковременное) между анабиозом и гипобиозом описано под названием мезабиоз [3, 4]. Он характеризуется односторонним, разрушительным процессом — диссимиляцией, имеющей место при увлажнении высушенных биологических объектов, например семян, или в результате дегидратации под влиянием низких температур.

Явления постанабиоза и мезабиоза имеют значение для успешной консервации биологических систем вследствие нарушенного и неполного метаболизма, вызывающего неустойчивое состояние объекта. Поэтому эти вопросы нуждаются в дальнейшем специальном исследовании. Естественно, что дискуссия о предмете криобиологии и понятиях, важных для криобиологии, должна быть продолжена.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Бахметьев П. И.* Как я нашел анабиоз у млекопитающих. — Природа, 1912, 1, № 5, с. 606—622.
2. *Бродский А. Ф.* Консервирование и гомотрансплантация. — Киев: Здоров'я, 1965, — 144 с.
3. *Голдовский А. М.* О состояниях организмов и некоторых вопросах биологии. — Журн. общ. биологии, 1970, 31, № 3, с. 316.
4. *Голдовский А. М.* Основы учения о состояниях организмов. — Л.: Наука, 1977. — 116 с.
5. *Калабухов Н. И.* Анабиоз животных при температурах ниже 0°. Действие низких температур на летучих мышей Chiroptera. — Бюл. Моск. о-ва испытателей природы, 1933, № 12, с. 243—252.
6. *Калабухов Н. И.* Спячка животных. — Харьков: Изд-во Харьк. ун-та, 1956. — 253 с.
7. *Лапчинский А. Г., Викторов В. Ф., Горбовицкий Е. Б., Медведева Г. В., Пересторонин С. А.* Консервация и пересадка конечностей и почек у собак. — В кн.: Проблемы пересадки консервированных органов и тканей. М., 1959, с. 255—259.
8. *Лозина-Лозинский Л. К.* Жизнеспособность и анабиоз при низких температурах. — В кн.: Шмидт П. Ю. Анабиоз. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1955, с. 381—433.
9. *Лозина-Лозинский Л. К.* Криобиология. — В кн.: БСЭ. 3-е изд. 1973, т. 13, с. 428—429.
10. *Лозина-Лозинский Л. К.* Анабиоз как явление жизни. — В кн.: Анабиоз и преданабиоз микроорганизмов. Рига: Зинатне, 1973, с. 5—9.
11. *Лозина-Лозинский Л. К.* Очерки по криобиологии. — Л.: Наука, 1972. — 288 с.
12. *Майстрах Е. В.* Гипотермия и анабиоз. — М.; Л: Наука, 1964. — 327 с.
13. *Неговский В. А.* Оживление организма и искусственная гипотермия. — М.: Медгиз, 1960. — 303 с.
14. *Пушкарь Н. С., Шраго М. И., Белоус А. М. и др.* О терминологии процесса криоконсервирования биологических объектов. — В кн.: Механизмы криоповреждения и криопротекции биологических структур. Киев: Наук. думка, 1976, с. 140—144.
15. *Пушкарь Н. С., Рудько Ю. М., Шраго М. И. и др.* Некоторые принципы систематизации криобиологической терминологии. — Харьков, 1976. — 11 с.
16. *Словарь* иностранных слов/Ред. И. В. Лехина, Ф. И. Петрова. — 4-е изд.-М.: Гос. изд-во иностр. и национальн. словарей, 1954. — 351 с.
17. *Слоним А. Д.* Основы общей экологической физиологии млекопитающих. — М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1961. — 432 с.
18. *Слоним А. Д.* Среда и поведение. — Л.: Наука. 1976. — 375 с.
19. *Шмидт П. Ю.* Анабиоз. — 4-е изд. — М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1955. — 380 с.
20. *Cryobiology/Ed. H. Meryman.* — London; New York: Acad. press, 1966. — 55 p.
21. *Eisentraut M.* Winterstarre, Winterschlaft und Winterruhe. Eine kurze biologisch-physiologische studie. — Mitt. Zool. Mus. Berlin, 1933, 19, S. 48—63.
22. *Smith A. U.* Biological effects of freezing and supercooling. — London, 1961.
23. *Смит О.* Биологическое действие замораживания и переохлаждения. — М.: Изд-во иностр. лит., 1963. — 503 с.

Институт цитологии АН СССР

Поступила в редколлегию
06.07.77

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043

О. П. Маркова, Э. И. Обозная, А. С. Капрельянц, В. И. Строна

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ЦИТОЛОГИЧЕСКОЕ, ЦИТОХИМИЧЕСКОЕ И ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА, ЗАМОРОЖЕННЫХ ПОД ЗАЩИТОЙ ПЭО-400

Цель настоящего исследования — сравнительное изучение цитологических, цитохимических и электронно-микроскопических показателей ядерных клеток костного мозга, замороженных под защитой ПЭО-400. Объектом исследования служил костный мозг крыс, полученный после декапитации животных из бедренных костей на консервирующем растворе ЦОЛИПК-3.

Цитологические (учет общего количества ядерных клеток в 1 мкл, процент живых клеток по эозиновой пробе, изучение миелограмм в мазках, окрашенных по Паппенгейму), цитохимические (определение содержания фосфолипидов с помощью судана черного В и активности цитохромоксидазы (ЦХО); и электронно-микроскопические исследования (методы ультратонких срезов и растровой микроскопии) проводили в сравнительном аспекте в одних и тех же образцах в исходном костном мозге, после экспозиции с ПЭО-400 в 15%-ной конечной концентрации, после замораживания по двухэтапной программе до температуры —196°С под защитой ПЭО-400 и последующего размораживания в водяной бане при 42°С сразу и через 30 мин. В качестве дополнительного цитологического экспресс-теста для характеристики состояния клеточной мембраны изучали ее структурную целостность в нефиксированных препаратах (ув. 1500), учитывая процент клеток с «отслоением» мембран.

Для электронно-микроскопических исследований клетки костного мозга фиксировали в 2%-ном глютаральдегиде и 1%-ном OSO_4, обезвоживали в возрастающих концентрациях ацетона и заливали в эпоксидную смолу «Эпон». Ультратонкие срезы изучали в электронном микроскопе ЭМВ-100 А при ускоряющем напряжении 75 кВ. Срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом Na. Для растровой электронной микроскопии взвесь ядерных клеток фиксировали в 2%-ном глютаральдегиде, обезвоживали в ацетоне, а затем высушивали. Напыление образцов производили углеродом и платиной.

Цитологические исследования показали, что в костном мозге, подготовленном для исследований (исходный костный мозг), содержалось 26,0±1,47 тыс. миелокариоцитов в 1 мкл с высоким процентом живых клеток (92,0±2,31) и незначительным количеством форменных элементов с «отслоением» клеточной мембраны (1,5±0,84). Анализ миелограмм свидетельствовал о полноценном клеточном составе.

Цитохимическое определение фосфолипидов показало, что фосфолипиды в виде гранул черного цвета располагаются в цитоплазме клеток. В бластных клетках содержится незначительное количество фосфолипидов, более высокий уровень последних определяется в незрелых и особенно в зрелых гранулоцитах. Исследования активности ЦХО свидетельствуют, что в бластных клетках выявляется умеренная активность, по мере созревания клеток активность ЦХО увеличивается. Как правило, гранулы диформазана, маркирующие места ферментативной активности, располагаются вокруг ядра, внутренней поверхности плазматической мембраны, а также в цитоплазме клеток. Количественную оценку содержания фосфолипидов и активности ЦХО определяли по данным среднего гистохимического коэффициента (СГК).

Матеріал, захищений авторським правом

Электронно-микроскопически выявлена обычная для клеток костного мозга ультраструктура. Большинство миелокариоцитов имели нормальные размеры и форму (рис. 1).

Таким образом, исходный костный мозг на этапе подготовки к низкотемпературной консервации содержал достаточное количество структурно и функционально полноценных ядерных клеток.

После экспозиции миелокариоцитов с ПЭО-400 по сравнению с исходными данными количество и процент живых клеток значимо не изменились ($p>0,05$), возросло число клеток, имеющих «отслоение» клеточной мембраны ($p<0,05$). В миелограммах уменьшилось количество зрелых гранулоцитов и увеличился процент агранулоцитов ($p<0,05$). Процентное соотношение остальных клеточных элементов незначительно отличалось от исходного. Цитологические изменения миелокариоцитов выражались в сморщивании клеток и вакуолизации цитоплазмы некоторых гранулоцитов и агранулоцитов.

При цитохимическом определении содержания фосфолипидов и активности ЦХО обнаружена различная реакция: если в незрелых и зрелых гранулоцитах содержание фосфолипидов значимо снизилось ($p<0,05$), то активность ЦХО существенно не изменилась ($p>0,05$).

Электронно-микроскопически обнаружено, что основная часть миелокариоцитов имеет почти неповрежденную ультраструктуру (рис. 2). В некоторых клетках отмечается образование микроворсинок плазматической мембраны. В то же время встречаются клетки, в основном агранулоциты, с повреждением ультраструктуры, выраженным изменением формы ядра, очаговым увеличением перинуклеарного пространства, набуханием митохондрий и их лизисом (рис. 3).

При цитологическом исследовании костного мозга сразу после размораживания установлено, что количество клеток незначительно снизилось, в то время как процент живых клеток уменьшился достоверно. Значительно увеличилось количество клеток с «отслоением» мембраны по сравнению как с исходными данными, так и с результатами после экспозиции с ПЭО-400. В миелограммах также, как и после экспозиции с ПЭО-400, наблюдались уменьшение числа незрелых форм и увеличение количества агранулоцитов по сравнению с исходными данными. К цитологическим особенностям миелокариоцитов на этом этапе следует отнести сморщивание клеток (менее выраженное, чем после экспозиции с ПЭО-400) и вакуализацию цитоплазмы части гранулоцитов.

Цитохимическое изучение содержания фосфолипидов свидетельствует о том, что большая часть миелокариоцитов содержит фосфолипиды с неизмененной локализацией. В единичных клетках обнаружено перераспределение продукта реакции (образование конгломератов). При исследовании активности ЦХО не выявлено грубых изменений в локализации фермента, местами встречались клетки с перераспределением продукта реакции.

Количественное содержание фосфолипидов и активность ЦХО достоверно снизились не только по сравнению с исходными данными, но и с данными, полученными после экспозиции миелокариоцитов с ПЭО-400.

Электронно-микроскопические исследования определяли преимущественно неповрежденную ультраструктуру миелокариоцитов сразу после размораживания (рис. 4). Структурные элементы ядра и цитоплазмы как незрелых, так и зрелых форм в основном без существенных изменений. Все же в некоторой части клеток обнаруживаются нарушения ультраструктуры в виде локального просветления цитоплазмы и появления микроворсинок плазматической мембраны. Некоторые миелокариоциты имели грубые разрывы клеточной мембраны.

Матеріал, захищений авторським правом

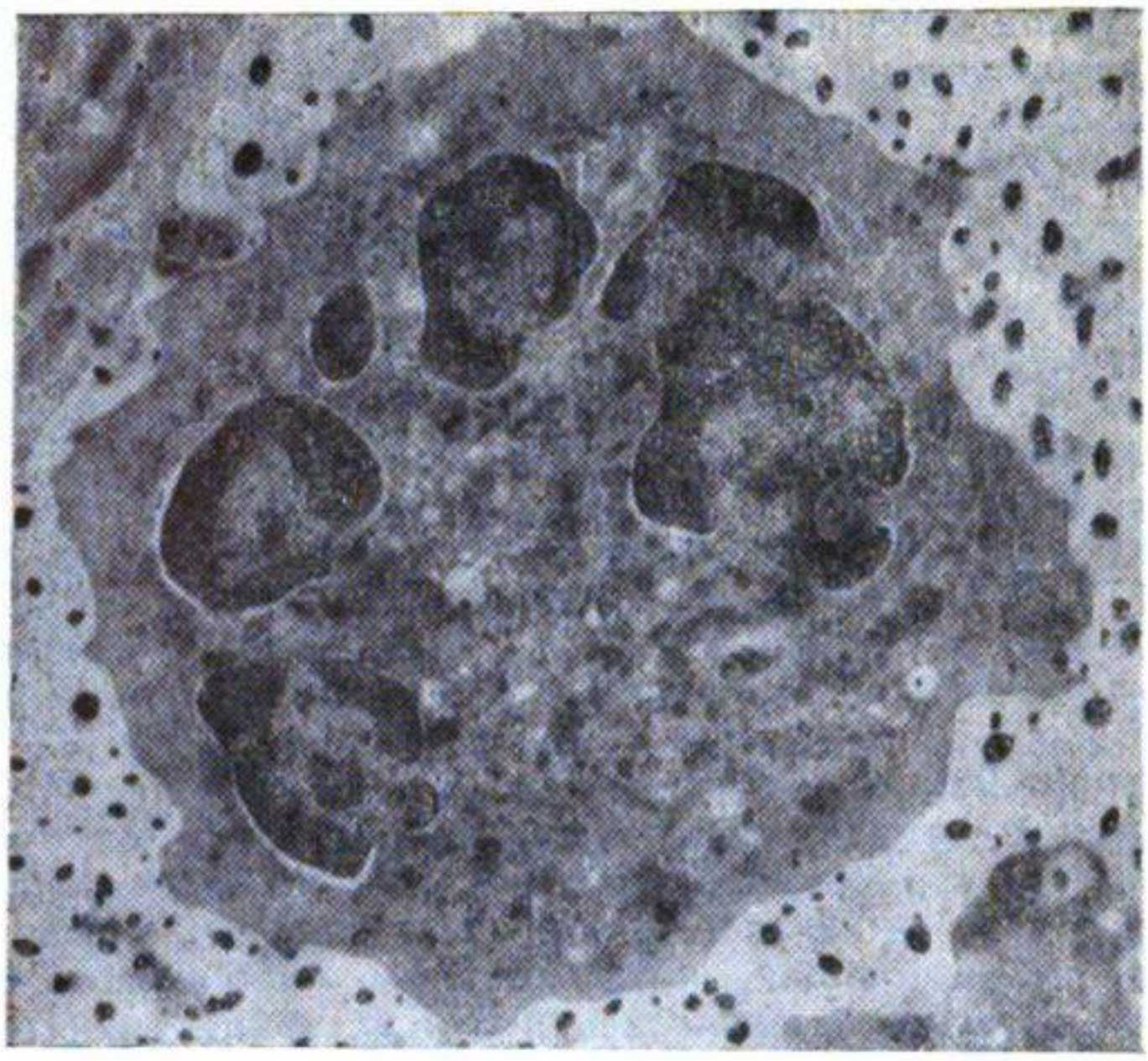


Рис. 1. Миелокариоцит в исходном костном мозге (нормальная ультраструктура), ×10 000.

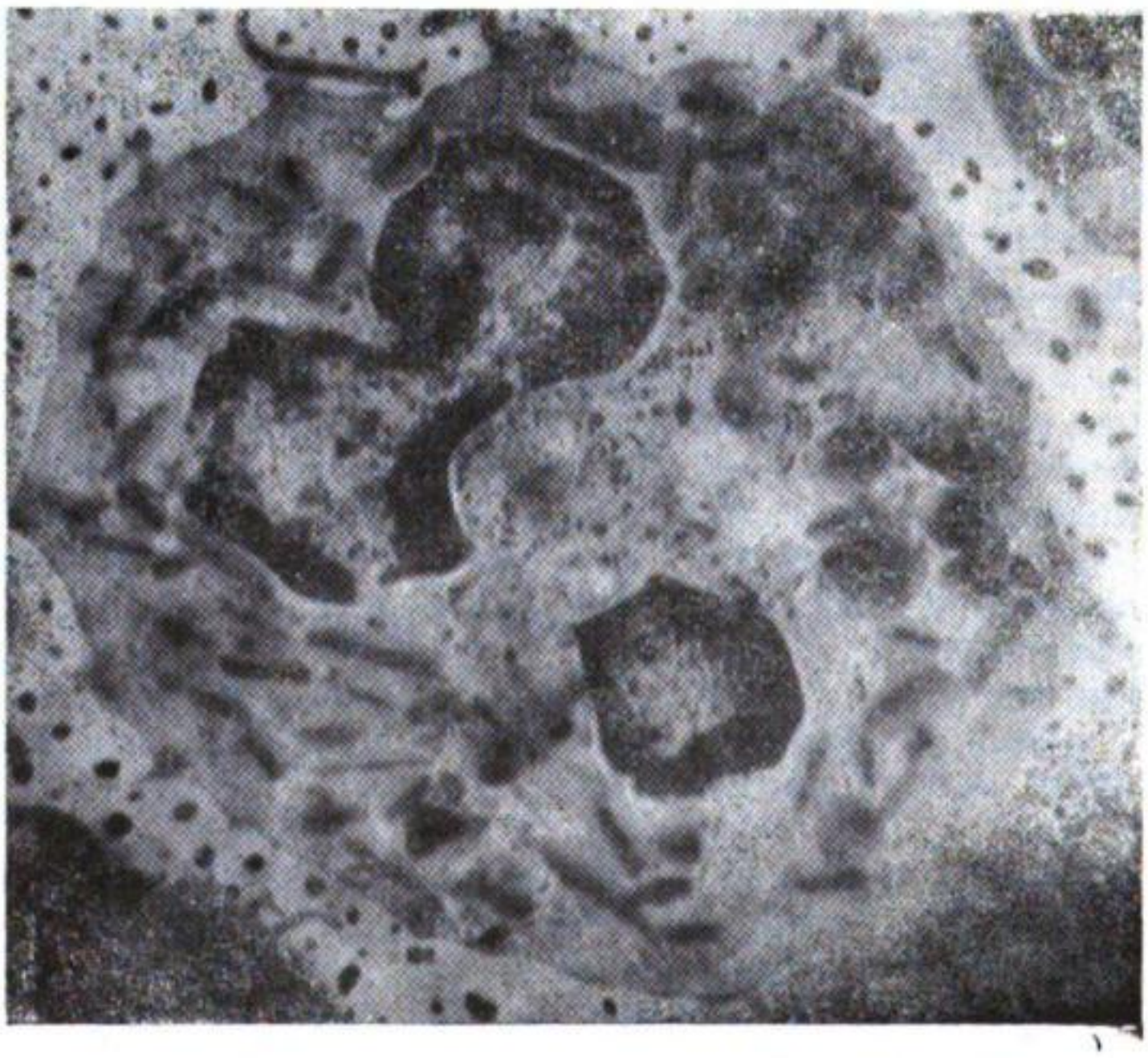


Рис. 2. Миелокариоцит после экспозиции с 15%-ным ПЭО-400 (нормальная ультраструктура), ×10 000.

Матеріал, захищений авторським правом

Рис. 3. Агранулоцит костного мозга после экспозиции с 15%-ным ПЭО-400 (изменение формы ядра, очаговое увеличение перинуклеарного пространства и размеров митохондрий с лизисом крист), ×10 000.

Рис. 4. Гранулоцит сразу после размораживания (ультраструктура без существенных повреждений), ×10 000.

Матеріал, захищений авторським правом

Рис. 5. Растровая электронная микроскопия клеток костного мозга сразу после размораживания (клетки обычной формы и размеров), ×3 000.

Исследования, проведенные с использованием растровой микроскопии, показали, что среди основной массы миелокариоцитов, имеющих округлую форму и обычные размеры (рис. 5), встречаются клетки с резко измененными контурами и разрывами клеточной мембраны.

Через 30 мин после размораживания цитологическая картина клеток костного мозга мало отличается от описанной сразу после размораживания. Существенные различия по сравнению с исходными данными и результатами после экспозиции с ПЭО-400 выражались в снижении количества живых клеток и увеличении числа миелокариоцитов с «отслоением» клеточной мембраны. В миелограммах наблюдалось уменьшение процента зрелых гранулоцитов и увеличение содержания агранулоцитов лишь по сравнению с исходными. Цитологические особенности проявлялись в некотором сморщивании клеток и вакуолизации цитоплазмы гранулоцитов.

Цитохимически обнаружено, что содержание фосфолипидов и активность ЦХО в незрелых и зрелых гранулоцитах достоверно снижены по сравнению с исходными данными. Однако содержание фосфолипи-

Матеріал, захищений авторським правом

дов в отличие от активности ЦХО в незрелых гранулоцитах значительно выше по сравнению с их содержанием в клетках этой же группы, исследованных сразу после размораживания; активность ЦХО существенно не изменилась.

Электронно-микроскопически выявлено значительное количество клеток с лизисом клеточной мембраны и органоидов цитоплазмы. Следует особо отметить, что при этом остаются без существенных повреждений специальные гранулы миелокариоцитов (рис. 6).

Рис. 6. Сохранение специальной грануляции миелокариоцита через 30 мин после размораживания, ×100 000.

Примененное комплексное исследование одних и тех же образцов костного мозга крыс с использованием цитологических, цитохимических и электронно-микроскопических методов позволило выявить определенные изменения миелокариоцитов на этапах низкотемпературного консервирования. Наиболее важными являются результаты, касающиеся состояния мембран клеток и их специфических гранул.

Так, с помощью морфологического экспресс-метода, позволяющего выявить структурную целостность наружной клеточной мембраны, на этапе экспозиции миелокариоцитов с ПЭО-400 удалось констатировать появление большего числа клеток с «отслоением» наружной мембраны. В дальнейшем, на этапе размораживания, при исследовании сразу и через 30 мин количество их значительно увеличилось. При этом результаты эозиновой пробы свидетельствуют о нарушении ее проницаемости: увеличивается число клеток, через мембрану которых проникает эозин (процент живых клеток значительно снижается).

Цитохимически выявлено снижение содержания фосфолипидов и ЦХО в миелокариоцитах как после экспозиции костного мозга с ПЭО-400, так и после замораживания-размораживания под защитой ПЭО-400.

Поскольку содержание фосфолипидов отражает состояние клеточных мембран, а активность ЦХО — мембран митохондрий, полученные данные позволяют характеризовать функциональные изменения этих структур на этапах низкотемпературного консервирования.

Электронно-микроскопические исследования подтверждают нарушение структурной целостности наружной клеточной мембраны, начиная с незначительных изменений после экспозиции с ПЭО-400 и более значительных, включая разрывы и лизис клеточных мембран и мембран органоидов цитоплазмы.

Обнаруженный факт, касающийся сохранности специальных гранул миелокариоцитов, по-видимому, может поставить под сомнение гипотезу о ведущей роли лизосом в гибели клетки при низкотемпературной консервации.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
04.05.77

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043

Ю. М. Рудько, А. М. Бражников, Б. П. Камовников, А. С. Черепнев

МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА АППАРАТУРЫ ДЛЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ БИООБЪЕКТОВ

Для совершенствования отечественных моделей установок криоконсервирования биообъектов необходима их объективная оценка в рамках Государственных стандартов на качество продуктов [1—3].

Прежде всего необходимо дать определение термину «установка для криоконсервирования биообъектов» [1]. Авторами предлагается следующая редакция этого термина: установка для криоконсервирования биообъектов — совокупность установок, объединенных в функционирующий управляемый комплекс, предназначенный для обработки холодом, хранения и размораживания (деконсервации) биообъектов с целью максимального сохранения нативных (исходных) свойств объекта.

Вполне очевидно, что для контроля за качеством установок для консервирования биообъектов требуются оценки не только уже действующих моделей, но также вновь создаваемых образцов на различных этапах их разработки и внедрения (исследование процесса, конструирование установок, их изготовление и эксплуатация). Разработку методов оценки уровня качества действующих и вновь создаваемых моделей криобиологических установок следует рассматривать как единую проблему. Таким образом, возникает задача построения системы оценок качества установок для криоконсервирования биообъектов как на разных стадиях ее создания, так и при эксплуатации. Для решения этой задачи предлагается трехступенчатая система (см. схему) взаимоподчиненных оценок качества, при этом показатель качества нижнего уровня входит в состав общего показателя, определяющего уровень такового более высокого ранга.

Схема уровней оценок криобиологических установок.

Нижний (процессовый) уровень качества предназначен для оценки исходных данных, выдаваемых на проектирование технологической установки; показатели этого уровня не содержат конструктивных параметров установки и по сути являются критериями оценки результатов

Матеріал, захищений авторським правом

предпроектных научных исследований процессов, которые будут протекать в установке.

Средний (технический) уровень качества предназначен для оценок технического совершенства установок как на стадии создания ее рабочей документации, так и при производственной эксплуатации; он имеет две градации: проектно-технический подуровень, в показатели которого входят наряду с параметрами нижнего уровня и конструктивные характеристики установки; эксплуатационно-технический подуровень, в показатели которого входят реальные эксплуатационные характеристики вместе с параметрами нижнего уровня.

Верхний (технико-экономический) уровень качества технологической установки предназначен для ее оценок при заводской, отраслевой и государственной аттестациях; показатели этого уровня также являются комплексными и включают кроме параметров нижнего и среднего уровней еще ряд независимых величин, в том числе и экономических.

Комплексным показателем оценки качества установок для криоконсервирования на процессовом (нижнем) уровне является обратимость процесса криоконсервирования:

$$R^{н} = \sum_{i=1}^{n} m_i f\left(\frac{q_i}{q_i^{н}}\right) \frac{1}{p} \left[\frac{\text{отн. ед.}}{\text{ед. изм. } p}\right], \qquad (1)$$

где $R_н$ — показатель обратимости; m_i — весомость i-го свойства биообъекта; q_i — свойство восстановленного биообъекта; $q_i^{н}$ — свойство нативного объекта; p — нормирующий параметр нижнего (процессового) уровня.

Вид функции (1) мы даем на основании методов квалиметрии, поскольку к настоящему времени это — единственный метод, позволяющий дать интегральную количественную оценку качественным изменениям биообъектов разной природы [4]. Разумеется, другие формы задания функции $R^{н}$ не исключаются.

Вид функции $f\frac{q_i}{q_i^{н}}$ определяется конкретным содержанием свойств, общие соображения по выбору ее вида изложены в работе [5].

Обратимость процесса должна нормироваться по наиболее важному для данной установки параметру. Такими параметрами могут быть: рабочий объем V_a или рабочая площадь S_a активной зоны, мощность высокопотенциальной электрической энергии, необходимой для отвода тепла и т. д. Выбор конкретной величины нормирующего параметра определяется из соображений среднего (технического) уровня.

Показатель $R^{н}$ — комплексный процессовый параметр, зависящий от свойств объекта обработки, характеристик внешнего воздействия и выбранного режима.

В общем случае $R = f(U^{з}_{ср}; \alpha^{з}_{ср}; U_{хр}; t_{хр}; U_{ср}; \alpha^{в}_{ср}; L)$, где $U^{з}_{ср}$, $U^{в}_{ср}$ — характер изменения температуры среды соответственно при замораживании и восстановлении; $\alpha^{з}_{ср}$, $\alpha^{в}_{ср}$ — характер изменения коэффициентов теплоотдачи при замораживании и восстановлении; $U_{хр}$ — температура хранения; $t_{хр}$ — продолжительность хранения; L — характерный размер биообъекта.

Основная цель исследований, предшествующих проектно-конструкторским работам, заключается в нахождении оптимальных условий протекания процесса. Предлагаемый критерий процессового совершенства — средство количественной оценки оптимальности принимаемых решений на стадии научных исследований. Очевидно, что реализация

Матеріал, захищений авторським правом

оптимума по локальному критерию (1) имеет место при экстремальном значении показателя $R^{п}$.

Для оценки технического совершенства установки на стадии его проектирования в качестве критерия предлагается использовать годовое напряжение по нормирующему параметру, т. е. годовую производительность, нормированную по параметру ξ:

$$G_{\xi}^{п} = \frac{TK_{с}^{п}R^{п}}{\xi}\left[\frac{\text{отн. ед.}}{\text{год. ед. }\xi}\right], \qquad (2)$$

где T — годовой фонд рабочего времени [ед. вр./год]. Параметр $G_{\xi}^{п}$ учитывает конструктивные и эксплуатационные особенности установки (цикличность работы, потери рабочего времени на профилактику, ремонт и т. д.). Эти особенности учитываются коэффициентом среднего (технического) уровня качества установки:

$$K_{с}^{э} = K_{т}\,K_{ц}P \quad [\text{ед. } P].$$

Верхний индекс п определяет принадлежность показателя к проектно-техническому подуровню. Следует отметить, что нередко $R^{п} < R^{н}$, поскольку на стадии научных исследований обратимость процесса определяется либо в лабораторных условиях, либо расчетным путем, в то время как $R^{п}$ характеризует интенсивность процесса для реальных производственных условий. Все показатели с верхним индексом п определяются расчетным путем на стадии проектирования и могут отличаться от аналогичных показателей с верхним индексом *э*, определяемых в реальных условиях производственной эксплуатации установки: $K_{т}^{п} = \frac{T_{н}^{п}}{T_{п}^{п}+T_{н}^{п}}$ — проектный показатель эксплуатационной надежности установки; $T_{н}^{п}$, $T_{п}^{п}$ $\left[\frac{\text{ед. вр.}}{\text{год}}\right]$ — соответственно среднегодовая длительность периода непрерывной работы установки и среднегодовое время ее простоя для профилактики и ремонта; $K_{ц}^{п} = \frac{t_{к}^{п}}{t_{ц}^{п}}$, где $t_{к}^{п} = t_{ц}^{п} + t_{р}^{п}$ — проектный показатель цикличности работы установки; $t_{к}^{п}$ и $t_{р}^{п}$ — показатели длительности консервирования и регенерации установки в пределах одного цикла ее работы; ξ — нормирующий параметр установки: по аналогии с параметром P выбирается с учетом оценок на более высоком уровне. Показатель ξ должен входить в критерий экономической оценки (приведенные совокупные затраты) и определять в нем влияние конструктивных характеристик установки на остальные статьи затрат. Выбор $G_{\xi}^{п}$ в качестве показателя технического совершенства определяется следующими соображениями: $G_{\xi}^{п}$ характеризует техническое совершенство установки по основному показателю целевого назначения и позволяет сопоставить установки одинакового целевого назначения, но с различной производительностью, что особенно важно при оценках современного технического уровня и выборе оптимального прототипа проектируемых образцов (по критерию $G_{\xi}^{п} \longrightarrow \max$).

В качестве нормирующего показателя ξ можно использовать рабочий объем V_{a} активной зоны установки, т. е. объем, в котором расположены контейнеры с биообъектами.

Матеріал, захищений авторським правом

Следует отметить, что при проектировании установки по критерию $G_{\xi}^{п} \longrightarrow \max$ не исключаются экономические оценки по приведенным совокупным затратам

$$З^{п} = \frac{C^{п} + EK^{п}}{G^{п}} = \frac{C_{\xi}^{п} + EK_{\xi}^{п}}{G_{\xi}^{п}}, \qquad (2а)$$

где $З^{п}$ — проектные совокупные затраты на обработку 1 кг материала (руб·кг); E — нормативный коэффициент эффективности $\left(\frac{1}{\text{год.}}\right)$; $C^{п}$ — проектные текущие затраты на обработку 1 кг материала [руб./год. кг]; $C_{\xi}^{п}$ — проектные текущие затраты нормированные [руб. ед./год. кг] $K^{п}$ — проектные капитальные (единовременные) затраты на создание технологической установки [руб.]; K_{ξ} — проектные капитальные затраты, нормированные по показателю ξ. Согласно (2) конструктор установки для реализации оптимального варианта $G_{\xi}^{п} \longrightarrow \max$ варьирует параметрами $K_{с}^{п}$, $R^{п}$, ξ. В стадии эксплуатации установки вариации параметра ξ невозможны (за исключением случая ее модернизации). Поэтому для оценки качества установки на эксплуатационно-техническом уровне предлагается использовать ее годовую производительность

$$G^{э} = TK_{с}^{э}R_{к}^{э}\left[\frac{\text{отн. ед.}}{\text{год.}}\right], \qquad (3)$$

где $K_{с}^{э}$ и $R_{к}^{э}$ — аналоги величин, входящих в (2), но полученных по результатам эксплуатации установки. Следует отметить, что отношение $K_{пэ} = \frac{K_{с}^{п}R_{к}^{п}}{K_{с}^{э}R_{к}^{э}}$ характеризует степень достоверности и совершенства существующих инженерных методов расчета установок, в то же время показатель $K_{нэ} = \frac{R_{к}^{п}}{R_{к}^{э}}$ характеризует достоверность и эффективность предпроектных научных исследований процесса обработки объектов холодом. На стадии эксплуатации установки по аналогии с (2а) производятся экономические оценки:

$$З^{э} = \frac{C^{э} + EK^{э}}{G^{э}} = \frac{C_{\xi}^{э} + EK_{\xi}^{э}}{G_{\xi}^{э}} \qquad (3а)$$

где $K^{э}$ — реальные единовременные затраты на изготовление установок [руб.]. Сопоставляя выражения (1), (2) и (3), убеждаемся, что в каждый из показателей среднего (технического) уровня входит показатель R нижнего (процессового) уровня.

На стадии заводских, отраслевых и государственных испытаний требуется оценка качества установок на высшем (технико-экономическом) уровне. Руководствуясь методологией квалиметрии, введем комплексный технико-экономический показатель

$$V = \sum_{i=1}^{n} \beta_i f\left(\frac{z_i}{z_i^{б}}\right), \qquad (4)$$

Матеріал, захищений авторським правом

где z_i, $z_i^{\text{б}}$ — соответственно единичный показатель качества установки и его базовое значение. Вид функции $f\left(\frac{z_i}{z_i^{\text{б}}}\right)$ следует выбирать из тех же соображений, что и вид функции $f\left(\frac{q_i}{q_i^{\text{н}}}\right)$ в выражении (1); β_i — коэффициент весомости единичного показателя качества работы установок; n — количество единичных показателей, входящих в комплексный показатель.

Число показателей качества установки и значение весовых коэффициентов, безусловно, зависят от ее конкретного назначения. Авторы полагают, что в общем случае можно ограничиться следующими пятью показателями: z_1 — совокупность приведенных затрат на осуществление процесса $\left[\frac{\text{руб.}}{\text{отн. ед.}}\right]$. Заводская аттестация аппаратуры производится на заводе-изготовителе; в этом случае в соответствии с (2а) $z_1 = З^{\text{п}}$. При отраслевой и государственной аттестациях установки, например при принятии решения о ее серийном производстве после промышленных испытаний головного образца, в соответствии с (3а) показатель z_1 определяется из условий эксплуатации $z_1 = З^{\text{э}}$. Легко видеть, что в обоих случаях показатель высшего уровня качества z_1 содержит параметры среднего G и нижнего R уровней; z_2 — эргономический показатель качества установок; z_3 — эстетический показатель качества установок; z_4 — патентно-правовой показатель качества установок; z_5 — показатель стандартизации и унификации установок.

Значения базовых показателей качества работы технологических установок принимаются в соответствии с данными, характеризующими работу лучших установок рассматриваемого типа. Значения весовых коэффициентов определяются методом экспертных оценок для конкретного типа технологических установок [4, 5]. В общем случае можно отметить, что наиболее весомым следует считать показатель z_1, т. е. $\beta_1 > (\beta_2+\beta_3+\beta_4+\beta_5)$. Между коэффициентами, характеризующими остальные показатели, полагаем целесообразным установить следующие соотношения: $\beta_2 : \beta_3 : \beta_4 : \beta_5 \approx 5 : 1 : 3 : 1$. Приведенное соотношение отражает только мнение авторов и в каждом конкретном случае может быть изменено. Вычисление показателей z_1, z_2, z_3, z_4 и z_5 производится по методикам, изложенным в литературе [6]. Основной удельный вес в комплексном показателе V имеет z_1.

Предложенный количественный метод оценки качества технологических установок по комплексным показателям R, G и V предназначен в первую очередь для составления карт технического уровня, а при соответствующей детализации — для управления качеством технологических установок при их серийном выпуске.

Введение комплексных показателей качества позволит на единой методологической основе соотнести понятийный аппарат различных медико-биологических, инженерно-технических и химико-технологических дисциплин, используемых при исследовании и разработке установок для криоконсервирования биообъектов различного назначения. Комплексные показатели R, G и V позволяют произвести сравнительное технико-экономическое сопоставление данной установки со значениями аналогичных величин, определяющих современный достигнутый уровень установок соответствующего назначения. Другими словами, сопоставляя значения показателей R, G и V, характеризующих данную установку со средними R^*, G^* и V^* («мировые стандарты»), отражающими современный уровень развития науки, техники и культуры производства, можно оценить достоинства и недостатки данной установки.

Матеріал, захищений авторським правом

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *ГОСТ 16431—70.* Качество продукции: Показатели качества и методы оценки уровня качества продукции. Термины и определения. — Введ. 01.01.72.
2. *ГОСТ 15467—70.* Качество продукции: Эргономические показатели. Номенклатура. — Введ. 01.01.71.
3. *ГОСТ 2116—71.* Мука кормовая рыбная и из морских млекопитающих и ракообразных. — Введ. 01.01.73.
4. *Бражников А. М., Карпычев В. А., Пелеев А. И.* Аналитические методы исследования процессов термической обработки мясопродуктов. — М.: Пищ. пром-сть, 1974. — 283 с.
5. *Азгальдов Г. Г.* О применении экспертного метода для измерения качества. — Стандарты и качество, 1969, № 1, с. 96.
6. *Сборник* нормативно-технических документов по оценке качества продукции. — М.: Изд-во стандартов, 1977. — 92 с.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Московский технологический институт
мясо-молочной промышленности

Поступила в редколлегию
03.04.77

УДК 57.043

Г. Б. Сергеев, В. А. Батюк, Б. М. Сергеев

КИНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ БИОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ ПРИ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Развитие исследований в области химии и биохимии низких температур связано с решением целого ряда практических и теоретических проблем химии, биохимии, биологии и медицины. До сих пор понижение температуры считается единственным и наиболее эффективным методом консервации пищевых продуктов, биохимических и медицинских препаратов, в том числе крови, костного мозга и трансплантируемых органов. Понижение температуры и создание криопротекторов — отправной пункт учения об анабиозе.

Замедление химических и биохимических процессов понижением температуры позволяет во многих случаях детально изучить их механизм, идентифицировать и исследовать свойства промежуточных короткоживущих продуктов, например фермент-субстрактных комплексов [1]. Традиционные представления о влиянии низких температур на биохимические реакции основаны на законе Аррениуса, т. е. на экспоненциальном замедлении процессов с понижением температуры. Однако, как показали многочисленные исследования, низкие температуры могут в ряде случаев стимулировать различные химические и биохимические реакции, изменять их механизм [2]. Подобные факты заставляют искать новые подходы к описанию механизма действия температуры на сложные биохимические системы.

Исследования, выполненные в последние годы в МГУ, показывают, что многие кинетические закономерности химических и биохимических процессов, происходящих в замороженных многокомпонентных системах, могут быть поняты, если в качестве структурных дефектов, ответственных за химические превращения, рассматривать жидкую фазу. Методами электронно-парамагнитного резонанса (ЭПР) и ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) показано, что замороженные многокомпонентные системы ниже точки замерзания содержат фазовые неоднородности и различающиеся по молекулярной подвижности состояния растворенных веществ [3]. Найдено, что фазовые неоднородности — области незамерзшего растворителя с повышенными концентрациями

Матеріал, захищений авторським правом

растворенных веществ. Вымерзание воды в лед приводит к концентрированию в незамерзших областях низко- и высокомолекулярных компонентов раствора. К настоящему времени число процессов, изученных в замороженных растворах, насчитывает более двух десятков, к ним относятся реакции гидроксиламинолиза, присоединения, окисления, нуклеофильного замещения и др. [2].

Приведем некоторые результаты осуществленного в МГУ исследования катализирующего пероксидазой окисления фосфорных эфиров гидрохинонов — хинолфосфатов — перекисью водорода в замороженных водных растворах [4—6].

Температурная зависимость скорости реакции в замороженных растворах (рис. 1) имеет колоколообразный характер. Так, при —17°С

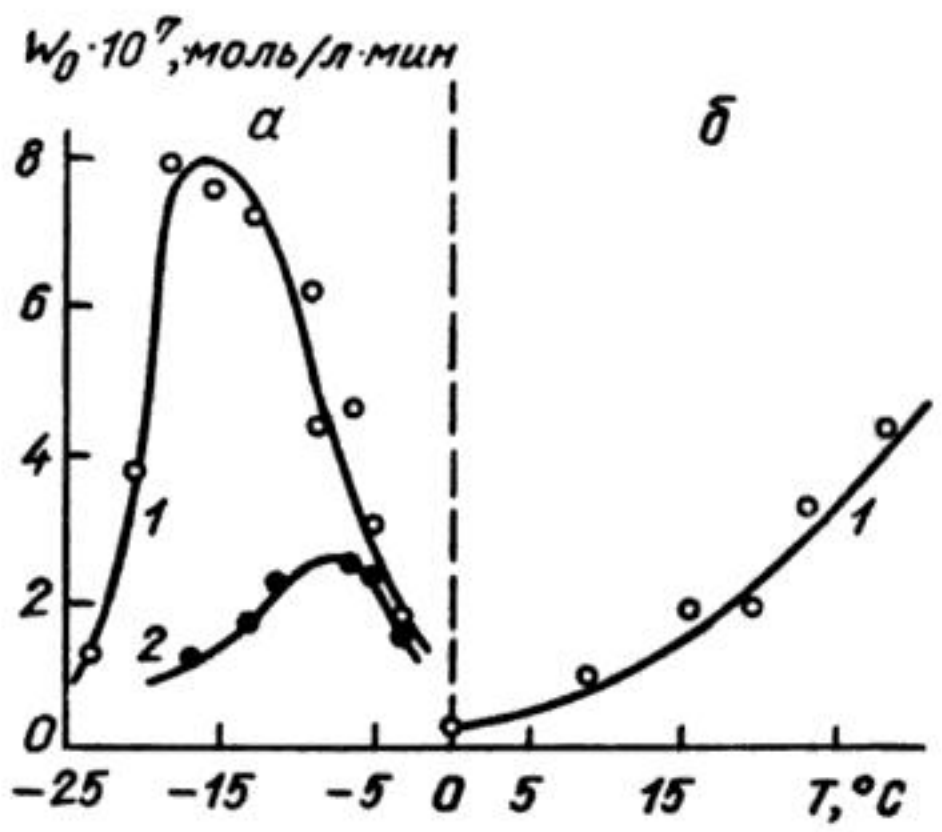


Рис. 1. Температурная зависимость скорости пероксидазного окисления 2,3-диметил-1,4-нафтохинол-1-фосфата (ДНХФ) перекисью водорода в замороженных (*а*) и жидких (*б*) растворах в присутствии (*1*) и в отсутствие хлористого натрия (*2*). $[HRP]=7{,}5\times10^{-9}$М; $[ДНХФ]=2{,}5\times10^{-5}$М; $[H_2O_2]=3{,}5\times10^{-5}$М; [NaCl] = 0,1 М; pH = 7,0 (0,1М фосфатный буфер).

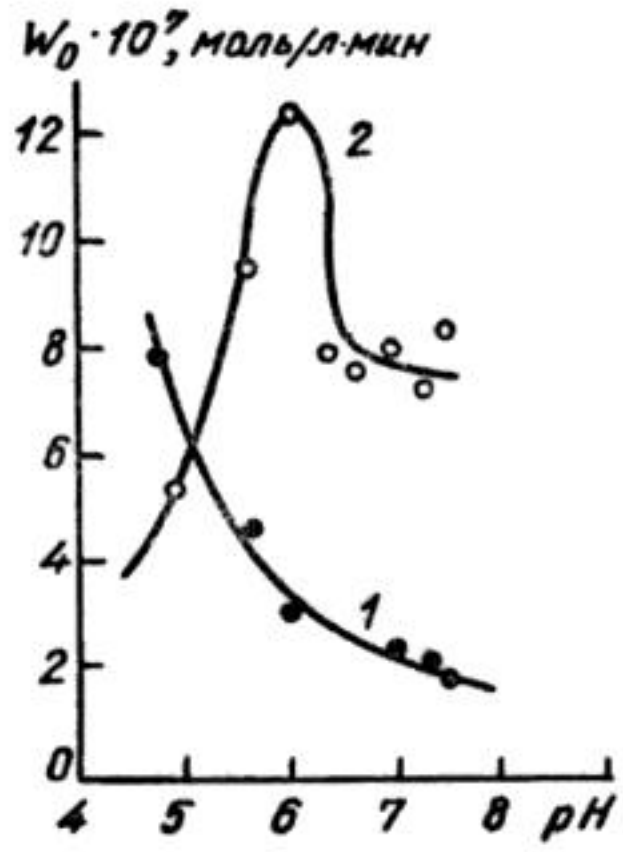


Рис. 2. Влияние величины pH среды на скорость пероксидазного окисления ДНХФ перекисью водорода в жидкой фазе (*1*) при 25°С и во льду при —17°С (*2*). $[HRP]=7{,}5\times10^{-9}$М; $[ДНХФ]=2{,}5\times10^{-5}$М; $[H_2O_2]=3{,}5\times10^{-5}$М; [NaCl] = 0,1М.

в присутствии NaCl реакция идет почти в 20 раз быстрее, чем в жидкой фазе при 0°С. Подобный вид температурной зависимости типичен для многих реакций в замороженных растворах и может быть объяснен конкуренцией двух факторов: замедлением реакции с понижением температуры и ее ускорением вследствие концентрирования субстратов и фермента в областях фазовой неоднородности.

Замораживание влияет на физико-химические свойства системы и вызывает изменение констант ионизации ионогенных групп субстрата и фермента. Относительные концентрации молекул и ионов изменяются, а это в свою очередь влияет на вид зависимости скорости реакции от pH среды (рис. 2). Видно, что во льду при —17°С появляется характерный максимум вблизи pH 6. Наличие максимума, по нашему мнению, связано с тем, что в этой области возрастают концентрации реакционноспособных форм субстрата и каталитически активной формы фермента. Изучение зависимости скорости реакции от концентрации субстрата показало, что в замороженных растворах уравнение Михаэлиса — Ментен перестает адекватно описывать кинетику пероксидазного окисления хинолфосфатов. Это объясняется тем, что реакция во льду происходит в существенно других физико-химических условиях и при других концентрациях реагентов. Показано, что во льду, как и в

Матеріал, захищений авторським правом

жидкой фазе, скорость реакции прямо пропорциональна концентрации фермента. Была изучена инактивация пероксидазы в замороженных растворах. Установлено, что метанол в концентрации 0,1М и 0,5М практически не влияет на скорость реакции в жидкой фазе при 25°, во льду же при —17°С те же концентрации спирта вызывали соответственно

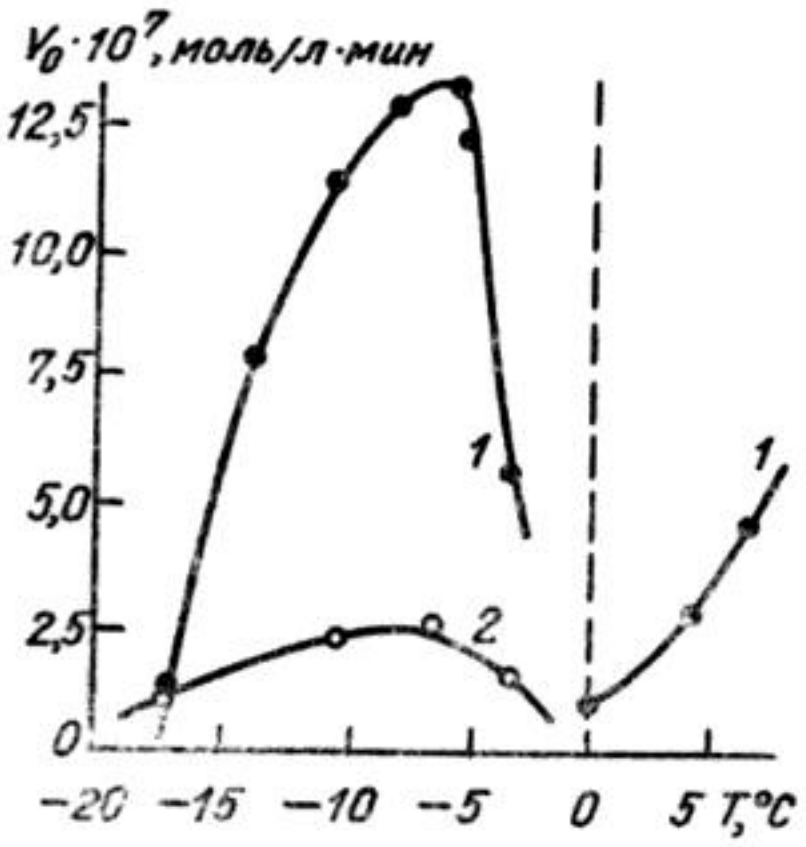


Рис. 3. Температурная зависимость скорости пероксидазного окисления ДНХФ перекисью водорода во льду в присутствии (*1*) и в отсутствие (*2*) активатора — 1,4-бензохинол-1-диметилфосфата (БХФ). $[HRP]=1,5\times10^{-9}$М; $[ДНХФ]=2,5\times10^{-5}$М; $[H_2O_2]=3,5\times10^{-5}$М; [активатор] $=1,4\times10^{-5}$М; pH=7,0 (0,1М фосфатный буфер).

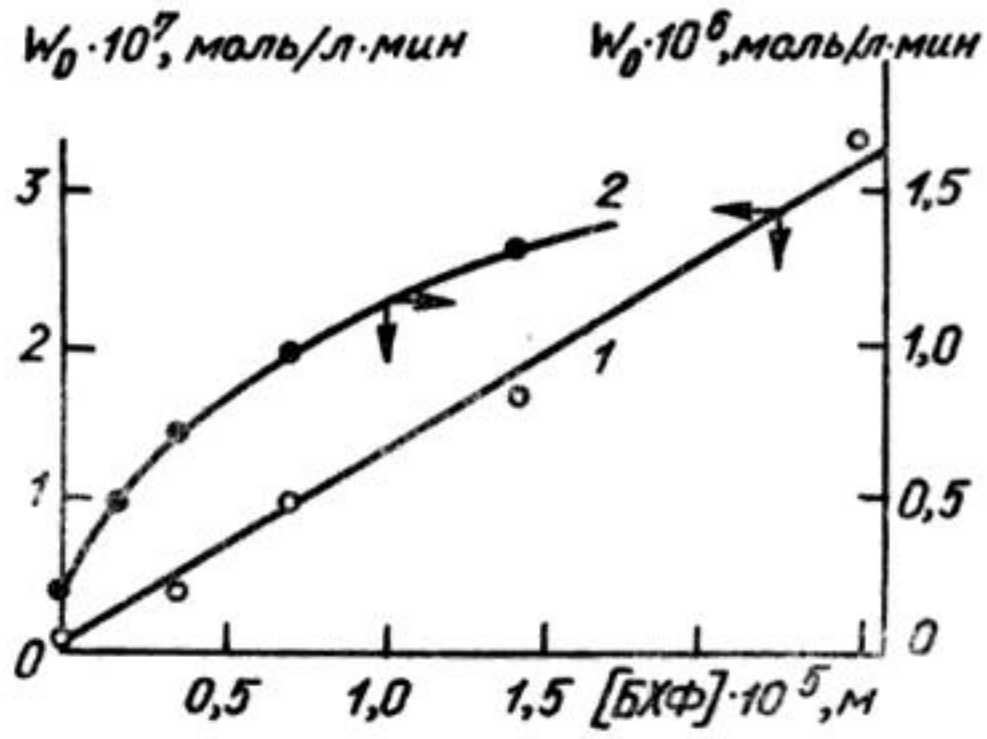


Рис. 4. Зависимость скорости пероксидазного окисления ДНХФ перекисью водорода от концентрации активатора БХФ в жидкой фазе при 20°С (*1*) и во льду при —5,5°С (*2*). $[HRP]=1,5\times10^{-9}$М; $[ДНХФ]=2,5\times10^{-5}$М; $[H_2O_2]=3,5\times10^{-5}$М; pH=7,0 (0,1 М фосфатный буфер).

3- и 9-кратное замедление реакции. Явление это связано с уменьшением диэлектрической проницаемости среды при концентрировании спирта.

В жидкой фазе для изученной реакции обнаружено явление субстрат-субстратной активации. Оно состоит в том, что при совместном окислении двух хинолфосфатов различной химической природы присутствие одного субстрата оказывает активирующее действие на окисление другого. При этом окисляется лишь один из субстратов, активатор же вплоть до значительных глубин превращения не расходуется. Как видно из рис. 3, присутствие активатора увеличивает скорость окисления во льду, подтверждая тем самым наши представления о структуре замороженных растворов и особом эффекте пространственного сближения молекул при замораживании для реакций с участием числа частиц.

Как уже отмечалось, при замораживании существенно изменяются концентрационные условия протекания реакции. Так, в жидкой фазе при 20°С скорость реакции прямо пропорциональна концентрации активатора (рис. 4, *1*), в то время как в замороженном растворе при температуре —5,5°С порядок реакции по активатору отличен от единицы (рис. 4, *2*).

Как и в случае индивидуального окисления 2,3-диметил-1,4-нафтохинол-1-фосфата, замораживание, изменяя кислотность среды, изменяет вид pH-зависимости скорости активационного окисления (рис. 5).

Изучение реакций в замороженных растворах позволило установить следующие их особенности: 1) процессы происходят при температурах ниже точки замерзания растворителя; 2) реакции идут быстрее, чем при тех же температурах в переохлажденных растворах; 3) графи-

Матеріал, захищений авторським правом

ки температурных зависимостей скоростей реакций имеют колоколообразную форму; 4) в системе наблюдается явление отрицательного температурного коэффициента, т. е. в некотором температурном интервале скорость реакции растет с понижением температуры.

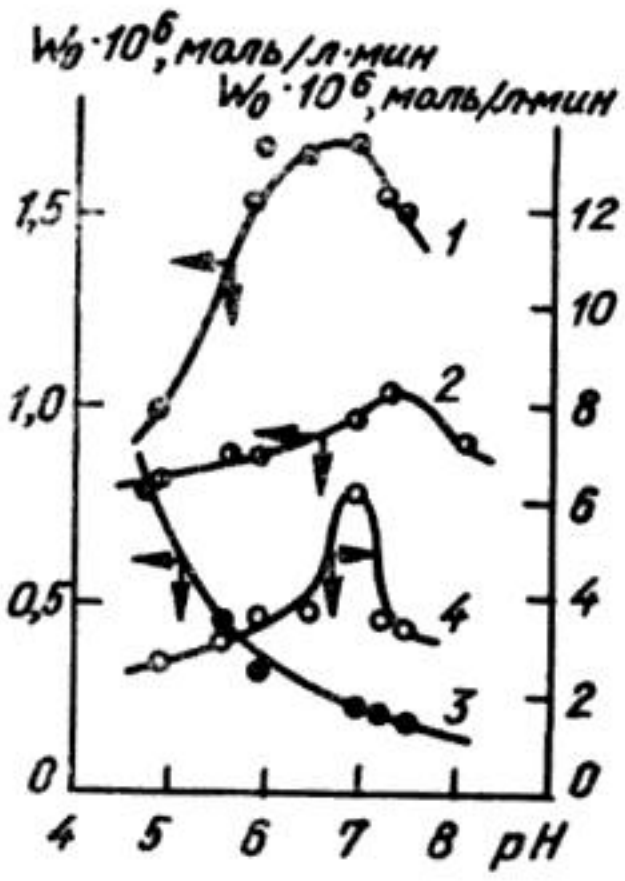


Рис. 5. Зависимость скорости пероксидазного окисления хинолфосфатов перекисью водорода от pH среды: *1* — окисление ДНХФ в присутствии активатора БХФ при — 25°С [HRP]=1,5×10⁻⁹М: [ДНХФ]-=2,5×10⁻⁵М. [H_2O_2]=3,5×10⁻⁵М; [БХФ]=1,4×10⁻⁵М); *2* — то же во льду при —5,3°С ([HBP]=-1,3×10⁻⁹М; [ДНХФ]=2,5×-×10⁻⁵М; [H_2O_2]=3,5×10⁻⁵М; [БХФ]=7,1×10⁻⁶М; *3* — индивидуальное окисление ДНХФ при — 25°С ([HRP]=7,5×10⁻⁹М; [ДНХФ]=2,5×10⁻⁵М. [H_2O_2]=-=3,5×10⁻⁵М); *4* — индивидуальное окисление активатора — БХФ при 25°С ([HRP]=1,5×-×10⁻⁹М; [H_2O_2]=3,5×10⁻⁵М [БХФ]=2,5×10⁻⁵М). Все опыты проводили в 0,1М фосфатном буфере.

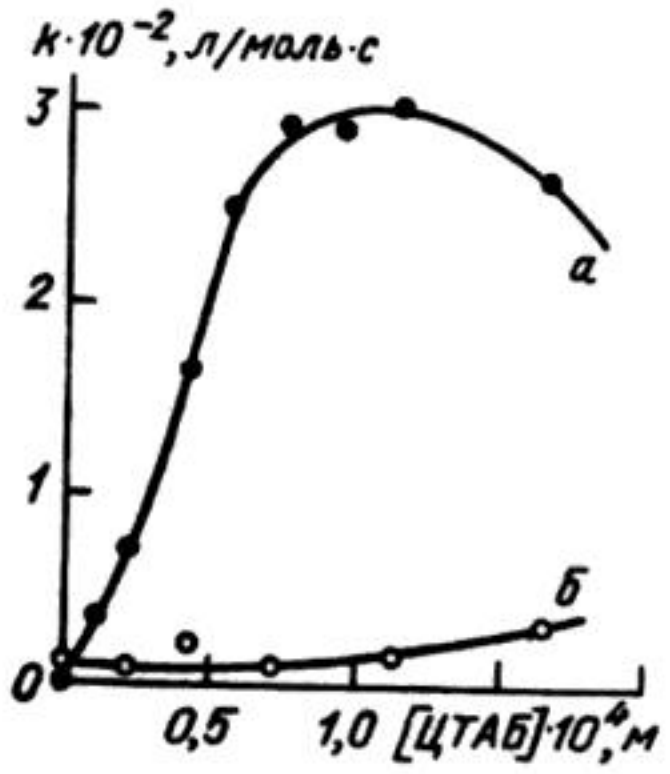


Рис. 6. Зависимость константы скорости реакции 2,4-динитрофторбензола с глицилфенилаланином от концентрации бромистого цетилтриметиламмония (ЦТАБ) в жидкой фазе при температуре —20°С (*а*) и в замороженных водных растворах при —10°С (*б*) [2,4-динитрофторбензол] =3,3×-×10⁻⁴М; [глицилфенилаланин]=3,3×10⁻⁴М; pH 7,25 (0,1М фосфатный буфер).

Предположение, что замораживание и концентрирование могут приводить к пространственному сближению частиц и сопровождаться в ряде случаев дополнительным структурообразованием, нашло подтверждение при изучении мицеллярного катализа во льду. Оказалось, что каталитическое действие мицеллообразователя — бромистого цетилтриметиламмония — в замороженных растворах при температуре —10°С начинает проявляться при концентрациях в 5—10 раз меньших, чем в жидкой фазе при 20°С (рис. 6). Агрегация молекул, образование комплексов, ассоциатов несомненно играет важную роль в процессах, происходящих при замораживании и хранении клеточных суспензий и других медико-биологических препаратов.

Аномальное поведение химических и биохимических систем во льду связано с тем, что понижение температуры в большей или меньшей степени затрагивает все физико-химические свойства системы: происходит замедление химических реакций в соответствии с законом Аррениуса и процессов диффузии, меняются полярность среды и ее кислотность, молекулы полимеров претерпевают конформационные переходы и, наконец, вся система может перейти в другое фазовое состояние. Взаимное наложение этих факторов и их конкуренция являются при-

Матеріал, захищений авторським правом

чиной того, что заранее описать поведение сложной системы при низких температурах в общем случае невозможно.

Переход от жидкой фазы к замороженным растворам влияет на протекание химических и биохимических реакций значительно сильнее, чем простое понижение температуры. В области фазового перехода скачкообразно меняются свойства среды, вызывая самые неожиданные изменения в ходе реакции.

На основании прямого экспериментального изучения фазового состояния и молекулярной подвижности в замороженных растворах методами ЯМР и ЭПР, а также анализа изменения физико-химических свойств системы при замораживании была сформулирована и подтверждена экспериментально структурно-кинетическая модель химических и биохимических реакций в замороженных растворах [3]. Модель основана на положениях о структурно-фазовой неоднородности замороженных растворов, проявляющейся в неравномерности распределения компонентов в матрице основного вещества и сосуществования в широком температурном интервале фаз с различной молекулярной подвижностью и разными физико-химическими свойствами. Согласно модели значения физико-химических параметров, описывающие разные фазы, не могут быть получены простой экстраполяцией данных для гомогенной системы. Модель позволяет в аналитическом виде получить выражения, описывающие температурную зависимость скорости и величину максимального ускорения реакции во льду.

Несмотря на то что применение низких температур для решения биохимических задач началось сравнительно недавно, уже сейчас можно указать на некоторые перспективы развития этого направления. Постоянное совершенствование и все более широкое использование современных методов исследования в сочетании с низкими температурами дают ключ к пониманию механизмов ферментативных реакций, структуры и физико-химических свойств биополимеров. Открываются новые методы синтеза важных биохимических препаратов и закладываются научные основы криоконсервации и учения об анабиозе. Возможность выделения в чистом виде промежуточных продуктов ферментативных реакций указывает на путь дальнейшего изучения метаболизма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Сергеев Г. Б., Батюк В. А.* Реакции в многокомпонентных замороженных системах. — Успехи химии, 1976, **45**, № 5, с. 793—826.
2. *Сергеев Г. Б., Батюк В. А., Степанов М. Б., Сергеев Б. М.* Кинетическая модель химических реакций в замороженных растворах. — Докл. АН СССР, 1973, **213**, № 4, с. 891—894.
3. *Сергеев Г. Б., Батюк В. А., Сергеев Б. М.* Кинетика ферментативного окисления в замороженных водных растворах. — Докл. АН СССР, 1974, **214**, № 6, с. 1354—1357.
4. *Сергеев Г. Б., Батюк В. А., Сергеев Б. М., Люкманов Н. Ф.* Кинетика катализируемого пероксидазой окисления нафтохиминолфосфатов во льду. — Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия, 1975, **16**, № 5, с. 557—562.
5. *Сергеев Г. Б., Батюк В. А., Сергеев Б. М., Люкманов Н. Ф.* Субстрат-субстратная активация пероксидазного окисления хинолфосфатов во льду. — Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия, 1976, **17**, № 2, с. 182—189.
6. *Fink A. L.* Cryoenzymology: The use of sub-zero temperatures and fluid solutions in the study of enzyme mechanisms. — J. Theor. Biol., 1976, N 61, p. 419—445.

Московский университет

Поступила в редколлегию
06.07.77

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043

А. М. Утевский, В. А. Чуйко, Н. Ф. Губина

ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ НЕЙРО-ГУМОРАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ОХЛАЖДЕНИИ РАЗЛИЧНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СТРУКТУР

Одной из актуальных проблем учения о влиянии охлаждения, замораживания и отогрева биообъектов (клеток, тканей, органов, организмов) на их жизнедеятельность и жизнеспособность является проблема сохранения ими в условиях действия температур, к которым они не адаптированы, способности регулировать и быть регулируемыми, т. е. способности снова стать полноценной интегральной частью системы более высокого уровня.

В настоящей статье приведен экспериментальный материал, подтверждающий, что регуляция и ауторегуляция чувствительны к температурным сдвигам, они в значительной степени определяют узкий температурный интервал жизнедеятельности и одновременно широкие температурные границы адаптации и возможного сохранения жизнеспособности.

В процессах ауторегуляции и регуляции существенную роль играют биогенные моноамины (БМА), образующиеся при декарбоксилировании аминокислот и являющиеся, очевидно, первыми или одними из первых в филогенезе раздражителей протоплазмы. БМА выполняют функции аутогормонов, гормонов, центральных и периферических медиаторов нервной системы и вполне оправдывают мнение, что они участвуют во всех биологических процессах «от гниения до мышления». Особое место среди БМА занимают катехоламины (КА) и индолалкиламины, в частности серотонин (5-окситриптамин-5-ОТ). Изучение влияния охлаждения на некоторые стороны обмена КА (адреналин — А и норадреналин — НА) и явилось первым этапом наших исследований в области криобиохимии нейро-гуморальных систем.

КА, выполняя свои регуляторные функции, подвергаются в биологических структурах различным превращениям, в которых определенную роль играют процессы окислительного дезаминирования под влиянием митохондриальной моноаминоксидазы (МАО) и О-метилирования при действии катехол-О-метилтрансферазы (КОМТ). Они располагают двумя фенольными группами, легко переходящими в хиноны и семихиноны, и для их обмена большое значение имеет открытый А. М. Утевским и В. О. Осинской «хиноидный» путь окисления. Наряду с указанными ферментативными превращениями большое значение для нейро-гуморальной регуляции имеют процессы «захвата» (uptake) и «обратного захвата» (reuptake) КА, процессы, осуществляющие своеобразный круговорот этих биологически активных веществ и тесно связанные с их специфическими функциями (например, с функцией синаптического аппарата в случае «захвата» и «обратного захвата» НА и А или с функцией агрегации тромбоцитов в случае серотонина).

Часть КА, подвергшихся «обратному захвату» из синаптической щели, дезаминируется МАО и превращается в соответствующие альдегиды, гликоли и кислоты. Таким образом, существует тесная связь между круговоротом регулятора и его ферментативным превращением.

Процессы захвата КА энергозависимы, в большей или меньшей степени избирательны и неодинаковы по своему характеру и обеспечивающим их механизмам. Прежде всего различают нейрональный и экстранейрональный захваты, далее в особую группу выделяют процессы захвата дофамина и процессы включения НА, уже захваченного симпатическими нервными окончаниями, в соответствующие гранулы,

Матеріал, захищений авторським правом

где молекулы медиатора резервируются, вступая в соединение с АТФ и специфическими белками и служат лабильным пулом этого гормона-медиатора.

В качестве биологических объектов нами использованы следующие органы: семявыносящий проток (vas deferens) крыс — гладкомышечная структура, почти исключительно иннервируемая адренергическими (норадренергическими) нейронами; гипоталамус крыс как чисто нервная структура; предсердия крыс и быка. Часть опытов была проведена с *L*-НА, динамика захвата которого определялась с помощью флуориметрического триоксииндолового метода В. О. Осинской. В других сериях опытов использован «меченый» А (*D, L*-А — 7^3Н), и соответствующие исследования проводились измерением активности проникшего в биологическую структуру изотопа. В некоторых опытах проведено предварительное «опустошение» пулов медиатора с помощью тирамина.

Первая серия опытов с семявыносящим протоком проведена следующим образом. Были использованы половозрелые животные весом 180—250 г. После декапитации и выделения протока запасы КА в нем опустошали путем инкубации органов с тирамином (0,2 мм, 120 мин). Инкубацию проводили при температуре 37°С. Проведенные опыты показали, что клетки vas deferens функционально полноценны и проявляют способность к активному (против градиента концентрации) захвату НА как без предварительной инкубации с тирамином, так и после таковой (рис. 1). При быстром замораживании (до —196°С) и последующем отогреве способность к захвату экзогенного НА не утрачивается, однако отчетливо уменьшается (на 25—50% в зависимости от программы замораживания, присутствия и вида криопротекторов и т. д.).

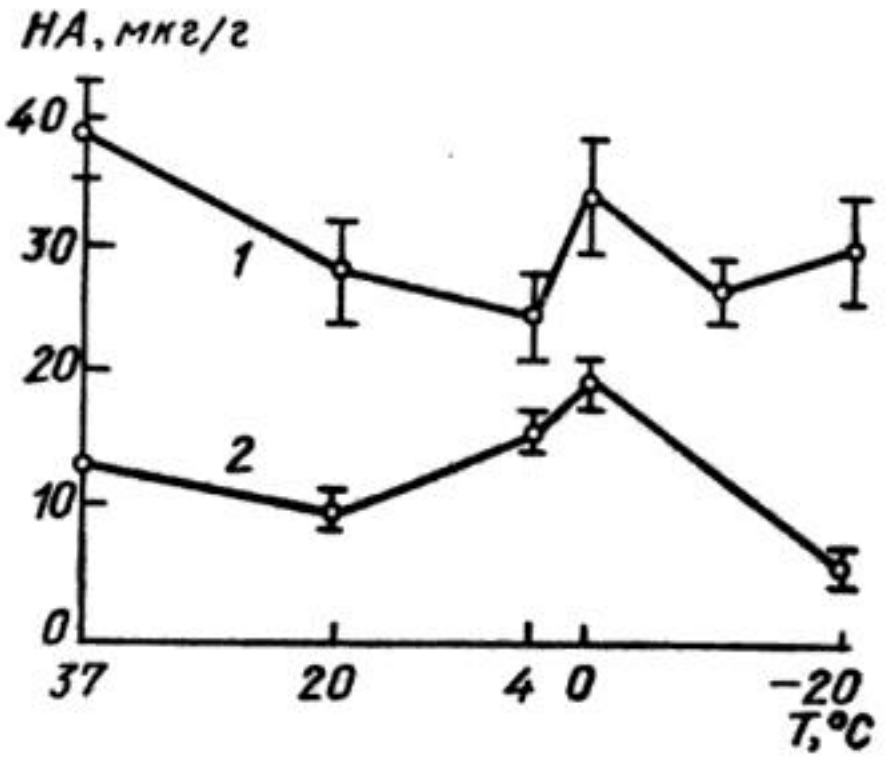


Рис. 1. Влияние охлаждения на процесс захвата НА срезами предсердий быка (*1*) и семявыносящим протоком крыс (*2*).

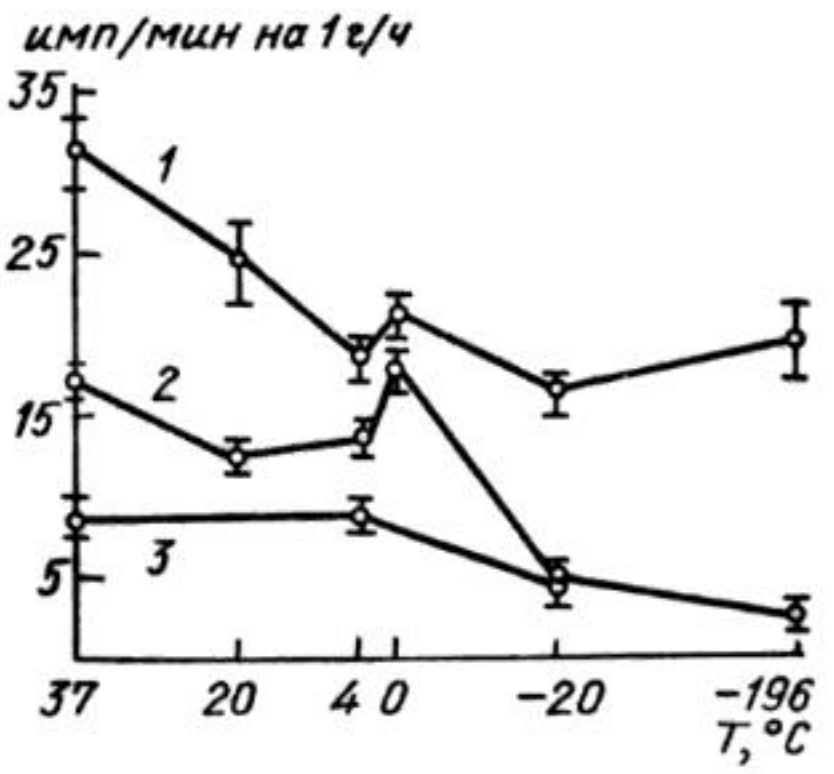


Рис. 2. Влияние охлаждения на процесс захвата *D, L*-А — 7^3Н предсердиями (*1*), семявыносящим протоком (*2*) и гипоталамусом крыс (*3*).

Установив, что как быстрое, так и медленное замораживание с последующим отогревом приводит к утрате клетками семявыносящего протока 25—50% активности захвата НА против градиента концентрации, что может быть результатом или частичного ингибирования всего этого процесса, или полного угнетения одного (криолабильного) механизма захвата и сохранения другого (криостабильного), мы решили детальней проанализировать влияние различных (плюсовых и минусовых) температур на эти процессы, играющие существенную роль в функционировании основных звеньев нейро-гуморальной регуляции.

Продолжая опыты с семявыносящим протоком крыс, мы провели исследование этого процесса, расчленив следующим образом температурные воздействия. Изолированные vas deferens выдерживали 60 мин при заданных температурах (37, 20, 4, 0, —10, —20°С) и затем уже ин-

Матеріал, захищений авторським правом

кубировали с *L*-НА при температуре 37°С. При этом обнаружены следующие своеобразные явления. Уже воздействие 20°С сказывается на исследуемом процессе, вызывая статистически достоверное его торможение. Это не зависит от самого «выдерживания» органа, от влияния временного параметра, так как контрольные пробы выдерживались такое же время, но при температуре 37°С. Еще более своеобразным является то, что органы, подвергнутые экспозиции при 4°С, проявляют значительно бóльшую активность захвата медиатора, причем этот «пик» процесса сохраняется и в органах, выдерживаемых при 0°С (см. рис. 1). Дальнейшее охлаждение сопровождается отчетливой утратой клетками части способности захватывать НА.

Аналогичные опыты проведены с применением вместо *L*-НА изотопа — А (*D*, *L*-А-7^{3}Н). Последний добавляли в дозах 0,05 МСi/мл). Способность клеток семявыносящего протока к захвату А и влияние на этот процесс замораживания и отогрева прослежены нами в более ранних работах, и отмеченные характеристики напоминали те, что получены нами при исследовании захвата НА. В этих предварительных опытах мы определяли А флуориметрическим методом. В опытах с меченым А мы смогли проследить различные температурные интервалы, при выдерживании которых клетки исследуемого органа претерпевают сдвиги в активности механизмов захвата гормона-медиатора. Полученные данные почти в точности повторили те, которые получены нами при исследовании захвата НА: достоверное снижение активности захвата при предварительной выдержке исследуемого органа при 20°С, повышение активности под влиянием температурного интервала от +4 до 0° и резкое угнетение при воздействии низких температур (рис. 2).

Близкая закономерность обнаружена нами при исследовании аналогичного процесса и условий с другим биологическим объектом — гипоталамусом крыс. Для нервных клеток изолированного гипоталамуса характерно сохранение процесса при температуре, близкой к нулю, с последующим ингибированием при дальнейшем охлаждении (рис. 2).

Исследования, проведенные со срезами предсердий быка, показали, что «захват» НА в контрольных опытах составляет в среднем 42,2 мкг/г ткани. Выдерживание срезов предсердий при температуре 20°С в течение 60 мин (с последующим исследованием активности этого процесса при обычных условиях, т. е. +37°С) ведет к достоверному снижению захвата НА (см. рис. 1). Экспозиция срезов при +4°С также уменьшает поглощение медиатора по сравнению с контролем, причем активность этого процесса выражается в захвате 25,8 мкг/г ткани.

Процесс характеризуется некоторым пиком после экспозиции органа при 0°С. Выдерживание предсердий при —10° и —20°С приводит к выраженному угнетению процесса захвата НА.

Аналогичные результаты получены в опытах с предсердиями крыс.

В последующей работе исследована способность семявыносящего протока, гипоталамуса и предсердий крыс, а также предсердий быка к захвату *D*, *L*-А-7^{3}Н после выдерживания этих органов как при положительных, так и при отрицательных температурах и влияние на этот процесс *L*-НА, который в условиях, свойственных данным органам температурных режимов, вступает с А в конкурентные взаимоотношения (так же, как А с НА). Эти опыты поставлены с целью выяснить, сохраняются ли в условиях экспозиции органов при различных температурах структурные конкурентные взаимоотношения адренергических веществ, обычно характерные для функции их рецепторов и мембранных механизмов захвата.

Проведенные опыты показали, что добавление *L*-НА (30 мкг/мл) сопровождается достоверным понижением захвата *D*, *L*-А-7^{3}Н (в контрольных опытах с предварительной экспозицией органа при 37°С).

Матеріал, захищений авторським правом

Еще большее снижение захвата меченого А, т. е. более выраженное конкурентное действие, имеет место при повышении дозы добавляемого *L*-НА (60 мкг/мл) (рис. 3).

Выдерживание срезов предсердий при 20°С достоверно не изменяет процесс захвата *D, L*-А 7^3Н после добавления как 30, так и 60 мкг/мл НА. Следовательно, выдерживание этих срезов при такой, казалось бы, близкой к оптимальной, температуре, как 20°С, уже отчетливо сказывается на тех свойствах рецепторных систем клеток, которые ответственны за проявление конкурентного взаимодействия А и НА. Глубокое замораживание (—196°С) и последующий отогрев срезов предсердий приводят к тому, что конкурентное взаимодействие полностью исчезает.

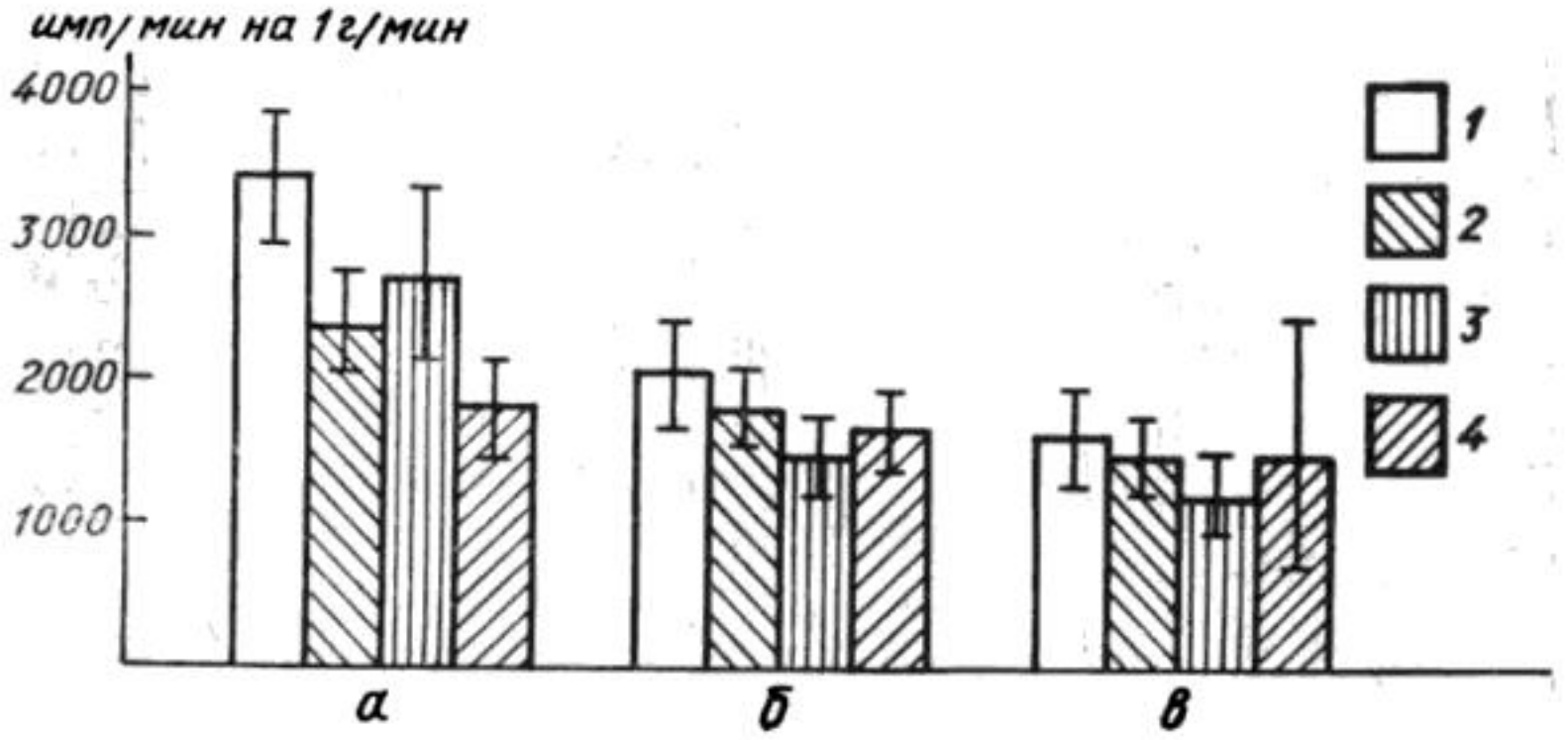


Рис. 3. Влияние температуры и НА на захват *D*, *L*-адреналина-7^3Н срезами предсердий быка:
а — контроль; *б* — НА, 30 мкг/г; *в* — НА, 60 мкг/г; *1* — (+37°С); *2* — (+20°С); *3* — (0°С); *4* — (—196°С).

Заслуживает внимания то обстоятельство, что выдерживание срезов предсердий при 0°С оказывает меньшее влияние на проявление конкурентного взаимоотношения, чем экспозиция при 20°С.

Таким образом, модификация под влиянием определенных положительных и отрицательных температур процесса захвата медиатора вполне согласуется с проявлением конкурентного взаимодействия — А: НА. Несомненно, в основе этих процессов, хотя и однонаправленных, могут лежать принципиально различные механизмы — нарушения взаимодействий в рецепторном звене исследуемых процессов — в случае положительных температур, и фазовые изменения при замораживании в системе вода—лед.

Процессы захвата гормона (А) и медиатора (НА) тесно связаны с дальнейшим их превращением в эффекторных клетках, а в случае обратного захвата НА из синаптической щели связаны также с резервированием медиатора в соответствующих гранулах окончаний симпатических преганглионарных нейронов. Как было указано выше, существенную роль в метаболизме НА в симпатических окончаниях и эффекторных клетках играет митохондриальная моноаминоксидаза, регулирующая внутриклеточный (в особенности интранейрональный) уровень катехоламинов.

Изучая влияние разных температурных режимов на круговорот регуляторов в клетках различного происхождения, структуры и функции, мы наряду с процессами захвата исследовали активность и субстратную специфичность МАО. Исследования активности МАО проведено Л. А. Назаровой.

Активность МАО изучалась по отношению к таким субстратам: тирамин, серотонин, бензиламин. Из навески ткани сердца 2—4 г (от 5—10 крыс) получали на холоду 10%-ный гомогенат в 0,25 М сахарозе

Матеріал, захищений авторським правом

на трис-буфере. Митохондрии получали методом дифференциального центрифугирования (12 тыс. об/мин), промывали 0,01 М фосфатным буфером, суспендировали из расчета 3—5 мл белка на пробу. Инкубацию проводили в сосудах, содержащих 0,5 мг буфера, 1,0 митохондрий и 0,5 мл субстрата в течение 50 мин при 37°С. Реакцию останавливали добавлением 20%-ной трихлоруксусной кислоты. От белка освобождались центрифугированием. Количество освободившегося аммиака определяли по Конвею с последующей несслеризацией. Было найдено, что активность МАО в сердце крыс при +37°С (контроль) выражается в следующих величинах: при тирамине в качестве субстрата 1,01±0,26; при серотонине — 1,8±0,36; при бензиламине — 0,5+0,14 (рис. 4).

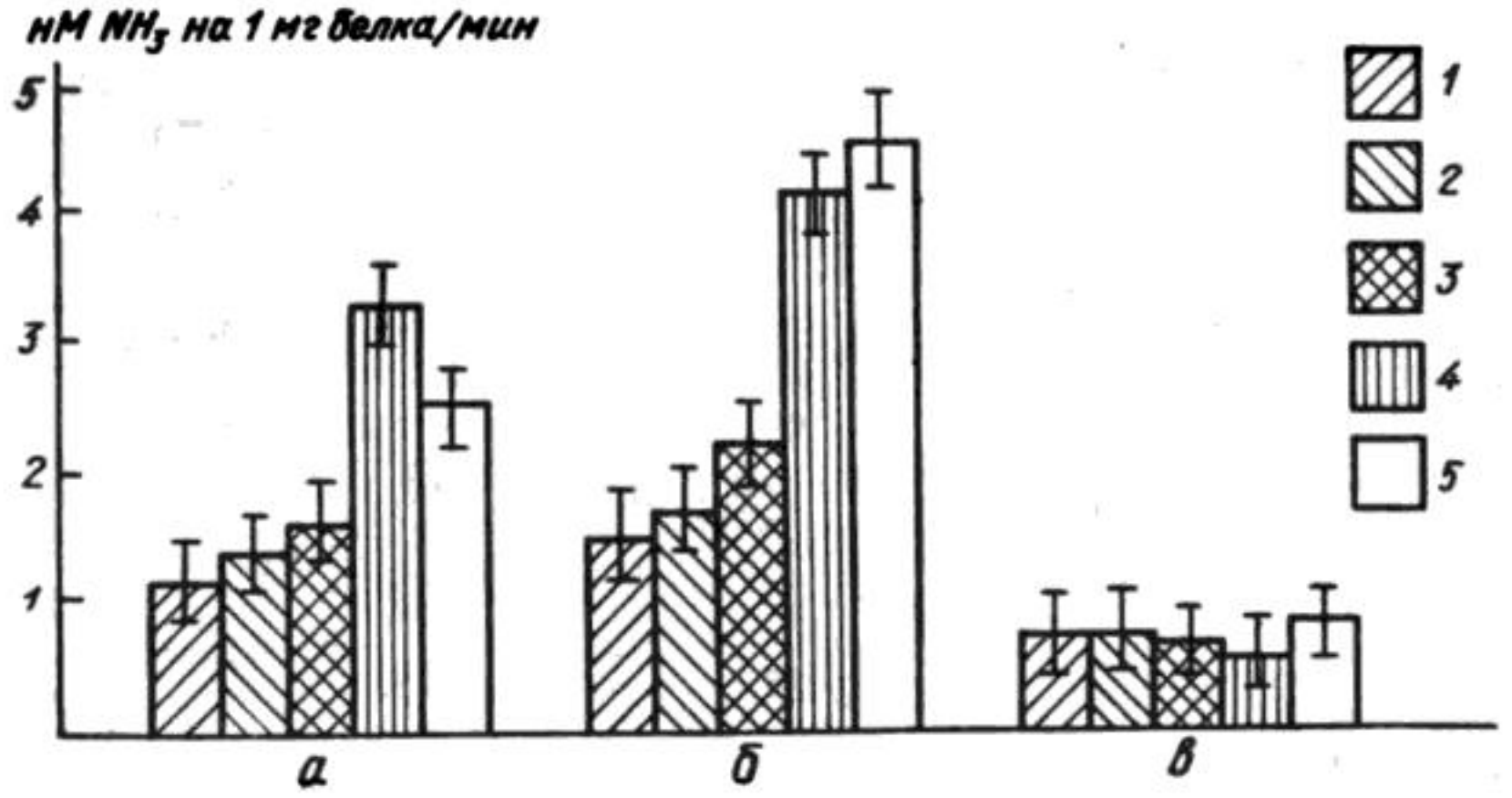


Рис. 4. Влияние температуры на активность моноаминоксидазы в сердце крыс: *а* — тирамин; *б* — 5-ОТ; *в* — БА; *1* — (+37°С); *2* — (+4°С); *3* — (0°С); *4* — (—10°С); *5* — (—20°С).

Предварительное выдерживание исследуемого органа при температурах +20°С; +4; 0°; —10; —20°С выявляло следующее. Экспозиция сердца при 20° и 4°С фактически не изменяет уровень активности МАО (по отношению ко всем исследованным субстратам). Выдерживание при 0°С проявляется в тенденции (статистически недостоверной) к повышению активности МАО по отношению к тирамину и серотонину и некоторому снижению по отношению к бензиламину. Существенно изменяется (повышается) активность МАО в условиях выдерживания сердца крыс при —10 и —20°С. Активирование это относится только к таким субстратам, как тирамин и серотонин. При этом сохраняется наиболее выраженная активность по отношению к последнему (см. рис. 4).

Таким образом, не только пребывание при низких температурах, но и выдерживание биологических структур при температуре, не слишком отдаленной от привычной для вида животных, от которых был взят исследуемый орган, оставляет отчетливый след на факторах его регуляции и ауторегуляции. Каждый температурный интервал может стать причиной регуляторных (и, следовательно, метаболических и функциональных) обратимых и необратимых сдвигов, своего рода «температурной памяти» биологической структуры. Особое значение, нужно полагать, имеет «память» пребывания биологической структуры возле температурных точек, связанных с фазовыми переходами. Программы быстрого и сверхбыстрого охлаждения и отогрева криообъектов, очевидно, позволяют «проскочить» ряд опасных, а иногда и благоприятных температурных интервалов без формирования и закрепления следовых явлений. Вопрос о значении быстрого, сверхбыстрого или медленного охлаждения и отогрева рассматривался всегда с точки зрения повре-

Матеріал, захищений авторським правом

ждающего действия обезвоживания, осмотического шока, кристаллизации и рекристаллизации, поэтому не учитывалось состояние факторов регуляции и ауторегуляции. Между тем приведенные данные указывают на высокую чувствительность по крайней мере некоторых из этих факторов к сравнительно небольшим сдвигам температуры и на прочную «температурную память» таких сдвигов.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
05.12.77

УДК 57.043.615.387:547.963.32:547.422

А. А. Цуцаева, А. Н. Гольцев, Ю. Е. Микулинский, Л. В. Останкова

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДЕКОНСЕРВИРОВАННЫХ МИЕЛОКАРИОЦИТОВ И ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА ТЕЧЕНИЕ РЕПАРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В НИХ

В настоящее время при лечении нарушений гемопоэза, вызванных лучевым поражением и химиотерапией, все более широко применяется трансплантация костного мозга, хранившегося при низких температурах.

Однако в процессе консервации клетки костного мозга претерпевают определенные изменения. Есть сообщения, что хранение их в жидком азоте, даже в присутствии криофилактиков, приводит после деконсервации к появлению структурных изменений в ядре [21], а также к снижению включения меченых предшественников в ДНК [29] и белки [23]. В то же время остается малоизученной судьба деконсервированных миелокариоцитов в организме облученных реципиентов.

Поэтому цель настоящей статьи — изучение пролиферативной активности, скорости дифференцировки и топографии расселения деконсервированных миелокариоцитов в организме облученных реципиентов, активности и течения иммунных реакций, реализуемых деконсервированными миелокариоцитами в облученном организме. Проведено также сравнительное изучение влияния препаратов РНК, на процессы метаболизма в клетках деконсервированного костного мозга и исследование влияния раздельного и комбинированного применения препаратов РНК и ДНК на функциональную активность деконсервированных миелокариоцитов, трансплантированных облученным реципиентам.

В качестве объекта исследования использовали костный мозг мышей линии CBA/T_6T_6, CBA/H, (CBA×C57Bl)F_1 и костный мозг трупов скоропостижно умерших людей. Препараты РНК из печени и селезенки мышей, а также из печени эмбриона человека получали по методу, описанному в литературе [1]. Выделение т-РНК, р-РНК и температурной фракции ядерной РНК (Т-РНК) проводили по известной методике [3], как и рибонуклеазный гидролизат [13].

Во всех используемых препаратах РНК содержание ДНК и белка не превышало 1%. Препараты ДНК были получены из спермы лососевых рыб фенольным методом [17]. Клетки миелоидной ткани замораживали и оттаивали по описанному методу [7].

Мышей облучали на установке РУМ-11 в коробках из оргстекла с индивидуальными ячейками для каждой мыши. Условия облучения следующие: напряжение — 250 kV, сила тока — 16 мА; фокусное расстояние — 60 см; фильтры — 1 мм Cu + 1 мм Al, мощность дозы 90 р/мин. Опыты in vitro были проведены в суспензионной культуре миелоидной ткани человека [8]. Клетки костного мозга ($2{,}5 \cdot 10^7$ клеток/

Матеріал, захищений авторським правом

/мл или $5 \cdot 10^7$ на пробу) инкубировали с препаратами РНК (75 мкг/мл) в течение 3; 6; 12 и 24 ч при температуре 37°С.

Для изучения синтеза белка к миелокариоцитам добавляли смесь ^{14}С-аминокислот по 1 мккюри/мл. Интенсивность синтеза РНК и ДНК определяли, используя в качестве меченых предшественников ^{3}Н-уридин и ^{3}Н-тимидин, которые добавляли к клеточной взвеси из расчета 2,5 мккюри/мл. В опытах по изучению скорости синтеза ДНК меченые предшественники добавляли за 3 ч до окончания инкубации, а при исследовании обмена РНК и белка -- за 60 мин. Обработку радиоактивных проб проводили по методу Кеннел [2]. Радиоактивность определяли на сцинтилляционном спектрометре SL-40 Интертехник в толуоловом сцинтилляторе. Количество белка в пробах определяли по методу Лоури [20], РНК — по методу Албаум [9], ДНК — по методу Дише [12].

Тотальную клеточную РНК из миелоидной ткани человека фракционировали в градиенте сахарозы — 5—20%, ацетатный буфер 0,01 МрН — 5,1, Спинко L2-65B, SW-65, 6000 об/мин, 150 мин. Коэффициент седиментации рассчитывали по формуле Мартин [22].

После оттаивания $3 \cdot 10^6$ клеток костного мозга мышей СВА/T_6T_6 вводили мышам линии (СВА×С57Bl)F_1, облученным в дозе 850 р, в различные сроки после трансплантации (одновременно, на 2-е, 3-и, 5-е сут) вводили комбинированно или раздельно препараты ДНК и РНК. Препараты ДНК были введены в дозе 80 мкг, РНК — 300 мкг.

По результатам предварительных экспериментов, данные дозы оказывали максимальный стимулирующий эффект. Число колоний в селезенках реципиентов учитывали на 8—9-е сут после трансплантации костного мозга.

Терапевтический эффект трансплантации деконсервированной миелоидной ткани в сочетании с препаратами нуклеиновых кислот оценивали по 30-дневной выживаемости облученных мышей. Мышам линии (СВА×С57Bl)F_1, облученным в дозе 850 р, трансплантировали $2 \cdot 10^6$ деконсервированных миелокариоцитов мышей линии СВА/Н. Одновременно с трансплантацией костного мозга на следующий день и через два дня реципиентам было введено 800 мкг ДНК+300 мкг РНК.

При изучении пролиферативной активности и скорости дифференцировки деконсервированных и нативных миелокариоцитов мышам линии СВА/Н, облученным в дозе 850 р, трансплантировали $1,5—2 \cdot 10^5$ клеток донорского костного мозга мышей линии СВА/T_6T_6. В различные сроки после трансплантации (с 6-х по 13-е сут) в селезенках реципиентов определяли число колоний и степень их дифференцировки; кроме того, по методу Форда [15] определяли число колоний, принадлежащих к донорскому типу.

Результаты данной серии экспериментов показали, что при трансплантации нативного костного мозга в селезенках реципиентов (группа А) на 6-е сут отмечалось $12,2 \pm 0,6$ гемопоэтических колоний. Максимальное их число отмечалось на 8-е сут ($21,4 \pm 1,1$) и несколько снижалось к 13-м сут ($18,1 \pm 0,6$).

В селезенках мышей с трансплантатом деконсервированного костного мозга (группа Д) число колоний на 6-е сут было значительно ниже, чем в группе А ($7,4 \pm 0,7$:$12,2 \pm 0,6$; $p < 0,05$). Только к 10-м сут число колоний у реципиентов группы Д достигало максимальных величин, причем было оно достоверно меньше по сравнению с группой А ($14,5 \pm 1,2$:$21,4 \pm 1,1$; $p < 0,05$).

При гистологическом исследовании установлено, что у реципиентов группы А уже на 6-е сут 67,7% колоний состояли из дифференцированных клеточных элементов, при этом соотношение колоний эритроидно-гранулоцитарного (Э : Г) типа составляло 3,7 : 1. Максимальный

Матеріал, захищений авторським правом

процент колоний дифференцированного типа отмечался на 8-е сут (92,3%), а соотношение колоний Э : Г типа 2,2 : 1.

У реципиентов группы Д на 6-е сут только 29,3% общего числа колоний составляли колонии дифференцированного типа, причем соотношение колоний типа Э : Г составляло 5,4 : 1. К 8-м сут процент дифференцированных колоний увеличивался до 50,9% (соотношение колоний Э : Г типа 3,8 : 1) и лишь к 12-м сут процент их, а также показатель соотношения колоний типа Э : Г достигали значений, близких к аналогичным показателям, определяемым в группе А на 8-е сут (90,9%; 2,3 : 1).

Учитывая имеющиеся данные о линейной зависимости между числом введенных стволовых клеток и числом образованных в селезенках летально облученных реципиентов колоний [10], а также полученные нами результаты, можно заключить, что после низкотемпературной консервации, при данных условиях эксперимента, сохраняется около 70% стволовых клеток. При этом пролиферативная активность и скорость дифференцировки снижены в течение определенного промежутка времени после трансплантации реципиентам.

Оказывают ли влияние указанные выше изменения на функциональные свойства стволовых клеток?

В литературе нет сведений о способности клеток деконсервированного костного мозга приживляться в организме облученного реципиента, а также об их функциональной активности, в особенности клеток лимфоидного пула, дифференцирующихся из деконсервированных стволовых клеток. В этой связи скорость репопуляции лимфоидных органов клетками донорского типа, скорость их дифференцировки, способность к реализации иммунных реакций представляют не только теоретический, но и практический интерес. К тому же данные, касающиеся указанных свойств нативных миелокариоцитов, неоднозначны.

Так, используя систему T_6T_6, авторы [25—27] показали возможность пролиферации донорских миелокариоцитов в костном мозге и селезенке летально облученных реципиентов сразу после трансплантации.

По некоторым данным, донорские миелокариоциты в первые две недели после пересадки в тимусе летально облученных реципиентов не пролиферируют [28, 30], а в лимфоузлах пролиферирующие донорские клетки обнаруживаются только с 10-го дня посттрансплантационного периода [15, 19]. Вместе с тем имеются данные, свидетельствующие о появлении пролиферирующих клеток донорского типа в тимусе летально облученных реципиентов уже с пятого-шестого дня после трансплантации [26] и репопуляции лимфоузлов облученных реципиентов в первые дни после миелотрансплантации [28]. Это в свою очередь вызывает необходимость систематизации данных о топографии расселения и нативных миелокариоцитов в организме реципиента.

Вследствие этого в следующей серии экспериментов нами была поставлена задача изучить с помощью метода хромосомного маркера T_6T_6 топографию расселения и пролиферативную активность нативных и деконсервированных миелокариоцитов в миелоидных и лимфоидных органах реципиентов, облученных в дозе 800 р. Кроме того, предполагалось изучить функциональную активность клеток деконсервированного трансплантата в организме летально облученного реципиента, в частности изучить их способность реализовать иммунный ответ на эритроциты барана, а также участвовать в кооперативных процессах с сингенными тимоцитами на этапах развития иммунного ответа к данному антигену.

При изучении топографии расселения нативного и деконсервированного костного мозга в различные сроки после трансплантации в миелоидных и лимфоидных органах и тканях облученных реципиентов (с

Матеріал, захищений авторським правом

5-х по 90-е сут) определяли процентное содержание клеток донорского типа.

Для получения метафазных пластинок клеток костного мозга, селезенки и тимуса реципиентам за 2,5 ч до забоя внутрибрюшинно вводили раствор колхицина из расчета 5—6 мг на 1 г веса животного; для получения метафазных пластинок клеток лимфоузлов колхицин вводили за 3,5 ч до забоя животных в концентрации 0,08% по 5—6 мг на 1 г веса животных. Приготовленные препараты окрашивали по Романовскому. Из 50 клеток, находящихся в митозе, учитывали содержание донорских клеток. При подсчете клеток в лимфоузлах и тимусе в ранние сроки после трансплантации учитывали менее 50 клеток, находящихся в митозе, поскольку в это время у облученных реципиентов в указанных органах отмечалась низкая клеточность. Для учета среднего процента донорских клеток в исследуемых органах и тканях в каждый срок после трансплантации забивали по семь-восемь мышей из группы.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что донорские нативные миелокариоциты составляли более 90% всей делящейся клеточной популяции в костном мозге и селезенке реципиентов уже на пятые сут после трансплантации. К восьмым сут число клеток с хромосомным маркером увеличивалось и в дальнейшем они обнаруживались как доминантная популяция, составляя 100% всех делящихся клеток.

При трансплантации деконсервированных миелокариоцитов клетки донорского типа также преобладали в костном мозге и селезенке облученных реципиентов на протяжении всего периода наблюдения, однако на пятые сут процент их был достоверно ниже, чем у реципиентов, защищенных нативными миелокариоцитами (соответственно $72\pm6{,}2 : 92\pm\pm5{,}1$ и $80\pm3{,}9 : 95\pm3{,}5$; $p<0{,}05$). К восьмым сут процент делящихся клеток деконсервированного трансплантата быстро увеличивался в костном мозге и селезенке реципиентов, составляя к этому сроку соответственно $92\pm2{,}8\%$ и $96\pm3{,}2\%$ всей делящейся популяции. Во все последующие сроки наблюдения процент клеток донорского типа в костном мозге и селезенке реципиентов данной группы достоверно не отличался от аналогичного показателя у реципиентов с нативным трансплантатом.

Результаты гистологических исследований показали, что у реципиентов с трансплантатом нативного и деконсервированного костного мозга на пятые сут после облучения в селезенке отмечались единичные гемопоэтические колонии, локализующиеся в основном в красной пульпе. Число колоний, а также митотическая активность клеточных элементов в них были в большей степени выражены в селезенках реципиентов с нативным трансплантатом. На восьмые сут число колоний, образованных деконсервированными колониеобразующими единицами (КОЕ), хотя и оставалось меньшим, чем у реципиентов с нативным трансплантатом, однако митотическая активность клеточных элементов в них повышалась по сравнению с пятыми сут.

Количество лимфоидных элементов в фолликулах селезенки облученных животных было незначительным до 22 сут и только к пятой неделе у большинства мышей возрастало их количество, увеличивалось число митозов, что являлось причиной гиперплазии перифолликулярной и периартериальной зоны; параллельно отмечалось восстановление структуры герминативных центров.

В тимусе пролиферирующие клетки нативного и деконсервированного костного мозга не обнаруживались до 12-х сут, и лишь единичные клетки определялись клетками донорского типа у некоторых животных. Начиная с 12-х сут процент делящихся клеток донорского типа быстро увеличивался, достигая к 15-м сут 70%, а к концу третьей недели — более 85% делящейся популяции. Во все последующие сроки абсолютное большинство делящихся клеток в тимусе было представлено клетками донорского типа.

Матеріал, захищений авторським правом

При гистологическом исследовании тимуса реципиентов исследуемых групп было установлено, что на пятые и восьмые сут в корковой зоне отмечались очаги дистрофии, обнаруживались лимфоциты с пикнотичными ядрами, в состоянии кариорексиса и зернистой дистрофии. Не обнаруживались митозы. Корковая зона становилась довольно однородной по составу — преобладали лимфобласты и эпителиоидные клетки. В мозговом веществе обнаруживалось скопление лимфоидных элементов в различной степени деструкции и распада (очаги некробиоза и некроза), снижение числа телец Гассаля.

На 15-е сут в тимусе мышей опытных групп встречались плазматические клетки, которые прежде всего появлялись вокруг сосудов, а затем равномерно распределялись в органе.

В период с 15-х по 21-е сут начинало увеличиваться количество лимфоцитов в кортикальной зоне, причем данный процесс протекал значительно интенсивнее в тимусе мышей с трансплантатом нативного костного мозга. У мышей данной группы гистологическая структура тимуса приближалась к норме уже к 32-м сут, в то время как у реципиентов с деконсервированным трансплантатом — только к 40-м сут.

В лимфоузлах митозы клеток нативного и деконсервированного костного мозга отмечались уже на первой неделе после трансплантации. Так, у реципиентов с нативным трансплантатом к пятым сут вся делящаяся популяция состояла на $96\pm3{,}2\%$ из клеток донорского типа.

При трансплантации деконсервированных миелокариоцитов большинство делящейся популяции в указанный срок также представлено клетками донорского типа, однако процент их был достоверно ниже, чем у реципиентов с нативным трансплантатом (соответственно $72\pm\pm5{,}8\%$ и $96\pm3{,}2\%$; $p<0{,}05$). К восьмым сут содержание их в делящейся популяции увеличивалось до $90\pm4{,}5\%$, достоверно не отличаясь в этот срок от аналогичного показателя у реципиентов с нативным трансплантатом.

В течение второй недели в лимфоузлах реципиентов обеих групп снижалось содержание делящихся клеток донорского типа, но начиная с 15-х сут, когда процент их был наименьшим ($78\pm2{,}6$ и $76\pm3{,}9\%$), отмечалось быстрое замещение клеток реципиента клетками донорского типа, которые к концу третьей недели составляли более 90% всей делящейся популяции лимфоузла, оставаясь на этом уровне до конца срока наблюдения.

Следует отметить, что замещение делящихся клеток в лимфоузле реципиента клетками донорского типа отмечалось в тот период, когда клетки донорского типа уже интенсивно пролиферировали в тимусе. Не исключено, что в это время происходило заселение лимфоузлов клетками донорского типа, но тимусного происхождения.

В лимфатических узлах реципиентов опытных групп на 5—8-е сут отмечались различные стадии деструкций лимфоидных элементов: пикнозы, кариорексис, цитоплазмы, вакуолизация, что приводило к появлению участков некробиоза и некроза. Лимфоциты исчезали в первую очередь из периферической зоны фолликулов. Гибнущие лимфоциты активно фагоцитировались макрофагами, в цитоплазме которых часто обнаруживался клеточный детрит и бурые пигментные включения. Такие картины особенно наглядны в герминативных центрах лимфатических узлов. Общее число лимфоцитов в лимфатических узлах в этот период значительно уменьшалось.

В период с 15-х по 21-е сут у мышей опытных групп зоны в фолликулах лимфоузлов еще не выявлялись, распределение клеток на всем их протяжении становилось почти равномерным, а количество на единицу площади меньше, чем в интактных реактивных центрах.

Начиная с 21-х сут наблюдалось восстановление герминативных центров, появлялись ретикулярно-переходные клетки и бласты в состо-

Матеріал, захищений авторським правом

янии митоза. Пролиферация клеток в герминативных центрах в большей степени выражена у мышей с нативным трансплантатом.

На 21-е сутки вокруг вторичных фолликулов начинала формироваться периферическая зона, однако малые лимфоциты располагались в ней рыхло и только к 30-м сут наблюдалась гиперплазия ее за счет малых средних лимфоцитов. Репарация паракортикальной зоны лимфоидными элементами отмечалась у мышей обеих групп на 40-е сут.

В ходе пострадиационного восстановления в лимфоузлах появлялось большое число плазмобластов, а затем зрелых плазматических клеток. Плазмоцитарная реакция, которая отмечалась с 15-х по 21-е сут у мышей с трансплантатом нативного и с 14-х по 30-е сут — с трансплантатом деконсервированного костного мозга, была наиболее выражена в периферической зоне лимфоидных фолликулов и особенно в мякотных шнурах. Интересно отметить, что в период с 15-х по 21-е сут после облучения у мышей обеих опытных групп отмечали нейтрофильную инфильтрацию мякотных шнуров, причем наиболее выраженную при пересадке нативного костного мозга.

В следующей серии экспериментов проведено сравнительное изучение способности нативных и деконсервированных миелокариоцитов реализовать в организме летально облученных реципиентов иммунные реакции на эритроциты барана.

Мышам-гибридам $(CBA \times C57Bl)F_1$, облученным в дозе 850 р, трансплантировали $2 \cdot 10^7$ клеток сингенного нативного (группа А) или $3 \cdot 10^7$ деконсервированного (группа Д) костного мозга (деконсервированный костный мозг был введен в большей дозе с учетом восполнения погибших после низкотемпературной консервации стволовых клеток). В день трансплантации костного мозга, а также на 7-е, 15, 21, 25, 30, 40 и 60-е сут мышей иммунизировали эритроцитами барана (БЭ) и через восемь дней по методу Ерне [11] в селезенках защищенных реципиентов определяли число бляшкообразующих клеток (БОК). При оценке способности миелокариоцитов участвовать в кооперативных процессах с сигненными тимоцитами реципиентам, защищенным нативным костным мозгом (группа С) или деконсервированным (группа Т) костным мозгом, в день иммунизации вводили $5 \cdot 10^8$ сингенных тимоцитов. Контролем служили облученные мыши без трансплантата костного мозга и необлученные гибриды $(CBA \times C57Bl)F_1$. В каждой опытной группе в указанные сроки забивали по пять-шесть мышей; эксперимент повторен трижды.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что большинство летально облученных мышей-гибридов $(CBA \times C57Bl)F_1$ без трансплантата костного мозга погибало к концу второй недели после облучения. При иммунизации мышей данной группы сразу после облучения в селезенках выживших к седьмым сут животных определялось незначительное число БОК $(12{,}6 \pm 2{,}2)$.

В селезенках иммунизированных мышей с трансплантатом костного мозга наблюдался выраженный процесс накопления БОК, однако отмечался определенный промежуток времени от момента введения миелокариоцитов до начала интенсивного накопления БОК. Так, при иммунизации реципиентов групп А и Д сразу после трансплантации костного мозга число БОК в селезенках мышей равнялось соответственно $31{,}5 \pm 4{,}2$ и $23{,}9 \pm 3{,}5$. В тех случаях, когда животных иммунизировали через семь дней после миелотрансплантации, число БОК в селезенках животных указанных групп составляло $56{,}2 \pm 7{,}1$ и $40{,}6 \pm 2{,}1$.

При иммунизации реципиентов начиная с 15-х и по 21-е сут количество гемолизинпродуцирующих клеток у животных обеих групп интенсивно нарастало. Однако, если в селезенках мышей группы А число БОК при иммунизации на 15-е сут возрастало примерно в 12 раз по сравнению с их содержанием при иммунизации на седьмые сут, то в

Матеріал, захищений авторським правом

группе Д — только в пять раз. При этом только при иммунизации на 15-е сут показатели содержания БОК у реципиентов обеих групп имели достоверные различия ($674\pm78{,}4 : 208\pm18{,}6$; $p<0{,}001$). При иммунизации в последующие сроки наблюдения (21-е, 25, 30, 40 и 60-е сут) данные показатели у реципиентов групп А и Д не имели существенных различий.

Следовательно, у реципиентов с трансплантатом нативного или деконсервированного костного мозга при иммунизации в период с 15-х по 21-е сут отмечалась максимальная скорость накопления БОК. Однако необходимо отметить, что, хотя при иммунизации на 21-е сут число БОК в селезенках мышей обеих опытных групп и увеличивалось более чем в 42 раза по сравнению с иммунизацией на седьмые сут, абсолютное их содержание к концу третьей недели составляло лишь 9,5% уровня содержания БОК в селезенках необлученных иммунизированных мышей-гибридов $(CBA\times C57Bl)F_1$ (20640 ± 1247; контрольная группа).

В течение четвертой недели после трансплантации костного мозга число БОК в селезенках мышей обеих опытных групп продолжало нарастать; время удвоения БОК в этот период составляло около четырех дней и уже к концу месяца уровень их содержания достигал примерно 55% аналогичного показателя у мышей контрольной группы. С этого времени скорость накопления БОК начинала заметно снижаться, а время их удвоения возрастало до четырех недель. Так, при иммунизации на 40-е сут число БОК у мышей групп А и Д составляло около 57%, а спустя два месяца после трансплантации миелокариоцитов — несколько больше 70% содержания БОК в селезенках мышей контрольной группы.

В следующей серии экспериментов изучена способность деконсервированных и нативных миелокариоцитов участвовать в кооперативных процессах с сингенными тимоцитами на этапах развития иммунного ответа к эритроцитам барана.

Результаты данных исследований показали, что при иммунизации облученных мышей, которым были введены только клетки тимуса, существенного увеличения числа БОК по сравнению с их содержанием у облученных иммунизированных мышей не наблюдалось ($17{,}6\pm2{,}1$). Однако, когда тимоциты были введены летально облученным мышам с трансплантатом костного мозга, значительное накопление БОК, при иммунизации БЭ, отмечалось в более ранние сроки, чем у реципиентов, которым трансплантировали только костный мозг. Так, у мышей, защищенных нативным костным мозгом (группа С), которым в день трансплантации миелокариоцитов вводили сингенные тимоциты и иммунизировали эритроцитами барана, число БОК было в 7,9 раза больше, чем у защищенных, иммунизированных в этот же срок животных, которым тимоциты не вводили. У реципиентов с трансплантатом деконсервированного костного мозга (группа Т) количество БОК также увеличивалось, если иммунизация в день миелотрансфузии сочеталась с введением тимоцитов. Однако в данном случае число гемолизинпродуцирующих клеток было значительно меньше, чем в селезенках мышей группы С ($99{,}6\pm13{,}8$:$231{,}7\pm58{,}4$; $p<0{,}05$).

Наиболее выраженный эффект стимуляции в отношении накопления БОК под влиянием сингенных тимоцитов отмечался при иммунизации животных на седьмые сут после трансплантации миелокариоцитов. В данном случае число БОК увеличивалось более чем в 19 раз в селезенках реципиентов группы С и почти в 18 раз в селезенках животных группы Т ($1107\pm308{,}2$:$56{,}2\pm7{,}1$ и $718{,}6\pm221{,}6$:$40{,}6\pm2{,}1$; $p<0{,}05$). Начиная с седьмых сут и во все последующие сроки наблюдения показатели содержания БОК в селезенках реципиентов группы С не имели существенных различий по сравнению с аналогичным показателем у реципиентов группы Т.

Матеріал, захищений авторським правом

При иммунизации мышей групп С и Т спустя 15 дней после трансплантации костного мозга эффект стимуляции накопления БОК под действием тимоцитов еще проявлялся в достаточной степени, но уже с 21-х сут отмечалось выраженное его снижение. Начиная с 25-х сут и во все последующие сроки наблюдения показатели содержания БОК в селезенках иммунизированных реципиентов с трансплантатом костного мозга и тимоцитов не отличались существенно от таковых у иммунизированных мышей, защищенных только костным мозгом.

Таким образом, полученные результаты показали, что после низкотемпературной консервации отмечается снижение метаболической, пролиферативной активации и скорости дифференцировки миелокариоцитов, в результате чего запаздывает реализация функциональной активности клеток. Поэтому возникла необходимость применения биологически активных веществ, ускоряющих восстановительные процессы в клетках, подвергавшихся консервации холодом.

Ряд авторов [4, 13, 14, 31] описывают активацию репаративных процессов в клетках и тканях, подвергавшихся воздействию различных экстремальных факторов, под влиянием экзогенных нуклеиновых кислот. Нами проведено изучение возможного влияния препаратов ДНК и РНК на указанные выше свойства деконсервированных миелокариоцитов.

Исследования, проведенные в суспензионной культуре костного мозга человека, показали, что в клетках миелоидной ткани, подвергнутой низкотемпературной консервации, значительно снижается интенсивность включения меченых предшественников в нуклеиновые кислоты.

При изучении динамики синтеза ДНК в миелоидной ткани установлено, что удельная активность ДНК деконсервированных миелокариоцитов через 3 ч от начала инкубации ниже на 43,5% ($p<0,05$), чем аналогичные показатели нативного костного мозга. Эта закономерность в основном сохранялась и в остальные сроки инкубации, хотя к 12 и 24 ч культивирования различия между синтезом ДНК в клетках нативного и деконсервированного костного мозга выражены менее отчетливо.

Подобные результаты получены и при сравнительном изучении уровня синтеза РНК и белка в суспензионных культурах нативной и деконсервированной миелоидной ткани, причем низкий уровень синтеза РНК и белка в клетках деконсервированного костного мозга наблюдали в первые 3 и 6 ч культивирования, когда удельная активность РНК составляла соответственно 39 и 41%, а удельная активность белка — 36,9 и 40,1% соответствующих контрольных значений ($p<0,05$).

Под влиянием тотальной клеточной РНК печени эмбриона человека в клетках деконсервированной миелоидной ткани через 12 ч инкубации отмечена четкая тенденция к возрастанию скорости синтеза ДНК. Эффект стимуляции еще более выражен при введении в культуральную среду ядерной фракции РНК (Т-РНК). Под действием данного препарата уровень синтеза ДНК к 12 ч инкубации возрастал на 39% по сравнению с контролем, к 24 ч это увеличение составляло 32,2% ($p<0,05$).

При изучении синтеза РНК в культуре деконсервированной миелоидной ткани показано, что при инкубации клеток костного мозга с тотальной клеточной РНК из печени эмбриона удельная активность РНК деконсервированных миелокариоцитов спустя 3 ч от начала культивирования была выше, чем в контрольных пробах на 41% ($p<0,05$). Эта тенденция сохранялась на протяжении всего периода инкубации, хотя в остальные сроки различия были недостоверны. Наиболее интенсивная стимуляция синтеза РНК в клетках деконсервированного костного мозга наблюдалась при использовании ядерной фракции РНК печени эм-

Матеріал, захищений авторським правом

бриона (Т-РНК). Под влиянием препарата Т-РНК удельная активность РНК деконсервированных миелокариоцитов возрастала на 62% в первые 3 ч инкубации ($p<0,05$).

Достоверное увеличение удельной активности РНК в клетках деконсервированного костного мозга после воздействия препарата Т-РНК отмечено во все сроки наблюдения и составляло к 6, 12 и 24-м ч соответственно 39, 40 и 34% ($p<0,05$) по отношению к удельной активности РНК деконсервированных миелокариоцитов, культивируемых без препаратов РНК.

При изучении синтеза белка в суспензионной культуре костного мозга показано, что под действием препаратов РНК из печени эмбриона значительно увеличивалась интенсивность включения меченых аминокислот в белки деконсервированных миелокариоцитов, причем наиболее высокой эффективностью обладал препарат Т-РНК, в результате применения которого удельная активность белка в клетках деконсервированного костного мозга увеличивалась через 3 и 6 ч культивирования соответственно на 101 и 85% ($p<0,05$), а к 12 ч это увеличение составляло 52% ($p<0,05$). Спустя 24 ч тенденция к усилению синтеза белка в клетках деконсервированного костного мозга под влиянием препарата РНК сохранялась, однако различия были статистически недостоверны.

Введение в суспензионную культуру деконсервированной миелоидной ткани препаратов дрожжевой РНК и гидролизата РНК печени эмбриона не оказывало существенного влияния на интенсивность включения радиоактивных предшественников в нуклеиновые кислоты и белки деконсервированного костного мозга.

Подводя итог этому разделу работы, можно сделать вывод, что после низкотемпературной консервации в клетках костного мозга наблюдаются определенные изменения, выражающиеся в снижении уровня синтеза белка и нуклеиновых кислот. Использование в качестве стимуляторов препаратов тотальной клеточной РНК из печени эмбриона человека и особенно ее ядерной фракции (Т-РНК) способствует усилению течения восстановительных процессов в деконсервированных клетках, о чем свидетельствует возрастание уровня ДНК, РНК и белка в клетках деконсервированной миелоидной ткани, в то время как препараты дрожжевой РНК, а также гидролизат РНК стимулирующего действия не оказывают.

Для более полной характеристики процессов, проходящих в клетках костного мозга после деконсервации, проведено сравнительное изучение седиментационных свойств РНК, выделенной из нативной и деконсервированной миелоидной ткани. Показано, что после низкотемпературной консервации в клетках костного мозга наблюдается заметная деградация высокомолекулярных фракций РНК, о чем свидетельствуют значительное снижение уровня радиоактивности в зоне 28S и 18S, а также полное исчезновение пика радиоактивности в области 45 — 32S. Одновременно отмечался существенный прирост радиоактивности в зоне градиента с низким коэффициентом седиментации (2-4S).

Инкубация клеток деконсервированного костного мозга с препаратом экзогенной РНК способствует сохранению высокомолекулярных фракций РНК, о чем свидетельствует наличие пика радиоактивности в зоне градиента 45 — 32S, а также высокая удельная активность 28 и 18S РНК.

Таким образом, одним из возможных механизмов, вызывающих снижение уровня синтеза белка в клетках костного мозга после криоконсервации, является деградация высокополимерных РНК, вызванная, очевидно, активацией латентных нуклеаз. Добавление препаратов экзогенной РНК к деконсервированным клеткам может, по-видимому, насыщать фермент субстратом, как это было показано на ткани селе-

Матеріал, захищений авторським правом

зенки [18], и таким образом защищать собственную РНК от нуклеазной активности. Причем предохранять собственные РНК от деградации могут не только молекулы высокополимерной экзогенной РНК, но также их олигонуклеотидные блоки [24].

Различная эффективность используемых препаратов РНК может быть связана с разной скоростью их проникновения в клетки. По данным литературы [16], 18S РНК проникает в клетки быстрее, чем 28S и 4S РНК, а следовательно, количество попавшего субстрата зависит от вида используемой РНК.

В связи с тем что в опытах in vitro наблюдалось выраженное стимулирующее действие препаратов РНК на процессы метаболизма в клетках деконсервированного костного мозга, представлялось целесообразным использовать раздельно и комбинированно экзогенные нуклеиновые кислоты ДНК и РНК для стимуляции пролиферативной активности и дифференцировки деконсервированных миелокариоцитов, трансплантированных облученным реципиентам.

Учитывая результаты контрольных опытов по подбору оптимальной дозы и схемы применения РНК, препараты РНК вводили внутривенно на пятые сут после трансплантации костного мозга.

В случае введения дрожжевой РНК на 5-е сут после трансплантации деконсервированной миелоидной ткани количество и размер колоний к 8-м сут существенно не изменялись, однако к 12-м сут их содержание достоверно увеличивалось (на 65,5%) по сравнению с группой животных, которым был пересажен деконсервированный костный мозг.

Под влиянием РНК селезенки, введенной по аналогичной схеме, уже к 8-му дню наблюдалась значительная стимуляция пролиферативной активности деконсервированных миелокариоцитов. Число колоний у животных данной группы составляло 63,1% интактного контроля ($p<0,05$), в то время как количество колоний, образованных к этому сроку клетками деконсервированного костного мозга, составляло 7,9% контроля ($p<0,05$).

При введении препарата ДНК отмечалась определенная зависимость между сроками введения препарата и интенсивностью стимулирующего действия. Так, наибольшее число колоний в селезенках реципиентов отмечалось в случае применения препарата одновременно с костным мозгом ($14,4\pm0,8$).

По мере увеличения срока между имплантацией костного мозга и введением ДНК значения этого показателя снижались. Однако даже при введении ДНК на 5-е сут после трансплантации костного мозга количество колоний в селезенках реципиентов данной группы достоверно превышало ($p<0,05$) их содержание в селезенках мышей, защищенных только деконсервированным костным мозгом ($8,3\pm0,9 : 4,5\pm0,6$; $p<0,05$).

Дифференцированные колонии у реципиентов, которым ДНК и костный мозг вводили одновременно, составляли 93,2%. При введении ДНК во все остальные сроки процент дифференцированных колоний был несколько ниже.

При изучении влияния комбинированного применения ДНК и РНК на пролиферативную активность и скорость дифференцировки миелокариоцитов показано, что так же, как и при введении только ДНК, максимальное число колоний в селезенках реципиентов отмечалось при введении нуклеиновых кислот одновременно с костным мозгом ($16,5\pm\pm2,1$).

При гистологическом изучении селезенок установлено, что максимальная стимуляция процессов клеточной дифференцировки отмечалась при введении нуклеиновых кислот одновременно с костным мозгом. В этом случае процент дифференциальных колоний равнялся

Матеріал, захищений авторським правом

91,4%, а соотношение колоний эритроидно-гранулоцитарного типа составляло 2,3 : 1.

Эндогенные колонии, образованные стволовыми клетками реципиента при введении препаратов ДНК и РНК, состояли преимущественно из недифференцированных клеточных элементов (52,7% недифференцированных колоний).

При использовании в качестве донорского материала клеток, содержащих хромосомные маркеры T_6T_6, установлено, что на 8-е сут после трансплантации костного мозга как без препаратов, так и с препаратами ДНК и РНК клетки донорского типа определялись в селезенке и в костном мозге реципиентов, составляя 100% делящейся популяции. Причем в последнем случае клетки донорского типа составляли абсолютное большинство делящейся популяции независимо от срока введения препарата.

Таким образом, с помощью данного метода показано, что ускорение пролиферативной активности и течения процессов клеточной дифференцировки обусловлено стимуляцией нуклеиновыми кислотами указанных выше свойств донорских стволовых клеток.

Учитывая тот факт, что препараты ДНК и РНК оказывают выраженный стимулирующий эффект на пролиферативную активность и скорость дифференцировки деконсервированных миелокариоцитов, в следующей серии экспериментов проведено изучение возможного влияния комбинированного применения препаратов на терапевтическую эффективность трансплантации деконсервированного костного мозга.

Облучение мышей в дозе 850 р вызывало их 100%-ную гибель уже к 20-му дню после облучения. При этом бóльшая половина животных погибала до 10-го дня.

Трансплантация деконсервированного костного мозга оказывала выраженный защитный эффект, в результате гибель облученных реципиентов к 30-м сут не превышала 29,6±2,9% общего числа защищенных реципиентов. Под влиянием препаратов ДНК и РНК защитный потенциал костного мозга повышался, о чем свидетельствовало достоверное снижение количества погибших реципиентов к 30-м сут (19,3± ±1,5 : 29,6±2,9%; $p<0,05$).

Защитный эффект трансплантации костного мозга в сочетании с нуклеиновыми кислотами зависел от схемы применения препаратов: двукратное комбинированное введение ДНК и РНК (одновременно с костным мозгом+на следующий день после трансплантации) вызывало достоверное снижение показателя смертности животных к 30-м сут по сравнению с группой мышей, которым ДНК и РНК вводили с костным мозгом однократно (13,9±1,7%:19,3±1,5%; $p<0,05$).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что препараты экзогенной ДНК оказывают стимулирующее действие на пролиферативную активность деконсервированных миелокариоцитов. Данный эффект зависит от дозы и срока введения препарата. Максимальное его проявление наблюдалось в случае применения препарата одновременно с миелотрансфузией или на 2-е сут после нее.

При обсуждении механизма влияния препарата ДНК на деконсервированные миелокариоциты можно предположить, что антилучевое и стимулирующее гемопоэз действия ДНК связан со снижением ДНКазной активности как в деконсервированных [20], так и в облученных клетках [13].

Кроме того, экзогенную ДНК можно использовать для пополнения пула предшественников, стимулирующих биосинтетические процессы в клетках.

Не исключено, что экзогенные нуклеиновые кислоты могут оказывать на деконсервированные клетки костного мозга множественное действие, включающее перечисленные выше механизмы.

Матеріал, захищений авторським правом

Анализируя полученные результаты, можно отметить следующее. После низкотемпературной консервации клетки костного мозга претерпевают определенные изменения. В опытах in vitro установлено, что в деконсервированных миелокариоцитах в течение определенного промежутка времени отмечается снижение метаболической активности — снижение синтеза ДНК, РНК и белка. Это коррелирует с результатами, полученными в опытах in vivo.

Показано, что деконсервированные миелокариоциты приживляются в миелоидных и лимфоидных органах облученного реципиента. В то же время пролиферативная активность и скорость дифференцировки деконсервированных стволовых клеток в течение определенного промежутка времени после трансплантации снижены по сравнению с нативными, что находится в соответствии с результатами, полученными другими авторами [5 — 7].

Топография расселения клеток деконсервированного костного мозга не отличается от таковой нативных миелокариоцитов. Однако в ранние сроки после трансплантации (5-е сут) процент клеток донорского типа был достоверно ниже в костном мозге, селезенке и лимфоузлах реципиентов, защищенных деконсервированными миелокариоцитами. В этот же срок в костном мозге, селезенке и лимфоузлах отмечалось значительное снижение митотической активности клеток деконсервированного трансплантата.

Учитывая, что процент делящихся клеток донорского типа зависит от степени пролиферативной активности введенных клеток, можно предположить, что имеющиеся различия в процентном содержании донорских клеток нативного и деконсервированного костного мозга на 5-е сут обусловлены более низкой пролиферативной активностью деконсервированных миелокариоцитов.

По всей видимости, этим можно объяснить и запаздывание восстановления активности клеток лимфоидного пула, дифференцирующихся из деконсервированных стволовых клеток и реализующих в организме летально облученных реципиентов иммунные реакции на эритроциты барана.

На основании полученных результатов можно сделать ряд выводов.

1. После низкотемпературной консервации миелокариоцитов при условиях, выбранных в данных экспериментах, сохраняется около 68—70% стволовых клеток.
2. Пролиферативная активность и скорость дифференцировки деконсервированных миелокариоцитов в течение определенного промежутка времени после размораживания снижены.
3. Деконсервированные миелокариоциты приживляются и пролиферируют как в миелоидных, так и в лимфоидных органах облученных реципиентов.
4. Деконсервированные стволовые клетки способны дифференцироваться в лимфоидный росток кроветворения, восстанавливая иммунологическую реактивность летально облученных реципиентов на эритроциты барана.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Георгиев Г. П., Мантьева В. А.* Информационная и рибосомальная РНК хромосомно-ядрышкового аппарата, методы разделения и нуклеотидный состав. — Биохимия, 1962, 23, № 5, с. 949—953.
2. *Кеннелл Д.* Методы определения радиоактивности РНК, ДНК, белка. — В кн.: Методы исследования нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1970, с. 138—144.
3. *Лихтенштейн А. В.* Фракционирование ядерных и цитоплазматических РНК печени крыс на колонке МАК. — Докл. АН СССР, 1970, 193, № 4, с. 936—939.
4. *Лучник Н. В.* Влияние дрожжевых экстрактов на облученные организмы. — Биохимия, 1958, 23, № 4, с. 146—153.
5. *Лаврик С. С., Муравова Л. П.* Иммунологические реакции при гомотрансплантации костного мозга, консервированного глубоким замораживанием в жидком азоте. —

Матеріал, захищений авторським правом

В кн.: Тр. симпоз. по трансплантации органов и тканей. М.: Медицина, с. 320—321.
6. *Федотенков А. Г., Данилова Л. А., Алексеева Л. П.* Влияние различных режимов замораживания на пролиферативную активность и дифференцировку родоначальных клеток костного мозга. — Пробл. гематологии и переливания крови, 1971, **16**, № 8, с. 21—25.
7. *Пушкарь Н. С., Иткин Ю. А.* Влияние скорости замораживания на сохранность клеток костного мозга при консервировании низкими температурами. — В кн.: Тез. докл. 3-я обл. науч.-практ. конф. по вопр. онкологии. Харьков, 1967, с. 101—102.
8. *Шехтер С. Ю.* Культивирование костного мозга в виде суспензии для изучения эритропоэтической активности плазмы. — Патол. физиология и эксперим. терапия, 1965, **9**, № 2, с. 81—83.
9. *Albaum H. G., Umbereit W. W.* Differentiation between riboso-3-phosphate and riboso-5-phosphate by means of the orcinolpentose reaction. — J. Biol. Chem., 1947, **167**, N 2, p. 369—373.
10. *Becker A. J., McCulloch E. A., Till J. E.* Cytologikal demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. — Blood, 1963, **26**, N 2, p. 296—308.
11. *Jerne N. K., Nordin A. A.* Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. — Science, 1963, **140**, N 4, p. 405—406.
12. *Dische Z., Colowick S. P.* Methods in enzymology. — New York: Acad. press, 1957, 3, N 1, p. 99—103.
13. *Duplan S. F., Ehert B., Leynand E.* Die wiederherstellunge Wirkung der Heferibonukleinsäure auf die bestrahlte Blutbildungsorganzeller. — Atomkernenergie, 1971, **18**, N 2, S. 97—100.
14. *Ebel I. P., Beck C., Keith G. et al.* Study the cherapeutic effect on irradiated mice of sulbstances contained in RNA preparations. — Int. J. Radiat. Biol., 1969, **16**, N 3, p. 201—209.
15. *Ford C. E., Hamerton J. L., Barner D. W. et al.* Cytological identification of radiation chimeras. — Nature, 1956, **177**, N 2, p. 452—454.
16. *Kanehisa Takeharu, Oki Yoshio, Ikuta Kazujoski.* Partial specificity of low molecular weight RNA that stimulates RNA synthesis in various eissues. — Arch. Biochem. and Biophys., 1974, **165**, N 1, p. 146—152.
17. *Kirby K. S.* A new method for isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues. — Biochem. J., 1956, **64**, N 3, p. 405—408.
18. *La Via M. F., Vatter A. E., Hammond W. S., Northup P. V.* The nature of polysomes isolated from spleen cells of rats stimulated by antigen. — Proc. Nat. Acad. Sci., 1967, **57**, N 1, p. 79—84.
19. *Leuchars E., Davies A. J. S., Wallis V.* Studies on T-ceil precursors. — Int. Arch. Allergy and Appl. Immunol., 1973, **45**, N 1-2, p. 237—239.
20. *Maisin J., Dunjic A., Dumont P.* Restorative action of yeast ribonucleic acid and its mixed nucleotides on bone-marrow death induced in rats by Myleran. — Int. J. Radiat. Biol., 1965, **5**, N 3, p. 291—296.
21. *Malinin T.* Injury of human polymorphonuclear granul ocytes in the presence of cryoprotective agents. — Gryobiology, 1972, **9**, N 2, p. 123—130.
22. *Martin R. G., Ames B. N.* A method for determining the sedimentation behaviour of enzymes: application to protein mixtures. — J. Biol. Chem., 1961, **236**, N 5, p. 1372—1379.
23. *Mosimann W., Furlan M, Beck E. A., Bucher V.* Zellkonservierung durch Tiefktlhlung. — Schweiz. med. Wochen schr., 1972, **102**, N 44, s. 1600—1602.
24. *Natori S., Yogo Y., Mizuno D.* Inhibition by oligonucleotides of the antidegradation of ribosomal and messenger RNA in cell free preparations from ribonuclease J-Less Bacteria. — Biochim. et biephys. acta, 1967, **145**, N 3, p. 621—628.
25. *Nowell P. C., Wilson D. B.* Lymphocytes and hemic stem cells. — Amer. J. Pathol., 1971, **65**, N 3, p. 641—652.
26. *Takada A., Takada Y., Chester C. et al.* Biphasic pattern of thymus regeneration after whole-body irradiation. — J. Exp. Med. (USA), 1969, **129**, N 3, p. 445.
27. *Takada A., Takada Y.* Proliferation of donor hematopoietic cells in irradiated and unirradiated host mice. — Transplantation, 1971, **12**, N 4, p. 334—337.
28. *Takada A., Takada Y.* Proliferation of bone marrow and thymus cells in the myeloid and lymphoid organs of irradiated syngeneic hoct mice. — J. Exp. Med., 1973, **137**, N 2, p. 543—546.
29. *Urso P., Congdon C. C.* Short-term preservation of mouse bone marrow at refrigerator temperature for irradiation experiments. — J. Appl. Physiol., 1957, **10**, N 2, p. 314—323.
30. *Wallis V., Leuchars E., Chwalinski S. et al.* On the sparce seeding of bone marrow and thymus in radiation chimeras. — Transplantation, 1975, **19**, N 1, p. 2.
31. *Wilhelm G.* Über eine Ribonukleoproteidgruppe mit zelldifferenzierenden Eigenschaften und ihre Beziehung zur Immunologie. — Arzneimittel-Forsch., 1972, **22**, N 10, p. 1800—1808.

Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
05.07.77

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043:001.05

А. С. Черепнев, Р. К. Хайкин, С. И. Ткаченко,
С. В. Руденко

ПРИНЦИПЫ ПОСТРОЕНИЯ КИБЕРНЕТИЧЕСКИХ СИСТЕМ В ОБЛАСТИ КРИОБИОЛОГИИ

Криогенная медико-биологическая аппаратура не может проектироваться вне связи с биологическим объектом. Поэтому предметом нашего обсуждения являются системы, включающие биологические объекты и технические устройства, в которых в результате низкотемпературного и других вещественно-энергетических воздействий на биообъект достигается полезный эффект, соответствующий назначению системы. В них протекают процессы управления состоянием живой материи и параметрами всех воздействий, изучением которых занимаются биокибернетика и техническая кибернетика. Предлагаем такие системы называть криобиокибернетическими (КБКС), что хорошо согласуется с принятой в системологии [1] классификацией.

Качественные показатели и темпы разработки КБКС отстают от современных требований. Это объясняется использованием некоторых традиционно сложившихся принципов проектирования, а внедрение новых технических идей тормозится недостаточным уровнем разработки теоретических вопросов построения этих систем. Ввиду большого функционального и конструктивного разнообразия КБКС необходима определенная специализация разработок теоретических вопросов построения этих систем. В данной статье рассматриваются общесистемные теоретико-методологические принципы и подходы к математическому моделированию свойств биологических объектов. Обсуждение вопросов постановочное, поскольку исследования по этой проблеме только начинаются.

Некоторые общесистемные теоретико-методологические вопросы. В системологии разрабатываются три вида описания: морфологические (состав системы, связи между элементами), функциональное (описание процессов взаимодействия между элементами), информационное (организация управления и адаптации к условиям среды). Все они необходимы для построения модели системы, с помощью которой можно было бы решать практические задачи по синтезу и оптимизации КБКС. Выделим следующие теоретико-методологические вопросы: разработку основных общесистемных методологических принципов построения КБКС; разработку принципов управления состоянием биообъектов в КБКС.

1. **Основные общесистемные методологические принципы построения КБКС.** Каждая КБКС выполняет одну или несколько целевых функций, отражающих ее назначение. Например, в системе, предназначенной для консервации объектов, целесообразно выделить целевые функции: замораживание, хранение и размораживание.

Для оценки качества выполнения системой каждой функции следует ввести понятие функциональной эффективности. Эффективность выполнения системой i-й целевой функции будем оценивать показателем $Э_i$, представляющим количественную меру степени успеха при выполнении данной функции. Совокупность всех показателей $Э_i$ определяет общую эффективность системы.

В соответствии с принятыми в теории систем принципами показатель функциональной эффективности $Э_i$ должен учитывать полезный эффект, достигаемый при выполнении данной функции (оценивается показателем $Q_{пi}$), и затраты, связанные с выполнением функции (оце-

Матеріал, захищений авторським правом

ниваются показатели $Q_{зi}$). В случае, когда затраты можно не учитывать, $Э_i = Q_{пi}$.

Показатель полезного эффекта $Q_{пi}$ должен отражать достигаемую при выполнении i-й функции степень обеспечения предъявленных к системе медико-технических требований. Полезный выходной эффект КБКС в большинстве случаев определяется количеством и качеством (или только качеством) биоматериала, прошедшего полный цикл обработки. В частности, полезный эффект системы для консервации, хранения и расконсервации биологических объектов должен оцениваться набором показателей $q_{пij}$, которые характеризуют количество (производительность) расконсервированного материала и его свойства (функциональные, иммунологические и др.).

Для определения $q_{пij}$ системология дает рекомендацию [1]. Показатели качества одной из функций системы должны определяться показателями, характеризующими полезный эффект всей системы, при условии, что все остальные функции система выполняет идеально, т. е. без снижения полезного эффекта. Применительно к функции консервации эта рекомендация означает, что $q_{пj}$ — это показатели количества и свойств деконсервированного материала, определенные при условии, что хранение и расконсервация проводятся идеально.

Применительно к некоторым типам КБКС такая рекомендация может показаться нереалистичной, поскольку многие важные свойства биообъектов могут быть определены экспериментально только после хранения и расконсервации, которые практически не идеальны и потому не позволяют выделить в чистом виде показатели качества консервации. Несмотря на это, мы считаем, что только такой подход позволяет оценивать все функции системы по преобразованию биоматериала одинаковыми по смыслу показателями и раздельно определять тот вклад, который дает каждая функция в общий полезный эффект. Методы определения показателей эффективности $Э_i$ можно найти в работах [1, 2].

При определении показателей эффективности в системологии [1] рекомендуется использовать иерархическую процедуру определения показателей качества системы $q_{пij}$ $(q_{зij})$.

На первом уровне рассматривается морфологическая структура системы, определяющая ее состав и основные взаимосвязи. В КБКС при моделировании на общесистемном уровне удобно выделить следующие подсистемы: биологический объект; внутреннюю среду — подсистему, в которой осуществляется вещественно-энергетическое воздействие на биообъект; техническую часть — подсистему, содержащую устрой-

Схема 1. Структура криобиокибернетической системы.

Матеріал, захищений авторським правом

ства (управляющие, измерительные, исполнительные и т. д.) различного назначения; внешнюю среду — пространство, в котором размещена система и откуда она получает вещество и энергию, необходимые для ее функционирования. Далее следует определить множество $F^{(1)}(t)$ процессов первого порядка взаимодействия между основными подсистемами. Так, например, применительно к схеме КБКС множество $F^{(1)}(t)$ включает подмножество процессов взаимодействия: между биологическим объектом и внутренней средой $F_{12}^{(1)}(t)$ при заданных параметрах внешней среды; между внутренней средой и техническими элементами системы $F_{23}^{(1)}(t)$ при заданных параметрах внешней среды; между технической частью и внешней средой $F_{34}^{(1)}(t)$.

Протекание процессов взаимодействия $F_{12}^{(1)}(t)$ за время τ_i выполнения i-й функции определяет свойства биологического объекта, поэтому показатели $q_{\text{п}ij}$ являются функционалами, определенными на множестве процессов $F_{12}^{(1)}(t)$, протекающих в течение τ_i: $q_{\text{п}ij}=\varphi_{\text{п}ij}[F_{12}^{(1)}(t); \tau_i]$. Точно так же технические показатели $q_{\text{т}ij}$, характеризующие параметры внутренней среды и качество регулирования, являются функционалами $q_{\text{т}ij}=\varphi_{\text{т}ij}[F_{23}^{(1)}(t); \tau_i]$.

Показатели, характеризующие затраты на выполнение i-й функции, в основном определяются процессами взаимодействия между технической частью КБКС и внешней средой, т. е. $q_{\text{з}ij}=\varphi_{\text{з}ij}[F_{34}^{(1)}(t); \tau_i]$.

Процессы взаимодействия первого порядка зависят в свою очередь от показателей, характеризующих внутренние свойства взаимодействующих подсистем. Например, протекание процессов взаимодействия между биологическим объектом и внутренней средой безусловно зависит от множества внутренних показателей биообъекта $Q_{i1}^{(2)}$ и внутренней среды $Q_{i2}^{(2)}$, т. е. $F_{12}^{(1)}(t)=F_{12}^{(1)}(t, Q_{i1}^{(2)}; Q_{i2}^{(2)})$.

Для определения внутренних показателей $Q^{(2)}$ следует производить моделирование на втором уровне — на уровне основных подсистем. Это означает, что следует описать морфологию каждой подсистемы, выделить процессы второго порядка — взаимодействия между элементами подсистем $F^{(2)}(t)$ и определить показатели $Q^{(2)}$ как функционалы, определенные на множество процессов $F^{(2)}(t)$, которые зависят от показателей $Q^{(3)}$. Подобную иерархическую процедуру следует продолжать до некоторого уровня, зависящего от степени сложности системы.

Обсудим в этой связи некоторые специфические особенности и трудности моделирования КБКС.

Специфические для КБКС трудности возникают при определении требований к техническим устройствам. Требования к энергетическим, временным, точностным параметрам программ всех видов воздействий на биообъекты и методам их корректировки, законы изменения параметров биологических объектов и внутренней среды КБКС могут быть определены только на основе моделирования $F_{12}^{(1)}(t, Q_{i1}^{(2)}; Q_{i2}^{(2)})$, определения показателей $q_{\text{п}ij}$ и функциональных эффективностей $Э_i$ системы.

Биообъекты во многом еще не познаны, а процессы, которые изучены, не поддаются адекватному математическому описанию. По этим причинам биообъекты являются слабо формализуемыми системами, т. е. такими, для которых возможно построить лишь очень приближенные гомоморфные модели. Кроме того, и биообъект, и внутренняя

Матеріал, захищений авторським правом

среда стохастичны. Случайность поведения биологического объекта обусловлена, во-первых, тем, что в поведении каждой клетки наряду с детерминированной компонентой имеется случайная составляющая. Это означает, что имеет место случайность состояния клетки $b=(b_1, ..., b_2)$ при фиксированных параметрах среды $c=(c_1 ..., c_m)$. Во-вторых, клетки случайным образом отличаются одна от другой по параметрам $\bar{\alpha}=(\alpha_1, ..., \alpha_к)$, характеризующим индивидуальные ее возможности, т. е. для каждой клетки нужно рассматривать условную плотность вероятностей $f(\bar{b}/\bar{c}, \bar{\alpha})$.

Внутренняя среда стохастична, поскольку на ее поведение в принципе влияют случайные воздействия внешней среды, взаимодействие со случайным биологическим объектом, случайные управляющие воздействия, формируемые техническими элементами. Влияние этих факторов проявляется в том, что каждая малая область среды $\delta c(x, y, z)$. окружающая каждую клетку, может находиться во многих состояниях, которые можно охарактеризовать многомерной плотностью вероятностей $f(\bar{c}, x, y, z)$. Стохастическая картина совместного поведения локального участка среды и взаимодействующей с ней клетки приводят к тому, что возникает совместная локальная неопределенность в их состояниях, которая количественно оценивается локальной энтропией $H(\bar{b}, \bar{c})=H(\bar{b})+H(\bar{c}/\bar{b})$. Локальная неопределенность — причина общей неопределенности в состояниях биологического объекта (Б) и среды (С), характеризуемой энтропией H (Б, С) $=H$(Б) $+H$(С/Б).

Принципы математического моделирования явлений, возникающих при протекании процессов взаимодействия $F_{12}^{(1)}(t)$, позволяют в какой-то мере преодолеть указанные трудности.

1. Ввиду слабоформализованности Б при моделировании всех явлений взаимодействия Б и С следует приближенно учитывать только наиболее существенные факторы.

2. Предметом моделирования в биологических объектах должны быть такие свойства, которые могут быть определены экспериментально. При этом сохраняется возможность коррекции математических моделей по результатам экспериментов.

3. В тех случаях, когда при моделировании свойств биообъекта возникает необходимость учета внутренних процессов в клетках, будем считать допустимым использование правдоподобных гипотез о характере этих процессов.

В соответствии с первым принципом при учете стохастичности биообъекта и среды необходимы следующие упрощения: а) достаточно высокая организация клетки позволяет пренебречь случайностью в ее поведении при фиксированных условиях среды $\bar{c}$ и ее внутренних свойств $\bar{\alpha}$. При этом предположении следует рассматривать состояние поведения клетки $\bar{b}$ как заданную функцию $\bar{b}=\bar{b}(\bar{\alpha}, \bar{c})$ текущих случайных параметров $\bar{\alpha}$ и $\bar{c}$; б) все однотипные клетки биологического объекта будем считать статистически независимыми и имеющими одинаковые плотности вероятностей параметров $\bar{\alpha}$. Это означает, что многомерная плотность распределения совокупности параметров $A=(\bar{\alpha}_1, ..., \bar{\alpha}_N)N$ однотипных клеток равна $f(A)=[f(\alpha)]^N$; в) влияние параметров внутренней среды на поведение и свойства биологического объекта проявляется значительно больше, чем обратное влияние объекта на среду. Поэтому в первом приближении будем считать среду независимой от объекта и справедливыми следующие соотношения для совместной плотности вероятностей $f(\bar{\alpha}, \bar{c})=f(\bar{\alpha})f(\bar{c})$ и энтропии H(Б, С) $=H$(Б) $+$ $+H$(С); г) при описании неопределенности (стохастичности) параме-

Матеріал, захищений авторським правом

тров среды можно предположить, что при фиксированных параметрах внешней среды $\bar{\beta}=(\beta_1 \ldots \beta_p)$ параметры внутренней среды описываются заданной функцией $\bar{c}=c(x, y, z, \bar{u}, \bar{\beta})$ координат x, y, z и управляющих воздействий $\bar{u}=(u_1 \ldots u_R)$.

2. **Принципы управления состоянием биообъекта в КБКС.** Эффективность КБКС зависит как от вида физического воздействия на биообъект, так и от законов управления этими воздействиями. Поэтому принципы воздействия на биообъект, принципы управления воздействиями и способы построения систем автоматического управления (САУ) являются важнейшими вопросами обсуждаемой проблемы. Ограниченность существующих КБКС состоит в том, что в большинстве из них применяется только одно из физических воздействий — низкотемпературное. Между тем известно, что влияния других воздействий то стимулируют некоторые проявления жизнедеятельности, то оказывают угнетающий, повреждающий эффект. Представляется целесообразным изучение возможностей применения в КБКС кроме низкотемпературного других физических воздействий, удовлетворяющих следующим требованиям.

При определенных параметрах физическое воздействие должно обладать стимулирующим влиянием на свойства биообъекта, хотя не исключено, что при других параметрах воздействие будет оказывать повреждающий эффект.

Физическое воздействие должно оказывать такое влияние на внутреннюю среду в КБКС, чтобы она способствовала формированию криопротектирующих свойств или усилению действия существующих криопротекторов.

Устройства, формирующие другие физические воздействия, должны хорошо совмещаться с аппаратурой, обеспечивающей низкотемпературное воздействие на биообъект.

Многочисленные работы по влиянию различных физических воздействий на жизненные проявления биообъектов показывают, что первому требованию удовлетворяют следующие воздействия: звуковые и ультразвуковые колебания, электростатические и низкочастотные электрические поля, электромагнитные излучения (это относится в первую очередь к красному излучению и УФ-излучению), СВЧ [3—6].

Второму требованию, по нашему мнению, могут удовлетворить ультразвуковые колебания, изменяющие характер кристаллизации суспензий и электростатические поля, которые могут ослабить действие гиперконцентрированных растворов. Предполагается, что центрифугирование охлаждаемой суспензии совместно с электростатическим полем может позволит предотвратить ряд клеточных повреждений за счет отделения клеток от гипертонических растворов и льда.

Третьему требованию удовлетворяют воздействия электрическим полем, световым облучением, ультразвуковыми и звуковыми колебаниями.

Мы считаем, что первоочередными являются исследования по применению в КБКС ультразвука и электрического поля.

Большинство разработанных до настоящего времени КБКС имеют САУ, обеспечивающие управление по заданной программе и построенные по принципу регулирования по отклонению. Этот принцип заключается в выработке управляющего воздействия на основе информации об отклонении управляемой величины от требуемого (заданного) значения. Однако такие САУ являются недостаточно эффективными при низкотемпературной консервации биообъектов. Это объясняется, по нашему мнению, следующими причинами.

Системы автоматического управления, реализующие приведенные принципы, имеют постоянную внутреннюю структуру (неизменные пе-

Матеріал, захищений авторським правом

редаточные функции звеньев, составляющих САУ), в то время как теплофизические характеристики внутренней среды системы существенно изменяются при охлаждении. Такое несоответствие приводит к тому, что качество управления воздействием удовлетворительное, на одном временном интервале программы и неудовлетворительное на другом.

Указанные САУ реализуют заданные программы управления воздействием, не учитывая при этом текущее и прогнозируемое состояния биообъекта. Вместе с тем заданная программа воздействия может оказаться далеко не наилучшей для данного биоматериала.

Эти недостатки в значительной мере снижаются в адаптивных САУ, способных изменять свою внутреннюю структуру и корректировать программу воздействия в зависимости от текущего состояния внутренней среды и биологического объекта. В отличие от обычной САУ адаптивная САУ (см. схему 2) имеет дополнительный контур регули-

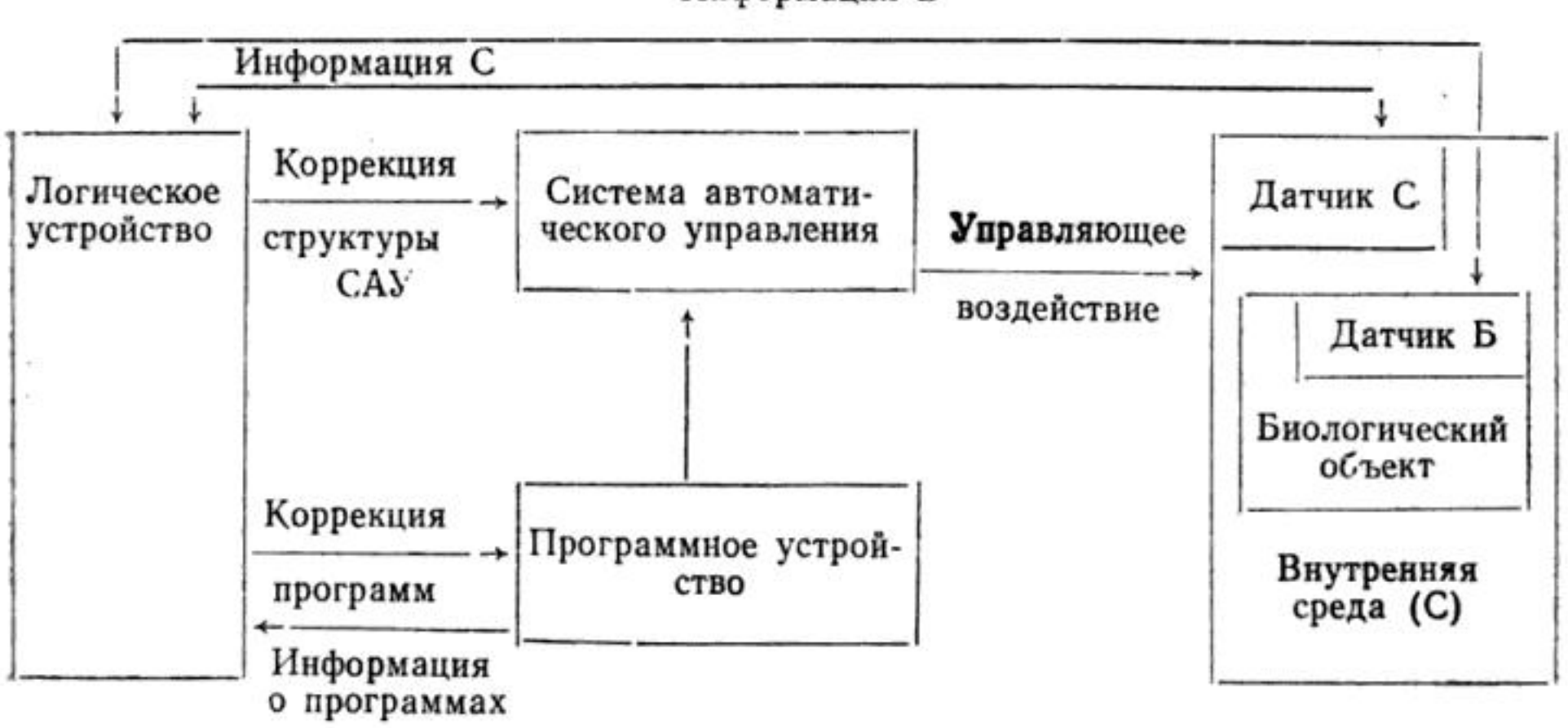


Схема 2. Адаптивная система автоматического управления воздействием на биообъект.

рования (адаптации), включающий датчики информации о состоянии биологического объекта и внутренней среды и логическое устройство, формирующее команды для корректировки программы и изменения внутренней структуры САУ. Таким образом, разработка адаптивных САУ для криобиокибернетических систем возможна при условии, что будут найдены методы получения информации о текущем состоянии биоматериала и обоснованы алгоритмы обработки этой информации в целях адаптации системы.

Решению этой задачи способствовало бы изучение электрических характеристик биоматериалов и развитие методов математического моделирования их свойств.

3. **О возможных подходах к математическому моделированию свойств биологических объектов.** Задача разработки математических моделей свойств биологических объектов, изменяющихся при функционировании КБКС, очень сложна, и пока можно только лишь обсуждать подходы к ее решению. На первом этапе работы имеет смысл ограничиться моделированием только тех свойств, которые являются важнейшими, наиболее изученными и определяемыми в экспериментах (например, жизнеспособность). Ввиду многообразия биообъектов следует считать бесперспективной попытку создавать для каждого из них свою модель. На наш взгляд, целесообразнее выделить среди биологических объектов классы однотипных объектов (клеточные суспензии, ткани и т. д.) и попытаться для каждого класса построить легко варьируемую универсальную модель. Вариация модели должна осуществляться за счет

Матеріал, захищений авторським правом

параметров, определяемых экспериментально для каждого типа биообъекта, относящегося к данному классу. Рассмотрим два подхода к построению таких моделей.

Первый подход — попытка разработать модель для оценки жизнеспособности однотипных клеток в процессе консервации-расконсервации на основе теории криоповреждений и криопротекции. Модель базируется на следующих идеях.

Процесс консервации и расконсервации разбивается на характерные с точки зрения повреждений этапы, обстоятельно обоснованные Н. С. Пушкарем [7]. На каждом этапе выделяются основные факторы криоповреждений и выбираются такие показатели z_i, характеризующие влияние i-го фактора на жизнеспособность, которые могут быть определены в экспериментах (например, для фактора дегидратации клеток показателем может быть относительная потеря клетками воды).

Для каждого показателя z_i выбирается математическая модель на основе следующих положений:

а) z_i представляет функционал, определенный на множестве законов $F_i(t, \bar{c}, \bar{\alpha})$, отражающих изменение во времени фактора криоповреждений, а также учитывающих параметры внутренней среды $c(t)$ и параметры биоматериала $\bar{\alpha}$. Функционал определяется за время τ_i действия i-го фактора: $z_i = \varphi_i[F_i(t, \bar{c}, \bar{\alpha}, \tau_i)]$;

б) параметры биоматериала α должны удовлетворять требованиям: учета возможности биоматериала по противодействию i-му фактору криоповреждений; учета изменения защитных способностей биоматериала по отношению к i-му фактору при различных концентрациях криопротектора; возможности экспериментального определения.

Жизнеспособность биоматериала предполагается оценивать вероятностью выживания клеток $P_ж$, которая определяется как функция $P_ж(\bar{z}, \bar{\Gamma})$ показателей $\bar{z} = (z_1, ..., z_N)$ и параметров $\Gamma = (\nu_1, ..., \nu_m)$, характеризующих свойства данного материала. Функцию $P_ж(\bar{z}, \bar{\Gamma})$ находят методом функционального моделирования [8].

Способ применения модели для нового биоматериала состоит в проведении предварительных частных экспериментов, позволяющих определить параметры $\bar{\alpha}$ и $\bar{\Gamma}$, и в использовании модели для прогнозирования результатов выживания клеток при различных программных воздействиях.

О полезности данной модели можно говорить лишь в том случае, если объем экспериментов по нахождению параметров $\bar{\alpha}$ и $\bar{\Gamma}$ окажется значительно меньше, чем объем полного экспериментального исследования нового биоматериала, а точность модели позволит значительно сократить объем и сроки экспериментов по проверке эффективности методов воздействия.

Модель для оценки свойств биоматериалов при низкотемпературной консервации сложнее предыдущей, так как более универсальна и рассчитана на оценку не только жизнеспособности биоматериала, но и других его свойств.

Изменение свойств биоматериалов в процессе консервации — расконсервации — результат определенных изменений, происшедших в морфологической структуре клетки. Поэтому математическая оценка изменения свойств биоматериала может быть основана на расчетах этих структурных изменений. Для осуществления таких расчетов предполагается разработать вспомогательную информационно-энергетическую модель клетки, которая основывается на следующих представлениях и гипотезах.

Морфологическая структура живой клетки может быть представлена как совокупность подструктур различного назначения (генетиче-

Матеріал, захищений авторським правом

ский аппарат, белок — синтезирующий аппарат и т. д.), являющихся хранителями определенной морфологической информации. При разработке модели клетки должны быть обоснованы методы теоретико-экспериментального определения количества и ценности информации, содержащейся в каждой подструктуре.

Количество информации может быть оценено числом энергетических состояний, в которых может находиться данная подструктура, а ценность — степенью того влияния, которое оказывает убыль содержащейся в ней информации на определенные свойства.

В кибернетической модели клетки можно использовать разработанные в системологии [1] понятия о тезаурусе системы. Тезаурус — информационный ресурс системы, определяющий ее возможности по приему и переработке информации о среде, а также по формированию инструкций, определяющих поведение системы в процессе адаптации к новым условиям среды. Тезаурус может совершенствоваться (изменяться), что означает способность биосистемы к обучению. Эти положения о тезаурусе предполагается частично формализовать путем описания количества получаемой информации о среде и содержания инструкций.

В информационно-энергетической модели клетки предполагается использовать гипотезу [1] о том, что процессы ее взаимодействия со средой происходят в два этапа: сначала быстро на информационном уровне в пределах текущих возможностей тезауруса, а затем на вещественно-энергетическом — со скоростями, зависящими от условий протекания процессов внутреннего и внешнего метаболизма. Использование этой модели позволяет ставить задачи по оптимизации программ воздействия.

В обсуждаемой модели планируется на основе принятой этапизации [7] выделить основные процессы адаптации клетки и криоповреждений. Объектом моделирования является убыль морфологической информации различных клеточных подструктур во время выделенных процессов. При моделировании адаптационных процессов расчет потерь морфологической информации строится на определенных гипотезах: о функциях, описывающих инструкцию тезауруса по перестройке морфологической структуры каждого вида и ее реализацию, о распределении энергетических ресурсов по видам структуры, о функциях, характеризующих восстановление разрушенных структур и требующихся для этого запасов энергии. При моделировании процессов криоповреждений предполагается использовать статистические гипотезы (о плотностях вероятности повреждений в объеме клетки) и некоторые другие подходы, взятые из модели оценки жизнеспособности. При моделировании обоих типов процессов должны использоваться параметры биоматериала, определяемые экспериментально.

Убыль морфологической информации различных клеточных подструктур рассчитывается для некоторой средней клетки данного типа. Оценку свойств биоматериала по убыли морфологической информации предполагается производить с помощью характеристик ее ценности.

Предварительная проработка этой модели привела к выводу о целесообразности проверки двух гипотез. Первая гипотеза состоит в утверждении, что для успешной адаптации к условиям консервации и расконсервации клетки должны потреблять энергию и, следовательно, целесообразно клеточные суспензии на этапе подготовки к консервации насыщать питательными веществами и веществами, способными связывать выходные продукты клеточного метаболизма. Вторая гипотеза заключается в утверждении о способности клеток к обучению, в целесообразности введения в программы замораживания-размораживания «участков» тренировки. Тренировка должна состоять в периодическом кратковременном, но интенсивном воздействии фактором сре-

Матеріал, захищений авторським правом

ды, вызывающим повреждение структуры клетки. Подтверждение этой гипотезы — экспериментальные данные об эффективности предварительной тепловой закалки некоторых растительных и животных клеток, описанные в работе [9].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Дружинин В. В., Конторов Д. С.* Проблемы системологии. — М.: Сов. радио, 1976. — 296 с.
2. *Адлер Ю. П., Маркова Е. В., Грановский Ю. В.* Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий. — М.: Наука, 1976. — 279 с.
3. *Инюшин В. М., Чекуров П. Р.* Биостимуляция лучом лазера и биоплазма. — Алма-Ата : Казахстан, 1975. — 119 с.
4. *Физико-химические* основы действия физических факторов на живой организм и его антиокислительные системы. — В кн.: Сборник статей Московского ветеринарного института. М., 1974. — 213 с.
5. *Медведева Е. П., Бондаренко Н. П., Медведева В. М. и др.* Действие света гелий—неонового лазера на культуру ткани: Предпринт Харьк. Физ.-техн. ин-та.— Харьков, 1974. — 8 с.
6. *Биологическое* действие ультрафиолетового излучения. — М. : Наука, 1975. — 279 с.
7. *Пушкарь Н. С.* Физико-химические основы метода низкотемпературной консервации биологических объектов. — В кн.: Механизмы криоповреждений и криопротекции биологических структур. Киев : Наук. думка, 1976, с. 5—11.
8. *Антомонов Ю. Г.* Моделирование биологических систем : Справочник. — Киев : Наук. думка, 1977.— 259 с.
9. *Александров В. Я.* Клетки, макромолекулы и температура. — Л. : Наука, 1975. — 329 с.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
05.06.77

УДК 57.043.615.832.9:617+536.24

В. Г. Эпштейн, Б. П. Сандомирский

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИБЛИЖЕННОГО РЕШЕНИЯ ТЕРМИЧЕСКОЙ ЗАДАЧИ КРИОХИРУРГИИ

Криохирургический метод все шире применяется в медицинской практике. В локально охлаждаемой ткани возникает температурное поле, которое и является исходным повреждающим фактором. Возможность математического моделирования температурного режима открывает новые перспективы применения криохирургии, так как позволяет предсказать зону поражения по известным параметрам ткани и характеристикам рабочей части зонда.

Численные и аналитические методы решения термической задачи криохирургии приведены в работах [1—8]. Наиболее удобна для практического применения приближенная квазистационарная модель [4]. В настоящей статье проводится анализ области применения этой математической модели.

Сферически симметричное температурное поле, создаваемое криозондом, описывается системой уравнений теплопроводности и граничных условий, которая может быть представлена в безразмерном виде [4]:

в замороженной зоне

$$\nabla^2\Theta_f = \frac{k_u c_f (T_0 - T_{pc})}{k_f L} \frac{\partial\Theta_f}{\partial\tau}, \qquad (1)$$

в незамороженной зоне

$$\nabla^2\Theta_u - \beta\Theta_u = \frac{c_u (T_0 - T_{pc})}{L} \frac{\partial\Theta_u}{\partial\tau}, \qquad (2)$$

Матеріал, захищений авторським правом

граничные условия $\Theta_f=1$ при $R=1$, $\Theta_f=\Theta_{pc}=\Theta_u$, при $R=r^*$, $\Theta_u=\Theta$, если $R\to\infty$,

$$k_f\frac{\partial\Theta_f}{\partial R}=k_u\frac{\partial\Theta_u}{\partial R}-k_u\Theta_{pc}\frac{dr^*}{d\tau},\ \text{при}\ R=r^*. \tag{3}$$

Безразмерные параметры уравнений (1)—(3) связаны с размерными соотношениями

$$\Theta_u=\frac{T_u-T_0}{T_s-T_0},\quad \Theta_f=\frac{T_f-T_0}{T_s-T_0},\quad \Theta_{pc}=\frac{T_{pc}-T_0}{T_s-T_0},$$

$$\Phi=-\frac{k_f}{k_u}\frac{T_{pc}-T_s}{T_{pc}-T_0},\quad R=\frac{r}{r_0},\quad r^*=\frac{R}{r_0},$$

$$\sqrt{\beta}=a=\left(\frac{m_bc_b}{k_u}\right)^{1/2}r_0,\quad \tau=\frac{k_u(T_0-T_{pc})}{\rho Lr_0^2}t,$$

где r — текущая координата температурного поля; r_0 — радиус зонда; R — положение фронта замороженной области; t — время; T_u — температура в незамороженной области; T_f — температура в замороженной области; T_0 — температура на периферии области охлаждения; T_{pc} — температура замерзания ткани; T_s — температура рабочей части зонда; σ — плотность ткани; c_f, c_u, c_b — теплоемкость замороженной, незамороженной ткани и крови соответственно; k_f, k_u — теплопроводность замороженной и незамороженной тканей; L — теплота фазового перехода замороженная -- незамороженная ткань; m_b — перфузия ткани кровью.

Решение системы (1)—(3) получено с учетом малого эффекта теплоемкости по сравнению с эффектом теплоты перехода вода — лед. В соответствии с этим предположением в уравнениях (1), (2) отбросим правые части. Тогда температурное поле в замороженной зоне имеет вид [4]

$$\Theta_f=1+(\Theta_{pc}-1)\frac{r^*}{r^*-1}\frac{R-1}{R}, \tag{4}$$

в незамороженной зоне

$$\Theta_u=\frac{\Theta_{pc}r^*}{R}\exp\left[-a(R-r^*)\right], \tag{5}$$

$$\tau=\int_1^{r^*}\frac{\eta(1-\eta)d\eta}{a\eta^2+(1-a)\eta-(1+\varphi)}. \tag{6}$$

Ясно, однако, что отброшенные (1), (2) выражения становятся достаточно малыми лишь начиная с некоторого значения $r^*=r^*_0$. Действительно, из $\frac{\partial\Theta}{\partial\tau}=\left(\frac{\partial\Theta}{\partial r^*}\right)_R\left(\frac{\partial\tau}{\partial r^*}\right)^{-1}$, а также из (4)—(6) получаем поле скоростей охлаждения в зоне криодеструкции. Для замороженной зоны

$$\frac{\partial\Theta_f}{\partial\tau}=(1-\Theta_{pc})\frac{R-1}{R}\frac{ar^{*2}+(1-a)r^*-(1+\varphi)}{r^*(1-r^*)^3}, \tag{7}$$

для незамороженной зоны

Матеріал, захищений авторським правом

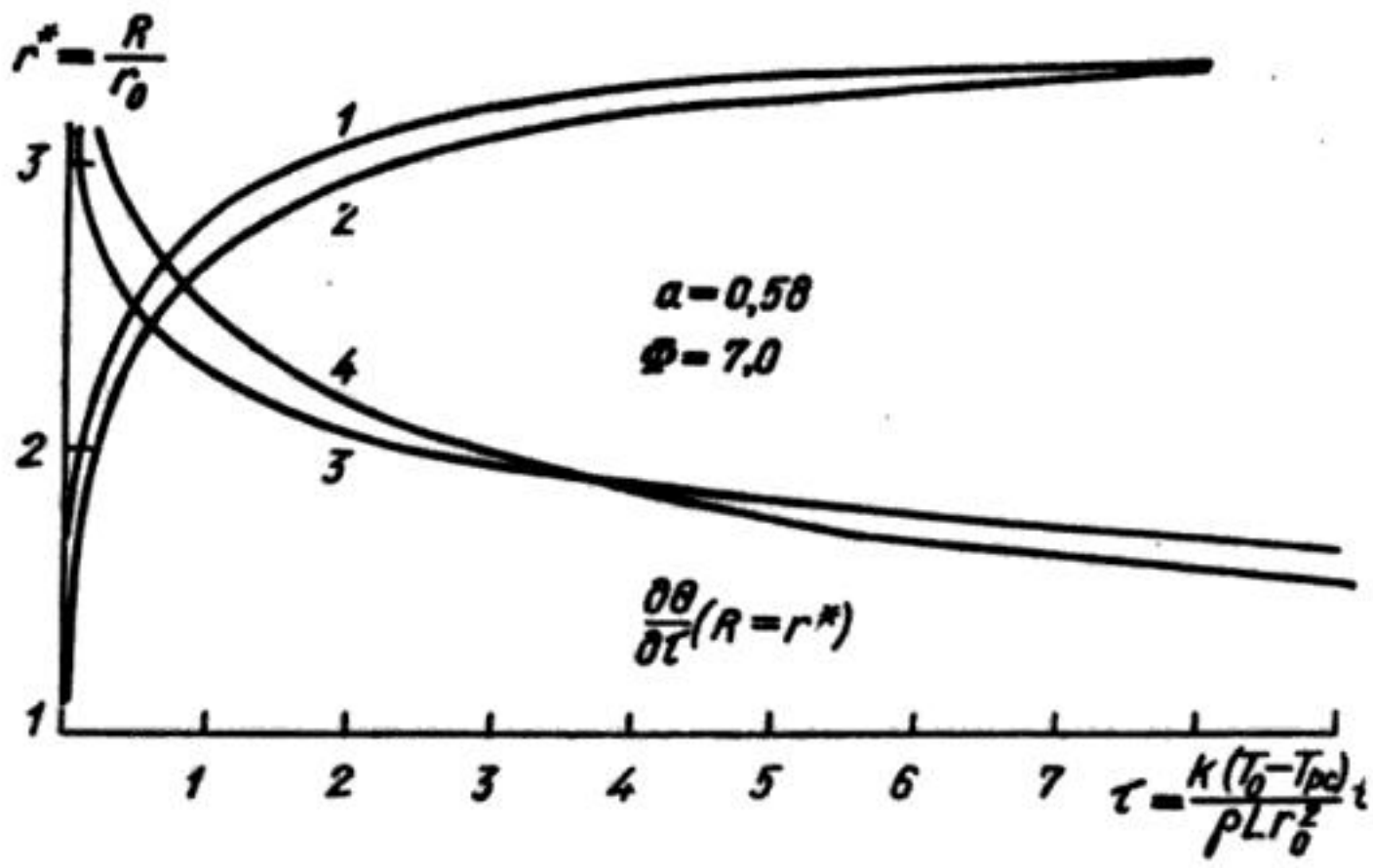
$$\frac{\partial \Theta_u}{\partial \tau} = \frac{\Theta_{pc}}{R}(1+ar^*)\frac{ar^{*2}+(1-a)r^*-(1+\varphi)}{r^*(1-r^*)}\exp\left[-a(R-r^*)\right]. \qquad (8)$$

Необходимым условием корректности решения (4)—(8) является выполнение неравенств:

$$0{,}002T_0\frac{\partial \Theta_f}{\partial \tau} \ll 1, \quad 0{,}008T_0\frac{\partial \Theta_u}{\partial \tau} \ll 1, \qquad (9)$$

которые получены для следующих значений параметров уравнений (1, 2) : $k_f/k_4=3$; $L=80$ кал/г, $c_f=0{,}5$ кал/г°С; $c_4=1$ кал/г°С; $T_{pc}=0$°С. Температура T_0 выражается в градусах Цельсия. Как видно из (7), (8), эти неравенства можно считать выполненными спустя определенный промежуток времени от начала замораживания.

На рисунке приведены данные о динамике роста замороженной зоны, определенной при помощи уравнения (6) и при точном численном



Зависимость r^* (τ), полученная аналитическим (*1*) и численным (*2*) методами расчета [1], и скорость охлаждения на фронте замораживания со стороны замороженной (*3*) и незамороженной (*4*) зон.

решении, полученные в работе [4]. Здесь же представлены графики распределения скоростей охлаждения (7, 8) на фронте замороженной зоны, т. е. для $R=r^*$. Представленные данные показывают, что начиная с величины $r^* \sim 2{,}5$ условия (9) можно считать выполненными, и скорости движения фронта замороженной области, полученные аналитическим и численным методами, принимают близкие значения.

Условия (9) приводят также к существенному для экспериментальных исследований выводу: с понижением температуры ткани (или моделирующей среды) расширяется область применения решений (4)—(8). Наблюдаемое в работе [8] хорошее соответствие между экспериментальными и теоретическими (6) данными нельзя переносить на ткань in vivo, так как температура экспериментальной среды ($T_0=22$°С) значительно отличалась от нормальной температуры ткани ($T_0=37\div 38$°С).

Полученные уравнения для определения скорости охлаждения могут быть непосредственно использованы для исследования условий некроза ткани и оптимизации режима криовоздействия, так как согласно современным представлениям скорость охлаждения является одним из основных криоповреждающих факторов [7].

Проведенное в настоящей работе исследование показывает, что простая квазистационарная модель удовлетворяет требованиям прак-

Матеріал, захищений авторським правом

тической и экспериментальной криохирургии, так как описывает температурное поле в наиболее существенной области криоповреждения. Последнее следует из того обстоятельства, что именно на периферии этой области достигается минимальный некроз ткани.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Коими, Дель Днидиче.* Тепловые аспекты криохирургии. — Теплопередача, 1976, № 4, с. 8—16.
2. *Рубински, Шитцер.* Исследование задачи Стефана для биологической ткани вокруг криохирургического фонда. — Теплопередача, 1976, № 3, с. 187—193.
3. *Barron R. F.* Heat transfer problems in cryosurgery. — J. Cryosurgepy, 1968, N 1, p. 316—325.
4. *Cooper T. E., Trezek G. J.* Rate of lession growth around spherical and cylindrical cryoprobes. — Cryobiology, 1971, 7, N 4-6, p. 183—190.
5. *Cooper T. E., Trezek G. J.* Analitical prediction of the temperature field emanating from a cryogenic surgical canula. — Cryobiology, 1970, 7, N 2-3, p. 79—93.
6. *Cooper T. E., Petrovic W. K.* An experimental investigation of the temperature field produced by a cryosurgical canula. — Trans. ASME, Ser. C. — J. Heat Transfer., 1974, 96, N 3, p. 415—420.
7. *Cravalho E. G.* An analitical prediction of the spatial extent of necrosis in cryosurgery. — Cryobiology, 1971, 8, N 4, p. 396—398.
8. *Walder M. D.* Experimental cryosurgery. — In: Cryosurgery. Springfield, 1968, p. 3--18.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
05.05.77

УДК 57.043.617.713:615.361.014.41

Т. Н. Юрченко, Т. М. Шарлай

К ПРОБЛЕМЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ КОНСЕРВАЦИИ РОГОВОЙ ОБОЛОЧКИ

Среди актуальных проблем офтальмологии важное место занимает пересадка роговой оболочки — наиболее действенное средство борьбы со слепотой от бельм. В последние годы пересадка роговицы применяется не только с оптической целью, но и как метод лечения многих воспалительных и дистрофических процессов роговицы, а также для исправления рефракции и косметических недостатков [2, 6, 9, 19].

Развитие различных методов кератопластики требует больших запасов биологического полноценного донорского материала. В связи с этим приобретает важное значение проблема консервирования и длительного хранения донорских роговиц.

Теоретические исследования и экспериментальные данные показали, что использование низких температур обеспечивает пока единственную возможность длительного хранения клеток и тканей в жизнеспособном состоянии, при этом сохранение функциональной активности является первоочередной задачей [4, 5, 30, 35].

Все методы консервации роговицы делят на краткосрочные и долгосрочные [29, 31]. Первые позволяют сохранять ткани роговицы в пригодном к трансплантации состоянии в течение нескольких дней, лишь ненадолго задерживая быстро развивающиеся необратимые изменения. Долгосрочные методы консервации удлиняют время пригодности трансплантата для кератопластики до нескольких месяцев и лет вследствие значительного замедления всех биологических процессов.

Несмотря на существование большого числа методов краткосрочной консервации роговой оболочки [31, 17], метод В. П. Филатова [13] остается общепринятым и общедоступным, одним из лучших для сквозной кератопластики. К недостатку этого метода следует отнести слиш-

Матеріал, захищений авторським правом

ком короткий период пригодности консервированной роговой оболочки для трансплантации.

С целью максимально необходимого для длительного хранения роговицы замедления процессов жизнедеятельности было предложено несколько различных методов обработки ткани [3, 15. 26. 32]. Как показали многочисленные исследования, при этом происходит утрата жизнеспособности трансплантата, т. е. он может служить только «каркасом», по которому идет регенерация клеток роговичной ткани реципиента.

Ранний период использования низких температур при консервации роговицы характеризовался преобладанием эмпирического подхода к этой проблеме. Впервые попытку сохранить глазное яблоко при низких температурах (—6°С) предпринял Маджито [27]. Эти опыты не увенчались успехом. М. А. Баженова [1, 14] изучала возможность хранения роговиц при температурах от —3 до —20°С. Глубокое замораживание для консервации роговицы первыми попытались использовать Смелсер с соавт. [33], охлаждая роговицу в жидком азоте или изопентане до —196°С. При этом все роговицы впоследствии помутнели. Плохое приживление роговиц после консервации с помощью низких температур убеждало в бесперспективности этого метода. Повторное открытие криозащитных свойств глицерина побудило исследователей вновь обратить внимание на возможность низкотемпературной консервации роговой оболочки. Первые эксперименты были проведены с обрабатыванием роговицы 15%-ным глицерином и охлаждением до —79°С [21]. В настоящее время в иностранной литературе преобладает мнение, что такие роговицы пригодны лишь для послойной кератопластики. С открытием в 1959 г. защитных свойств диметилсульфоксида (ДМСО) консервированная под его защитой роговица стала успешно применяться для сквозных трансплантаций [24, 20, 28]. Однако сам процесс замораживания-отогрева при этом довольно сложный и требует большого количества времени [8, 11, 21, 23, 28].

Целью проводимого нами исследования явилось изучение влияния замораживания-размораживания и полиэтиленоксида мол. массы 400 (ПЭО-400) в качестве криопротектора на морфологические и функциональные свойства роговой оболочки человека и некоторых животных, а также испытания трансплантационных свойств криоконсервированных роговиц в эксперименте.

Материал и методы исследования. Объектом исследования служили роговые оболочки человека, свиньи и кролика. Используемые для экспериментов глазные яблоки человека исследовали не позднее чем через 12—24 ч после его смерти. Глаза кроликов исследованы через 1—2 ч, а глаза свиньи — через 2—3 ч после забоя животного. Для испытания криозащитного эффекта ПЭО-400 использована программа замораживания, которая предусматривает двухэтапное замораживание со скоростью охлаждения на первом этапе (от +20°С до температуры начала кристаллизации воды) 1—2° в мин, 5—10 мин кристаллизации раствора, и на втором этапе (от точки кристаллизации до —196°С) 300—400° в мин. Отогрев проводили на водяной бане при температуре +42°С в течение 50—60 с. При изучении криозащитных свойств ДМСО и глицерина были использованы известные способы консервации роговиц с этими криопротекторами. Исследованию подвергались нативные роговые оболочки, роговицы, инкубированные с криопротекторами, а также после завершения программного замораживания с криопротекторами и без них.

В качестве тестов, определяющих биологическую активность роговицы, были использованы морфологические и функциональные методы: тканевое дыхание с использованием усовершенствованного варианта портативного микрореспирометра, впервые примененного для исследо-

Матеріал, захищений авторським правом

вания потребления кислорода и выделения углекислого газа; окрашивание клеток эндотелия трипановым синим на тотальных препаратах для изучения проницаемости клеточных мембран. Мы отказались от принципиальной оценки жизнеспособности эндотелия по числу окрашенных клеток и определяли состояние клеток на основе введенной нами трехбальной системы оценки: неокрашенные клетки — 0 баллов, окрашено только ядро — 1 балл, окрашена вся клетка — 2 балла. Кроме того, подсчитывалось количество эндотелиальных клеток на десцеметовой мембране. Гистохимическое изучение активности некоторых окислительно-восстановительных ферментов проводили на тотальных препаратах по методике, предложенной Кауфман [23]. Степень активности ферментов оценивалась по интенсивности окрашивания клеток. Использована четырехбалльная система оценки: интенсивно окрашенные клетки — 3 балла; умеренно окрашенные клетки — 2; слабо окрашенные клетки — 1 балл; неокрашенные клетки — 0 баллов. Для объективизации в сопоставлении результатов был выведен средний гистохимический коэффициент (СГК) для каждого препарата [18]. Для гистологического исследования применялись стандартные методы. В эксперименте на кроликах производилась послойная и сквозная кератопластика с использованием аллогенного криоконсервированного и нативного (контроль) трансплантатов.

Результаты. Влияние инкубации в растворах ПЭО-400 различной концентрации. Потребление кислорода роговыми оболочками свиньи после инкубации с ПЭО-400 изучалось в сравнении с потреблением кислорода интактными роговицами. Результаты 19 опытов показали, что роговица в норме потребляет в среднем в 1 ч на 100 мг сырого веса 96,5 мкл кислорода. После 30-минутной экспозиции роговицы с ПЭО 5-, 10-, 15- и 20%-ными концентрациями наблюдалось достоверное снижение интенсивности потребления кислорода в степени, зависящей от концентрации ПЭО-400. Наименьшее угнетение дыхания отмечено после инкубации с ПЭО-400 5- и 10%-ной концентрации. Потребление кислорода соответственно составило на 100 мг 86,8 и 82,5 мкл/ч. Замораживание роговой оболочки без криопротектора приводило к грубым структурным изменениям во всех слоях: появлялись вакуоли во всех слоях роговицы, в отдельных препаратах наблюдалось почти полное разволокнение стромы. Исследования интенсивности потребления кислорода показали, что потребление резко снижается после замораживания без криопротектора — 41,9 мкл/ч. Самый высокий показатель тканевого дыхания после замораживания с ПЭО-400 10%-ной концентрации был 80,4 мкл/ч. Замораживание с ПЭО 15- и 20%-ной концентраций значительно снизило интенсивность потребления кислорода, соответственно в среднем до 40,6 и 32,8 мкл. При сопоставлении результатов, полученных при исследовании тканевого дыхания и гистологическом исследовании, мы не могли обнаружить строгого параллелизма. Функция тканевого дыхания более чувствительный тест, чем стандартные гистологические методы. Отмечается строгая закономерность при воздействии низких температур на ткань роговицы без криопротектора: резко понижается интенсивность потребления кислорода, морфологически обнаруживаются значительные структурные изменения, а присутствие ПЭО эти изменения в значительной степени предотвращает.

Основываясь на полученных данных, можно сделать вывод, что оптимальной для сохранения структуры и функции роговой оболочки является 10%-ная концентрация ПЭО-400.

Морфофункциональная оценка роговиц человека, замороженных с различными криопротекторами. Поскольку данных об использовании полиэтиленоксида в качестве криопротектора при консервации роговой оболочки мы не нашли, необходимо сравнить эффективность стандартных криопротекторов глицерина и ДМСО и предлагаемого нового про-

Матеріал, захищений авторським правом

тектора в обеспечении морфофункциональной сохранности замороженных-размороженных роговиц человека. При исследовании гистологических препаратов были обнаружены довольно однотипные изменения — инкубация в течение 30 мин без последующего замораживания не приводила к значительным изменениям в структуре ткани. При изучении действия замораживания под защитой указанных криопротекторов на структуру роговицы обнаружено, что структурные изменения выражены незначительно. На основании проведенных исследований невозможно сделать окончательный вывод о преимуществе какого-либо из использованных криопротекторов, поскольку гистологическое изучение роговичной ткани является недостаточно чувствительным тестом.

Интенсивность потребления кислорода роговицами человека была изучена на 85 роговицах до замораживания, после инкубации с различными криопротекторами, после замораживания под защитой криопротекторов и без нее. Дыхание нативных роговиц человека составляет 72,7 мкл/ч. При инкубации роговиц с ПЭО незначительно снизилось потребление кислорода (63,1 мкл). Инкубация с глицерином и ДМСО вызывала достоверное снижение потребления кислорода, что соответственно составило 52,7 и 55,9 мкл/ч. После замораживания под защитой указанных криопротекторов отмечалось уменьшение потребления кислорода. Более высокие цифры потребления кислорода сохранили роговицы, замороженные с 10%-ным ПЭО — 58,8 мкл/ч. При замораживании с ДМСО и глицерином дыхательная функция снижалась соответственно до 39,9 и 35,3 мкл/ч.

По мнению большинства авторов, для осуществления успешной сквозной трансплантации роговицы необходимо, чтобы эндотелий трансплантата был жизнеспособным [5, 12, 14, 22, 30, 35, 36].

Одним из наиболее удобных и простых методов оценки жизнеспособности эндотелия является его суправитальное окрашивание трипановым синим. Этот краситель проникает только в мертвые и поврежденные клетки и окрашивает их, оставляя неповрежденные клетки неокрашенными. При этом глубина деструкции клетки проявляется в избирательном окрашивании ее компонентов. Чем сильнее воздействие на клетку и ее повреждение, тем интенсивнее поглощается краситель сначала ядерными структурами, затем всей клеткой. Кроме того, окрашивание трипановым синим позволяет получить общую обзорную картину всего эндотелия и обнаружить отсутствие даже одной клетки в этом монослое.

Проведенные нами исследования показали, что в трупной роговой оболочке человека окрашивается около 1% клеток, при этом окрашиваются только ядра. По предложенной нами балльной системе оценки это соответствует 0,02 балла. Замораживание незащищенных клеток эндотелия приводит к резкому увеличению числа окрашенных клеток. Лишь единичные клетки оставались неокрашенными или имели только окрашенные ядра. Остальные клетки прокрашивались полностью. Такие роговицы оценивались нами в 1,95 балла.

Инкубация роговиц с ПЭО-400, ДМСО и глицерином вызывает как увеличение числа окрашенных клеток, так и качественные изменения в окрашивании. Экспозиция с ПЭО увеличивает число клеток с окрашенным ядром, оставляя интактной цитоплазму всех клеток, что соответствует 0,04 балла. Эквилибрация роговиц с растворами ДМСО и глицерина приводит не только к увеличению количества окрашенных клеток, но и к тому, что среди клеток с окрашенным ядром появляются полностью окрашенные клетки. При этом количество прокрашенных клеток при инкубации с глицерином меньше, чем при инкубации с ДМСО, и составляет соответственно 0,21 и 0,31 балла.

При замораживании с криопротекторами наилучшие результаты были получены с ПЭО-400: ядра были бледно-голубого цвета с почти

Матеріал, захищений авторським правом

неизменной структурой. Прокрашивания всех клеточных элементов мы не наблюдали. Такие роговицы оценивались нами в 1,00 балла. При замораживании роговиц с ДМСО большая часть клеток была с окрашенным ядром, а остальные прокрашивались полностью. Замораживание с глицерином приводило к тому, что бóльшая часть клеток была прокрашена. Полученные результаты были оценены соответственно в 1,30 и 1,75 балла.

Помимо качественной оценки степени проникновения красителя в клетку окраска трипановым синим дает возможность подсчитать число клеток эндотелия, которое в интактной роговице составляло 98,2%. Инкубация роговиц со всеми криопротекторами приводит к незначительному уменьшению количества клеток. Замораживание роговиц без криозащиты снижает общее число клеток до 69,5%. Это свидетельствует о том, что замораживание приводит не только к изменению проницаемости клеточной мембраны и повреждению структур клетки, но и к механическому слущиванию клеток.

При замораживании с ПЭО, ДМСО и глицерином больше всего клеток эндотелия на десцеметовой мембране сохранилось при защите их ПЭО — 95,6%. Худшие результаты получены при замораживании с глицерином — 73%.

Анализ полученных результатов, по данным дыхательной функции и по окрашиванию трипановым синим, показал, что наименьшим токсическим действием на роговую оболочку человека обладает полиэтиленоксид. Стандартные гистологические исследования при изучаемых воздействиях каких-либо различий не выявили.

Сравнительная оценка криозащитных свойств ПЭО-400 по использованным лабораторным методам исследования свидетельствует о его высокой эффективности, не уступающей таким криопротекторам, как ДМСО и глицерин. Необходимо отметить, что по степени окрашивания и количеству сохранившихся клеток растворы ПЭО и ДМСО дают наиболее оптимальные результаты; те же показатели значительно ниже при использовании раствора глицерина.

Гистохимическое исследование активности окислительно-восстановительных ферментов в клетках эндотелия. Изучалась активность следующих окислительно-восстановительных ферментов: сукцинатдегидрогеназы (СДГ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Гл-6-ФДГ) и НАДН-диафоразы. Активность указанных ферментов сравнивали с их активностью в интактных трупных роговицах человека. Как уже указывалось, для объективизации в учете реакции использован СГК.

По содержанию окрашенного продукта реакции легко различались клетки с тремя уровнями активности фермента: низкой, умеренной и высокой. Под влиянием некоторых воздействий наблюдалось как изменение общей активности фермента в эндотелии, так и изменение характера распределения клеток эндотелия по уровню активности ферментов.

Исследуемые нами ферменты по уровню активности каждого в клетках эндотелия можно расположить в следующем порядке: НАДН-диафораза, Гл-6-ФДГ и СДГ.

Морфологически картина клеток эндотелия трупных роговиц человека при выявлении изучаемых ферментов выглядела так: клетки располагались в виде монослоя на десцеметовой оболочке, границы их четко определялись. Поскольку определяемые ферменты локализуются в цитоплазме, видны были неокрашенные ядра клеток правильной округлой формы, лежащие в центре клетки или слегка эксцентрично. В местах дефекта монослоя обнаруживались пустоты, по форме соответствующие находившимся там клеткам. Цитоплазма имела диффузное окрашивание, интенсивность которого варьировала в зависимости от вида фермента и условий эксперимента.

Матеріал, захищений авторським правом

Наибольшая потеря активности фермента по среднему гистохимическому коэффициенту отмечалась при действии низких температур без криопротекторной защиты. Активность НАДН-диафоразы и СДГ снизилась на 34%, а активность Гл-6-ФДГ снизилась несколько меньше — на 32%.

С уменьшением активности ферментов изменялись и морфологические особенности клеток эндотелиального слоя. Не всегда четко были выражены границы клеток, появлялись вакуоли в цитоплазме, иногда терялась структурная организация клеток. Те из них, в которых фермент не определялся, имели вид «теней клеток». При этом ядро слегка контурировалось, границы клетки были прерывисты и различались с трудом. В цитоплазме окрашенных клеток появлялись вакуоли различных размеров.

Инкубация роговых оболочек с ПЭО-400 вызывает достоверное снижение активности всех изучаемых ферментов (НАДН-диафоразы на 6,5, СДГ и Гл-6-ФДГ — на 8%). После замораживания с ПЭО активность всех ферментов снижается несколько больше, чем при инкубации: НАДН-диафоразы на 9% к исходной, СДГ и Гл-6-ФДГ соответственно на 15 и 11%. Распределение клеток эндотелия по уровню активности также варьировало.

В эндотелии интактной роговицы при выявлении всех исследуемых ферментов больше всего наблюдалось клеток с умеренной активностью фермента (в пределах 70—80% клеток), клеток с низкой и высокой активностью было значительно меньше. Наибольшее количество клеток с высокой (19%) и наименьшее — с низкой (6,7%) активностью фермента наблюдалось при выявлении НАДН-диафоразы. Для СДГ и Гл-6-ФДГ эти показатели были равны соответственно 6 и 10% (с высокой активностью) и 13,3 и 16% (с низкой активностью). Количество клеток, в которых не определялось наличие фермента, было почти одинаково для всех изучаемых ферментов (1—2%).

Замораживание роговых оболочек без криозащиты приводит не только к резкому падению активности НАДН-диафоразы, СДГ и Гл-6-ФДГ, но и к изменению в характере распределения клеток по активности фермента. Появляется гораздо больше неокрашенных клеток — 22,8% для НАДН-диафоразы, 19% для СДГ и 13,9% для Гл-6-ФДГ. Резко увеличивается число клеток с низкой активностью фермента — 22,7% для НАДН-диафоразы, 38,4 для СДГ и 44,5% для Гл-6-ФДГ. При выявлении СДГ и Гл-6-ФДГ почти полностью сравнивается число клеток с низкой и умеренной активностью, тогда как активность НАДН-диафоразы остается на более высоком уровне. Значительно снижается процент клеток с высокой активностью — 13,8 для НАДН-диафоразы, 1 для СДГ и 2,3% для Гл-6-ФДГ.

При замораживании роговиц с ПЭО-400 10%-ной концентрации характер распределения клеток по активности фермента, как и в интактной, подчинен закону нормального распределения. Наименьшие изменения в распределении клеток по активности после замораживания под защитой ПЭО мы наблюдали при выявлении НАДН-диафоразы. В то же время происходит значительное уменьшение числа клеток с высокой активностью и увеличение числа клеток с низкой активностью СДГ и Гл-6-ФДГ.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что наибольшей криоустойчивостью обладает НАДН-диафораза, а наиболее криочувствительна — сукцинатдегидрогеназа.

Определение трансплантационных свойств роговицы в эксперименте. Окончательное представление о биологической сохранности роговой оболочки, и в частности клеток эндотелиального слоя, может быть получено только после трансплантации замороженных и реконсервиро-

Матеріал, захищений авторським правом

ванных роговиц. Результаты трансплантации могут помочь в оценке значимости используемых лабораторных тестов.

Частичная сквозная кератопластика проводилась на кроликах. «Донорская» аллогенная роговая оболочка замораживалась по описанной программе и хранилась в жидком азоте до 6 мес. Срок наблюдения за животными в послеоперационном периоде был разбит на несколько этапов с максимальным сроком наблюдения до 1 года. По характеру приживления трансплантата нами выделены 3 группы: приживление с сохранением прозрачности, полупрозрачное и мутное приживление. При оценке результатов трансплантации нас в основном интересовали ранние сроки приживления трансплантата, так как именно в течение первых 10 дней состояние лоскута определяется функциональным состоянием эндотелия, а в более поздние сроки начинают влиять другие факторы, связанные с послеоперационными осложнениями и иммунологической реактивностью.

Результаты проведенных нами пересадок свидетельствуют о пригодности криоконсервированной роговой оболочки для частичной сквозной кератопластике у кроликов. Это дает основание к рекомендации этого метода для испытаний в клинической практике.

На основании изложенного можно сделать вывод о пригодности и достаточной информативности использованных критериев определения жизнеспособности ткани роговой оболочки для оценки действия низких температур и криопротектора.

Значительные криоповреждения мы смогли выявить всеми использованными методами, тогда как при выборе условий консервации гистологическое изучение препаратов роговицы и определение проницаемости клеточных мембран оказались недостаточно информативны. Очевидно, при замораживании повышается проницаемость всех клеточных мембран, что приводит к окрашиванию ядер. Однако, судя по успешности трансплантаций, явление это имеет обратимый характер. При оценке условий низкотемпературной консервации более чувствительны такие тесты, как определение потребления кислорода и гистохимическое выявление фермента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Баженова М. А.* Тканевые культуры сушеной замороженной роговицы. — Мед. журн., 1938, 8, вып. 3, с. 772—781.
2. *Блаватская Е. Д.* Рефракционная кератопластика. — Ереван : Айастан, 1973. — 211 с.
3. *Войно-Ясенецкий В. В.* Пересадка роговицы от глаз, сохраненных в растворах формалина. — Учен. зап. Укр. эксперим. ин-та глаз. болезней и тканевой терапии, 1958, № 4, с. 63—76.
4. *Ерошевский Т. И.* Пересадка роговицы. — Куйбышев : Кн. изд-во, 1961. — 97 с.
5. *Копаева В. Г.* Жизнеспособность роговичного эндотелия и пересадка роговицы. — В кн.' Материалы IV Всесоюз. съезда офтальмологов. М. : 1973, т. 1, с. 465—469.
6. *Краснов М. М.* Первый опыт хирургического исправления близорукости и афакии методом рефракционной кератопластики. — Вестн. офтальмологии. 1970, № 2, с. 24—28.
7. *Перелыгин Н. И.* Пересадка замороженной роговой оболочки. — В кн.: Проблемы гомопластики и аллопластики. Киев : Здоров'я, 1967, с. 305—307.
8. *Протасов А. И.* Организация длительного хранения донорского материала для целей кератопластики. — Тр. Куйбышев. мед. ин-та, 1967, 42, с. 142—146.
9. *Пучковская Н. А.* Пересадка роговой оболочки при осложненных бельмах. — Киев : Здоров'я, 1960. — 257 с.
10. *Радзиховский В. Л., Водовозов А. М., Евстюгов Л. М.* О пересадке роговицы, замороженной и высушенной в вакуум-аппарате. — Офтальмол. журн., 1959, № 8, с. 485—488.
11. *Савушкина Н. М.* Пересадка роговой оболочки, сохраненной при низких температурах. — Вестн. офтальмол., 1962, № 5, с. 36.
12. *Стукалов С. Е., Капичников М. М.* Пересадка роговой оболочки, консервированной изолированно при низких температурах. — Офтальмол. журн., 1968, № 3, с. 237.

Матеріал, захищений авторським правом

13. *Филатов В. П.* Роговица трупа как материал для пересадки. — Сов. вестн. офтальманологии, 1934, № 2, с. 222—225.
14. *Филатов В. П., Баженова М. А.* Экспериментальная пересадка сушеной и замороженной роговицы. — Вестн. офтальмологии, 1940, вып. 17, № 5, с. 536—542.
15. *Шершевская О. И.* Пересадка роговицы свежим консервированным и фиксированным материалом : Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Новосибирск, 1940. — 34 с.
16. *Шульгина Н. С., Никулина Н. Б.* Биологические свойства роговой оболочки, консервированной разными методами. — В кн.: Проблемы пересадки роговой оболочки. Киев : Здоров'я, 1966, с. 268—271.
17. *Archer D. B., Trevor-Roper P. D.* Organization and administration of Westminster-Moorfields Eye Bank. — Brit. J. Ophthalmol., 1967, N 51, p. 1—12.
18. *Astaldi L., Verga J.* The glucogen content of the cells of lymphatic leucaemia. — Acta haematol., 1957, 17, N 3, p. 129—135.
19. *Barraquee M. J.* Quératomileuses pour la correction de la myopia. — Arch. Soc. Amer. Olhtalmol. Optom., 1964, N 5, p. 27—48.
20. *Capella J. A., Kaufman H. E., Robbins J.* Preservation of viable corneal tissue. — Cryobiology, 1965, N 2, p. 116—121.
21. *Eastcott H. H., Cross A. L., Leign A. L., North O. P.* Preservation of corneal grafts by freezing. — Lancet, 1954, N 1, p. 237—239.
22. *Katzin H. N.* The preservation of corneal tissue by freezing and dehydration. — Amer. J. Ophthaleol., 1947, N 30, p. 1128—1134.
23. *Kaufman H. E.* Preservation of corneas by freezing. — Arch. Ophthalmol., 1965, N 73, p. 907—908;
24. *Kaufman H. E., Capella J. A., Robbins J. E.* The human corneal endotheliüm. — Amer. J. Ophthalmol., 1966, N 61, p. 835—841.
25. *McNair J. M., King J. H.* Preservation of sornea by dehydration — A preliminary report. — Arch. Ophthalmol, 1955, N 53, p. 519—521.
26. *McPherson S. D., Draneim J. W., Evans V. J., Earle W. R.* The viability of fresh and frozen corneas as determined in tissue culture. — Amer. J. Ophthalmol., 1956, N 41, p. 513—519.
27. *Magitot A.* Recherches expérimentales sur la survie possible de la cornéé en déhors de l'organisme et sur la kératoplastic différée. — Ann. Oculist (Paris), 1811, N 146, p. 1—34.
28. *Muller F. O.* Technique for full-thickness keratoplasty in rabbits using fresh and frozen corneal tissue. — Brit. J. Ophthalmol., 1964, N 48, p. 377—393.
29. *Paharinen P.* Preservation of the cornea for penetrating keratoplasty an experimental study. — Acta ophthalmol., 1969, N 4, p. 944—945.
30. *Polack F. M.* Keratoplasty and graft response. — In: Corneal and external diseases of the eye: (First amer. sympos) Ed. F. M. Polack, Ch. Thomas. Springfield, 1970, p. 359—362.
31. *Rycroft B. W.* The corneal grafting oct. 1952. — Brit. J. Ophtralmol., 1953, N 37, p. 349—350.
32. *Salzer F.* Dauereinheilung von konservierten Hornhautstücken in die Hornhaut des Kaninchens. — Ber. Dtsch. opthalmol. Ges., 1910, N 36, p. 312—314.
33. *Smeizer G. K., Ozanics V.* Effect of quick freezing at very law temperature of donor tissue in corneal transplantation. — Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1946, N 62, p. 274—277.
34. *Smith A. U.* Problem of prolonged storage of the cornea. — Int. Ophthalmol. Clin., 1962, N 2, p. 731—755.
35. *Stocker F. W., Matton M. Th., Georgiade R., Georgiade N.* Longterm preservation of donor tissues for corneal grafts. — Amer. J. Ophthalmol., 1960, N 49, p. 729—740.
36. *Van Horn P. L., Schultz R. O.* Compariсon of serum eye bank storage of cat corneas. — Arch. Ophtnalmol., 1974, 92, N 2, p. 142—145.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР

Поступила в редколлегию
05.05.77

Матеріал, захищений авторським правом

СОДЕРЖАНИЕ

Белоус А. М., Бондаренко Т. П., Бондаренко В. А. Молекулярные механизмы криоповреждения мембранных структур 3
Виноград-Финкель Ф. Р., Федорова Л. И., Семенова Н. В. Усовершенствованные растворы для ресуспендирования размороженных эритроцитов после их деглицеринизации 14
Гордиенко Е. А., Иткин Ю. А. Вариационный принцип неравновесной термодинамики 20
Зинченко А. В., Моисеев В. А. Исследование низкотемпературных фазовых переходов в водных растворах ПЭГ-400 калориметрическим методом . . . 27
Лозина-Лозинский Л. К. К вопросу о терминах и понятиях в криобиологии . 30
Маркова О. П., Обозная Э. И., Капрельянц А. С., Строна В. И. Сравнительное цитологическое, цитохимическое и электронно-микроскопическое изучение клеток костного мозга, замороженных под защитой ПЭО-400 36
Рудько Ю. М., Бражников А. М., Камовников Б. П., Черепнев А. С. Метод количественной оценки качества аппаратуры для криоконсервирования биообъектов 42
Сергеев Г. Б., Батюк В. А., Сергеев Б. М. Кинетические особенности биохимических реакций при низких температурах 47
Утевский А. М., Чуйко В. А., Губина Н. Ф. Характеристика некоторых нейрогуморальных процессов при охлаждении различных биологических структур 52
Цуцаева А. А., Гольцев А. Н., Микулинский Ю. Е., Останкова Л. В. Иммунологические свойства деконсервированных миелокариоцитов и влияние некоторых биологически активных веществ на течение репаративных процессов в них 57
Черепнев А. С., Хайкин Р. К., Ткаченко С. И., Руденко С. В. Принципы построения кибернетических систем в области криобиологии 70
Эпштейн В. Г., Сандомирский Б. П. Область применения приближенного решения термической задачи криохирургии 78
Юрченко Т. Н., Шарлай Т. М. К проблеме низкотемпературной консервации роговой оболочки 81

Матеріал, захищений авторським правом

КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА
Выпуск 5

Печатается по постановлению ученого совета
Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР

Редактор *Е. Т. Тальнова.* Художественный редактор *А. В. Косяк.*
Технический редактор *С. Г. Максимова.*
Корректоры *Е. Н. Мережицкая, Л. М. Тищенко, С. Д. Семенова.*

Информ. бланк № 1679

Сдано в набор 08.12.78. Подп. в печ. 08.06.79. БФ 00167. Формат 70×108/16. Бумага типогр. № 1. Лит. гарн. Выс. печ. Усл. печ. л. 8,4. Уч. изд. л. 8,81. Тираж 1000 экз. Заказ 3943. Цена 1 руб. 30 коп.

Издательство «Наукова думка». 252601, Киев, ГСП, Репина, 3.
Областная книжная типография Львовского областного управления по делам издательств, полиграфии и книжной торговли, Львов, Стефаника, 11.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043.577:576.347

Молекулярные механизмы криоповреждения мембранных структур. Белоус А. М., Бондаренко Т. П., Бондаренко В. А. — Криобиология и криомедицина, 1979, вып. 5, с. 3—13.

Рассмотрена последовательность структурных изменений мембран, возникающих под воздействием околонулевых и субнулевых температур. При обсуждении полученных данных в рамках структурной гипотезы криоповреждений подчеркивается роль липидов и гидрофобных взаимодействий в инициировании структурной лабилизации мембран в зоне околонулевых температур и значение физико-химических факторов среды в индукции химической модификации липидов мембран, среди которых ведущая роль принадлежит цепным перекисным процессам и активации мембранной фосфолипазы.

Ил. 4. Список лит.: 65 назв.

УДК 57.043

Усовершенствованные растворы для ресуспендирования размороженных эритроцитов после их деглицеринизации. Виноград-Финкель Ф. Р., Федорова Л. И., Семенова Н. В. — Криобиология и криомедицина, 1979, вып. 5, с. 14—20.

Для продления срока полноценности размороженных эритроцитов, сохраняемых после оттаивания при 4°С изучен ряд разработанных новых растворов для взвешивания деглицеринизированных эритроцитов. По данным исследования гемолиза, АТФ, 2,3-ДФГ, жизнеспособности установлены наиболее эффективные рецептуры, основу которых составляет пропись раствора ЦОЛИПК № 8-в. Добавление в этот раствор одного из высокомолекулярных полимеров (проксанола, реополиглюкина, декальцинированного желатиноля) удлиняет срок полноценности эритроцитов на три дня. Включение в раствор № 8-в инозина, аденина и декальцинированного желатиноля (раствор ЦНИИГПК № 16) позволяет удлинить этот срок до семи дней.

Ил. 1. Табл. 3. Список лит.: 17 назв.

УДК 57.043.557.2:531.62:577.95:536.7

Вариационный принцип неравновесной термодинамики. Гордиенко Е. А., Иткин Ю. А. — Криобиология и криомедицина, 1979, вып. 5, с. 20—27.

Построен вариационный принцип термодинамики необратимых процессов, с помощью которых получаются все основные соотношения макроскопической физики в линейном приближении.

Список лит.: 5 назв.

УДК 57.043

Исследование низкотемпературных фазовых переходов в водных растворах ПЭГ-400 калориметрическим методом. Зинченко А. В., Моисеев В. А. — Криобиология и криомедицина, 1979, вып. 5, с. 27—30.

Описывается конструкция дифференциального сканирующего калориметра и результаты исследования теплоемкости водных растворов полиэтиленгликоля мол. массы 400 (ПЭГ-400) в диапазоне температур (0°) — (—150°С). В образцах ПЭГ-400, содержащих воду, наблюдается стеклопереход в интервале температур (—100°) — (—120°С). Показано. что при равных скоростях охлаждения система обладает повышенной склонностью к переохлаждению при концентрации 2 мол. H_2O на мол. ПЭГ-400 и 14—40 мол. H_2O на мол. ПЭГ-400.

Эвтектический состав водной смеси ПЭГ-400 лежит в интервале концентраций 16—18 мол. H_2O на мол. ПЭГ-400.

Ил. 3. Список лит.: 7 назв.

УДК 57.043

К вопросу о терминах и понятиях в криобиологии. Лозина-Лозинский Л. К. — Криобиология и криомедицина, 1979, вып. 5. с. 30—35.

Приводится обсуждение предмета криобиологии и явлений, которые могут быть отнесены к криобиологии. Автор предлагает дифференцировать такие понятия, как переохлаждение, гомойотермность, гипотермия и не выделять их в криобиологические из соответствующих разделов экологической физиологии, патофизиологии и медицины.

Справедливо указывается, что в отечественной и зарубежной специальной литературе часто имеет место неточное употребление терминов (глубокое замораживание, «deep freezing»). Отражаются также критерии жизнеспособности, понятия криоконсервации и криоконсервирования, а также отдельных состояний организмов животных (анабиоз, зимняя спячка и т. д.).

Список лит.: 22 назв.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043

Сравнительное цитологическое, цитохимическое и электронно-микроскопическое изучение клеток костного мозга, замороженных под защитой ПЭО-400. Маркова О. П., Обозная Э. И., Капрельянц А. С., Строна В. И. — Криобиология и криомедицина, 1979, вып. 5, с. 36—41.

Дан сравнительный анализ цитологических, цитохимических и электронно-микроскопических показателей ядерных клеток костного мозга крыс, замороженных под защитой ПЭО-400.

Примененное комплексное исследование одних и тех же образцов костного мозга позволило выявить структурные и функциональные изменения клеточных мембран и мембран митохондрий, начиная с незначительных изменений после экспозиции с ПЭО-400 и более выраженных, после замораживания-размораживания костного мозга под защитой ПЭО-400.

Ил. 6.

УДК 57.043

Метод количественной оценки качества аппаратуры для криоконсервирования биообъектов. Рудько Ю. М., Бражников А. М., Камовников Б. П., Черепнев А. С. — Криобиология и криомедицина, 1979, вып. 5, с. 42—47.

Оценку качества действующих и вновь создаваемых установок для криоконсервирования биообъектов предлагается осуществлять с помощью разработанной трехступенчатой системы показателей с учетом взаимоподчиненности.

Нижний (процессовый) уровень качества отражает оценку исходных данных, выдаваемых на проектирование. Средний (технический) — предназначен для оценки совершенства установок на стадии рабочей документации и производственной эксплуатации. Верхний (технико-экономический) уровень предназначен для оценок при заводской, отраслевой и государственной аттестациях.

Список лит.: 6 назв.

УДК 57.043.541.117

Кинетические особенности биохимических реакций при низких температурах. Сергеев Г. Б., Батюк В. А., Сергеев Б. М. — Криобиология и криомедицина, 1979, вып. 5, с. 47—51.

На примере катализируемого пероксидазой окисления хинолфосфатов перекисью водорода в замороженных водных растворах изучены кинетические закономерности и особенности биохимических реакций при низких температурах. Предложена структурно-кинетическая модель, позволяющая объяснить наблюдаемое ускорение реакции во льду с точки зрения изменения физико-химических свойств системы при ее замораживании и понижении температуры. Освещены некоторые перспективы применения низких температур в биохимии и связанных с ней областях науки.

Ил. 6. Список лит.: 6 назв.

УДК 57.043:547.422

Характеристика некоторых нейро-гуморальных процессов при охлаждении различных биологических структур. Утевский А. М., Чуйко В. А., Губина Н. Ф. — Криобиология и криомедицина, 1979, вып. 5, с. 52—57.

Приведены экспериментальные данные о влиянии экспозиции при различных температурах (37, 20, 4, 0, —10, —20, —196°С) биообъектов (семявыносящий проток, гипоталамус, предсердия крыс и быка) на последующую способность их к захвату — норадреналина (НА) и D, *L*-адреналина-7^{3}H, а также на активность и некоторые свойства митохондриальной моноаминоксидазы (МАО) сердца. Показана значительная чувствительность механизма захвата НА — торможение процесса при температуре 20°, активирование при 4—0°С и значительное угнетение при более низких температурах. Опыты с МАО показали, что этот фермент активируется после экспозиции предсердия при низких температурах. Рассматривается вопрос о возможном значении следовых температурных воздействий для последующего течения нейро-гуморальных процессов в биологических структурах.

Ил. 4.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043.615.387:547.963.32.547.422

Иммунологические свойства деконсервированных миелокариоцитов и влияние некоторых биологически активных веществ на течение репаративных процессов в них. Цуцаева А. А., Гольцев А. Н., Микулинский Ю. Е., Останкова Л. В. — Криобиология и криомедицина, 1979, вып. 5, с. 57—69.

Методом хромосомного маркера установлено, что клетки консервированного костного мозга после трансплантации облученным реципиентам приживляются и репопулируют в их организме. Число вводимых стволовых клеток достаточно для образования пулов иммунокомпетентных клеток, которые участвуют в реализации реакций трансплантационного иммунитета.

Показано, что после низкотемпературной консервации в клетках костного мозга наблюдается снижение уровня синтеза белка и нуклеиновых кислот. Применение в качестве биостимуляторов препаратов экзогенных нуклеиновых кислот способствует восстановлению процессов метаболизма.

Список лит.: 31 назв.

УДК 57.043:001.05

Принципы построения кибернетических систем в области криобиологии. Черепнев А. С., Хайкин Р. К., Ткаченко С. И., Руденко С. В. — Криобиология и криомедицина, 1979, вып. 5, с. 70—78.

Определяются кибернетические системы как комплексы, включающие биологические объекты и технические устройства, предназначенные для низкотемпературного и, возможно, других вещественно-энергетических воздействий на биообъекты, а также обсуждаются некоторые вопросы построения таких систем. Среди этих вопросов — принципы математического моделирования протекающих в них процессов и управления состоянием биообъекта.

Излагаются два подхода к построению математических моделей для оценки свойств биообъектов в процессах замораживания и размораживания.

Список лит.: 9 назв.

УДК 57.043:615.832.9:617+536.24

Область применения приближенного решения термической задачи криохирургии. Эпштейн В. Г., Сандомирский Б. П. — Криобиология и криомедицина, 1979, вып. 5, с. 78—81.

Проведен анализ квазистационарного решения уравнений, описывающих температурное поле в локально замораживаемой ткани. Показано, что эти решения справедливы в существенной области зоны криоповреждения. Проведен аналитический расчет скорости охлаждения ткани.

Ил. 1. Список лит.: 8 назв.

УДК 57.043:617.713:615.361.014.41

К проблеме низкотемпературной консервации роговой оболочки. Юрченко Т. Н., Шарлай Т. М. — Криобиология и криомедицина, 1979, вып. 5, с. 81—88.

Проводилось исследование ткани роговицы после инкубации в растворах ПЭО-400, глицерина, ДМСО, а также замораживания без криопротекторов и под их защитой. В качестве тестов, определяющих жизнеспособность, применялось определение дыхания на микрореспирометре, суправитальное окрашивание трипановым синим, гистохимическое выявление в клетках эндотелия ферментов СДГ, Гл-6-ФДГ и НАДН-диафоразы на тотальных препаратах. Значительные криоповреждения выявлялись всеми использованными тестами, в то время как для определения оптимальных условий консервации гистологическое изучение и показатели проницаемости клеточных мембран оказались недостаточно информативными. Очевидно, при замораживании повышается проницаемость клеток, что приводит к окрашиванию ядер. Однако результаты сквозной трансплантации свидетельствуют об обратимости отмеченных изменений. Наиболее криоустойчива НАДН-диафораза, наиболее криочувствительна СДГ.

Список лит.: 36 назв.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 57.043.577:576.347

Molecular Mechanisms of Cryoiniury to the Cell Membrane Structures. Belous A. M., Bondarenko T. P., Bondarenko V. A. — Kriobiologija i kriomeditsina, 1979, iss. 5, p. 3—13.

The sequence of structural changes in membranes was studied as influenced by temperatures above and below zero. When discussing the results obtained in the framework of a structural hypothesis of cryoinjury to cell membranes the role of lipids and hydrophobic interactions in the initiation of membrane structural lability within the region of near-zero temperatures is emphasized. Attention is also paid to the physicochemical environmental factors responsible for the induction of chemical modification of the membrane lipids. Chain peroxide processes and membrane phospholipase activation are shown to play the leading part.

4 Figs. Refs: 65 titles.

UDC 57.043

Improved Solutions for Resuspending Defrosted Erythrocytes After Their Deglycerinizing. Vinograd-Finkel F. R., Fedorova L. I., Semenova N. V. — Kriobiologija i kriomeditsina, 1979, iss. 5, p. 14—20.

In order to prolong the viability of defrosted erythrocytes stored after thawing at 4°C, a number of new developed solutions for suspending deglycerinized erythrocytes is studied. On the basis of the measurements data on hemolysis, ATP, 2,3-DPG, viability it is found that the most efbective solutions are those based on the ЦОЛИПК N 8-6 solution. One of high-molecular polymers (proxanol, reopolyglucin and decalcified gelatinol), when added to the solution, makes a 3-day prolongation in the viability of erythrocytes. Addition to the 86 solution of inosine, adenine and decalcified gelatinol (ЦНИИГПК N 16 solution) permited the viability to be prolonged up to 7 days.

1 fig. 3 Tables. Refs: 17 titles.

UDC 57.043.557.2:531.62:577.95:536.7

Variational Principle of Unbalanced Thermodynamics. Gordienko E. A., Itkin Ju. A. — Kriobiologia i kriomeditsina, 1979, iss. 5, p. 20—27.

The variational principle of irreversible processes thermodynamics is constructed. The principle helps to derive the base relations of macroscopic physics in a linear approximation.

Refs: 5 titles.

UDC 57.043

A Study of Low-Temperature Phase Transitions in PEG-400 Aqueous Solutions Using the Calorimetric Method. Zinchenko A. V., Moiseev V. A. — Kriobiologia i kriomeditsina, 1979. iss. 5, p. 27—30.

The differential scanning calorimeter design and the results of heat measurements of aqueous solutions of polyethylene glycol of molecular weight 400 (PEG-400) within a temperature range of O to —150°C are described. In the PEG-400 samples containing water a glass transition is observed over a temperature range of —100 to —120°C. It is shown that at equal cooling rates the system has an increased tendency to supercooling at a concentration of 2 mol of H_2O per 1 mol of PEG-400 and 14-20 mol of H_2O per 1 mol of PEG-400. The eutectic composition of aqueous PEG-400 mixtures is shown to be within a concentration range of 16-18 mol H_2O per 1 mol of PEG-400.

3 figs. Refs: 7 titles.

UDC 57.043

On the Problem of Terms and Notions in Cryobiology. Lozina-Lozinskij L. K. — Kriobiologija i kriomeditsina, 1979, iss. 5, p. 30—35.

The subject of cryobiology and phenomena which may be attributed to cryobiology are discussed. The author suggests to differentiate such notions as supercooling, homoiothermia, hypothermia, etc., and not to separate them into cryobiological ones from the corresponding fields of ecological physiology, pathophysiology and medicine.

It is reported that in home and foreign literature there are frequent incorrect terms («deep freezing, etc.). The emphasis is placed on the indices of viability, notions of cryopreservation and cryoconservation as well as of some states of animal bodies (anabiosis, hibernation, etc.).

Refs: 22 titles.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 57.043

Cytological, Cytochemical and Electron Microscopic Comparative Studies on Bone Marrow Cells Frozen Under Protection of PEO-400. Markova O. P., Oboznaja E. I., Kaproljants A. S., Strona V. I. — Kriobiologija i криomeditsina, 1979, iss. 5, p. 36—41.

A complex study of the same bone marrow samples showed certain alterations in cell and mitochondria membranes from the negligible changes after exposure to PEO-400 to more pronounced ones during freezing-defrosting of bone marrow cells under protection of PEO-400.
6 figs.

UDC 57.043

A Quantitative Method for Qualitative Estimation of Equipment for Cryoconservation of Biological Systems. Rud'ko Ju. M., Brazhnikov A. M., Kamovnikov B. P., Cherepnev A. S. — Kriobiologija i kriomeditsina, 1979, iss. 5, p. 42—47.

The developed three-step system of indices with regard for the interrelation is suggested for qualitative estimation of existing and newly created equipment.

The lower (process) level of quality reflects the estimate of the basic data given for designing. The mean (technical) level is intended for estimation of the equipment improvement at the stage of engineering documentation and operation. The higher (technical-economic) level is intended for estimations in factory, branch or state recommendation.

Refs: 6 titles.

UDC 57.043

Kinetic Features of Biochemical Reactions at Low Temperatures. Sergeev G. B., Batjuk V. A., Sergeev B. M. — Kriobiologija i kriomeditsina, 1979, iss. 5, p. 47—51.

Kinetic regularities and peculiarities of biochemical reactions at low temperatures were studied as exemplified by peroxidase-catalyzed oxidation of cholinophosphates with hydrogen peroxide in frozen aqueous solutions. The sunggested structural-kinetic model makes it possible to explain the observed reaction acceleration in ice from the view point of changes in physicochemical properties of the system on freezing or a decrease in temperature. Some prospects of low temperatures application to biochemistry and related sciences are elucidated.
6 figs. Refs: 6 titles.

UDC 57.043

Characteristics of Some Neurohumoral Processes Under Cooling of Different Biological Systems. Utevskij A. M., Chujko V. A., Gubina N. F. — Kriobiologija i kriomeditsina, 1979, iss. 5, p. 52—57.

The article deals with experimental data on the effect of exposure of biological systems (deferent duct, hypothalamus, rat and bull auricle) to various temperatures (37°, 20°, 4°, 0°, —20° and —196°) on their subsequent ability to noradrenaline (NA) and D, L-adrenaline-7H³ uptake and on the activity and some properties of heart mitochondrial monoamine oxidase (MAO). The mechanism of uptaking NA is shown to be highly sensitive. The pdocess is inhibited at 20° and activated at 4-0° and a lower temperature causes a considerable depression. Experiments with MAO showed the activation of the enzyme following exposure of tre auricles to low temperatures. The problem is considered on possible importance of temperature alter effects on subsequent course of neurohumoral processes in biological systems.
4 figs.

Матеріал, захищений авторським правом

UDC 57.043.615.387:547.963.32:547.422

The Immunological Capacity of Thawed Myelocaryocytes and the Effect of Certain Biologically Active Substances on Their Recovery. Tsutsaeva A. A., Gol'tsev A. N., Mikulinski Ju E., Ostankova L. V. — Kriobiologija i kriomeditsina, 1979, iss. 5, p. 57—69.

Using the method of chromosome marker the homing and repopulation of the preserved bone marrow cells were demonstrated after transplantation to the irradiated recipient body. The nember of administered stem cells was sufficient to produce pooling of immunocompetent cells involved in the realization of the transplantation immune reactions.

A decrease in the level of protein and nucleic acids synthesis was observed in the bone marrow cells after low-temperature preservation. Preparations of exogenous nucleic acids used as biostimulators are shown to promote the recovery of metabolic processes. Refs: 31 title.

UDC 57.043

Fundamentals of the Cybernetic Systems Construction in Cryobiology. Cherepnev A. S., Khajkin R. K., Tkachenko S. I., Rudenko S. V. — Kriobiologija i kriomeditsina, 1979, iss. 5, p. 70—78.

The cybernetic systems are defined as complexes including biological systems and equipment for low-temperature and, perhaps, other material-energy effects on biological systems. Certain problems of such systems construction, mathematical modeling of the processes proceeding in them and the control of biological systems state are discussed.

Two approaches to the development of the mathematical models for estimating the properties of biological systems during freezing and defrosting are presented.

Refs: 9 titles.

UDC 57.043.615.832.9:617+536.24

A Field of Application of Approximate Solution of the Thermal Problem to Cryosurgery Epstein V. G., Sandomirskij B. P. — Kriobiologija i kriomeditsina, 1979, iss. 5. p. 78—81.

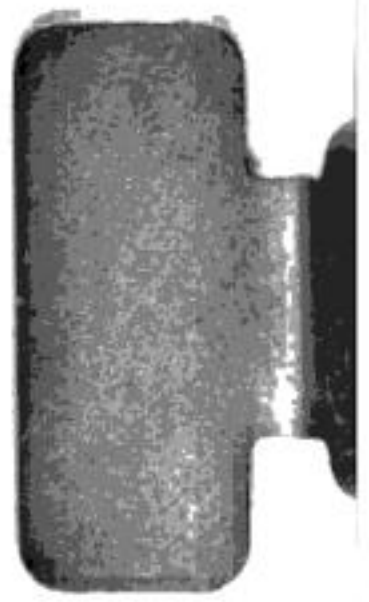
A quasi-stationary solution of equations describing the temperature field in the locally frozen tissue was analyzed. The solutions are shown to be valid for an essential area of cryoinjury. The rate of tissue cooling was analytically calculated.
1 fig. Refs: 8 titles.

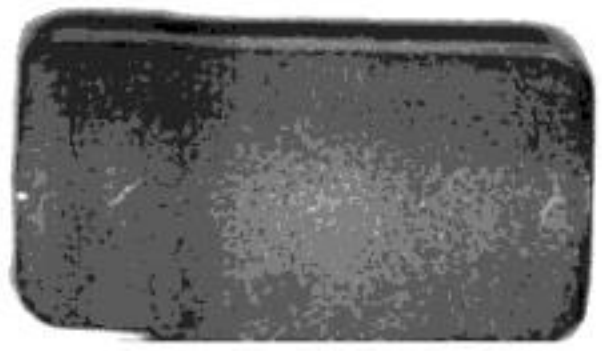
UDC 57.043:617.713:615.361.014.41

On the Problem of Cornea Cryopreservation. Jurchenko T. N., Sharlaj T. M. — Kriobiologija i kriomeditsina, 1979, ihs. 5, p. 81—88.

Corneal tissue was studied following incubation in PEG-400, glycerol or DMSO solutions as well as after freezing with or without cryoprotectants. Viability was assayed by determination of respiration with a microrespirometer and supravital staining with trypane blue. The preparations were subjected to histochemical examination and analyzed for succinate dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and NADH-diaphorase in endothelium cells. An essential cryoinjury was detected by all the tests, while histological and measurement data on cell membrane permeability proved to be insufficiently informative. Cell permeability seems to increase under freezing, that results in the nuclei staining. However, the results of penetrating transplantation indicate these alterations to be reversible. NADH-diaphorase is shown to be most cryoresistant and succinate dehydrogenase most cryolabile.
Refs: 36 titles.

Матеріал, захищений авторським правом





Матеріал, захищений авторським правом

1 руб. 30 коп.

«НАУКОВА ДУМКА»
КРИОБИОЛОГИЯ И КРИОМЕДИЦИНА, 1979
вып. 5, 4—108.

Матеріал, захищений авторським правом